

DESENVOLUPAMENT DEL PROCÉS D'OBTENCIÓ D'UN CONCENTRAT PROTEIC D'ALT VALOR NUTRITIU A PARTIR DE SANG PROCEDENT D'ESCORXADORS

Clara Ferrer Carré

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

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

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



TESI DOCTORAL

DESENVOLUPAMENT DEL PROCÉS D'OBTENCIÓ
D'UN CONCENTRAT PROTEIC D'ALT VALOR NUTRITIU
A PARTIR DE SANG PROCEDENT D'ESCORXADORS

Clara Ferrer Carré

2023





TESI DOCTORAL

DESENVOLUPAMENT DEL PROCÉS D'OBTENCIÓ D'UN
CONCENTRAT PROTEIC D'ALT VALOR NUTRITIU A PARTIR
DE SANG PROCEDENT D'ESCORXADORS

Clara Ferrer Carré

2023

PROGRAMA DE DOCTORAT EN TECNOLOGIA

Dirigida per: Dra. Carmen Carretero Romay

i Dra. Mònica Toldrà Alegret

Memòria presentada per optar al títol de doctor/doctora per la Universitat de Girona.



Certificat de direcció de la tesi

La Dra. Carmen Carretero Romay i la Dra. Mònica Toldrà Alegret, de la Universitat de Girona,

DECLAREN:

Que el treball titulat “Desenvolupament del procés d’obtenció d’un concentrat proteic d’alt valor nutritiu a partir de sang procedent d’escorxadors”, que presenta la Clara Ferrer Carré per obtenir el títol de doctora, ha estat realitzat sota la nostra direcció.

I, perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signem aquest document:

Dra. Carmen Carretero Romay

Dra. Mònica Toldrà Alegret

Girona, 21 d’abril de 2023

AGRAÏMENTS

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies a les meves dues directores de tesi, la Carmen Carretero i la Mònica Toldrà, que han fet possible que avui pugui estar presentant aquesta tesi. Per tot el que m'heu ensenyat; des del Màster, on em va formar en l'àmbit de la biotecnologia alimentària, passant per les pràctiques i treball de final de curs, fins a donar-me l'oportunitat d'entrar al grup per realitzar aquest doctorat, i acabar amb tota la feina que ha suposat.

Per altra banda, donar les gràcies a l'empresa Talleres Azuara i tota la família Azuara, la Mari, en Jesús i a en Josep Maria, qui em van donar l'oportunitat i van confiar en mi per realitzar aquesta tesi en col·laboració amb ells i que, tot i els quilòmetres que ens separaven, sempre em van acollir com una més. També a la resta de companys d'Azuara, l'Albert i en Juan, però especialment a l'Edgar. Treballar amb tots vosaltres em va fa créixer laboralment, però també a nivell personal.

Agrair a Doctorats Industrials del departament de Recerca i Universitats de la Generalitat de Catalunya, qui ha aportat el finançament per realitzar aquest treball.

Per suposat, a tota la gent del grup de Tecnologia dels Aliments i a l'INTEA, que m'han acabat ajudant una mica o molt en algun moment, no només en la realització de la tesi, sinó també en passar molt bons moments junts: l'Elena, la Dolors, l'Anna Maria, la Gemma, la Nuri, l'Anna Bonaterra, i la resta de companys.

A tots els companys que han passat pel laboratori en algun o altre moment: la Nathaly, la Iciar, en Jordi, en Pau, ... I un que es mereix una menció especial: en Narcís. Puc afirmar sense dubte que vas marcar un abans i un després en aquest camí. També a la Laura, l'Alba i la Cristina, els esmorzars i dinars canviaven qualsevol dia a millor.

Agrair a tots els col·laboradors del projecte Hydroblood (Ateknea amb l'Anton, Floren i resta d'equip) i a l'empresa Mafrica (especialment a en Ricard) que em van guiar i ajudar en tot moment.

Mil gràcies als amics d'infància, que m'han recolzat per seguir endavant, la Maria, La Raquel, l'Elena i la Lucia. Als amics de la Universitat, amb qui va començar el viatge a la UdG el 2010 amb les festes, les tardes distretes, estudiar una mica de tant en tant, i les mil experiències que hem viscut. Tot això us ha convertit en la meva segona família: en Pedro, la Irene Company, la Irene Peré i la Rebecca. A en Marc; per tots els moments en que em va ajudar a reflexionar en els resultats que no em quadraven, en les revisions de text on no sabia avançar, i perquè sens dubte hauria tirat la tovallola moltes vegades si no fos per ell.

A l'equip de Noel; l'Ari, les Martes, la Carla, en Genís i la Bea (sense tu la feina no és el mateix). Gràcies a en Xevi, sense tu no hauria acabat, sobretot per l'horari rigorós que em vas imposar per fer tesi dues tardes a la setmana. Tots vosaltres també heu marcat un abans i un després que mai m'hauria imaginat.

I finalment, agrair especialment a tota la meva família qui em recolza incondicionalment tot i que pugui costar comprendre què he estat fent tot aquest temps en "això del doctorat": a la mama, el papa, l'Ari, l'Albert, l'àvia, la tia Imma, el teu Jordi, el teu Lluís, la Laia i la Carla. Tinc la millor família del món.

ABREVIACIONS

- a***: paràmetre vermell-verd del color de l'escala CIE L*a*b*.
- ACSA: Agència Catalana de Seguretat Alimentària.
- AESAN: Agència Espanyola de Seguretat Alimentària i Nutrició.
- AGAUR: Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca.
- ANOVA: anàlisi de la variància.
- APPCC: Aàlisi de perills i punts de control crítics.
- aw: activitat d'aigua.
- b***: paràmetre groc-blau del color de l'escala CIE L*a*b*.
- BET: equació de Brunauer Emmet Taller.
- BGA: Agar Verd Brillant.
- BHI: Brains Heart infusion Agar.
- C***: paràmetre croma o saturació del color de l'escala CIE L*a*b*.
- CICYT: Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.
- CIE: Comissió Internacional de la Il·luminació.
- CIP: Clean in Place.
- CMC: carboximetilcel·lulosa.
- CRA: capacitat de retenció d'aigua.
- Cys: cisteïna.
- DACC: Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural.
- DBO: demanda biològica d'oxígen.
- DE: Desviació estàndard.
- DN: diàmetre nominal.
- DQO: demanda química d'oxígen.
- EDTA: àcid etilendiaminetetraacètic.
- EFRA: Associació Europea de Indústries Transformadores de Subproductes Animals.
- EST: extracte sec.
- FAO: Food and agriculture organization of the United Nations.
- FAT: percentatge de greix dels dluïds totals extraïbles.
- FDA: Food and Drug Administration.
- FEDNA: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- GH: grau d'hidròlisi.
- GPx-1, GPx-2, GPx-4, GPx-5, GPx-6, GPx-7 i GPx-8: glutatió peroxidasa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8 respectivament.
- GRAS: Generally Recognized as Safe.
- h***: paràmetre tonalitat o matís del color de l'escala CIE L*a*b*.
- h: equivalents d'hidròlisi o meq/g de proteïna de L-aminoàcids formats durant la hidròlisi, determinats a partir d'una corba patró amb L-Leucina.
- htot = equivalents d'hidròlisi en la hidròlisi total de proteïna o aminoàcids (suma del contingut d'aminoàcids individuals en 1 g de proteïna).
- IARC: International Agency for Research on Cancer.
- IDR: ingèsta diàris recomanada.
- Ile: isoleucina.
- INTEA: Institut de Tecnologia Agroalimentària.
- ISO: International Organization for Standardization.
- L***: paràmetre lluminositat del color de l'escala CIE L*a*b*.
- LAPU: quantitat d'enzim que hidrolitza 1 µm de L-leucina-p-nitroanilida per minut.
- Leu: leucina.
- Lparcial: letalitat parcial.
- Lys: lisina.
- MEC: Ministerio de Educación y Ciencia.
- Met: metionina.
- MICYT: Ministerio de ciencia y tecnología.
- MOS: marge de seguretat.
- MTGasa: transglutaminasa microbiana.
- N/D: no determinat.
- NNP: nitrogen no proteic.
- NOAEL: No Observed Adverse Effect Level.
- NT: nitrogen total.
- P70: valor de pasteurització en el que s'assoleix la seguretat i estabilitat d'un aliment.
- PCA: plate count agar.
- PCC: Punts de Control Crítics.
- PHD: proteïna hidrolitzada i descolorada.
- Phe: fenilalanina.
- PLC: Programmable Logic Control.
- RGB: red green blue, coodenades del color.
- ROS: espècies reactives d'oxígen.
- RTU: Remote Terminal Units.
- SANDACH: subproductes animals no destinats a consum humà.
- SCADA: Supervisory Control And Data Acquisition.
- SCVPH: Comitè Científic sobre mesures veterinàries relacionades amb la salut pública.
- SDS: Dodecilsulfat sòdic.
- SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis.
- SS: Salmonella-Shigella.
- T: temperatura al cor del producte.
- TBX: Tryptone X-Glucurònid.
- TCA: àcid tricloroacètic.
- TEF: fluids totals extraïbles.
- TNBS: àcid trinitro-benzen-sulfònic.
- T ref: temperatura a assolir per obtenir la reducció del microorganisme (70 °C en ambdós casos).
- Tyr: tirosina.
- UdG: Universitat de Girona.
- Ufc: unitats formadores de colònia.
- Val: valina.
- VRBG: Agar Cristall violeta-Roig neutre-Bilis-Glucosa.
- z: constant de resistència tèrmica.

ÍNDEX

ABREVIACIONS	1
ÍNDEX DE FIGURES	9
ÍNDEX DE TAULES.....	16
RESUM.....	21
RESUMEN	25
SUMMARY	29
CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ GENERAL	34
1.1. CONTEXTUALITZACIÓ	34
1.2. SECTOR CARNI, SUBPRODUCTES I SOSTENIBILITAT.....	37
1.2.1. Sector carni i altres fonts de proteïna alternativa.....	37
1.2.2. Subproductes carnis.....	40
1.2.3. Legislació.....	42
1.3. LA SANG D'ESCORXADOR.....	44
1.3.1. Característiques de la sang.....	44
1.3.2. Sistemes de recollida de la sang.....	46
1.3.2.1. Fraccions de la sang.....	48
1.3.2.2. Propietats funcionals.....	51
1.3.3. Usos i aplicacions de la sang d'escorxador	52
1.3.4. Marc legal alimentari de la sang.....	54
1.3.4.1. Marc legal pel consum animal	55
1.3.4.2. Marc legal pel consum humà.....	56
1.4. MÈTODES DE DESCOLORACIÓ DE LA SANG	58
1.4.1. Extracció mitjançant solvents.....	58
1.4.2. Segrestants	59
1.4.3. Hidròlisi	59
1.4.4. Oxidació	60
1.4.5. Mètodes patentats en base a la utilització de peròxid d'hidrogen	61
1.4.6. Marc legal sobre l'ús del peròxid d'hidrogen en la indústria alimentària.....	62

CAPÍTOL 2. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL	69
2.1. OBJECTIUS.....	69
2.2. PLA DE TREBALL.....	72
CAPÍTOL 3. ESTUDIS PRELIMINARS	76
3.1. INTRODUCCIÓ.....	76
3.2. OBJECTIUS.....	78
3.3. MATERIAL I MÈTODES.....	79
3.3.1. Disseny experimental.....	79
3.3.2. Procedència de les mostres.....	81
3.3.3. Obtenció del concentrat proteic segons el mètode descrit per Florido (2008)	82
3.3.4. Deshidratació.....	84
3.3.5. Caracterització fisicoquímica	85
3.3.5.1. Composició química	85
3.3.5.2. Determinació del color.....	87
3.3.6. Caracterització microbiològica	88
3.3.7. Electroforesi SDS-PAGE.....	89
3.3.8. Tractament estadístic de les dades.....	90
3.4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	91
3.4.1. Caracterització dels productes obtinguts a escala de laboratori	91
3.4.1.1. Anàlisis fisicoquímiques	91
3.4.1.2. Anàlisis microbiològiques.....	96
3.4.1.3. Anàlisi proteica	98
3.4.1.4. Digestibilitat	99
3.4.2. Caracterització d'un concentrat proteic obtingut a escala de planta pilot.....	100
3.4.2.1. Anàlisis fisicoquímiques	100
3.4.2.2. Anàlisis microbiològiques.....	102
3.4.2.3. Anàlisi proteica	103
3.4.3. Efecte de la utilització de metabisulfid de sodi per conservar la sang	106
3.5. CONCLUSIONS	110
CAPÍTOL 4. OBTENCIÓ D'UN CONCENTRAT PROTEIC DESCOLORAT A PARTIR DE SANG SENCERA	113

4.1.	INTRODUCCIÓ	113
4.2.	OBJECTIUS.....	115
4.3.	MATERIAL I MÈTODES.....	116
4.3.1.	Disseny experimental.....	116
4.3.2.	Procedència de les mostres.....	119
4.3.3.	Obtenció del concentrat proteic	120
4.3.4.	Deshidratació per liofilització	123
4.3.5.	Caracterització fisicoquímica dels concentrats proteics.....	124
4.3.6.	Grau d'hidròlisi	125
4.3.7.	Tractament estadístic de les dades.....	126
4.3.8.	Obtenció de productes model.....	126
4.3.8.1.	Productes model carnis.....	126
4.3.8.2.	Proves d'aplicació en galetteria	131
4.3.9.	Caracterització fisicoquímica dels productes model.....	133
4.4.	RESULTATS I DISCUSSIÓ	135
4.4.1.	Concentrat proteic obtingut mitjançant precipitació àcida.....	135
4.4.2.	Concentrat proteic a partir de sang sencera obtingut mitjançant tractament tèrmic previ a la descoloració	139
4.4.2.1.	Efecte del tractament tèrmic sobre els paràmetres CIE L*a*b* del color del concentrat proteic	139
4.4.2.2.	Composició química del concentrat proteic obtingut mitjançant tractament tèrmic.....	141
4.4.2.3.	Composició aminoacídica.....	143
4.4.2.4.	Anàlisis microbiològiques del concentrat proteic obtingut mitjançant tractament tèrmic	145
4.4.2.5.	Obtenció d'aliments model.....	147
4.4.3.	Caracterització dels hidrolitzats descolorats obtinguts mitjançant Flavourzyme o Alcalasa	155
4.5.	CONCLUSIONS	159
CAPÍTOL 5. OBTENCIÓ D'UN CONCENTRAT PROTEIC DESCOLORAT A PARTIR DE FRACCIÓ CEL·LULAR DE SANG MITJANÇANT HIDRÒLISI.....		162
5.1.	INTRODUCCIÓ.....	162

5.2.	OBJECTIUS.....	164
5.3.	MATERIAL I MÈTODES.....	165
5.3.1.	Disseny experimental.....	165
5.3.2.	Procedència de les mostres.....	167
5.3.3.	Obtenció del concentrat proteic.....	167
5.3.4.	Deshidratació per atomització.....	169
5.3.5.	Caracterització fisicoquímica dels concentrats proteics.....	170
5.3.5.1.	Composició química.....	170
5.3.5.2.	Rendiment de la hidròlisi.....	171
5.3.5.3.	Determinació dels paràmetres CIE L*a*b* del color.....	171
5.3.5.4.	Grau d'hidròlisi.....	171
5.3.6.	Electroforesi SDS-PAGE.....	171
5.3.7.	Tractament estadístic de les dades.....	172
5.4.	RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	173
5.4.1.	Caracterització dels hidrolitzats obtinguts mitjançant Flavourzyme o Flavourzyme i Alcalasa.....	173
5.4.2.	Caracterització dels hidrolitzats obtinguts mitjançant Flavourzyme.....	177
5.5.	CONCLUSIONS.....	185
CAPÍTOL 6. PLANTA PILOT.....		188
6.1.	INTRODUCCIÓ.....	188
6.2.	OBJECTIUS.....	190
6.3.	MATERIAL I MÈTODES.....	191
6.3.1.	Disseny experimental.....	191
6.3.2.	Definició dels tractaments i equips de processat.....	191
6.3.3.	Posta en marxa de la planta pilot.....	192
6.3.4.	Caracterització fisicoquímica i microbiològica del producte obtingut a la planta demostrativa.....	192
6.3.5.	Autorització sanitària de la planta pilot i aplicació del sistema APPCC.....	195
6.4.	DEFINICIÓ DE PROCESSOS I EQUIPS.....	196
6.4.1.	Procés de transformació de sang tècnica.....	196

6.4.2.	Procés de transformació de sang higiènica	197
6.4.3.	Línies de tractament	197
6.4.4.	Aigua de procés	204
6.4.5.	Components i característiques de la planta pilot.....	204
6.5.	DISSENY, MUNTATGE I POSTA EN MARXA DE LA PLANTA PILOT.....	208
6.5.1.	Equips principals.....	208
6.5.2.	Equips auxiliars	224
6.5.3.	Automatització del procés mitjançant software	232
6.6.	PRODUCTE OBTINGUT EN LA PLANTA PILOT	235
6.6.1.	Caracterització del producte obtingut en la planta pilot	235
6.7.	PROCÉS D'AUTORITZACIÓ SANITARI	242
6.7.1.	Sistema APPCC	243
6.7.2.	Etiquetatge	249
6.8.	CONCLUSIONS	252
	DISCUSSIÓ GENERAL I PERSPECTIVES DE FUTUR	255
	CONCLUSIONS GENERALS	260
	BIBLIOGRAFIA.....	265
	ANNEXOS.....	291
	ANNEX 1: Resultats de l'anàlisi estadística dels capítols 3, 4 i 5.	291
	ANNEX 2: Planta pilot	300

ÍNDIX DE FIGURES

Capítol 1

Figura 1.1. Producció càrnia dels principals productors a nivell mundial. Dades expressades en milions de tones de carn des del 1961 fins al 2018. Figura extreta de https://ourworldindata.org/meat-production	37
Figura 1.2. Recol·lecció de la sang d'animals de sacrifici en escorxador mitjançant el dessagnat en obert (Figura modificada de FAO, 2020b).....	46
Figura 1.3. Recol·lecció de la sang d'animals de sacrifici en escorxador mitjançant un ganivet tubular o trocar (Figura modificada de Wismer- Pedersen, 1988).....	47
Figura 1.4. Fraccions derivades del processament de la sang d'escorxador (Andrades, 2008; Toldrà, 2002; Toldrà et al., 2019a).....	48
Figura 1.5. Estructura quaternària d'una molècula d'hemoglobina: es mostra les cadenes α en vermell, les cadenes β en blau i els grups hemo en verd (Figura extreta de Labmedica, 2020).....	50
Figura 1.6. Estats de l'hemoglobina i coloració corresponent. Font: modificat a partir de LabMedica (2020).....	50
Figura 1.7. Estructura quaternària d'una glutatió peroxidasa humana 1 (GPx-1, esquerra) i 3 (GPx-3 dreta), extret de BioinformàticaUPF (2020).....	65
Figura 1.8. Estructura quaternària d'una Catalasa, extret de SASBDB (2020).....	66

Capítol 2

Figura 2.1. Esquema general de la tesi.....	72
Figura 2.1. Disseny experimental dels 4 apartats de la tesi.....	73

Capítol 3

Figura 3.1. Disseny experimental dels assajos preliminars (1r i 2n assaig) per l'estudi i caracterització del concentrat proteic i el seu procés d'obtenció mitjançant el procés patentat per Florido (2008).....	80
Figura 3.2. Disseny experimental seguit en l'avaluació del metabisulfit de sodi com a conservant de la sang envers al mètode convencional utilitzat en escorxadors.....	81
Figura 3.3. Diagrama de flux del procés d'obtenció d'un concentrat proteic deshidratat a partir de sang porcina sencera, segons el procediment descrit per Florido (2008).....	83
Figura 3.4. Representació tridimensional de l'espai CIE L*a*b* (esquerra) i CIE L*C*h° (dreta) del color (adaptat de X-Rite, Incorporated, 2002).....	88

Figura 3.5. Productes proteics dessecats obtinguts a partir de sang de porc sencera a escala de laboratori mitjançant el procés descrit per Florido (2008).....	91
Figura 3.6. Fraccions de sobrenedant recollides en l'etapa d'eliminació d'aigües després del rentat del producte proteic obtingut a partir de sang porcina, a escala de laboratori mitjançant el mètode de Florido (2008). D'esquerre a dreta: tercer rentat, segon rentat, primer rentat, aigües mare (sobrenedant recuperat) i aigües generals mesclades.....	95
Figura 3.7. Valors del percentatge d'extracte sec, cendres i proteïna en les aigües descartades en l'etapa de neteja del producte proteic obtingut a partir de sang porcina a escala de laboratori. Es mostren les mitjanes i desviació per cada anàlisi realitzada per duplicat.....	96
Figura 3.8. Gel obtingut en l'electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 20 % de mostres de producte proteic liofilitzat obtingut a partir de sang porcina i produït a escala de laboratori mitjançant el mètode de Florido (2008). Es poden observar les mostres (d'esquerre a dreta): M (marcador de pes molecular), C1, C2, C3, C4 i M.....	99
Figura 3.9. Gel obtingut en l'electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida (20%) de mostres de concentrat proteic de sang porcina proporcionats per l'empresa Talleres Azuara, obtingut mitjançant els equips proposats en la fabricació de la planta pilot. Es poden observar les mostres (d'esquerre a dreta): M1 (marcador de pes molecular 220 KDa), SANG sencera, P1 (lot 1), P2 (lot 2), P3 (lot 3), P4 (lot 4), P5 (lot 5) i M2 (marcador de pes molecular 100 KDa).....	104
Figura 3.10. Comparació del contingut en aminoàcids essencials Isoleucina, Arginina, Lisina, Metionina, Treonina i Valina (en %), de diferents concentrats proteics: producte proteic hydroblood, farina de sang, hemoglobina dessecada, plasma dessecat, caseïna i farina de soja). Dades extretes de FEDNA (2020).....	105
Figura 3.11. Evolució dels recomptes d'aerobis mesòfils totals en mostres de sang (log UFC/mL) amb citrat sòdic com a anticoagulant (blau) i amb metabisulfit sòdic com a conservant (verd). Mitjanes \pm DE (n=3).....	107
Figura 3.12. Evolució dels recomptes d'Enterobacteris en la sang (log UFC/mL) amb citrat sòdic com a anticoagulant (blau) i amb metabisulfit sòdic com a conservant (verd). Mitjanes \pm DE (n=3).....	108
Figura 3.13. Evolució del pH de mostres de sang amb citrat sòdic com a anticoagulant (taronja) i amb metabisulfit sòdic com a conservant (blau). Mitjanes \pm DE (n=3).....	108

Capítol 4

Figura 4.1. Disseny experimental del procés d'optimització del procediment d'obtenció d'un concentrat proteic descolorit a partir de sang porcina d'escorxadors mitjançant precipitació àcida o tractament tèrmic.....	116
Figura 4.2. Disseny experimental de les proves de concepte d'elaboració de productes alimentaris model utilitzant com a ingredient el concentrat proteic procedent de sang porcina.....	118
Figura 4.3. Disseny experimental del primer assaig per l'obtenció d'un concentrat proteic dessecat amb tractament hidrolític sobre sang sencera.....	119

Figura 4.4. Diagrama de flux del procediment d'obtenció d'un concentrat proteic a partir de sang sencera mitjançant el mètode descrit per Florido (2008), aplicant diferents concentracions de peròxid d'hidrogen i dues temperatures (50 i 60 °C) durant la reacció de descoloració.....	120
Figura 4.5. Diagrama de flux de la metodologia emprada per l'obtenció d'un concentrat proteic a partir de sang sencera mitjançant inactivació enzimàtica i precipitació de les proteïnes per tractament tèrmic seguit d'una descoloració amb peròxid d'hidrogen al 0,75% durant 30 min.....	121
Figura 4.6. Diagrama de flux del procés d'elaboració dels productes carnis tipus mortadel·la.....	128
Figura 4.7. Diagrama de flux del procés d'elaboració del paté.....	130
Figura 4.8. Procés d'elaboració de galetes.....	132
Figura 4.9. Paràmetres CIE L*, a* i b* del color dels concentrats proteics descolorats a dues temperatures de tractament (50 o 60 °C) en funció de la concentració de peròxid d'hidrogen (0'75, 1'25, 1'5, 1'75, 2, 2'25 o 3% p/v) i deshidratats per liofilització. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard de les mitjanes per cada grup (n = 3). Les lletres diferents mostren les diferències significatives per l'efecte de la temperatura (majúscula) i la concentració de peròxid (minúscula) (P <0,05).....	137
Figura 4.10. Imatges dels concentrats proteics descolorits i deshidratats per liofilització obtinguts a partir d'un tractament tèrmic a 70, 80 o 90 °C durant 10 min (d'esquerra a dreta), prèvia a la descoloració amb peròxid, i representació del color en l'escala RGB a partir dels valors en l'escala CIE L*a*b* (part inferior de cada figura) (n=3).....	139
Figura 4.11. Contingut dels aminoàcids essencials Isoleucina, Arginina, Lisina, Metionina, Treonina i Valina (en %), en diferents concentrats proteics: producte proteic obtingut per precipitació àcida, producte proteic obtingut mitjançant tractament tèrmic, farina de sang, hemoglobina dessecada, plasma dessecat, caseïna i farina de soja). Dades extretes de FEDNA (2020).....	144
Figura 4.12. Mortadel·les obtingudes a partir d'una fórmula tradicional (CONTROL) i substituint la soja per concentrat proteic descolorat de sang porcina en estat humit (inferior) i dessecat (superior).....	147
Figura 4.13. Evolució de la temperatura al cor de les mortadel·les elaborades amb concentrat proteic descolorat durant la cocció. S'indica el temps on s'assoleix la seguretat i l'estabilitat en base a la reducció de <i>L. monocytogenes</i> (fletxes en vermell) i d' <i>Enterococcus spp</i> (fletxes en groc), respectivament.....	148
Figura 4.14. Aspecte d'un tall transversal de les mortadel·les obtingudes. Es mostra la mortadel·la assaig (esquerre) i control (dreta).....	150
Figura 4.15. Patés obtinguts a partir d'una fórmula tradicional (control) i substituint el caseïnat per concentrat proteic descolorat de sang (P).....	151
Figura 4.16. Evolució de la temperatura al cor del paté durant el procés de cocció. S'indica el temps on s'assoleix la seguretat en base a la reducció de <i>L. monocytogenes</i> (en vermell) i on s'assoleix l'estabilitat del producte en base a la reducció de <i>Enterococcus spp</i> (en groc).....	152
Figura 4.17. Galetes obtingudes a partir d'una fórmula tradicional de galeta tipus "Maria" (imatge superior i d'esquerre a dreta: control, amb un 2,5% de concentrat proteic (P1) i amb un 5% de concentrat proteic(P2)) i galetes de civada (imatge inferior, d'esquerre a dreta: control, amb un 5,5% de concentrat proteic (P1) i amb un 7% de concentrat proteic (P2)).....	154

Capítol 5

Figura 5.1. Disseny experimental del primer assaig per l'obtenció d'un concentrat proteic dessecat amb tractament hidrolític sobre la fracció cel·lular.....	165
Figura 5.2. Disseny experimental del segon assaig per l'obtenció d'un concentrat proteic dessecat amb tractament hidrolític amb Flavourzyme sobre fracció cel·lular.....	166
Figura 5.3. Diagrama de flux del procés per l'obtenció d'un concentrat proteic deshidratat a partir de fracció cel·lular de sang mitjançant hidròlisi amb Neutrasa i Flavourzyme i descoloració amb peròxid d'hidrogen.....	168
Figura 5.4. Representació d'un deshidratador per atomització d'escala laboratori. Figura modificada a partir de BUCHI Mini Spray Dryer B-290.....	169
Figura 5.5. Electroforogrames obtinguts mitjançant electroforesis SDS-PAGE en gel de poliàcrilamida d'alta densitat (20 %) de diferents fraccions procedents de fracció cel·lular de sang porcina hidrolitzada i descolorada. M1 (marcador de pes molecular de 10 a 220 kDa), M2 (marcador de pes molecular de 3,4 a 100 kDa), SD (sobrenedant descolorat), S (sobrenedant no descolorat), P (precipitat) i FC (fracció cel·lular de sang porcina control). El subíndex (Núm.) indica la rèplica.....	183

Capítol 6

Figura 6.1. Diagrama del pla de treball corresponent a les diferents fases dutes a terme en la construcció, posta en marxa i validació de la planta pilot demostrativa.....	191
Figura 6.2. Esquema del procés i equips utilitzats en el processat de sang higiènica. Imatge modificada a partir d'Azuara S.L. (2019).....	200
Figura 6.3. Esquema del procés i els equips utilitzats en el processat de sang tècnica. Imatge modificada a partir d'Azuara S.L. (2019).....	203
Figura 6.4. Equips seleccionats pel processament de la sang higiènica i la tècnica i equips i materials auxiliars dels processos.....	204
Figura 6.5. Esquema de l'estructura general de la planta pilot demostrativa. Es mostra, en blau fosc, la línia de processat de sang higiènica i, en taronja, la línia de processat de sang tècnica. A més, es mostra, en color blau clar, l'esquema de la xarxa d'aigua. Imatge modificada a partir d'Azuara S.L. (2019).....	206
Figura 6.6. Distribució de la planta pilot dins la nau industrial situada a les instal·lacions de l'escorxador Mafrica. Imatge modificada a partir d'Azuara S.L. (2018).....	207
Figura 6.7. Disseny industrial dels reactors pel processat de sang tècnica. Extret d'Azuara S.L. (2018).....	208
Figura 6.8. Disposició dels reactors tècnics sobre la plataforma (esquerra) i acabat final (dreta). Figura esquerra estreta d'Azuara S.L. (2019).....	209
Figura 6.9. Bola rotatòria del sistema CIP. Extret d'Allen (2021).....	211

Figura 6.10. Modificació del disseny de les pales per millorar l'agitació del producte en els reactors de sang tècnica.....	212
Figura 6.11. Disseny del triagi (esquerra) i equip instal·lat a la planta pilot (dreta). Figura esquerra extreta d'Azuara S.L. (2018).....	213
Figura 6.12. Disseny industrial dels reactors pel processat (precipitat i descoloració) de producte higiènic. Figura extreta d'Azuara S.L. (2018).....	214
Figura 6.13. Imatge d'un dels dos tancs de processat de producte higiènic situat a un lateral del triagi.....	215
Figura 6.14. Esquema de la centrífuga RINA 300F (Riera Nadeu) (esquerra) i equip instal·lat (dreta). Figura esquerra modificada a partir d'Azuara S.L. (2018).....	216
Figura 6.15. Disseny de la tremuja de centrífuga. Imatge modificada a partir d'Azuara S.L. (2018).....	218
Figura 6.16. Tremuja de centrífuga.....	219
Figura 6.17. Representació del disgregador i detall de la sortida de producte. Figura modificada a partir d'Azuara (2018).....	220
Figura 6.18. Assecador RINA-Jet Turbo (Riera Nadeu S.A., Granollers, Espanya). Imatge modificada a partir de RINA Flash Dryer (2021).....	221
Figura 6.19. Assecador RINA-Jet Turbo instal·lat a la planta pilot industrial.....	221
Figura 6.20. Esquema del funcionament del filtre de mànigues i instal·lació de l'equip a la planta. Imatge modificada a partir de Btech (2021).....	223
Figura 6.21. Molí micronitzador IMF-60 muntat sobre Taula de suport (esquerra) i ensacadora DEP 5/100 (dreta) (ATPP Lleal®, Barberà del Vallès, Espanya). Figura modificada a partir d'Azuara S.L. (2018).....	224
Figura 6.22. Discs micronitzadors del molí i filtre de mànigues. Figura modificada a partir d'Azuara (2018).....	224
Figura 6.23. Disseny i representació del tanc de conservació de sang higiènica. Imatge extreta de Azuara S.L. (2018).....	225
Figura 6.24. Esquema del vis sens fi per transportar producte sec. Imatge modificada a partir de Azuara S.L. (2018).....	225
Figura 6.25. Bomba de lòbuls. Imatge extreta de Azuara S.L. (2018).....	226
Figura 6.26. Bomba centrífuga auto-encebadora. Imatge extreta de Talleres Azuara S.L. (2018).....	226
Figura 6.27. Bombes dosificadores. Imatge extreta de Talleres Azuara S.L. (2008).....	227
Figura 6.28. Tanc de 1000 L de IBC. Imatge extreta de Talleres Azuara S.L. (2018).....	228
Figura 6.29. Disposició dels tancs de reactius sobre la prestatgeria amb les cubetes de retenció (esquerra) i càrrega/descàrrega dels reactius (dreta). Imatge extreta de Talleres Azuara S.L. (2018).....	228

Figura 6.30. Disseny del reactor pel sistema de neteja CIP. Imatge modificada a partir de Talleres Azuara S. L. (2018).....	229
Figura 6.31. Disseny dels tancs pulmó d'aigua neta i aigües descartades. Imatge extreta de Talleres Azuara S.L. (2018).....	231
Figura 6.32. Planta de tractament de l'aigua residual del procés per osmosi inversa. Imatge extreta de Talleres Azuara S.L. (2018).....	231
Figura 6.33. Pantalla de control del software Scada per la línia de processat de sang tècnica (imatge superior) i sang higiènica (imatge inferior) de la planta pilot industrial.....	233
Figura 6.34. Etiquetes dissenyades pels dos concentrats proteics obtinguts (Pro 96 i P 93) a la planta pilot industrial.....	250
Figura 6.35. Mostra del concentrat proteic deshidratat destinat al consum humà (Pro 96) obtingut a la planta pilot.....	251

ÍNDEX DE TAULES

Capítol 1

Taula 1.1. Projectes d'investigació del grup de Tecnologia Alimentària de la Universitat de Girona, centrats en l'aprofitament i revaloració de la sang d'escorxadors i les seves fraccions.....	35
Taula 1.2. Principals subproductes de la indústria càrnia i possibles aplicacions.....	41
Taula 1.3. Composició general de la sang porcina.....	45
Taula 1.4. Fraccions de la sang i contingut en les principals proteïnes segons espècies d'animals de sacrifici.....	45
Taula 1.5. Concentració dels aminoàcids essencials en la sang sencera de porc i ingesta diària recomanada (IDR) per un adult (>13 anys) segons la FAO (2007).....	45
Taula 1.6. Composició de les fraccions de la sang (expressat en g/g fracció).....	49
Taula 1.7. Principals aplicacions industrials de la sang d'escorxadors.....	53
Taula 1.8. Productes comercials pel consum humà desenvolupats a partir de les fraccions de la sang.....	54
Taula 1.9. Disposicions del mètode de transformació 7, definit a l'annex IV del capítol III del Reglament (CE) nº 42/2011.....	55
Taula 1.10. Criteris de seguretat alimentària definits en el capítol 1 del Reglament (CE) nº 2073/2005.....	56
Taula 1.11. Criteris de higiene dels processos per la carn i productes derivats definits en l'apartat 2.1. del Capítol 2 del Reglament (CE) nº 2073/2005.....	57
Taula 1.12. Càlcul del marge de seguretat d'exposició al peròxid d'hidrogen pel consum de farina de sang tractada amb el reactiu a una concentració del 0,75% segons dades d'AESAN 2011-006.....	63
Taula 1.13. Regulació de l'ús de peròxid d'hidrogen en l'àmbit alimentari. Extret de (AESAN, 2011-006).....	64

Capítol 3

Taula 3.1. Composició química dels productes proteics liofilitzats obtinguts a partir de sang porcina i produïts a escala de laboratori mitjançant el mètode patentat per Florido (2008). Es mostra el percentatge d'extracte sec, cendres, greix i proteïna, activitat d'aigua (aw) i el contingut en ferro (mitjanes \pm DE).....	92
Taula 3.2. Paràmetres del color dels quatre productes proteics liofilitzats obtinguts a partir de sang porcina i produïts a escala de laboratori mitjançant el mètode patentat per Florido (2008). Es mostren els paràmetres CIE L* a* b* del color, els paràmetres de l'escala RGB, la representació del color per cada mostra proteica i la mitjana \pm DE.....	94

Taula 3.3. Recomptes de microorganismes en tres mostres de producte proteic liofilitzat obtingut a partir de sang porcina i produïts a escala de laboratori mitjançant el mètode de Florido (2008). Els valors s'expressen en ufc/g de mostra pels recomptes d'aerobis mesòfils, enterobacteris i E. Coli, i la determinació de la presència/absència en Salmonella spp.....	97
Taula 3.4. Percentatge de digestibilitat in vitro per l'extracte proteic descolorat Hydroblood.....	100
Taula 3.5. Valors obtinguts en la caracterització dels 5 lots d'extracte proteic obtinguts a partir de sang porcina a escala de planta pilot proporcionats per Talleres Azuara. Es mostra el percentatge d'extracte sec, cendres, greix, proteïna i NNP/NT, l'activitat d'aigua (aw) i el contingut en ferro.....	101
Taula 3.6. Recomptes de microorganismes en cinc lots de producte proteic obtinguts a partir de sang de porc proporcionats per l'empresa Talleres Azuara. Aquests s'han obtingut mitjançant els equips proposats en la fabricació de la planta pilot de processat de sang. S'expressa els valors en ufc/g de mostra per enterobacteris, E. coli i aerobis mesòfils i determinació de la presència/absència en Salmonella spp. en 25g.....	102
Taula 3.7. Contingut aminoacídic (%) del concentrat proteic de sang porcina proporcionat per l'empresa Talleres Azuara S.L., obtingut mitjançant els equips proposats en la fabricació de la planta pilot.....	105

Capítol 4

Taula 4.1. Condicions òptimes i tipus d'activitat proteolítica dels enzims utilitzats en l'obtenció d'un concentrat proteic descolorit a partir de sang porcina.....	122
Taula 4.2. Condicions assajades en els experiments per l'obtenció d'un concentrat proteic descolorit a partir de sang porcina d'escorçador, mitjançant hidròlisi amb Alcalasa i Flavourzyme.....	123
Taula 4.3. Formulació utilitzada en les proves de concepte de fabricació de producte carni tipus mortadel·la control i assaig (P1) amb el concentrat proteic humit i deshidratat procedent de sang (g·kg ⁻¹).....	128
Taula 4.4. Formulació utilitzada en l'elaboració dels patés control i assaig (P) amb el concentrat proteic deshidratat procedent de sang (g·kg ⁻¹).....	130
Taula 4.5. Formulació (g/g) utilitzada en les galetes tipus maria i de civada control i assaig amb 2 aportacions de proteïna diferent utilitzant el concentrat proteic de sang (P1 -2,5 a 5,5%- i P2 -5 a 7%-).....	132
Taula 4.6. Color obtingut en cada concentrat proteic assecat per liofilització segons la concentració de peròxid utilitzada i la temperatura aplicada durant el tractament de descoloració (n=3). Es mostra els valors de l'escala CIE L*a*b* per cada tractament.....	138
Taula 4.7. Paràmetres CIE L*a*b* del color dels concentrats proteics obtinguts mitjançant un tractament tèrmic de la sang a 70, 80 o 90 °C durant 10 min, amb una posterior descoloració amb un 0,75% de peròxid d'hidrogen, durant 30 min (Mitjanes ± DE, n=3). Les lletres diferents indiquen diferències significatives entre tractaments (P<0,05).....	140
Taula 4.8. Composició química i activitat de l'aigua dels concentrats proteics descolorits i deshidratats per liofilització obtinguts mitjançant un tractament tèrmic (a 70, 80 o 90 °C) durant 10 min, previ a la descoloració amb un 0,75% de peròxid d'hidrogen, durant 30 min. Es mostren les mitjanes ± DE (n=3).....	142
Taula 4.9. Contingut en aminoàcids (%) del concentrat proteic de sang porcina obtingut mitjançant tractament tèrmic i increment (Δ%) respecte al concentrat proteic obtingut mitjançant precipitació àcida (determinat en els estudis preliminars).....	143

Taula 4.10. Recomptes d'enterobacteris i aerobis mesòfils (ufc/mL sang i ufc/g d'extracte sec) de la sang utilitzada en l'obtenció del concentrat proteic. Mitjanes \pm DE (n=3).....	145
Taula 4.11. Recomptes d'enterobacteris i aerobis mesòfils (en Log10 ufc/g extracte sec) dels concentrats proteics descolorits i deshidratats per liofilització segons el tractament tèrmic (70, 80 i 90 °C), previ a una descoloració amb un 0,75% de peròxid d'hidrogen, durant 30 min. Es mostren les mitjanes \pm DE (n=3). Les lletres diferents indiquen diferències significatives entre tractaments (P<0,05).....	146
Taula 4.12. Resultats de la caracterització de les mortadel·les control i assaig amb producte humit i dessecat. Es mostra el percentatge d'humitat, cendres i proteïna, el percentatge de fluids extraïbles (TEF), percentatge de greix del TEF (FAT) en pasta crua i la capacitat de retenció d'aigua (CRA), i els paràmetres CIE L*a*b* del color de les salsitxes cuites. Mitjanes \pm DE (n = 2).....	149
Taula 4.13. Composició fisicoquímica (humitat i proteïna), % TEF, % FAT i paràmetres CIE L*a*b del color dels patés obtinguts (Control i Producte (P)) (mitjana \pm DE, n=2).....	152
Taula 4.14. Composició fisicoquímica (humitat, cendres i proteïna) i color del les galetes obtingudes (Control, P1 i P2 de galetes de farina de blat i galetes de civada) (mitjana \pm DE).....	154
Taula 4.15. Caracterització del color dels concentrats proteics obtinguts a partir de sang sencera, descolorats mitjançant un procés d'hidròlisi i peròxid d'hidrogen, i dessecats mitjançant liofilització. Es mostren els valors pels paràmetres L*, a*, b*, cromà (C*), tonalitat (H) i color en l'escala RGB pels concentrats TRACTAMENT (Taula superior) i CONTROL (Taula inferior).....	156
Taula 4.16. Grau d'hidròlisi (% GH) dels concentrats proteics obtinguts mitjançant la hidròlisi i descoloració de sang sencera porcina.....	157

Capítol 5

Taula 5.1. Condicions òptimes i tipus d'activitat proteolítica dels enzims utilitzats en l'obtenció d'un concentrat proteic descolorit a partir de sang porcina.....	167
Taula 5.2. Paràmetres de color dels concentrats proteics obtinguts mitjançant hidròlisi de la fracció cel·lular de sang amb Flavourzyme o Flavourzyme i Neutrasa (indicat com a FL i FN respectivament). Es mostren els valors dels paràmetres CIE L*a*b*, el cromà, la tonalitat i els valors i representació de l'escala RGB. Es mostren les mitjanes \pm DE (n=3).....	174
Taula 5.3. Percentatge de les fraccions recuperades dels concentrats proteics obtinguts mitjançant hidròlisi de la fracció cel·lular de sang amb Flavourzyme o Flavourzyme i Neutrasa.....	175
Taula 5.4. Composició química dels concentrats proteics obtinguts mitjançant hidròlisi de la fracció cel·lular de sang amb Flavourzyme o Flavourzyme i Neutrasa. Es mostren les mitjanes \pm SD (n=3) per l'extracte sec, a _w , cendres, proteïna i NNP (nitrogen no proteic).....	177
Taula 5.5. Percentatge de cada fracció obtinguda (precipitat i sobrenedant) en hidrolitzats de fracció cel·lular de sang mitjançant Flavourzyme, i rendiment en sobrenedant, expressat com % de proteïna recuperat.....	178
Taula 5.6. Grau d'hidròlisi (%) dels concentrats proteics obtinguts mitjançant hidròlisi de la fracció cel·lular de sang amb Flavourzyme. Es mostren les mitjanes \pm DE (n = 3).....	179

Taula 5.7. Composició química dels concentrats proteics obtinguts a partir de la hidròlisi de fracció cel·lular de sang mitjançant Flavourzyme. Es mostren les mitjanes \pm DE (n=3).....179

Taula 5.8. Color dels concentrats proteics obtinguts mitjançant hidròlisi de la fracció cel·lular de sang amb Flavourzyme. Es mostra les mitjanes \pm DE (n = 3) dels paràmetres CIE L*a*b*, croma, tonalitat i els valors i representació de l'escala RGB del sobrenedant, el sobrenedant descolorat (S i SD respectivament) i la mitjana de les 3 repeticions. Les lletres diferents indiquen diferències significatives entre tractaments (P<0,05).....182

Taula 5.9. Color de la fracció precipitada dels concentrats proteics obtinguts mitjançant hidròlisi de la fracció cel·lular de sang amb Flavourzyme. Es mostra les mitjanes \pm DE (n = 3) dels paràmetres de l'escala CIE L*a*b*, el croma, la tonalitat i els valors i representació de l'escala RGB.....182

Capítol 6

Taula 6.1. Paràmetres utilitzats en el processat de sang higiènica en la planta pilot industrial.....198

Taula 6.2. Paràmetres utilitzats en el processat de sang tècnica en la planta pilot industrial.....201

Taula 6.3. Escalat del volum necessari pel processat de sang tècnica.....210

Taula 6.4. Escalat del volum necessari pel processat de sang higiènica.....215

Taula 6.5. Caracterització fisicoquímica dels productes proteics obtinguts a la planta pilot industrial.....235

Taula 6.6. Aminograma dels productes obtinguts en la planta pilot industrial i increment ($\Delta\%$: $\%_{\text{planta pilot}} - \%_{\text{laboratori}}$) respecte al percentatge determinat en els productes obtinguts a nivell de laboratori.....236

Taula 6.7. Recomptes de microorganismes en cinc mostres de producte proteic tècnic obtingut a la planta pilot a partir de sang porcina. Els valors s'expressen en ufc/g de mostra pels recomptes d'Enterobacteris, Aerobis mesòfils i la determinació de la presència/absència de *Salmonella* spp.....237

Taula 6.8. Resultats de la caracterització dels productes proteics higiènics obtinguts en la planta pilot a partir de sang porcina en 5 produccions diferents. Es mostra el percentatge d'humitat, cendres, greix i proteïna, activitat d'aigua (a_w) i el contingut en ferro (mitjanes \pm DE).....238

Taula 6.9. Paràmetres del color de les 5 produccions de concentrat proteic higiènic obtingudes a la planta pilot a partir de sang porcina. Es mostren els paràmetres CIE L* a* b* del color, el croma, la tonalitat, els paràmetres de l'escala RGB, la representació del color per cada mostra i la mitjana \pm DE.....240

Taula 6.10. Recomptes de diferents microorganismes en cinc mostres de concentrat proteic higiènic obtingut a la planta pilot a partir de sang porcina. Els valors s'expressen en ufc/g de mostra pels recomptes d'Enterobacteris, Aerobis mesòfils, Esporulats, Clostridis Sulfit Reductors, *Staphylococcus Coagulasa Positiu*, i la determinació de la presència/absència en *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* spp.....241

Taula 6.11. Límits acceptables i inacceptables de microorganismes en superfície dins del control de superfícies en contacte amb els productes alimentaris (Reglament 2073/2005).....247

Taula 6.12. Límits acceptables i inacceptables de recomptes de microorganismes en el concentrat proteic deshidratat.....248

RESUM

Les previsions a nivell mundial d'una falta imminent de proteïna animal pel consum humà ha desembocat en la cerca de noves fonts de proteïna alimentàries, ja sigui de fonts alternatives vegetals, fúngiques o d'insectes, o bé procedent de subproductes de la indústria alimentària. La sang d'escorxadors representa un subproducte important de la indústria càrnia degut als grans volums que se'n generen. En general, aquesta no és del tot aprofitada tot i les seves propietats nutricionals d'alt interès, doncs conté un alt percentatge de proteïna i una gran quantitat de compostos d'elevat interès en la indústria alimentària. A més, les proteïnes de les fraccions de la sang també presenten molt bones propietats tecno-funcionals que justifiquen la seva valorització. La cerca d'un procés de transformació d'aquesta sang en un producte alimentari no només permetria aconseguir una nova font per suplir la demanda creixent de proteïna, sinó que també permetria disminuir les despeses de la gestió d'aquest tipus de subproductes tractats com a residus i la problemàtica ambiental que comporten, per així aconseguir processos sostenibles basats en un model d'economia circular dins la indústria càrnia.

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat la cerca d'un procés basat en la descoloració de l'hemoglobina per transformar la sang procedent d'escorxadors industrials en un concentrat proteic apte pel consum animal i humà, i contribuir al disseny i posta en marxa d'una planta pilot demostrativa per escalar i implementar el procés seleccionat a nivell industrial.

Aquest treball s'ha englobat dins d'un conveni entre el grup de recerca de Tecnologia Alimentària de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA) de la Universitat de Girona (UdG) i l'empresa Talleres Azuara S.L. (Valls, Tarragona), en paral·lel amb el programa d'investigació i innovació SMI *Horizon 2020* de la Unió Europea (UE) amb nº 766747 i títol "Planta de processament innovadora per la producció òptima de Proteïna Hidrolitzada i Descolorada (PHD)".

Per obtenir aquest concentrat proteic derivat de la sang, s'han estudiat diferents processos sobre sang sencera o bé sobre la fracció cel·lular, després de recuperar el plasma per separat, que tenen en comú la utilització del peròxid d'hidrogen com a agent descolorant de l'hemoglobina, molècula de la sang que li dona la coloració característica, de vermell intens a un marró fosc en el seu estat oxidat. Perquè el producte obtingut sigui apte pel consum humà, s'ha tingut en compte les recomanacions d'ús del peròxid, d'un informe del Comitè Científic de l'Agència Espanyola de Seguretat Alimentària y Nutrició (AESAN, 2011), amb una exposició màxima de la sang a aquest coadjuvant tecnològic de 30 min a una concentració del 0,75 % (p/v) sobre sang sencera.

En primer lloc, s'han estudiat dos processos no proteolítics basats en la precipitació i insolubilització de les proteïnes de la sang sencera mitjançant acidificació o aplicant un procés tèrmic, seguit d'un procés de descoloració amb peròxid. El primer procés, basat en la precipitació àcida, descrit i patentat per Florido

(2008), permet obtenir un producte en pols estable amb un 93,42 % de proteïna i una coloració marronosa o ocre en funció de la quantitat de peròxid utilitzat en la descoloració i en funció de la temperatura aplicada durant aquest procés. Aquest producte és apte pel consum animal, però no pel consum humà perquè les concentracions de peròxid necessàries per obtenir un producte amb suficient grau de descoloració excedeixen la dosi recomanada per ser utilitzat com a ingredient alimentari.

El segon procés, basat en la precipitació tèrmica de les proteïnes, prèviament al tractament amb peròxid, permet obtenir un producte en pols apte pel consum humà amb una major descoloració i un major contingut proteic (94,9 %) utilitzant unes condicions de tractament previ de la sang a 90 °C durant 10 min i una posterior descoloració amb un 0,75 % de peròxid durant 30 min. Per una banda, les proves de concepte realitzades en productes carnis tipus pastes fines emulsionades han demostrat que la baixa funcionalitat del producte, degut a la seva insolubilitat i una coloració encara massa intensa, fan que no sigui prou interessant per a aquest ús. Per altra banda, s'han obtingut resultats interessants en l'ús d'aquest ingredient per a la producció de galetes proteiques, el que podria ser una aplicació d'interès com a font de proteïnes i ferro hèmic.

Per produir, a escala industrial, aquests dos productes, es va dissenyar i construir una planta pilot demostrativa ubicada en un escorxador a partir de la qual s'ha processat, de manera automatitzada, sang tècnica (barrejada amb residus i amb alta contaminació bacteriana) i sang higiènica porcina (recollida en condicions higièniques) en dues línies diferenciades per obtenir un producte apte pel consum animal i humà, respectivament. En aquesta tesi, s'ha contribuït a la millora d'algunes etapes del procés, s'han caracteritzat els productes obtinguts, i s'ha dissenyat el sistema APPCC. Ambdós productes presenten unes característiques microbiològiques acceptables.

Per altra banda, s'ha estudiat l'aplicació d'un procés hidrolític sobre sang sencera o bé sobre la fracció cel·lular. Els tractaments hidrolítics estudiats aplicats sobre sang sencera, utilitzant els enzims Alcalasa i *Flavourzyme* i seguits d'una descoloració amb peròxid, han demostrat no ser suficientment eficaços per l'obtenció d'un producte descolorat, pel que se n'ha descartat la utilització.

Altrament, s'han obtingut millors resultats en aplicar un procés d'hidròlisi i descoloració en la fracció cel·lular per separat, descartant la fracció plasmàtica que ja disposa d'una gran varietat d'aplicacions en la indústria alimentària. En aquest procés, s'ha dut a terme una hidròlisi mitjançant l'enzim *Neutrasa* en combinació amb *Flavourzyme*, o sols utilitzant *Flavourzyme*, seguida d'una posterior descoloració mitjançant peròxid d'hidrogen. El segon procés, utilitzant un sol enzim, ha demostrat els millors resultats, aconseguint un producte descolorat amb un 27 % de grau d'hidròlisi, sense arribar a trencar les subunitats de l'hemoglobina. En deshidratar mitjançant atomització la fracció sobrenedant descolorada procedent de la hidròlisi prèvia de l'hemoglobina, s'obté una pols soluble amb una coloració marro clara-beix i un contingut proteic mínim del 85 %, el que el converteix en una opció molt interessant per ser utilitzada com a ingredient alimentari. Tot i l'obtenció d'aquests bons resultats, el procés estudiat ha presentat un baix

rendiment, recuperant sols un 30-50 % de la proteïna de la fracció tractada, el que suposa una important limitació en la implementació industrial, especialment si no es dona valor a la fracció insoluble no descolorada descartada. Així, caldria dur a terme un estudi més exhaustiu tant del procés d'hidròlisi com del producte obtingut per estudiar-ne la viabilitat o, per altra banda, buscar mètodes hidrolítics de processat alternatius seguint la mateixa línia d'estudi.

És necessari continuar en l'estudi de noves tecnologies innovadores que permetin el processament i la valorització de la sang, així com d'altres subproductes animals que es generen als escorxadors, per trobar solucions destinades a l'obtenció d'ingredients nutricionals i/o tecno-funcionals destinats a l'alimentació humana i animal, però també aplicacions en altres sectors industrials, amb l'objectiu final d'assolir l'objectiu de residu zero, en un context de bio-economia circular i encarant el futur del sector carni i la indústria alimentària cap a un desenvolupament més sostenible.

RESUMEN

Las previsiones a nivel mundial de una inminente falta de proteína animal para el consumo humano han desembocado en la búsqueda de nuevas fuentes de proteína alimentarias, ya sea de fuentes alternativas vegetales, fúngicas o de insectos, o bien procedente de subproductos de la industria alimentaria. La sangre de matadero representa un subproducto importante de la industria cárnica debido a los grandes volúmenes que se generan. Por lo general, ésta no es del todo aprovechada a pesar de sus propiedades nutricionales de alto interés, pues contiene un alto porcentaje de proteína y una gran cantidad de compuestos de elevado interés en la industria alimentaria. Además, las proteínas de las fracciones de la sangre presentan también muy buenas propiedades tecno-funcionales que justifican su valorización. La búsqueda de un proceso de transformación de esta sangre en un producto alimentario no sólo permitiría conseguir una nueva fuente para suplir la demanda creciente de proteína, sino que también permitiría disminuir los gastos de la gestión de este tipo de subproductos tratados como residuos y la problemática ambiental que conllevan, para así conseguir procesos más sostenibles basados en un modelo de economía circular en la industria cárnica.

El objetivo principal de este trabajo ha sido la búsqueda de un proceso basado en la decoloración de la hemoglobina para transformar la sangre procedente de mataderos industriales en un concentrado proteico apto para el consumo animal y humano, contribuyendo al diseño y la puesta en marcha de una planta piloto demostrativa para escalar e implementar el proceso seleccionado a nivel industrial.

Este trabajo se ha englobado dentro de un convenio entre el grupo de investigación de Tecnología Alimentaria del Instituto de Tecnología Agroalimentaria (INTEA) de la Universidad de Girona (UdG) y la empresa Talleres Azuara S.L. (Valls, Tarragona), en paralelo con el programa de investigación e innovación SMI Horizon 2020 de la Unión Europea (UE) con nº 766747 y título "Planta de procesamiento innovadora para la producción óptima de Proteína Hidrolizada y Descolorada (PHD)".

Para obtener este concentrado proteico derivado de la sangre, se han estudiado distintos procesos aplicados sobre sangre entera o bien sobre la fracción celular, después de recuperar el plasma por separado, que tienen en común la utilización del peróxido de hidrógeno como agente decolorante de la hemoglobina, molécula que le da la coloración característica a la sangre, de rojo intenso a un marrón oscuro en su estado oxidado. Para que el producto obtenido sea apto para el consumo humano, se han tenido en cuenta las recomendaciones de uso del peróxido, de un informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2011), con una exposición máxima de la sangre a este coadyuvante tecnológico de 30 min a una concentración del 0,75% (p/v) sobre sangre entera.

En primer lugar, se han estudiado dos procesos no proteolíticos basados en la precipitación e insolubilización de las proteínas de la sangre entera mediante acidificación o aplicando un proceso térmico,

seguido de un proceso de decoloración con peróxido. El primer proceso, basado en la precipitación ácida, descrito y patentado por Florido (2008), permite obtener un producto en polvo estable con un 93,42% de proteína y una coloración marrón u ocre en función de la cantidad de peróxido utilizado en la decoloración y en función de la temperatura aplicada durante este proceso. Este producto es apto para consumo animal, pero no para consumo humano ya que las concentraciones de peróxido necesarias para obtener un producto con un grado de decoloración suficiente exceden la dosis recomendada para ser utilizado como ingrediente alimentario.

El segundo proceso, basado en la precipitación térmica de las proteínas, previamente al tratamiento con peróxido, permite obtener un producto en polvo apto para el consumo humano con mayor decoloración y mayor contenido proteico (94,9 %) utilizando unas condiciones de tratamiento de la sangre a 90 °C durante 10 min y una posterior decoloración con un 0,75% de peróxido durante 30 minutos. Por un lado, las pruebas de concepto realizadas en productos cárnicos tipo pastas finas emulsionadas han demostrado que la baja funcionalidad del producto, debido a su insolubilidad y una coloración todavía demasiado intensa, hacen que no sea lo suficientemente interesante para este uso. Por otro lado, se han obtenido resultados interesantes en el uso de este ingrediente para la producción de galletas proteicas, lo que podría ser una aplicación de interés como fuente de proteínas y hierro hémico.

Para producir, a escala industrial, estos dos productos, se diseñó y construyó una planta piloto demostrativa ubicada en un matadero a partir de la cual se ha procesado, de forma automatizada, sangre técnica (mezclada con residuos y con alta contaminación bacteriológica) y sangre higiénica porcina (recogida en condiciones higiénicas) en dos líneas diferenciadas para obtener un producto apto para el consumo animal y humano, respectivamente. En esta tesis, se ha contribuido a la mejora de algunas etapas del proceso de la planta piloto demostrativa, se han caracterizado los productos obtenidos y se ha diseñado el sistema APPCC. Ambos productos obtenidos presentan unas características microbiológicas aceptables.

Por otra parte, se ha estudiado la aplicación de un proceso hidrolítico sobre sangre entera o sobre la fracción celular. Los tratamientos hidrolíticos estudiados aplicados sobre sangre entera, utilizando las enzimas Alcalasa y Flavourzyme y seguidos de una decoloración con peróxido, han demostrado no ser suficientemente eficaces para la obtención de un producto descolorado, por lo que se ha descartado su utilización.

Por otro lado, se han obtenido mejores resultados al aplicar un proceso de hidrólisis y decoloración en la fracción celular por separado, descartando la fracción plasmática que ya dispone de una gran variedad de aplicaciones en la industria alimentaria. En este proceso, se ha llevado a cabo una hidrólisis mediante la enzima Neutrasa en combinación con Flavourzyme, o sólo utilizando Flavourzyme, seguida de una posterior decoloración mediante peróxido de hidrógeno. El segundo proceso, utilizando una sola enzima, ha demostrado los mejores resultados, consiguiendo un producto descolorado con un 27% de grado de hidrólisis, sin llegar a romper las subunidades de la hemoglobina. Mediante la deshidratación por

atomización de la fracción sobrenadante descolorada, se obtiene un polvo soluble con una coloración marrón clara-beige y un contenido proteico mínimo del 85 %, lo que le convierte en una opción muy interesante para ser utilizada como ingrediente alimentario. A pesar de la obtención de estos buenos resultados, el proceso estudiado ha presentado un bajo rendimiento, recuperando sólo un 30-50% de la proteína de la fracción tratada, lo que supone una importante limitación para la implementación industrial, especialmente si no se da valor a la fracción insoluble no descolorada descartada. Así, se debería llevar a cabo un estudio más exhaustivo tanto del proceso de hidrólisis como del producto obtenido para estudiar su viabilidad o bien, por otra parte, buscar métodos hidrolíticos de procesado alternativos siguiendo la misma línea de estudio.

Es necesario continuar en el estudio de nuevas tecnologías innovadoras que permitan el procesamiento y valorización de la sangre, así como de otros subproductos animales que se generan en los mataderos, para encontrar soluciones destinadas a la obtención de ingredientes nutricionales y/o tecno-funcionales destinados a la alimentación humana y animal, pero también aplicaciones en otros sectores industriales, con el objetivo final de alcanzar el objetivo de residuo cero, en un contexto de bioeconomía circular y encarando el futuro del sector cárnico y la industria alimentaria hacia un desarrollo más sostenible.

SUMMARY

Global forecasts of an impending shortage of animal protein for human consumption have led to the search for new sources of dietary protein, either from alternative plant, fungal or insect sources, or from by-products of the food industry. Blood generated in industrial slaughterhouses represents an important by-product of the meat industry due to the large volumes generated. In general, it is not fully utilised despite its high nutritional properties, as it contains a high percentage of protein and a large amount of compounds of high interest in the food industry. In addition, the blood fractions proteins also have very good technological properties that justify their valorisation. The search for a process to transform this blood into a food products would not only provide a new source to meet the growing demand for protein, but would also make it possible to reduce the costs of managing this type of by-product treated as waste and the environmental problems associated with it, in order to achieve sustainable processes based on a circular economy model in the meat industry.

The main objective of this work has been the search for a process based on the decolourisation of haemoglobin to transform the blood from industrial slaughterhouses into a protein concentrate suitable for animal and human consumption, contributing to the design and start-up of a demonstrative pilot plant to scale up and implement the selected processes at industrial level.

This work is part of an agreement between the Food Technology research group of the Institute of Agri-Food Technology (INTEA) of the University of Girona (UdG) and the company Talleres Azuara S.L. (Valls, Tarragona), in parallel with the SMI Horizon 2020 research and innovation programme of the European Union (EU) with no. 766747 and title "Innovative processing plant for the optimal production of Hydrolysed and Discoloured Protein (PHD)".

To obtain this blood-derived protein concentrate, different processes have been applied on whole blood or on the cellular fraction, after recovering the plasma separately, which have in common the use of hydrogen peroxide as a bleaching agent for haemoglobin, the molecule that confers the characteristic colour to blood, from intense red to dark brown in its oxidised state. In order to obtain a product suitable for human consumption, the recommendations for the use of peroxide of a report by the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN, 2011) have been taken into account, with a maximum exposure of blood to this technological coadjuvant at a concentration of 0,75 % (w/v) for 30 minutes on whole blood.

Firstly, two non-proteolytic processes have been studied based on the precipitation and insolubilisation of whole blood proteins by acidification or by applying a thermal process, followed by a peroxide decolourisation process. The first process, based on the acid precipitation, described and patented by Florido (2008), makes it possible to obtain a stable powdered product with 93.42% protein and a brown or

ochre colour depending on the amount of peroxide used in the decolourisation process and the temperature applied during this process. This product is suitable for animal consumption, but not for human consumption, as the concentrations of peroxide necessary to obtain a product with a sufficient degree of decolourisation exceed the recommended dose for use as a food ingredient.

The second process, based on thermal precipitation of the proteins, prior to the peroxide treatment, allows obtaining a powder product suitable for human consumption with higher decolourisation and higher protein content (94,9 %) using blood treatment conditions at 90 °C for 10 min and subsequent decolourisation with 0,75% peroxide for 30 min. On one hand, the proof-of-concept tests on emulsified-type meat products have shown that the low functionality of the product, due to its insolubility and a still too intense brown colouring, make it not sufficiently interesting for this use. On the other hand, interesting results have been obtained in the use of this ingredient for the production of protein biscuits, which could be a promising application as a source of protein and heme iron.

In order to produce these two products on an industrial scale, a pilot demonstration plant was designed and built in a industrial slaughterhouse, in which technical (mixed with waste and with high bacteriological contamination) and hygienical porcine blood (collected under hygienic conditions) have been processed in an automated way in two different lines to obtain products suitable for animal and human consumption, respectively. In this thesis, we have contributed to the improvement of some stages of the process, we have characterised the products obtained and we have also designed the HACCP system. Both obtained products have acceptable microbiological characteristics.

Secondly, the application of a hydrolytic process on whole blood or on the cellular fraction has been studied. The hydrolytic treatments studied applied on whole blood, using the enzymes Alcalase and Flavourzyme and followed by decolourisation with peroxide, have proved not to be sufficiently effective to obtain a product with a sufficient degree of discolouration, so their use has been discarded.

Better results have been obtained by applying hydrolysis and decolourisation process on the cellular fraction separately, discarding the plasma fraction which already has a wide variety of applications in the food industry. In this process, hydrolysis has been carried out using the enzyme Neutrasa in combination with Flavourzyme, or using Flavourzyme alone, followed by subsequent decolourisation using hydrogen peroxide. The second process, using a single enzyme, has shown the best results, achieving a decolourised product with a 27 % degree of hydrolysis, without breaking the haemoglobin subunits. Spray drying of the decolourised supernatant fraction allows to obtain a soluble powder with a light brown-beige colour and with a minimum protein content of 85%, which makes it a very interesting option for use as a food ingredient. Despite obtaining these good results, the studied process has presented a low yield, recovering only 30-50 % of the protein of the treated fraction, which is an important limitation for implementation at industrial level, especially if no added value is given to the discarded non-discoloured insoluble fraction. Thus, a more exhaustive study of both hydrolysis process and a characterisation of the obtained products

should be carried out to study its viability or to look for alternative hydrolytic processing methods following the same research line.

It is necessary to continue the research of new innovative technologies that allow the processing and recovery of blood, as well as other animal by-products generated in slaughterhouses, to find solutions for obtaining nutritional and/or techno-functional ingredients for human food and animal feed, but also applications in other industrial sectors, with the ultimate goal of achieving the zero waste objective, in a context of circular bioeconomy and facing the future of the meat sector and the food industry towards a more sustainable development.

CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ GENERAL

CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ GENERAL

1.1. CONTEXTUALITZACIÓ

El treball realitzat en aquesta tesi es desenvolupa en el marc d'un conveni entre el grup de recerca de Tecnologia Alimentària de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA) de la Universitat de Girona (UdG) i l'empresa Talleres Azuara S.L. (Valls, Tarragona). A partir d'aquest es va demanar un ajut al programa de Doctorats industrials de l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya, concedit en la convocatòria DI-2016 i número d'expedient 2016 DI 070, que porta per títol "Desenvolupament del procés industrial d'un concentrat proteic d'alt valor nutritiu a partir de sang procedent d'escorxadors".

Talleres Azuara S.L. és una societat creada el 1980 a Catalunya, amb base a Valls (Tarragona), dedicada al manteniment industrial mecànic. Actualment basa la seva activitat en el manteniment i distribució de maquinària per la indústria alimentària i el desenvolupament i construcció d'instal·lacions industrials. Durant el 2016 decideix expandir el seu mercat treballant en un nou projecte anomenat *Hydroblood*, a partir del qual es busca desenvolupar una planta industrial de processament de sang de porc on s'optimitzi el procés descrit per la patent amb nº ES-2289937_B1 que defineix un "procés per la recollida i transformació de la sang en una proteïna hidrolitzada a partir de sang d'animals d'abast obtenint-se Proteïna Hidrolitzada de Sang (PHS)". És en aquest context que l'empresa signa un conveni de col·laboració amb l'Institut de Tecnologia Agroalimentària de la UdG.

El grup de Tecnologia Alimentària de la UdG, creat l'any 1996, va iniciar la seva investigació centrant-se en la problemàtica que comporta la sang produïda als escorxadors industrials i buscant possibles vies de valorització d'aquesta amb aplicacions en la indústria alimentària. Tots aquests estudis han estat finançats a partir dels diferents projectes d'investigació que es mostren a la Taula 1.1.

Durant aquest temps el grup ha dut a terme la caracterització fisicoquímica, microbiològica i funcional a nivell tecnològic de la sang de porc i les seves fraccions; s'ha estudiat la fracció plasmàtica i la fracció cel·lular deshidratades per atomització (Carretero i Parés, 1997), el plasma i l'hemoglobina concentrats i tractats o no mitjançant altes pressions hidrostàtiques (Parés *et al.*, 1999 i 2001; Parés i Ledward, 2001; Toldrà *et al.*, 2002 i 2004), la fracció cel·lular hidrolitzada (Toldrà *et al.*, 2002, 2011) i el fraccionament d'algunes proteïnes plasmàtiques (Dàvila *et al.*, 2006, 2007a, 2007b i 2007c). A més a més, s'ha estudiat el tractament del plasma amb transglutaminasa microbiana (MTGasa), aïllada o en combinació amb altres agents reductors o altes pressions amb l'objectiu de millorar-ne les propietats funcionals (Saguer *et al.*, 2007a i 2007b; Toldrà *et al.*, 2008).

Des del 2004 la recerca es va enfocar en l'obtenció d'ingredients alimentaris funcionals a partir de l'aprofitament de les proteïnes de la sang (Dàvila *et al.*, 2006, 2007a, 2007b i 2007c; Fort *et al.*, 2006, 2008

i 2009; Saguer *et al.*, 2004 i 2007) i d'hemoderivats utilitzats en formulació de productes carnis (Hurtado *et al.*, 2012; Parés *et al.*, 2012 i 2014). Amb l'objectiu d'obtenir un producte primari estable i amb bona qualitat, a partir del qual obtenir-ne productes d'interès, també s'ha estudiat la bioconservació de la sang mitjançant bacteris de l'àcid làctic (Dàvila *et al.*, 2006; Saguer *et al.*, 2007; Toldrà *et al.* 2008; Zamora *et al.*, 2006). Per altra banda, també ha estudiat la fracció cel·lular de la sang, valorant un possible ús d'aquesta com a colorant vermell estable a base d'hemoglobina i mitjançant l'addició d'agents quelants i/o antioxidants (Saguer *et al.*, 2003; Salvador *et al.*, 2009) o obtenint hidrolitzats d'hemoglobina descolorada (Toldrà *et al.*, 2005a, 2005b i 2011).

En els últims anys, el grup ha estès la seva recerca en l'obtenció d'ingredients tecno-funcionals a partir d'altres co-productes carnis d'escorxadors com són la melsa, el fetge o el cor d'origen porcí (Parés *et al.*, 2020; Toldrà *et al.*, 2019b i 2020), juntament amb els estudis de descoloració de la sang i les seves fraccions desenvolupats en col·laboració amb Talleres Azuara, S. L.

Taula 1.1. Projectes d'investigació del grup de Tecnologia Alimentària de la Universitat de Girona, centrats en l'aprofitament i revaloració de la sang d'escorxadors i les seves fraccions.

Referència	Títol Projecte	Entitat finançadora	Inici	Finalització
ALI 96-0913	Millora de la qualitat de la sang de porc d'escorxadors Industrials.	CICYT	1996	1998
UdG 98/177	Aplicació de bioprotecció a la sang d'escorxadors industrials	Convocatòria 1998 per projectes d'investigació de la UdG. Pla d'investigació de la Universitat de Girona	1999	2000
ALI 99-1055-C02-01	Desenvolupament d'ingredients alimentaris a partir de fraccions de sang de porc sotmeses a alta pressió hidrostàtica.	CICYT	1999	2001
AGL 2001-0888	Desenvolupament d'un sistema de bioconservació per la sang de porc d'escorxadors industrials. Aplicació de la bioconservació i l'alta pressió hidrostàtica com a mètodes combinats.	Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICYT)	2001	2004
AGL2004-06077	Aprofitament integral de la sang de porc d'escorxadors.	Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICYT)	2004	2007
AGL2007-60917/ALI	Utilització d'hemoderivats com a ingredients funcionals en la formulació d'aliments.	Ministerio de Educación y Ciencia (MEC)	2012	2013
SING11/18	Fraccionament i hidròlisi de proteïnes de la sang.	Universitat de Girona (UdG)	2012	2013
56 21 03 2016 3A Grups Operatius	Valorització de productes porcins de baix valor comercial.	Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural (DACC) de la Generalitat de Catalunya	2017	2019
RTA2017-00024-C04-02	Desenvolupament d'ingredients tecnofuncionals a partir de co-productes d'origen animal.	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)	2018	2020

Paral·lelament, l'empresa Talleres Azuara, S.L. va presentar, en col·laboració amb l'assessoria d'enginyers Ateknea Solutions Catalonia, S.A. (Cornellà de Llobregat, Barcelona), una proposta pel programa d'investigació i innovació SMI *Horizon 2020* de la Unió Europea, que va ser aprovada amb data d'inici de

maig del 2017 amb nº 766747 i títol “Planta de processament innovadora per la producció òptima de Proteïna Hidrolitzada i Descolorada (PHD)”.

L’objectiu proposat en aquest projecte, amb data prevista de finalització al gener del 2018, era dur al mercat una solució innovadora per reduir l’impacte ambiental de la sang produïda als escorxadors, tot optimitzant un procés de producció de proteïnes pel consum humà i animal de manera fiable i rendible. Per aconseguir-ho, es buscava desenvolupar una planta pilot de producció per poder demostrar als possibles clients el potencial de la tecnologia. És en el marc d’aquest projecte i el conveni entre Talleres Azuara i el grup de recerca de Tecnologia Alimentària de l’INTEA de la UdG que s’ha desenvolupat aquesta tesi doctoral.

1.2. SECTOR CARNI, SUBPRODUCTES I SOSTENIBILITAT

1.2.1. Sector carni i altres fonts de proteïna alternativa

Només a Catalunya, durant el 2018, es van obtenir aproximadament 2,5 milions de tones de carn de sacrifici en els escorxadors, dels quals 1,9 milions de tones corresponen a porcí, 390.000 tones a aviram i 134.000 tones a boví (Idescat, 2019). Aquestes dades representen el 35% del total produït a l'estat espanyol, amb unes xifres totals de 7 milions de tones de carn (Agrodigital, 2018).

Segons la *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) la producció del sector carni a nivell mundial s'estima en valors de 336,5 milions de tones durant el 2019. D'aquests, 128,4 milions corresponen a aviram, 115,6 milions a carn de porc, 71,6 a carn bovina i 15,3 a carn ovina. Aquesta producció representa una disminució del 0,2% respecte el 2018, trencant la tendència a l'augment de la producció de carn des de 1960 (Figura 1.1). Aquesta disminució és conseqüència del virus de la pesta porcina africana (VPPA) que va afectar greument la producció de carn porcina a la Xina durant el 2019. Aquest fet ha implicat un augment en la demanda de carn porcina, bovina i d'aviram, especialment des de Xina, el que, a la vegada, ha provocat un augment dels preus de la carn (FAO, 2019).

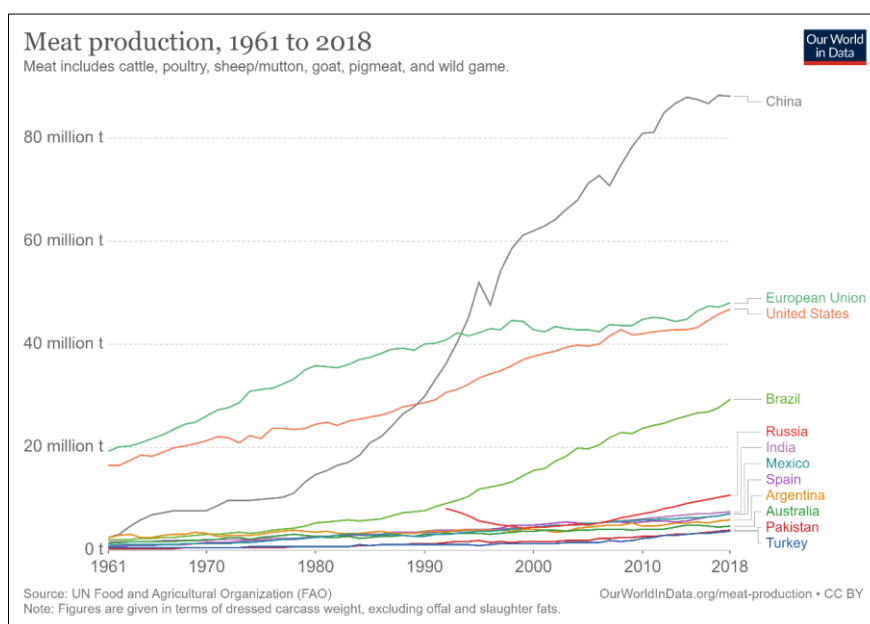


Figura 1.1. Producció càrnia dels principals productors a nivell mundial. Dades expressades en milions de tones de carn des del 1961 fins al 2018. Figura extreta de <https://ourworldindata.org/meat-production>.

S'estima que, a nivell mundial, el consum de carn augmentarà fins a un 14 % de cares al 2030 (Nacions Unides, 2023), lligat a un augment del consum en els països en desenvolupament, amb un increment de 25,5 a 37 kg per persona (FAO, 2020a), mentre que en els països industrialitzats aquest consum

s'estabilitzarà a conseqüència dels canvis de preferència dels consumidors i a un menor creixement poblacional (Nacions Unides, 2023).

Recentment, al novembre de 2022 la població mundial va arribar als 8000 milions. Les últimes projeccions de les Nacions Unides, suggereixen que el nombre d'habitants del planeta podria arribar al voltant de 8500 milions el 2030 i 9700 milions el 2050. Es projecta que arribarà a un pic d'uns 10.400 milions de persones durant la dècada del 2080 i que romandrà en aquest nivell fins al 2100 (Nacions Unides, 2022). La previsió de l'increment del 35 % de la població mundial durant els següents 30 anys, juntament amb l'increment de consum proteic per càpita, comporta passar d'una demanda de 200 milions de tones de proteïna actuals a 470 de cares al 2050 (FAO, 2009 i 2013), el que fa que sigui imprescindible optimitzar al màxim els processos industrials alimentaris i donar valor a totes les fonts de proteïna existents. Addicionalment, en una època de disminució dels recursos, sobretot en zones amb alta densitat de població, es requereixen alternatives sostenibles de fonts de proteïna per l'alimentació. Actualment, s'està treballant en opcions alternatives disponibles en productes tant innovadors com són els anàlegs de productes carnis a base de proteïna vegetal que volen emular el teixit animal, o a partir de proteïna procedent d'algues, proteïna fúngica, o altres proteïnes alternatives emergents com la dels insectes (Henchion *et al.*, 2017; Boukid i Gagaoua, 2022). Per altra banda, també s'està desenvolupant la obtenció de carn cultivada, carn "artificial" o teixit muscular cultivat *in vitro*, obtingut a partir de cèl·lules mare extreïdes dels animals, per produir carn de forma més sostenible.

En general, s'observa una clara disposició dels consumidors cap a una alimentació més saludable, sobretot degut als *inputs* rebuts durant els últims anys referent a l'augment de malalties relacionades amb la mala nutrició. Això ha fet que cada vegada més, el consumidor busqui productes considerats com a més sans i més sostenibles, observant-se, sobretot en les noves generacions, un augment en el percentatge de gent que es defineix com a vegà, vegetarià, pisciterià i, sobretot, flexiterià, que fa referència a la disminució del consum de carn (FMI, 2019). Aquestes tendències promociónen el consum de menys carn i més productes d'origen vegetal, incrementant el consum de productes de tipus *plant-based*, aliments més senzills que disposen d'"etiqueta blanca" (productes elaborats amb un nombre mínim d'ingredients), poc processats, baixos en sal o greixos, amb ingredients funcionals i/o productes que al·leguen complir amb les necessitats nutricionals bàsiques necessàries per una vida saludable.

La proteïna vegetal com a base d'elaborats alimentaris sorgeix arrel d'aquestes noves preocupacions de la població, donant èmfasi a l'alimentació saludable però, a més, a la sostenibilitat dels productes que consumeixen. Els productes *plant-based*, amb una variada gamma disponible en el mercat des de fa un temps, continuen presentant reptes per adaptar-se als requeriments del consumidor doncs, tot i tractar-se de productes elaborats a partir de proteïna vegetal, solen estar compostos per un llarg nombre d'ingredients, convertint-los en productes ultra-processats sobretot en els productes que volen emular el teixit animal. Les principals fonts de proteïna vegetal utilitzades són: la proteïna de llegums, com la soja o el pèsol, amb la problemàtica del seu gust amargant i astringent característic. A més, aquestes fonts de

proteïna són deficitàries en alguns tipus d'aminoàcids, però es pot millorar en combinació amb l'arròs. També es pot utilitzar proteïna a partir de llavors oleaginoses, amb un alt contingut de fibra, com la soja, colza, llavors de cotó, gira-sol o cacauets; de cereals, que contenen un baix contingut proteic a més de no presentar un bon equilibri aminoacídic; proteïna fúngica, que conté tots els aminoàcids essencials necessaris i és baixa en colesterol i àcids grassos saturats, però per contra és deficitària en ferro i vitamina B12 en comparació amb la carn; proteïna a partir d'algues, molt semblant a la proteïna vegetal a nivell nutricional però presenta certes dificultats de cultiu i extracció a partir dels mètodes utilitzats actualment, el que n'augmenta considerablement el cost (Asgar *et al.*, 2010; Henchion *et al.*, 2017).

Per altra banda, una altra font de proteïna que cada vegada sembla cobrar més rellevància és la proteïna d'insectes, una opció ecològicament sostenible ja que necessita de menys terra de cultiu, aigua i aliment consumits. La entomofàgia, o consum d'insectes, és una pràctica habitual en regions com l'Àsia, Àfrica o Amèrica llatina, on se'n consumeix més de 1900 espècies, però no és habitual en molts països industrialitzats, pel que no s'ha considerat com una opció fins fa relativament poc temps. La FAO (2022) en defensa la seva viabilitat degut a tractar-se d'ingredients amb molt bones característiques nutritives; aquests presenten un alt percentatge proteic (fins un 40-50 % del seu contingut) i un alt contingut en àcids grassos i omega 3, a més a més de ser rics en fibra i micronutrients (ferro, coure, magnesi, fòsfor, seleni i zinc) (FAO, 2020c). Tot i presentar aquestes característiques d'alt interès, al tractar-se d'un aliment de reduïdes dimensions, caldria consumir-ne una gran quantitat per poder adquirir la ingesta diària necessària per un adult, o caldria consumir-ho en format processat (com els extractes proteics o en forma de farines). Fins el 2018 Europa no va regular-ne el consum general, aplicant el Reglament (UE) 2015/2283 anteriorment publicat sobre el consum de nous aliments, a partir del qual s'han autoritzat fins a 3 espècies d'insectes comestibles mitjançant els Reglaments d'execució (UE) 2021/882, 2022/169, 2021/1975 i 2022/188. Tot i això, molts països desenvolupats no acostumats al seu consum encara presenten una important reticència cultural a la introducció d'aquests més enllà d'un consum molt puntual.

Altrament, la problemàtica de la falta de proteïna es pot enfocar des d'un punt de vista diferent; una possible solució és aplicar el màxim d'aprofitament en tota la cadena de producció animal, buscant un segon ús als productes de rebuig, el que es coneix com a bioeconomia circular, que s'inclou en el marc d'un desenvolupament sostenible. Aquesta, pretén passar d'un model de consum lineal a un de circular, reduint el consum de recursos primaris i potenciant la reutilització de materials considerats com a rebuig que sorgeixen dels diferents sectors que es deriven de l'activitat humana. Així, s'aconsegueix minimitzar el cost ambiental dels processos productius i dels productes durant el seu cicle de vida, donant un segon ús a les matèries primeres, que poden ser reincorporades en els mateixos processos productius o utilitzades en processos alternatius. Aquest re-processat permet disminuir la necessitat de generar més recursos primaris i la disminució en la generació de nous residus (Kayikci *et al.*, 2020; Narasimmali i Ramasamy, 2020). Per incentivar aquest tipus d'activitat, la Comissió Europea ha creat un Pla d'acció dins del Pacte Verd Europeu per dur a terme un creixement industrial sostenible i ecològic, no només acompanyant a les empreses cap

a models d'economia circular, sinó també educant i informant a la població sobre reparabilitat i durabilitat dels productes de consum (Comissió Europea, 2020).

Els processos associats a la indústria càrnia provoquen un increment en les emissions de gas en els camps de cultiu i en l'ús d'aigua potable. Així, un dels majors reptes d'aquest sector és el de produir carn de manera que es redueixi l'impacte ambiental, però que aquesta producció sigui capaç d'abastir les necessitats mundials actuals i futures de proteïna animal. En aquest context, és imprescindible aprofitar la totalitat dels animals sacrificats per obtenir el màxim de proteïna alimentària disminuint l'impacte de la producció.

L'economia circular aplicada en el sector de la ramaderia permet obtenir un major rendiment de cada procés implicat en el processat dels animals, el que comporta una major sostenibilitat de la cadena alimentària. A més a més, l'aprofitament de biomassa residual permet dur a terme una economia de baix carboni fòssil, doncs s'evita el cost associat a la generació d'aquests recursos des d'un inici de la cadena, a més d'evitar el cost associat a la gestió d'eliminar-los (Santagata *et al.*, 2017).

1.2.2. Subproductes carnis

Els productes obtinguts del sacrifici d'animals de granja en escorxadors es classifiquen en dos grups: els productes principals destinats al consum i els productes secundaris com són els residus i els subproductes. Aquests últims consisteixen en les parts de l'animal derivades del sacrifici difícils d'aprofitar, tot i el seu valor potencial, degut a la naturalesa d'aquests, o a aspectes econòmics que derivarien de la seva transformació. La proporció d'aquests subproductes varia, sobretot, en funció de l'espècie, edat, condició de cria i alimentació de l'animal. Es distingeix entre els subproductes comestibles, com per exemple la sang, fetge, pulmons, cor, etc; i els no comestibles, com serien les plomes, banyes, carn en mal estat o infectada, etc. Aquests subproductes, que poden arribar a constituir el 50 % del pes de l'animal (Ockerman & Hansen, 1988), representen 18 milions de tones per any a la Unió Europea (Kowalski & Krupa-Łuczec, 2007) i comporten un augment en la despesa econòmica total dels escorxadors degut a l'alt cost que requereix eliminar-los, pel que l'aprofitament i revaloració d'aquests és un objectiu clau en el sector carni. A la Taula 1.2 es poden observar algunes de les aplicacions actuals dels subproductes carnis.

Per poder aprofitar o reutilitzar aquests subproductes, ha estat clau la cerca de tecnologies que permetessin obtenir uns productes aptes per la seva utilització o consum. Un dels subproductes que representa una major font proteica és la sang, producte poc utilitzat tot i recollir-se en grans quantitats dins del sector carni. Degut a la seva composició, amb un alt valor nutritiu, presenta grans dificultats de conservació, el que en perjudica la reutilització per fins alimentaris.

Taula 1.2. Principals subproductes de la indústria càrnia i possibles aplicacions.

Subproducte	Aplicacions
Sang	Ingredients pel consum humà i animal, fertilitzants, usos varis en laboratori de recerca científica, farmacèutica, veterinària, ús industrial, etc.
Bilis	Detergents i farmacèutica.
Ossos	Aglutinant, alimentació animal, ús en medicina, estris varis (agulles, mànecs, daus, taulers...), font mineral (calci i fòsfor), adobs, etc.
Cervell i espina dorsal	Esteroides, colesterol, lecitina i cefalina.
Greixos	Anticongelant, alimentació animal, detergents, biodièsel, cosmètica, fertilitzants, medicina, farmacèutica, pintures, ús industrial, etc.
Glàndules	Adrenal: cortisona i epinefrina; Ronyó: farmacèutica; Fetge: heparina, extracte de fetge, factor intrínsec i vitamina B12; Pàncrees: quimotripsina, diàstasi, glucosa, insulina, pancreatina i tripsina; Pituitària: corticotropina, hormona antidiurètica, prolactina i vasopressina; Melsa: alimentació i ferritina; Timus: timosina i altres, extracte de timus i factor humoral tímic; Tiroides: tirotropina.
Retalls i pells	Estris varis (roba, maletes, taulers, tapisseria...), adhesius, gelatina i indústria farmacèutica.
Pèl, llana, ungles, banyes, plomes i peülles	Estris varis (pinzells, teixits, poms, pintes, botons...), proteïnes hidrolitzades, materials aïllants, filtres d'aire, etc.
Cor	Vàlvules per transplantaments.
Intestins	Alimentació (embotits), medicina, estris varis (instruments musicals, raquetes...) i heparina.
Pulmons	Heparina i alimentació.
Restes de carn amb ossos	Piròlisi, incineració, formigó i asfalt.
Ovaris	Estrògens.
Estómac i tripes	Pepsina i quall.
Tràquees	Sulfat de condroitina.

Font: adaptat de Leoci (2014) i Toldrà (2002).

Anualment es realitza un congrés organitzat per l'Associació Europea de Indústries Transformadores de Subproductes Animals (EFPPA) per tractar aquesta problemàtica. Durant el congrés a Barcelona del 2018 es va remarcar Espanya com el segon productor europeu de subproductes animals, després d'Alemanya, produint fins a 830.000 tones de subproductes de tipus farines i greixos animals no aptes pel consum humà. També es va posar de manifest la dificultat d'exportació d'aquests subproductes degut a la prohibició d'utilitzar-se en l'alimentació de remugants i animals monogàstrics de forma general segons la legislació Europea, el que comporta que, actualment, només s'exporti proteïna animal transformada d'espècies porcines i aviram a Tailàndia, Xile, Turquia, Israel, Sudàfrica, Sèrbia i Colòmbia (ANAGRASA, 2018).

Així, la valorització de subproductes no només depèn d'una conscienciació social encarada a l'economia circular o a la cerca de processos tecnològics que permetin el reaprofitament d'aquestes matèries primeres, sinó també a canvis legislatius que promoguin el tractament i la valorització d'aquests subproductes.

1.2.3. Legislació

Els subproductes carnis aptes pel consum animal es troben regulats pel Reglament (CE) nº 1774/2002 (modificat pel Reglament (CE) nº 1069/2009) i s'engloben en la categoria 3 que inclou "parts d'animals sacrificats que es consideren aptes pel consum humà de conformitat amb la normativa comunitària, però que no es destinen a aquest fi per motius comercials" i "parts d'animals sacrificats que s'hagin rebutjat per no ser aptes pel consum humà, però que no presenten cap signe de malaltia transmissible als éssers humans o als animals" entre d'altres.

Els subproductes carnis destinats al consum animal es regeixen pel Reglament (CE) nº 142/2011 que estableix les disposicions d'aplicació del Reglament (CE) nº 1069/2009 pel que s'especifiquen les normes sanitàries aplicables als subproductes animals i productes derivats no destinats al consum humà.

Els subproductes aptes destinats al consum humà no requereixen de certificació prèvia, però sí hauran de complir amb la normativa d'higiene alimentària especificada en el Reglament (CE) nº 853/2004, on s'estableixen les normes específiques d'higiene dels aliments d'origen animal, i el Reglament (CE) nº 2073/2005 que estableix els criteris microbiològics aplicables als productes alimentaris.

El tractament dels subproductes com a residus en les indústries càrniques comporta un gran impacte econòmic degut a que els processos necessaris per gestionar-ne una correcta eliminació són relativament cars. Aquesta correcta eliminació de residus per part de les indústries s'ha vist regulada a nivell legislatiu pels països i comunitats, amb l'objectiu d'evitar el gran impacte sobre el medi ambient que aquests comportaven en ser tractats de forma errònia.

Com ja s'ha comentat anteriorment, en els últims anys els esforços s'han redirigit cap a l'economia circular o residu zero, el que busca que tots els residus, en aquest cas els subproductes de la indústria càrnia, tinguin una segona vida útil com a matèries primeres per així, a més d'eliminar el perill ambiental que comporten quan no són tractats correctament, obtenir-ne un benefici econòmic i donar un major cicle de vida als recursos naturals dels que es disposa.

La producció de carn comporta un impacte significatiu en el medi ambient on el sòl i l'aigua representen uns bens escassos. Aquest impacte no es deu només als residus generats en la cria i sacrifici del bestiar, sinó també a l'impacte hídric i empremta de carboni que comporta; si es valora el volum d'aigua utilitzada (en m³) per tona d'animal de cria, s'observen uns valors de 3831 m³/t en porcí, 7477 en boví i 3364 en aviram (Mekonnen i Hoekstra, 2012). Si es valora el consum hídric per cada caloría de producte obtinguda, s'observa que la carn de porc presenta un índex de 2,15, la carn de vedella un 10,19 i la carn de pollastre 3, respecte als menors valors dels cultius de cereals (0,51) o tubercles (0,47) (Mekonnen i Hoekstra, 2011; Mulet, 2021). Aquests són consums molt elevats que es veuen incrementats quan es calcula el consum per kg de producte obtingut, pel que és de vital importància aconseguir un millor aprofitament del bestiar

sacri ficat, reduint al màxim tots els subproductes generats durant el procés i donant un millor profit als recursos gastats.

Actualment, ja es dóna ús a una part dels subproductes existents, tot i que se'n segueix descartant una gran quantitat. Alguns dels usos per aquests són:

- ✓ Alimentació: els subproductes són tractats mitjançant diferents processos per aprofitar-ne el seu contingut nutricional i així obtenir-ne ingredients pel consum animal o humà (Ockerman *et al.*, 1998; Gatnau *et al.*, 2001; Mora *et al.*, 2014; Toldrà *et al.*, 2016).
- ✓ Fertilitzants: es realitzen tractaments de transformació com la hidròlisi, que permet obtenir un producte amb un elevat contingut de nitrogen bio-disponible que es pot utilitzar en l'adobament de plantes i cultius (Irshad i Sharma, 2015).
- ✓ Plàstics: alguns subproductes són utilitzats com a components de plàstics, gomes, pintures, etc (Pearl, 2004).
- ✓ Productes de pell: la pell dels animals de sacrifici és àmpliament utilitzada en elaboració de sabates, bosses, roba diversa, automobilística o mobiliari domèstic (Ockerman i Basu, 2004; Alao *et al.*, 2017).
- ✓ Farmacèutica: obtenció de biomaterial per utilitzar en operacions o de substàncies utilitzades en farmacologia (Nollet i Toldrà, 2011; Jayathilakan *et al.*, 2012; Ferraro *et al.*, 2016).
- ✓ Biocombustibles: generació de biodièsel o biogàs (Baladincz i Hancsók, 2015; Adewale *et al.*, 2016; Dobbelaere, 2017).

1.3. LA SANG D'ESCORXADOR

La sang dels escorxadors representa el subproducte carni amb més valor nutritiu degut al seu alt contingut proteic i a que conté gran quantitat de compostos d'alt interès en la indústria alimentària (Kowalski, 2007; Piot *et al.*, 1986). Representa un 4% en pes dels animals o un 6-7% sobre el contingut de carn magra (Wismer-Pedersen, 1988) i se'n recullen milers de tones per any que, bàsicament, s'utilitzen en fins de poc valor o, directament, acaben sent descartades (Anderson i Yu, 2003).

Segons el MAPA (2019), la producció de porc a Espanya durant el 2019 va ser de més de 30 milions de caps, el que equival a 100 milions de litres de sang, considerant que s'obté una mitjana de 3,5 L per animal (Toldrà *et al.*, 2019a). Degut a aquests grans volums obtinguts, la sang representa el subproducte més problemàtic de la indústria càrnia; presenta un alt potencial contaminant quan s'avoca al medi ambient, contenint un nitrogen total d'aproximadament 30 g/L, una demanda química d'oxigen (DQO) de 375-400 g/L i una demanda biològica d'oxigen (DBO) de 200 g/L (Andrades, 2008; Del Hoyo *et al.*, 2008; Moure, 2003). Aquests valors excedeixen els límits legals imposats per la Directiva Europea 91/271/CEE i modificada per 98/15/CE, que estableix un màxim per la DQO de les aigües residuals procedents d'instal·lacions de depuració de 125 mg/L.

1.3.1. Característiques de la sang

La sang és el teixit connectiu líquid encarregat de transportar les substàncies d'interès (com l'oxigen i nutrients) i rebuig (metabòlits tòxics indesitjats) a través de l'organisme. Està constituïda per una fracció líquida, el plasma, que representa el 55-65 % de la sang, i la fracció cel·lular, representant el 35-45 % restant.

A la Taula 1.3 es pot observar la composició general de la sang, composta bàsicament per aigua, amb un contingut aproximat del 80 %, a més a més de ser rica en proteïna, que en representa el 18 %. Aquesta és considerada com una proteïna no al·lèrgica, si es compara amb altres proteïnes com les làcties o de la soja (Leoci, 2014). Tant el seu contingut en greix com en sals minerals és molt baix, ambdós amb valors inferiors a l'1 %. Per altra banda, també es considera una font rica de ferro d'elevada biodisponibilitat, degut a la presència del grup hemínic de l'hemoglobina.

La composició de la sang en els animals d'abast és força similar, tot i que varia lleugerament en funció de l'espècie, ubicació geogràfica i la maduresa de l'animal sacrificat. A la Taula 1.4 es pot observar el percentatge dels components principals de la sang en les principals espècies de sacrifici (boví, porcí, oví i pollastre). Tal com es mostra, hi ha una clara diferència entre la proporció de les fraccions de la sang en boví, oví i pollastre respecte a porcí.

Taula 1.3. Composició general de la sang porcina.

	Per 100 g de sang sencera
Energia (Kcal)	81
Aigua (g)	81
Proteïna (g)	17
Hemoglobina (g)	10
Albúmina (g)	2,8
Globulina (g)	2,2
Fibrinogen (g)	0,3
Proteïnes de l'estroma (g)	1,7
Lípids totals (g)	<0,3
Hidrats de carboni (g)	Traces
Fibra (g)	0
Calci (mg)	8
Ferro (mg)	52
Magnesi (mg)	10
Sodi (mg)	207
Potassi (mg)	174
Fòsfor (mg)	74

Font: adaptat de Lynch *et al.* (2017), Toldrà *et al.* (2019a) i Valero *et al.* (2018).

Taula 1.4. Fraccions de la sang i contingut en les principals proteïnes segons espècies d'animals de sacrifici.

Espècie animal	Contingut en sang (%)		Nivells de proteïna en sang sencera (%)				Fibrinogen	Hemoglobina
	Plasma	Fracció cel·lular	Albúmina	α -globulina	β -globulina	γ -globulina		
Boví	67,45	32,55	3,61	0,51	0,53	0,63	0,60	10,30
Porcí	56,49	43,51	3,83	0,59	0,49	0,95	0,65	14,20
Oví	72,00	23,00	3,83	0,19	0,50	0,83	0,46	9,30
Pollastre	75,00	25,00	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	8,90

N/D, dada no disponible. Font: adaptat de Bah *et al.* (2013) i Sorapukdee *et al.* (2017).

Taula 1.5. Concentració dels aminoàcids essencials en la sang sencera de porc i ingesta diària recomanada (IDR) per un adult (>13 anys) segons la FAO (2007).

Aminoàcid	g/100 g proteïna	IDR adult
Histidina (His)	5,50	N/D
Isoleucina (Ile)	0,69	1,3
Leucina (Leu)	9,66	1,9
Lisina (Lys)	5,84	1,6
Metionina (Met)	0,96	1,7 (+ Cys)
Fenilalanina (Phe) + Tirosina (Tyr)	8,54	1,9
Treonina (Thr)	2,68	0,9
Valina (Val)	5,72	1,3
Total	39,59	10,6

N/D dada no disponible.

Font: adaptat de Bracho *et al.*, (2001).

Si s'observa la composició aminoacídica de la sang (Taula 1.5), es pot veure que els valors de Leucina, Lisina, Fenilalanina + Tirosina, Treonina i Valina en 100 g de proteïna superen en gran mesura la ingesta diària de referència mitjana per un adult, pel que amb tan sols la meitat de producte s'adquiriria la quantitat diària necessària d'aquests aminoàcids. Per altra banda, s'observa que la sang és deficitària en altres aminoàcids essencials, com són la Isoleucina i la Metionina, el que comporta que la sang no pugui ser

considerada una font equilibrada d'aminoàcids, tot i sí ser considerada una molt bona font de proteïna animal.

1.3.2. Sistemes de recollida de la sang

Existeixen diferents metodologies per recollir la sang als escorxadors que permeten obtenir-la amb major o menor qualitat microbiològica. Aquest és un paràmetre molt important a tenir en compte degut a l'elevada susceptibilitat de la sang al deteriorament microbiològic.

Perquè la sang es pugui utilitzar pel consum humà és necessari que un veterinari del servei oficial de veterinaris en certifiqui la viabilitat, verificant que aquesta prové d'animals sans i que s'ha recollit en condicions suficientment higièniques. Si aquestes condicions es donen, la sang es considerarà higiènica i es podrà utilitzar pel consum humà; en cas contrari, es considerarà tècnica o veterinària i només podrà ser destinada al consum animal.

Existeixen dos mètodes principals que s'utilitzen per la recollida de sang durant el sacrifici dels animals en els escorxadors:

- **Dessagnat en obert:** la sang de l'animal que cau per gravetat després del degollat és recollida en una canal i dirigida cap a un tanc refrigerat (Figura 1.2). Aquesta sang és considerada veterinària o tècnica degut a que s'obté mesclada amb altres substàncies que provenen de l'animal (orina, femtes, aigua de rentat, etc.), el que provoca que s'obtingui una matèria amb una càrrega microbiològica molt alta (Bah *et al.*, 2013; Parés *et al.*, 2011).

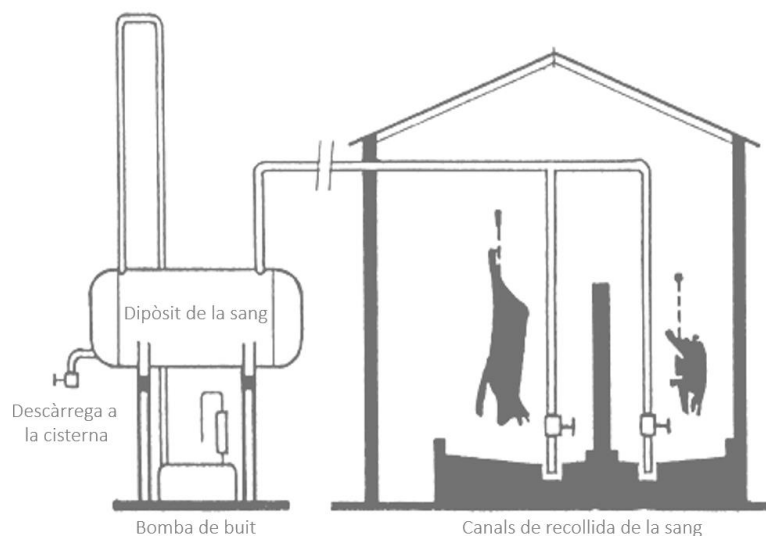


Figura 1.2. Recol·lecció de la sang d'animals de sacrifici en escorxadors mitjançant el dessagnat en obert (Figura modificada de FAO, 2020b).

Alguns escorxadors d'Espanya han aplicat un mètode similar en el que es separa la sang porcina en dues canals: en una primera canal més allunyada a l'animal es recull la sang que surt a pressió i a distància de l'animal just després del degollat i, per tant, amb una càrrega microbiana inferior; en una segona canal, que es troba sota l'animal, es recull la sang i restes que cauen de l'animal, arrossegant tota la contaminació microbiològica que comporta. Així, és possible una major optimització de la recollida de sang a partir d'una menor inversió de recursos.

- **Sistema tancat:** recollida de sang mitjançant un ganivet tubular o trocar. Aquest mètode de recollida, més lent i costós, consisteix en un degollat de l'animal mitjançant un ganivet acanalat que permet dirigir la sang directament del torrent sanguini a un dipòsit refrigerat gràcies a la gravetat o mitjançant una bomba de buit (Dàvila, 2006) (Figura 1.3). D'aquesta manera, la sang obtinguda no entra en contacte amb l'aire de l'ambient pel que és considerada higiènica, amb una baixa càrrega microbiològica i, per tant, de valor afegit superior.

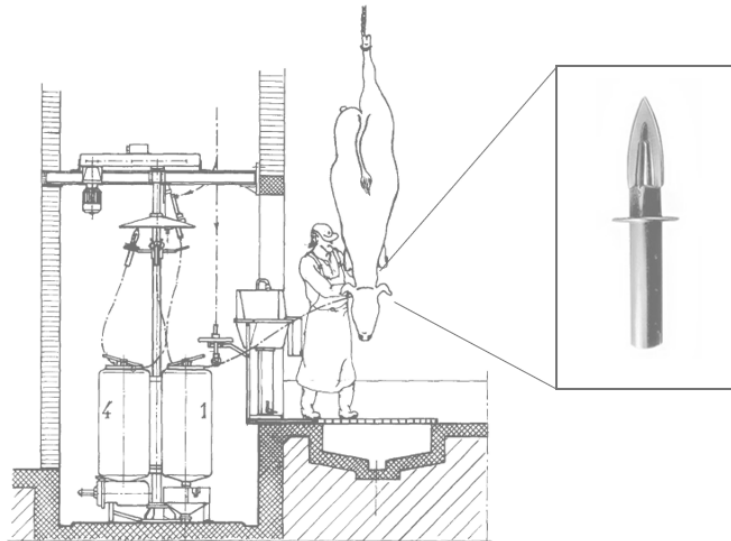


Figura 1.3. Recol·lecció de la sang d'animals de sacrifici en escorxador mitjançant un ganivet tubular o trocar (Figura modificada de Wismer- Pedersen, 1988).

La sang comença a coagular-se a partir dels 3-10 min després del sagnat, en funció de la temperatura ambient, pel que en ambdós processos de recollida és necessària l'addició d'un agent anticoagulant, que permeti conservar la sang sense que coaguli. Actualment els anticoagulants més utilitzats són el citrat sòdic, àcid cítric, polifosfat, heparina o àcid etilendiaminatetraacètic (EDTA) (Lundblad, 2003; Toldrà, 2002). Aquests actuen formant complexos amb el calci i inhibint la seva funció en la coagulació de la sang. A més, per evitar la proliferació dels microorganismes contaminants, és imprescindible refredar la sang immediatament després de la seva recollida en un bescanviador de calor. Finalment, la sang serà

conservada en un dipòsit en condicions de refrigeració (2-4 °C) i en agitació constant fins que sigui recollida o transportada pel seu posterior processament.

Tot i minimitzar el creixement bacterià mitjançant la refrigeració, Parés *et al.* (2011) van identificar soques psicròtrofes presents en la sang d'escorxadors en conservació capaces de degradar-ne la proteïna, pel que és important processar la sang en el mínim temps possible. Així, la sang ha de ser processada com a màxim 24 h després de ser recollida.

1.3.2.1. Fraccions de la sang

Les fraccions de la sang es poden obtenir mitjançant diferents procediments. La centrifugació de la sang, amb prèvia addició d'anticoagulant, permet separar el plasma de la fracció cel·lular i, duent a terme l'hemòlisi d'aquesta fracció, s'obté l'hemoglobina i l'estroma. Per altra banda, es pot dur a terme la desfibrinació de la sang a partir de la coagulació, el que succeeix de forma natural en la sang després de ser recollida i, seguit d'un procés de centrifugació, permet obtenir la fracció cel·lular i el sèrum (Figura 1.4).

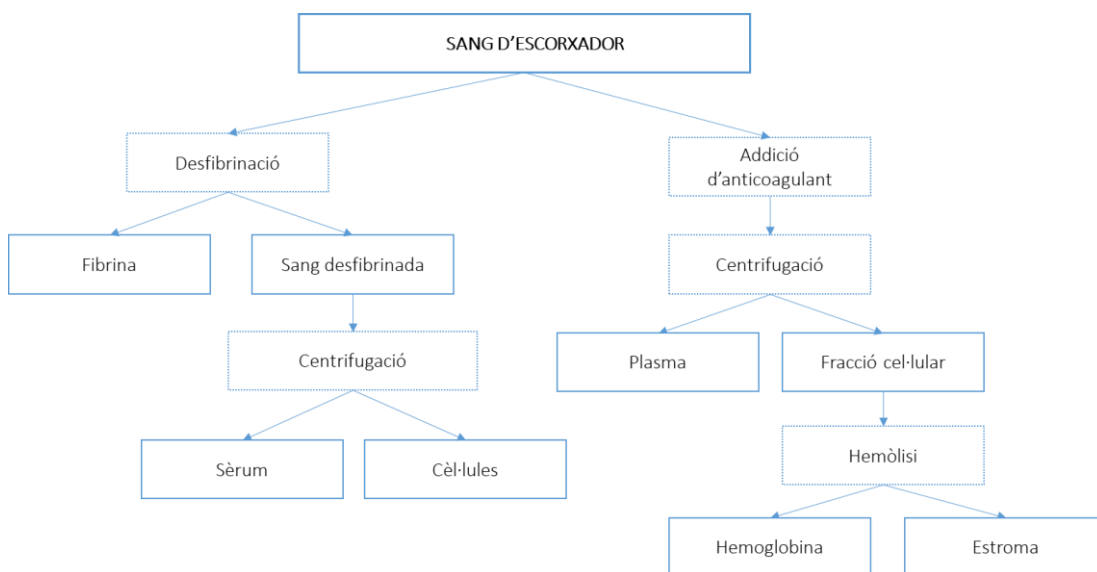


Figura 1.4. Fraccions derivades del processament de la sang d'escorxadors (Andrades, 2008; Toldrà, 2002; Toldrà *et al.*, 2019a).

A la Taula 1.6 es mostra la composició de les fraccions obtingudes a partir del processat de la sang, corresponent a la fracció cel·lular, el plasma i el sèrum.

Degut a l'alt valor nutritiu de les fraccions de la sang, és necessari conservar-les per mantenir-ne la qualitat nutricional a més a més d'assegurar-ne una seguretat alimentària. Els mètodes més utilitzats són la congelació de les fraccions i l'asseccament mitjançant atomització quan es volen utilitzar els productes en

alimentació, o a partir de mètodes químics de preservació en fins diferents als alimentaris (Lynch *et.al.*, 2017; Ockerman i Hansen 2000).

Taula 1.6. Composició de les fraccions de la sang (expressat en g/g fracció).

Component	Fracció cel·lular	Plasma	Sèrum
Aigua	60,8	90,8	91,2
Sals minerals	1,1	0,8	0,8
Greixos	0,4	0,1	0,1
Proteïnes	35,1	7,9	7,5
Albúmina	-	3,3	3,3
Fibrinogen	-	0,4	-
Globulina	-	4,2	4,2
Estroma	5,1	-	-
Hemoglobina	30,0	-	-
Altres substàncies	2,6	0,4	0,4

Font: Adaptat de Toldrà, 2002.

Fracció cel·lular

La fracció cel·lular representa entre un 35 i un 45 % de la sang; la seva composició és d'aproximadament un 61 % d'aigua i un 35 % de proteïna (Taula 1.6), formada majoritàriament per l'hemoglobina, present en els eritròcits o cèl·lules vermelles, responsables de la coloració de la sang; també conté els leucòcits (neutròfils, eosinòfils i basòfils) i les plaquetes.

Hemoglobina

La proteïna majoritària de la fracció cel·lular és l'hemoglobina (Figura 1.5) que representa un 90 % del contingut proteic d'aquesta fracció. L'hemoglobina està composta per un tetràmer de polipèptids, o globines, format per dues cadenes α i dues β , cada una amb un pes de 17 kDa, disposades en una estructura esfèrica amb un pes molecular total de 68 kDa (Wisner-Pedersen, 1988). Cada globina conté un grup de ferro hèmic, responsable de la coloració de la sang, que es pot lligar a una molècula d'oxigen i així transportar fins a 4 molècules d'oxigen.

En presència d'oxigen, la molècula de ferro de l'anell de porfirina de l'hemoglobina que es trobava en estat T (estat de tensió) s'associa a l'oxigen, esdevenint el pas de ferrohèmic a oxihemoglobina o hemoglobina oxigenada, passant a l'estat R (estat relaxat), el que li confereix la coloració vermella intensa característica de la sang (Figura 1.6). En determinades condicions, el ferro s'oxida passant de l'estat ferrós a l'estat fèrric, adoptant un canvi de color de vermell intens a marró fosc i, en aquestes condicions, l'hemoglobina perd la capacitat de lligar O_2 . Si aquesta molècula es redueix, es passa a l'estat inicial de ferrohèmic o desoxihemoglobina, amb una coloració porpra.

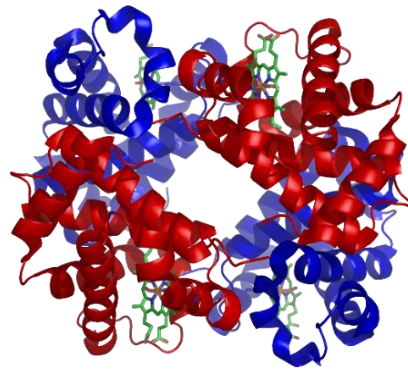


Figura 1.5. Estructura quaternària d'una molècula d'hemoglobina: es mostra les cadenes α en vermell, les cadenes β en blau i els grups hemo en verd (Figura extreta de Labmedica, 2020).

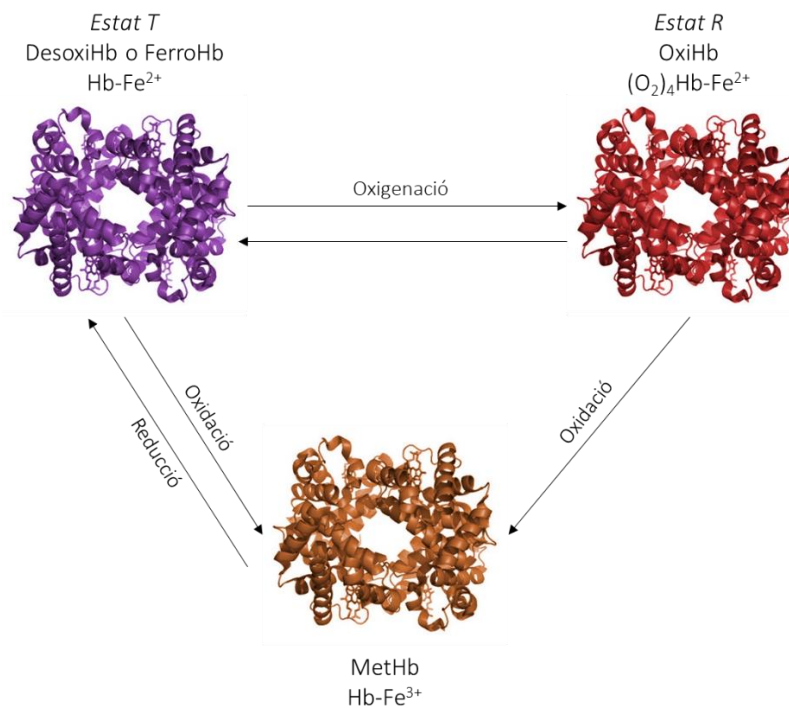


Figura 1.6. Estats de l'hemoglobina i coloració corresponent. Font: modificat a partir de LabMedica (2020).

Fracció plasmàtica

La fracció plasmàtica és la fracció líquida de la sang amb una coloració que va del groc al taronja/rosat, i que resta una vegada separades les cèl·lules o fracció corpuscular mitjançant la centrifugació, representant un 55-65 % de la sang. La qualitat del plasma vindrà determinada per les condicions de recollida de la sang i la minimització de l'hemòlisi dels eritròcits, que a la vegada ve condicionada per l'espècie de sacrifici (Gorbatov, 1998).

El plasma està compost per un 90% d'aigua i un 10% de sòlids dissolts, amb un 6-8 % representat per proteïna (Taula 1.6); les principals són l'albumina, les globulines (α_1 , α_2 , β i γ) i el fibrinogen, representant aproximadament el 56%, 40,2% i 0,6%, respectivament (Sorapukdee *et al.*, 2017). Aquestes tenen un alt valor com a proteïnes funcionals i es poden fraccionar utilitzant diferents mètodes com la precipitació mitjançant diferents solvents, mètodes de cromatografia o interacció amb medis sòlids, filtració tangencial per membranes, etc. (Del Hoyo *et al.*, 2007; Del Hoyo *et al.*, 2008; Moure *et al.*, 2003; Parés *et al.*, 2014).

Sèrum

El sèrum sanguini, format en un 90 % d'aigua (Taula 1.6), es diferencia del plasma per l'absència de fibrinogen. Aquest s'elimina sotmetent la sang a agitació suau i constant, el que permet separar els coàguls de fibrina i plaquetes, entre d'altres proteïnes relacionades amb les reaccions de coagulació (Lundblad, 2005), mentre que s'evita la coagulació de la totalitat de la sang. Aquest procés, seguit d'una centrifugació i decantació, permet obtenir el sèrum i la fracció cel·lular per separat.

1.3.2.2. Propietats funcionals

Les propietats funcionals d'un ingredient alimentari són aquelles propietats no relacionades amb el contingut nutricional que afecten d'una manera o altre a les característiques d'un l'aliment al que ha estat afegit. Així, les propietats funcionals d'un ingredient alimentari poden afectar directament a les característiques sensorials i físiques d'un aliment durant la preparació, transformació, emmagatzematge i consum d'aquest (Lynch *et al.*, 2017).

Les propietats funcionals de les proteïnes depenen de l'estructura que les conforma i es defineixen en tres grups: propietats d'hidratació dependents de les interaccions proteïna-aigua com la solubilitat, viscositat, inflament, adsorció, sorció i retenció d'aigua; propietats dependents de les interaccions proteïna-proteïna com la precipitació i gelificació; i propietats de superfície com les propietats emulsionants i escumants (UNAM, 2013).

Les proteïnes de la sang presenten unes propietats funcionals d'alt interès en la formulació d'aliments, tot i que aquestes varien en funció de la fracció de la sang, el procés d'obtenció i transformació d'aquesta fracció i l'aliment formulat. A més, la interacció de les proteïnes de la sang amb altres ingredients repercuteix directament en la funcionalitat de les proteïnes de la sang com a ingredient alimentari, pel que és necessari provar la incorporació de les fraccions en cada formulació.

El plasma és la fracció de la sang amb unes propietats funcionals més interessants; presenta una alta solubilitat en un ampli interval de pH, una alta capacitat per formar gels, que augmenta amb l'addició de sals, una alta capacitat de retenció d'aigua, i una bona capacitat escumant i emulsionant. A més a més, contràriament a la fracció cel·lular, presenta un color i gust neutres, pel que és utilitzat com a lligand en productes carnis, com a substitutiu de l'ou, greix o com a font de proteïna (Hurtado *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2003; Toldrà *et al.*, 2004; Tybor *et al.*, 1975).

Els productes derivats del plasma també són utilitzats per les seves bones propietats funcionals. En són un exemple l'albumina que és utilitzada com a substitutiu de l'ou per les seves propietats gelificants, o la trombina i el fibrinogen que són utilitzats, per exemple, en reestructurats carnis per les seves propietats gelificants, emulsionants i de retenció d'aigua.

Per altra banda, la fracció cel·lular presenta més limitacions en el seu ús com a ingredient alimentari tecnofuncional a causa del color vermell fosc intens i gust metàl·lic de l'hemoglobina, tot i que també presenta certes propietats d'interès. L'hemoglobina, que presenta una bona solubilitat sempre que no hagi patit tractaments intensos (altes temperatures o variació forta de pH), té unes bones propietats emulsionants, gelificants i de retenció d'aigua i una bona capacitat escumant. A més, pot ser utilitzada com a agent substitutiu del greix, colorant, estabilitzador, espessidor, gelificant o agent de curat en productes carnis (Appiah i Peggy, 2012; Ockerman i Hansen, 1988; Toldrà *et al.*, 2019a; Wismer-Pedersen, 1988). Altrament, el color de l'hemoglobina, que en la majoria d'aplicacions representa una problemàtica, fa que la fracció cel·lular pugui ser utilitzada com a font d'obtenció d'un colorant vermell natural per aliments (Saguer *et al.*, 2003; Salvador *et al.*, 2009), sempre que es sotmeti a processos per estabilitzar el seu poder colorant.

A més, aquesta fracció presenta un alt potencial per ser utilitzada com a font de proteïna i ferro hèmic, pel que varis mètodes busquen disminuir i/o emmascarar el color i olor de la fracció cel·lular i així obtenir un ingredient alimentari amb bones propietats funcionals que no alteri les característiques organolèptiques dels aliments als que és introduït.

1.3.3. Usos i aplicacions de la sang d'escorxador

En els últims anys ha augmentat l'interès pel reaprofitament de la sang dins de la indústria alimentària, no només amb l'objectiu d'obtenir una nova font proteica que permeti suplir la creixent demanda global de proteïna, sinó també per millorar la sostenibilitat, tot reduint l'impacte ambiental que suposa l'eliminació i gestió d'aquest subproducte carni.

Durant el 2001, sols un 30% de la sang obtinguda en escorxadors es va utilitzar com a ingredient alimentari (Gatnau *et al.*, 2001), valor que es creu que haurà incrementat ens els últims anys degut als esforços de la indústria càrnia (Appiah i Hsieh, 2012). Les característiques fisicoquímiques i funcionals de la sang permeten la utilització d'aquesta en un gran ventall d'aplicacions; les principals es recullen a la Taula 1.7.

Les fraccions de la sang són bàsicament utilitzades en l'alimentació animal, tot i que cada vegada més es busca desenvolupar ingredients alimentaris proteics aptes pel consum humà, de major valor afegit, que aportin diferents avantatges al ser incorporats als aliments, a més a més del nutritiu. Alguns exemples d'aquests productes comercials es mostren a la Taula 1.8.

Tot i les moltes aplicacions conegudes de la sang, aquesta continua suposant un problema quan s'obté en grans quantitats a causa de la seva coloració vermella, gust i olor intensos, inestabilitat i alt contingut en

aigua (Kowalski, 2007). En algunes espècies, la reutilització de la sang presenta certs impediments legals com a conseqüència del perill de la transmissió de malalties, com és el cas de l'encefalopatia espongiforme en boví. Per altra banda, aquest reaprofitament representa una problemàtica en moltes creences religioses que en prohibeixen el consum, com és el cas del Judaisme, l'Islamisme o els Testimonis de Jehovà.

Taula 1.7. Principals aplicacions industrials de la sang d'escorxadors.

Sector	Aplicació	
Alimentació	Animal	Farina de sang sencera per <i>pet food</i> : font de proteïna per pinsos. Plasma per alimentació de bestiar: suplement alimentari per bestiar, font de proteïna en pinsos. Hemoglobina per alimentació de bestiar, peixos i <i>pet food</i> .
	Humana	Additiu alimentari: plasma com a agent aglutinador en productes carnis; plasma dessecat com a emulsionant, gelificant en productes carnis, de peix o en pastisseria; hemoglobina com a colorant natural en productes carnis; globina com a emulsionant en productes carnis; pèptid ric en ferro com a suplement; agent clarificant; albúmina de la sang com a substitutiu de l'albúmina d'ou; agent estabilitzant.
		Sang sencera o fraccions dessecades: ingredient alimentari com a font proteica.
		Pèptids bioactius aïllats i purificats amb propietats antioxidants, antihipertensives, antibiòtiques, analgèsiques i amb activitat antinociceptiva.
		Sang sencera com a ingredient alimentari: típicament utilitzada en botifarra o embotits curats, galetes, paté, salses, surimi, pastissos i carn picada.
	Medicina	Fibrinolisis per digerir les proteïnes plasmàtiques dels coàguls de sang.
Trombina per promoure la coagulació, tractament de ferides i per mantenir sutures i transplantaments de pell immòbils.		
Fibrinogen utilitzat en aplicacions de bioenginyeria.		
Protrombina com a precursor de la producció i purificació de trombina.		
Farmacèutica	Albúmina per immunohematologia.	
	Hemoglobina dessecada com a matèria primera per la producció de derivats farmacèutics de porfirina. Sang sencera per transfusions, cèl·lules vermelles en casos d'anèmia o hemorràgies, plaquetes per hemorràgies, plasma fresc en transplantaments de pulmó o en problemes de sagnat, albúmina en transfusions, immunoglobulines en malalties immunodepressores, etc.	
Recerca	Sang sencera, fraccions (fracció cel·lular, plasma i sèrum), sang desfibrinada...	
	Plasma: medi pel creixement de bacteris probiòtics.	
	Fibrinogen: reactiu utilitzat en el medi de cultiu Baird Parker per la identificació de <i>Staphylococcus aureus</i> .	
Indústria química	Catalasa per la identificació d'espècies de bacteris.	
	Sang sencera fresca o dessecada com a adhesiu.	
	Finalitzadors en indústria de la pell i tèxtil.	
	Extintors de foc en escuma.	
	Sang en formigó porós.	
Fertilitzants	Albúmina com a base en formulació de plàstic i cosmètica.	
	Plasma com a base de films insolubles en aigua.	
	Sang per modificar el pH del sòl.	
	Hidrolitzat de sang sencera com a fertilitzant del sòl (font de nitrogen en un 12%, fòsfor i altres elements).	

Font: adaptat de Àlvarez (2021); Appiah i Hsieh (2012); Bah *et al.* (2013); Jayathilakan *et al.* (2012); Leoci (2014); Toldrà (2002) i Toldrà *et al.* (2019a).

Taula 1.8. Productes comercials pel consum humà desenvolupats a partir de les fraccions de la sang.

Producte	Empresa comercial	Funció
<i>Plasma Protein</i>	Sonac BV	Gelificant mitjançant escalfament
<i>Fibrimex (fibrinogen i trombina)</i>	Sonac BV	Gelificant mitjançant refredament
<i>Plasma Powders and FG+</i>		
<i>APro</i>	Essentia Protein Solutions	
<i>Vepro plasma, globin</i>	Vepro (Veos Group)	Gelificant
<i>Plasma protein</i>	Sonac	
<i>Plasma</i>	Veos	
<i>Prolican 70</i>	Lican	
<i>Apro</i>	Essentia Protein Solutions	Retenció d'aigua
<i>Vepro plasma</i>	Vepro (Veos Group)	
<i>Plasma protein</i>	Sonac	
<i>APro</i>	Essentia Protein Solutions	Estabilitzant de l'emulsió
<i>Vepro 95 HV (globina)</i>	Vepro (Veos Group)	
<i>Prietin</i>	Lican	
<i>Prolican (plasma)</i>	Lican	Colorant/potenciador del color
<i>Harimix proteïns (C,P o P+)</i>	Sonac	
<i>Hemoglobin</i>	Sonac	
<i>AProRed</i>	Essentia Protein Solutions	
<i>Vepro 70 COL P i l Red (hemoglobina)</i>	Vepro (Veos Group)	Suplement de ferro
<i>Myored</i>	Lican	
<i>ProFerrin</i>	Colorado Biolabs Inc.	
<i>B7301</i>	Proliant	Activador del sistema immunitari
<i>Aprofer</i>	Essentia/APC Europe	
<i>ImmunoLin</i>	Proliant Inc.	

Font: adaptat de Appiah *et al.* (2012) i Toldrà *et al.* (2019a).

1.3.4. Marc legal alimentari de la sang

Les normes sanitàries aplicables als subproductes animals no destinats al consum humà (SANDACH) i productes derivats es troben regulades pel reglament (CE) n° 1069/2009, definint com a subproducte el cos sencer o parts dels animals i productes d'origen animal anomenats a l'article 4, 5, i 6, no destinats al consum humà. La sang està inclosa en la categoria 3 de subproductes, definida a l'article 10 de la secció 4 i capítol I com:

Apartat d) Sang procedent d'animals que no presentaven cap signe de malaltia transmissible a través de la sang als éssers humans o als animals, obtinguda dels següents animals que hagin sigut sacrificats en un escorxador després d'haver estat considerats aptes pel sacrifici pel consum humà arran de una inspecció *ante-mortem* de conformitat amb la legislació comunitària: i) animals diferents de remugants i ii) remugants sotmesos a proves de diagnòstic amb resultat negatiu.

Apartat h) Sang, pells, peülles, plomes, llana, banyes i pèl procedents d'animals que no presentin signes clínics de cap malaltia transmissible a través d'aquell producte als éssers humans i als altres animals.

Quan es vol utilitzar la sang pel consum humà, s'ha de diferenciar de la classificació de subproducte i l'escorxadador que la recull ha de certificar que les condicions de recollida són òptimes, assegurant que no es produeixi contaminació en la recollida i que prové d'animals sans certificats per la inspecció veterinària. Així, es busca assegurar la seguretat alimentària i traçabilitat d'aquesta matèria primera que es destinarà al consum humà.

1.3.4.1. Marc legal pel consum animal

Els productes destinats al consum animal es troben regulats pel Reglament (CE) nº 183/2005, que fixa els requisits higiènics generals per instal·lacions i productes. Per altra banda, a nivell comunitari, es regula el registre de subproductes animals i productes derivats no destinats al consum humà a partir del Decret 81/2012, regulat pel Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural de la Generalitat de Catalunya.

Taula 1.9. Disposicions del mètode de transformació 7, definit a l'annex IV del capítol III del Reglament (CE) nº 42/2011.

Capítol III, Annex IV, Mètode de transformació 7
1. Identificació dels perills rellevants en la matèria primera, a la vista del seu origen, i dels riscos a la vista de la qualificació sanitària de l'estat membre o de la zona en la que es pretengui aplicar el mètode; 2. Demostrar capacitat del mètode de transformació per reduir tals perills a un nivell que no comporti riscos significatius per la salut pública o animal; 3. Mostreig diari del producte final al llarg de un període de 30 dies de producció en compliment de les següents normes microbiològiques: <ul style="list-style-type: none"> i) mostres de material recollides directament després del tractament: <i>Clostridium perfringens</i> absent en 1 g dels productes. ii) mostres de material preses durant el període d'emmagatzematge o al final del mateix: <i>Salmonella</i>: absent en 25 g: n=5, c=0, m=0, M=0 <i>Enterobacteriaceae</i>: en 1 g: n=5, M=300
<i>n</i> = nombre de mostres de l'assaig <i>m</i> = valor lliandar del nombre de bacteris; el resultat es considera satisfactori si el nombre de bacteris en totes les mostres no és superior a <i>m</i> ; <i>M</i> = valor màxim del nombre de bacteris; el resultat es considera insatisfactori si el nombre de bacteris en una o més mostres és igual o superior a <i>M</i> ; <i>c</i> = nombre de mostres amb recompte de bacteris entre <i>m</i> i <i>M</i> ; les mostres segueixen considerant-se acceptables si el recompte de bacteris de les altres mostres és igual o inferior a <i>m</i> .

Com ja s'ha comentat anteriorment, la sang no destinada al consum humà és regulada pel reglament (CE) nº 1069/2009, englobant-la en la categoria 3 de subproductes. El mateix reglament estableix que aquest subproducte pot ser transformat amb fins alimentaris pel consum animal, el que es veu regulat pel reglament (CE) nº 142/2011, pel que s'estableixen les disposicions d'aplicació del Reglament (CE) nº 1069/2009.

Aquesta normativa inclou la definició d'hemoderivat com aquell producte derivat de la sang o les seves fraccions, excloent la farina de sang, que pot ser utilitzat com a matèria primera per pinsos quan s'utilitzi

un mètode de transformació de l'1 al 5 o 7, definits en el mateix reglament en l'annex IV del capítol III. En el context d'aquest estudi, el mètode de transformació aplicable és el 7, tal com està descrit a la Taula 1.9.

1.3.4.2. Marc legal pel consum humà

La legislació que reglamenta els aliments destinats al consum humà no especifica de manera explícita les normes higièniques aplicables a la sang i els seus derivats destinats al consum. L'article 14 del Reglament (CE) nº 178/2002, que estableix els principis i requisits generals de la legislació alimentària, determina els requisits de seguretat alimentària per qualsevol aliment destinat al consum humà: no es comercialitzaran aliments que no siguin segurs i es seguiran les disposicions específiques de la legislació alimentària nacional de l'estat membre on es comercialitzi.

Taula 1.10. Criteris de seguretat alimentària definits en el capítol 1 del Reglament (CE) nº 2073/2005.

Categoria d'aliment	Microorganismes	Nº de mostres	Límits	Mètodes analítics de referència	Fase en la que s'aplica el mètode
1.2. Aliments llestos pel consum que poden afavorir el desenvolupament de <i>L. monocytogenes</i> , que no siguin destinats a lactants ni per usos mèdics especials	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	100 ufc/g	EN/ISO 11290-2	Productes comercialitzats durant la seva vida útil.
		5	Absència en 25 g	EN/ISO 11290-1	Abans de que l'aliment hagi deixat el control intermedi de l'explotador de l'empresa alimentària que l'ha produït.
1.3. Aliments llestos pel consum que no puguin afavorir el desenvolupament de <i>L. monocytogenes</i> , que no siguin destinats a lactants ni per usos mèdics especials	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	100 ufc/g	EN/ISO 11290-2	Productes comercialitzats durant la seva vida útil.
1.4. Carn picada i preparats de carn destinats a ser consumits crus	<i>Salmonella spp.</i>	5	Absència en 25 g	EN/ISO 6579	Productes comercialitzats durant la seva vida útil.
1.6. Carn picada i preparats de carn a base d'espècies diferents a aus de corral destinats a ser consumits cuïts	<i>Salmonella spp.</i>	5	Absència en 10 g	EN/ISO 6579	Productes comercialitzats durant la seva vida útil.
1.8. Productes càrnics destinats a ser consumits crus, exclosos els productes en els que el procés de fabricació o la composició del producte elimini el risc de salmonel·la	<i>Salmonella spp.</i>	5	Absència en 25 g	EN/ISO 6579	Productes comercialitzats durant la seva vida útil.
1.10 Gelatina i col·lagen	<i>Salmonella spp.</i>	5	Absència en 25 g	EN/ISO 6579	Productes comercialitzats durant la seva vida útil.

El Reglament (CE) nº 2073/2005 recull els criteris microbiològics aplicables als productes alimentaris. Els criteris de seguretat alimentària, especificats en el capítol 1 del mateix reglament, i els criteris d'higiene dels processos definits en el capítol 2, es mostren a les Taules 1.10 i 1.11, respectivament.

Tal com es pot observar a la Taula 1.10, no existeixen uns criteris de seguretat alimentària específics per als productes proteics dessecats procedents de la sang o productes similars (plasma, hemoglobina dessecada, etc.), però sí s'estableixen els criteris pels productes on aquest ingredient alimentari podria ser afegit. En general, s'observa que es busca la detecció d'absència de *Salmonella* i *L. monocytogenes* en 25 g de producte alimentari durant la seva vida útil, pel que es pot establir com a control bàsic dels productes proteics obtinguts.

Taula 1.11. Criteris de higiene dels processos per la carn i productes derivats definits en l'apartat 2.1. del Capítol 2 del Reglament (CE) n° 2073/2005.

Categoria d'aliment	Microorganismes	Pla de mostreig		Límits		Mètodes analítics referència	Fase en la que s'aplica el criteri
		n ¹	c ¹	m ¹	M ¹		
Canals bovines, ovines, caprines i equines	Aerobis mesòfils			3,5 log ufc/cm ² mitja log diària	5 log ufc/cm ² mitja log diària	ISO 4833	Canals després del seu treballat però abans del refredament
	Enterobacteris			1,5 log ufc/cm ² mitja log diària	2,5 log ufc/cm ² mitja log diària	ISO 21528-2	Canals després del seu treballat però abans del refredament
Canals porcines	Aerobis mesòfils			4 log ufc/cm ² mitja log diària	5 log ufc/cm ² mitja log diària	ISO 4833	Canals després del seu treballat però abans del refredament
	Enterobacteris			2 log ufc/cm ² mitja log diària	3 log ufc/cm ² mitja log diària	ISO 21528-2	Canals després del seu treballat però abans del refredament
Canals bovina, ovines, caprines i equines	Salmonel·la	50	2	Absència en la zona examinada per canal		EN/ISO 6579	Canals després del seu treballat però abans del refredament
Canals porcines	Salmonel·la	50	5	Absència en la zona examinada per canal		EN/ISO 6579	Canals després del seu treballat però abans del refredament
Canals de pollastres de carn i galls d'indi	Salmonel·la	50	7	Absència en 25 g de una mostra conjunta de pell del coll		EN/ISO 6579	Canals després del refredament
Carn picada	Aerobis mesòfils	5	2	5x10 ⁵ ufc/g	5x10 ⁶ ufc/g	ISO 4833	Final del procés de fabricació
	<i>E. coli</i>	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Final del procés de fabricació
Carn separada mecànicament	Aerobis mesòfils	5	2	5x10 ⁵ ufc/g	5x10 ⁶ ufc/g	ISO 4833	Final del procés de fabricació
	<i>E. coli</i>	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Final del procés de fabricació
Preparats de carn	<i>E. coli</i>	5	2	500 ufc/g o cm	5000 ufc/g o cm ²	ISO 16649-1 o 2	Final del procés de fabricació

¹ n= número de unitats que componen la mostra; c= número de unitats de mostreig que tenen valors entre m i M.

Per altra banda, a la Taula 1.11, es mostren els criteris higiènics pels processos, on s'especifiquen altres microorganismes de control segons diferents categories d'aliments. En aquest cas, els productes proteics procedents de sang es poden considerar com un producte englobat a la categoria 2.1. que defineix la carn i els productes derivats.

Tal com succeeix amb els criteris pels aliments, no existeix un criteri higiènic específic pel procés de transformació de la sang a un ingredient proteic dessecat, però sí es poden utilitzar els criteris per altres processos com a control de les condicions del propi procés. Així, es podria definir que els controls higiènics de procés haurien d'assegurar l'absència de Salmonel·la en 25 g de producte just acabar la producció, un límit de 3,5 log ufc/g per aerobis mesòfils i de 2 log ufc/g per Enterobacteris.

1.4. MÈTODES DE DESCOLORACIÓ DE LA SANG

Per evitar el problema que suposa la incorporació d'un ingredient amb una coloració vermella o marronosa intensa en l'elaboració d'aliments és necessari emmascarar o disminuir al màxim el poder colorant dels productes derivats de la sang (a excepció del plasma), pel que la majoria de procediments busquen dissociar i eliminar el grup hemo de la globina per obtenir productes amb una coloració més aviat groguenca o, fins i tot, blanquinosa.

Varis autors han estudiat sistemes de descoloració de la sang amb l'objectiu d'utilitzar-la com a ingredient alimentari; Wismer-Pedersen (1988) va descriure una possible descoloració duent a terme l'eliminació del grup hemo mitjançant una sèrie de mètodes com l'extracció amb solvents orgànics, utilitzant acetona en condicions àcides, o a través d'una absorció amb reactius com carboximetilcel·lulosa o resines, mètode també utilitzat per Yang *et al.* (2000).

Un altre mètode estudiat per molts altres autors (Bah *et al.*, 2016; Finn *et al.*, 1983; Hald-Christensen *et al.*, 1981; In *et al.*, 2001; Liu, *et al.*, 2012; Olsen, 1991; Shi *et al.*, 2015; Toldrà *et al.*, 2011; Yang i Lin, 1998), és la hidròlisi de l'hemoglobina mitjançant enzims proteolítics amb una posterior separació de la fracció precipitada utilitzant filtració o centrifugació.

Per altra banda, altres autors han estudiat la possibilitat d'utilitzar substàncies oxidants per obtenir l'hemoglobina en el seu estat fèrric, amb una coloració que va del marró a l'ocre (Hicks *et al.*, 2013).

1.4.1. Extracció mitjançant solvents

Alguns mètodes utilitzen solvents, com l'acetona acidificada o l'alcohol, per extreure el grup hemo de l'hemoglobina, el qual és soluble en els agents desnaturalitzants, mentre que la resta de pèptids es desnaturalitzen i precipiten.

Un dels mètodes descrits consisteix en disminuir el pH de la solució d'hemoglobina per sota de 4 mitjançant àcid ascòrbic i afegir acetona acidificada per separar el grup hemo i aconseguir la precipitació de la globina, el que permet recuperar-la a partir del rentat amb una solució d'etanol i separar-la mitjançant filtració (Tybor *et al.*, 1973 i 1975; Yang & Lin, 1998). La globina recuperada és dissolta en aigua, reajustant el seu pH a 7. Aquest procés permet obtenir un concentrat proteic amb un 88-92 % de proteïna.

Una alternativa a aquest mètode és la combinació de l'acetona acidificada amb peròxid d'hidrogen (10 %) per obtenir la globina descolorada insoluble. Aquest mètode consisteix en dosificar lentament la solució d'hemoglobina sobre la solució d'acetona acidificada amb peròxid d'hidrogen fins a una proporció final de 1:3, en condicions de refrigeració i agitació. En aquest mètode, el pigment hemo es separa de la globina, i aquesta es desnaturalitza, obtenint una proteïna insoluble descolorada. Degut a les condicions agressives de reacció, les propietats funcionals del producte obtingut es veuen reduïdes en gran mesura (Moure Fernández, 2000).

Degut a la utilització d'agents desnaturalitzants, el procés d'extracció mitjançant solvents representa un risc potencial en la possibilitat d'obtenir un producte final amb residus nocius (Yang & Lin, 1998).

1.4.2. Segrestants

La segregació del grup hemo mitjançant diferents reactius és una tècnica estudiada per molts autors que busca enllaçar la molècula responsable de la pigmentació de la sang amb un agent adsorbent amb una posterior precipitació d'aquest complex mitjançant punt isoelèctric i la separació per centrifugació. La fracció soluble recuperada és ultrafiltrada i assecada mitjançant atomització (*spray drying*), pel que s'obté un producte proteic de globina descolorada.

Alguns exemples d'agents adsorbents en són la carboximetilcel·lulosa (CMC) que permet recuperar la fracció precipitada en el procés i utilitzar-la com a font de ferro (Autio *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 1981; Toldrà, 2002; Yang i Lin, 1998), l'alginat de sodi (Lee *et al.*, 1990), el carbó actiu, l'àcid silícic o el diòxid de manganès (Marc & Vancikova, 1978).

Per altra banda, altres autors han estudiat la descoloració de la globina mitjançant agents segrestants en condicions menys agressives utilitzant l'intercanvi iònic amb resines (Yang i Lin, 2000), tot i tractar-se d'una tècnica limitada degut a la necessitat de refrigeració i a la saturació per part de les resines.

1.4.3. Hidròlisi

La hidròlisi de les proteïnes de la sang és un mètode que permet catalitzar el trencament dels enllaços que uneixen el grup hemo a la globina mitjançant tractaments amb reactius químics o enzims amb diferent activitat proteolítica. Després d'aquest tractament, el grup hemo es pot separar de la globina per precipitació mitjançant solvents orgànics, per centrifugació degut a la diferència de pes molecular, per ultrafiltració amb membranes o mitjançant tècniques cromatogràfiques.

Un possible mètode hidrolític, estudiat per Álvarez (2012) i Álvarez *et al.* (2016), és la hidròlisi de les proteïnes de la sang mitjançant altes pressions i altes temperatures, condicions que provoquen el trencament de l'enllaç hemo-globina degut a l'alta sensibilitat d'aquest. Durant el procés, el grup hemo és oxidat pel que es dona la descoloració del producte, que pot ser incrementada en condicions d'injecció d'oxigen.

Els mètodes enzimàtics consisteixen en utilitzar un o més enzims a una temperatura i pH determinats per catalitzar el trencament dels enllaços hemo-globina. Les condicions de reacció poc agressives amb el producte permeten obtenir un concentrat proteic més o menys descolorit i amb diferents característiques tecnofuncionals desitjables. A més, aquest mètode permet allargar la vida útil del producte alimentari, proporcionar una millora de les propietats coagulants, emulsionants o escumejants, eliminar aromes

desagradables i modificar-ne la textura. Diferents autors han estudiat l'aplicació d'un tractament d'hidròlisi amb un sol enzim o la combinació de més d'un sobre les proteïnes de la sang obtenint diversos resultats.

Un dels enzims més estudiats en la hidròlisi de la sang és l'Alcalasa, que permet obtenir productes més o menys descolorats segons les condicions i temps d'hidròlisi aplicats (Finn Jacobsen, Jens Asler-Nissen, 1983; Hald-Christensen, 1981; Houlier, 1986; Novo Nordisk, 1990; Synowiecki *et al.*, 1996; Toldrà, 2002; Verma *et al.*, 2018a i 2018b; Yang & Lin, 1998) o en combinació amb altres enzims com el *Flavourzyme* (Chang *et al.*, 2007). La Papaïna, Pepsina i Tripsina permeten, per separat, una descoloració de l'hemoglobina en condicions determinades com és l'aplicació d'altres pressions hidrostàtiques durant el procés d'hidròlisi (Liu *et al.*, 2012; Toldrà, 2002; Toldrà *et al.*, 2011). Alguns enzims estudiats, com la Neutrasa o Plasmina, no han demostrat ser tan efectius en la disminució del color intens de l'hemoglobina (Toldrà, 2002). Per contra, en alguns estudis, s'han obtingut bons resultats amb la combinació de diferents enzims, com l'aplicació d'hidròlisi mitjançant Tripsina, Quimotripsina i Termolisina (Wei i Chiang, 2009).

Altres estudis plantegen la combinació d'un tractament d'hidròlisi combinat amb la descoloració amb reactius oxidants, com Zheng *et al.* (2014) que van realitzar una hidròlisi de la fracció cel·lular mitjançant una proteasa neutra i *Flavourzyme*, seguit d'una descoloració amb peròxid d'hidrogen.

La hidròlisi enzimàtica també ha estat aplicada per varis autors (Álvarez *et al.*, 2016; Janitha *et al.*, 2002; Wanasundara *et al.*, 2002; Wei & Chiang, 2009) amb l'objectiu d'obtenir pèptids bioactius a partir de la sang i les seves fraccions. Els pèptids bioactius són petites seqüències aminoacídiques que comporten un benefici fisiològic quan, després de ser digerits, poden ser absorbits i passen directament al torrent sanguini, aportant beneficis associats a les seves propietats antimicrobianes, antihipertensives, antioxidants, anti-trombòtiques, al seu efecte immuno-modulador, efecte en la disminució del colesterol i un augment en l'absorció mineral (Korhonen & Pihlanto, 2003; Lantz *et al.*, 1991).

En general, els productes obtinguts a partir dels mètodes hidrolítics presenten un gust més o menys amargant. Aquesta amargor és causada per la formació de pèptids hidrofòbics de baix pes molecular i una seqüència i estructura espacial que influeixen en la percepció d'aquest gust (Kim & Li-Chan, 2006), el que representa un dels majors reptes que cal afrontar d'aquesta metodologia.

1.4.4. Oxidació

La utilització d'agents oxidants en el processat de la sang permet obtenir la porfirina en la seva forma oxidada, de tal manera que la molècula passa a presentar una coloració marró-ocre.

Diferents autors han descrit l'oxidació de l'hemoglobina mitjançant peròxid d'hidrogen (Hicks *et al.*, 2013; Ockerman & Hansen, 1988; Wismer-Pedersen, 1988; Yang & Lin, 1998). Altres exemples d'agents oxidants estudiats són l'àcid peracètic (Hicks *et al.*, 2013) o el peròxid de calci (Lun, 2012).

Wismer-Pedersen (1988) va descriure el mètode de descoloració mitjançant peròxid d'hidrogen, que consisteix en dur a terme l'hemòlisi dels eritròcits mitjançant l'addició d'aigua i la inactivació de la catalasa de la sang augmentant la temperatura fins a 70 °C. Seguidament, s'addiciona una solució de peròxid d'hidrogen amb una concentració de l'1 al 3% que oxidarà l'hemoglobina fins a obtenir la coloració desitjada. Per eliminar els possibles residus de peròxid s'utilitza l'enzim catalasa. El producte obtingut, tot i presentar una bona descoloració, és poc funcional degut a ser insoluble, pel que les aplicacions d'aquest com a ingredient alimentari són limitades.

La problemàtica d'aquest mètode recau en la possibilitat de que es formin residus oxidats perillosos per la salut com són els aminoàcids oxidats, relacionats amb la inhibició del creixement (Van der Oord i Wesdrop, 1979).

1.4.5. Mètodes patentats en base a la utilització de peròxid d'hidrogen

Existeixen varies patents que descriuen procediments per descolorar la sang i les seves fraccions mitjançant diferents tècniques. En aquest estudi s'ha valorat l'aplicació de dos procediments diferents descrits en les següents patents:

- Patent ES nº 2 289 937 (Florida, 2008): Procediment per la recollida i transformació de la sang en una proteïna hidrolitzada a partir de sang de bestiar obtenint-se Proteïna Hidrolitzada de la Sang (PHS).

Aquest mètode descriu un procediment per obtenir un producte proteic descolorat a partir de sang d'escorxadors o les seves fraccions. Durant la recollida en continu de la sang, s'afegeix 300 g de metabisulfit per litre de sang i una quantitat indefinida de sucre. Aquesta sang és guardada en un dipòsit en agitació suau quan es pretén tractar la sang sencera, o es separen les fraccions per tractar-les en dos procediments diferenciats.

El plasma, separat per centrifugació, és neutralitzat amb hidròxid de sodi fins a un pH de 7,4. Se li addiciona peròxid d'hidrogen en continu i, lentament, mentre que es corregeix l'acidificació del producte. La reacció es dona per acabada quan el pH roman estable. Finalment, la solució és filtrada, rentada amb aigua per eliminar-ne les sals que s'han format durant el procés, i deshidratada per atomització per obtenir un producte en pols i funcional.

Tanmateix, no es diferencia un tractament per la sang sencera o la fracció cel·lular. S'inicia el procés amb l'addició d'aigua en la mateixa quantitat que matèria primera i en condicions d'agitació. Es disminueix el pH fins arribar a 2 mitjançant àcid clorhídric, seguit de la neutralització amb hidròxid de sodi fins arribar a un pH de 4,8–5,2. Per aconseguir la descoloració s'addiciona el peròxid d'hidrogen (entre el 0,75 i 25% sobre matèria primera) i es controla el pH mitjançant hidròxid de sodi. La reacció es dona per acabada quan

ja no s'observa escuma densa. Seguidament, el producte es filtra per reduir les sals del mateix i s'asseca mitjançant atomització o liofilització. El producte resultant es pot moldre per homogeneïtzar-lo.

Tot i que aquesta metodologia es troba descrita en estudis anteriors, la patent basa la seva innovació en la utilització del metabisulfit de sodi com a agent conservant i estabilitzant de la sang, que no necessita la conservació a baixa temperatura, envers a les condicions de refrigeració amb anticoagulant que s'ha utilitzat fins al moment.

- Patent nº WO/2000/053195 (Lee et al., 2000): Productes descolorats de sang animal i mètode per obtenir-los.

Aquesta patent defineix el mètode per la descoloració de la sang i les seves fraccions utilitzant un agent oxidant com el peròxid d'hidrogen, peròxid de sodi, peròxid de calci o combinacions d'aquests.

El mètode descrit consisteix en diluir amb aigua la fracció a tractar (1:1) i sotmetre-la a un tractament tèrmic suficient per inactivar l'enzim peroxidasa present a la sang (de 50 a 80 °C durant 5 - 30 min, segons el procediment). Seguidament, la solució es deixa refredar a 35 – 50 °C i s'addiciona el reactiu oxidant fins a una concentració del 3 % sobre producte inicial. La concentració i temps de reacció dependrà del nivell de descoloració que es vol aconseguir. Finalment, el producte es pot conservar en solució o assecar mitjançant mètodes convencionals com l'atomització.

Per altra banda, es defineix la possibilitat d'aplicar mètodes addicionals sobre la matèria primera inicial o el producte final en solució per millorar-ne les característiques, com la hidròlisi enzimàtica per obtenir un producte amb major solubilitat.

El producte dessecat resultant presenta fins a un 95 % de la proteïna i el ferro inicial i una baixa contaminació microbiològica (menys de 3 ufc/g de *Staphylococcus spp.* i menys de 10⁴ ufc/g en recomptes d'aerobis totals).

1.4.6. Marc legal sobre l'ús del peròxid d'hidrogen en la indústria alimentària

El peròxid d'hidrogen és un reactiu considerat com a GRAS (*Generally Recognized as Safe*) per la FDA (*Food and Drug Administration*), no carcinogen per la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) i classificat com a substància autoritzada en alimentació humana amb una ingesta diària admissible no establerta i que condueix a la presència de residus tècnicament inevitables.

Degut a no presentar efectes carcinògens, no se n'ha calculat la ingesta diària tolerable. El 2003, el Comitè científic sobre mesures veterinàries relacionades amb la salut pública (SCVPH) de la Comissió europea va establir un NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) per al peròxid d'hidrogen en animals de 26-37 mg H₂O₂/kg per consumidor/dia. A més, tot i que en general s'estableixen marges de seguretat de 100, es va establir un marge segur (MOS) de 1.000, tenint en compte la poca informació toxicològica que es disposa

d'aquest reactiu. Comparant aquests valors amb els obtinguts a l'informe de l'AESAN (AESAN 2011-006) i extrapolant-los al consum humà, es considera que les condicions assajades en l'informe són segures per l'alimentació (Taula 1.12).

Taula 1.12. Càlcul del marge de seguretat d'exposició al peròxid d'hidrogen pel consum de farina de sang tractada amb el reactiu a una concentració del 0,75% segons dades d'AESAN 2011-006.

Exposició H ₂ O ₂ (mg/kg p.c./dia)	0,001-0,003
NOAEL (mg/kg p.c./dia)	26
Marge de seguretat (mg/kg p.c./dia)	8.000-22.000
Marge de seguretat recomanat (MOS) /mg/kg p.c./dia)	1000

El peròxid d'hidrogen és un reactiu utilitzat i regulat legislativament a nivell mundial en algunes aplicacions de l'àmbit alimentari com a coadjuvant tecnològic (Taula 1.13).

Tot i que actualment s'utilitza com a coadjuvant en molts processos alimentaris, el peròxid d'hidrogen presenta varies limitacions. Per una banda, l'efectivitat d'aquest reactiu en la descoloració de la sang es veu altament reduïda degut a la presència de dos enzims sanguinis, la glutatió peroxidasa i la catalasa, encarregats d'eliminar peròxids residuals del metabolisme dels organismes. Quan el peròxid d'hidrogen entra en contacte amb aquests enzims és degradat ràpidament esdevenint aigua i oxigen, el que evita el possible dany oxidatiu a l'organisme per la reducció de la concentració del reactiu. Tanmateix, aquesta reducció impedeix la interacció del peròxid amb l'hemoglobina i, per tant, la capacitat descolorant es redueix en gran mesura.

El peròxid d'hidrogen presenta una alta capacitat oxidativa, el que pot comportar efectes indesitjables en els aliments tractats, donant lloc a l'oxidació de carbohidrats, proteïnes, àcids grassos o àcids nucleics, especialment en presència de metalls de transició, productes que poden arribar a ser tòxics pel consum humà.

Per evitar el perill que pot comportar la utilització de peròxid d'hidrogen com a coadjuvant tecnològic en processos alimentaris, el Comitè científic de l'Agència Espanyola de Seguretat Alimentària i Nutrició (AESAN) va elaborar un informe en relació a l'ús del peròxid d'hidrogen com a coadjuvant en el processament d'hemoderivats i cefalòpodes (AESAN-2011-006), en el que es va determinar una exposició màxima de la sang al peròxid de 30 min a una concentració màxima del 0,75% com a factors segurs per la descoloració de sang sencera per al consum humà.

Taula 1.13. Regulació de l'ús de peròxid d'hidrogen en l'àmbit alimentari. Extret de (AESAN, 2011-006).

	Ús autoritzat	Referència
Europa	El Reglament (CE) nº 853/2004 estableix per les gelatines acabades (obtingudes a partir d'ossos, cuirs i pells de remugants de cria, pells de porcíns i pells d'aus de corral) un residu de peròxid d'hidrogen de 10 mg/kg (ppm).	(UE, 2004)
	El Reglament (CE) nº 123/2008 permet la utilització del peròxid d'hidrogen en la producció de gelatina a partir de productes d'origen animal.	(UE, 2008)
Espanya	Ús d'aigua oxigenada autoritzat a una dosi màxima de 5.000 ppm, en el blanqueig de budells naturals.	Ordre del 29 d'octubre de 1986
	Ús autoritzat per eliminar la contaminació d'aigua destinada al consum humà.	Reial Decret 140/2003
	Avaluació toxicològica favorable com a coadjuvant tecnològic pel seu efecte bacteriostàtic en cefalòpodes i descolorant en hemoderivats en condicions específiques.	(AESAN, 2011-006)
França	Ús autoritzat com a coadjuvant tecnològic en budells.	(Errêté del Ministère de l'Économie, des Finances et de l'Industrie, 2006)
	Avaluació toxicològica favorable com a coadjuvant tecnològic en la fabricació de lactosèrum de llets infantils.	(AFSSA, 2005, 2007)
	Avaluació toxicològica favorable, en solució junt amb àcid peracètic i àcid acètic, per la descontaminació microbiològica de farines.	(AFFSA, 2006, 2010)
Estats Units	Reconegut com a GRAS per la FDA, autoritzant el seu ús en llet (0,05%), lactosèrum (0,04%), formatge de lactosèrum (0,05%), midó (0,15%), xarop de blat de moro (0,15%) i en emulsionants (1,25%).	21 CFR 184.1366
	Ús autoritzat (27 CFR 240.1051) en vi (3 ppm) per facilitar fermentacions secundàries, amb la condició que el producte final no contingui residus, i per eliminar el color del suc de raïm vermell o negre (500 ppm).	(FDA, 2011)
	Autoritzat pel tractament d'òrgans i canals de pollastre.	21 CFR 173.370
	Inclòs en la base de dades d'additius alimentaris (EAFUS) i en la llista d'additius "indirectes" utilitzats en substàncies en contacte amb aliments (CFSAN), ambdós de la FDA.	-
Austràlia i Nova Zelanda	Ús autoritzat com a coadjuvant tecnològic (agent blanquejant) en aliments, establint un residu màxim de 5 mg/kg (ppm).	(ANZFSC, 2002)
Japó	Autoritzat com a agent blanquejant per tot tipus de productes alimentaris, establint com a limitació d'ús que no quedin residus en el producte final.	(FFCR, 2010)
Taiwan	Autoritzat com agent higienitzant en tots els productes alimentaris, excepte en farines, sempre que no quedin residus d'aquest agent en l'aliment destinat al consum humà.	(TFSA, 2009)

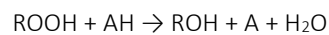
En aquest estudi es van provar les concentracions proposades per l'empresa sol·licitant, analitzant mostres d'hemoderivats tractats amb peròxid d'hidrogen al 0,75 % durant 15-30 min i comparant els resultats amb mostres sense tractar. Els resultats obtinguts van concloure que no hi havia diferències estadísticament significatives entre els productes tractats i sense tractar amb peròxid d'hidrogen respecte als continguts totals en òxids de colesterol i oxidació de proteïnes (aquest últim es va determinar com a un procés lligat a l'oxidació de lípids), pel que conclouen com a segures les condicions assajades.

Aquesta limitació en l'ús de peròxid va associada amb la dificultat que comporta en la sang la presència dels enzims glutatió peroxidasa i catalasa que descomponen el reactiu, pel que un dels principals reptes és la inactivació d'aquestes oxidoreductases.

Glutatió peroxidasa

Les peroxidases són un grup de proteïnes amb funció enzimàtica oxidoreductasa seleni-dependents presents en animals i vegetals. Se n'han identificat fins a vuit isoenzims, tots amb la funció de protegir els organismes contra el dany oxidatiu de compostos forans com el peròxid d'hidrogen o peròxids de lípids, reduint-los a aigua, oxigen i alcohols (Kehrer *et al.*, 2010).

Aquests enzims catalitzen reaccions oxido-reductores utilitzant oxigen o peròxid com a acceptor d'hidrogen (amb taxes elevades a baixes concentracions de substrat), formant un complex enzim-donant d'hidrogen descrit per Hemedi i Klein (1990) com:



S'han identificat i caracteritzat fins a vuit tipus de peroxidases en mamífers, quatre de les quals presenten una activitat intracel·lular (GPx-1, GPx-2 i GPx-4, GPx-8) i quatre activitat extracel·lular (GPx-3, GPx-5, GPx-6, GPx-7). Es creu que la glutatió peroxidasa 3 és l'enzim extracel·lular amb activitat antioxidant més important en mamífers i, igual que la glutatió peroxidasa 1, es troba present en la sang de tots els mamífers.

La glutatió peroxidasa 1 o GPx-1 (Figura 1.7, esquerra) està formada per 4 subunitats i és secretada al citoplasma dels eritròcits per protegir l'hemoglobina del dany oxidatiu. La glutatió peroxidasa 3 o GPx-3 (Figura 1.7, dreta) està constituïda per 4 subunitats, formant una estructura tetraèdrica que és secretada directament al citosol del fetge, ronyó, cor, gònades, fluid cerebroespinal i plasma sanguini.

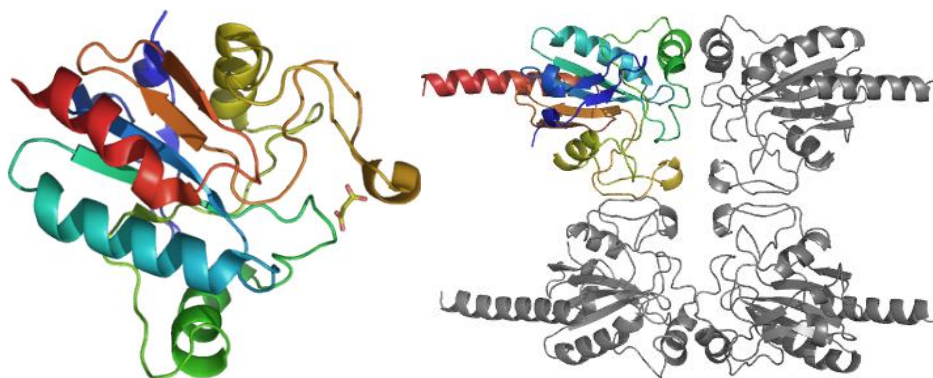


Figura 1.7. Estructura quaternària d'una glutatió peroxidasa humana 1 (GPx-1, esquerra) i 3 (GPx-3 dreta), extret de BioinformàticaUPF (2020).

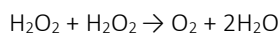
Aquesta família d'enzims es caracteritza per la seva tolerància als tractaments tèrmics, pel que es sol utilitzar com a enzim indicador en tractaments tèrmics de productes alimentaris d'origen animal i vegetal,

de manera que es considera que un tractament tèrmic (per exemple la pasteurització estàndard de la llet) ha estat efectiu quan s'observa l'activitat d'aquest enzim i no d'altres enzims sensibles al tractament com la fosfatasa alcalina.

A més de la termoresistència, la peroxidasa presenta capacitat de regeneració, que consisteix en la capacitat de recuperació de l'activitat enzimàtica transcorregut un temps després del tractament tèrmic degut a una desnaturalització parcial durant el tractament i una recuperació de l'estructura terciària (Hemeda i Klein, 1990). Dietrich *et al.* (1955) i Sheu i Chen (1991) van observar una regeneració de la peroxidasa en vegetals (pèsols i soja), detectant un increment en l'activitat peroxidasa durant l'emmagatzematge en refrigeració dels productes.

Catalasa

Les catalases, igual que les peroxidases, són un grup d'enzims amb funció oxidoreductasa presents en quasi tots els éssers vius. Aquestes, bàsicament presents en els peroxisomes, eviten el dany oxidatiu de les espècies reactives d'oxigen (ROS) catalitzant-ne l'oxidació a oxigen i aigua utilitzant com a cofactor un grup hemo i magnesi a una taxa de descomposició d'aproximadament 0,01-0,06 mmol/L/min (amb màxima taxa en altes concentracions de peròxid):



Estan formades per quatre subunitats, cada una dels quals presenta un grup hemo al centre actiu (Figura 1.8) (Kehrer *et al.*, 2010). Degut a la seva activitat és utilitzada en diverses indústries com l'alimentària o la tèxtil amb la finalitat d'eliminar restes de peròxid d'hidrogen utilitzat durant els processos industrials. Per altra banda, és més sensible als tractaments tèrmics respecte a la glutatió peroxidasa, el que permet inactivar-la més fàcilment.

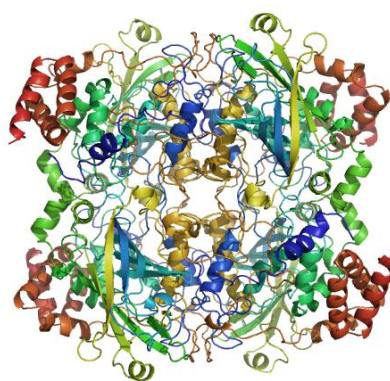


Figura 1.8. Estructura quaternària d'una Catalasa, extret de SASBDB (2020).

CAPÍTOL 2: OBJECTIUS I PLA DE TREBALL

CAPÍTOL 2. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL

2.1. OBJECTIUS

OBJECTIU GENERAL

L'objectiu general d'aquesta tesi de Doctoral industrial és el desenvolupament d'un procediment per l'obtenció d'un concentrat proteic ric en ferro i d'alt valor nutricional a partir de sang porcina d'escorxador i escalar-lo a nivell industrial.

Per assolir aquest objectiu, es van plantejar els següents objectius específics emmarcats en els 4 apartats de la tesi (capítols 3 a 6).

Capítol 3. Estudis preliminars

- L'objectiu dels estudis preliminars era l'aplicació d'una metodologia d'obtenció d'un concentrat proteic a partir de sang porcina a escala de laboratori, així com la caracterització fisicoquímica i microbiològica dels diferents productes proteics que s'obtenen.

Els objectius concrets van ser:

1. Estudiar la metodologia utilitzada en l'obtenció d'un concentrat proteic a partir de sang sencera en el projecte *HYDROBLOOD* i caracteritzar fisicoquímicament i microbiològicament els productes obtinguts a escala de laboratori.
2. Caracteritzar fisicoquímicament i microbiològicament els productes proteics facilitats per l'empresa Talleres Azuara S.L., obtinguts a escala de planta pilot mitjançant la tecnologia descrita en el marc del Projecte Europeu *HIDROBLOOD Horizon 2020*.

Capítol 4. Obtenció d'un concentrat proteic descolorat de sang porcina mitjançant tractament àcid o tractament tèrmic

- L'objectiu general d'aquest estudi era la cerca de les condicions més adequades d'aplicació del procés d'obtenció d'un concentrat proteic descolorit a partir de sang sencera porcina d'escorxador mitjançant una descoloració amb peròxid d'hidrogen.

Els objectius concrets d'aquesta part van ser:

1. Estudiar l'efecte de la concentració del peròxid d'hidrogen i de la temperatura de tractament en la descoloració de la sang sencera, reduint significativament el temps de reacció.
2. Obtenir un concentrat proteic descolorat mitjançant tractament tèrmic, seguit de la descoloració amb peròxid d'hidrogen, apte pel consum humà.
3. Caracteritzar el producte deshidratat obtingut a nivell fisicoquímic i microbiològic.
4. Avaluar la possible aplicabilitat del concentrat proteic mitjançant la realització de proves de concepte en productes alimentaris model, per substituir ingredients proteics ja utilitzats comercialment o per incrementar el contingut proteic final dels productes.
5. Avaluar l'efecte d'un tractament d'hidròlisi enzimàtica sobre la sang sencera, seguit d'una descoloració amb peròxid d'hidrogen, per obtenir un concentrat proteic amb una major descoloració.

Capítol 5. Obtenció d'un concentrat proteic descolorat mitjançant hidròlisi

- L'objectiu principal era la cerca de les millors condicions hidrolítiques sobre fracció cel·lular de sang porcina d'escorxadador mitjançant la utilització d'un o dos enzims per obtenir un concentrat proteic descolorat apte pel consum humà.

Així, es van establir els objectius específics següents:

1. Estudiar l'efecte de dos tipus de tractament proteolítics, sols amb Flavourzyme o en combinació amb Neutrasa, sobre la fracció cel·lular, aplicant un tractament posterior descolorant mitjançant peròxid d'hidrogen.
2. Analitzar el procés seleccionat en l'apartat anterior i caracteritzar els productes proteics obtinguts.

Capítol 6. Planta pilot

L'objectiu era contribuir en el disseny i la posta en marxa d'una planta pilot demostrativa per obtenir un concentrat proteic descolorat a partir del tractament de sang porcina d'escorxadador mitjançant la metodologia seleccionada i optimitzada a nivell de laboratori, en el marc del conveni de Doctorat Industrial entre l'empresa Azuara S.L. i el grup de Tecnologia Alimentària de la UdG.

Els objectius específics van ser:

1. Contribuir en la selecció dels equips més adients per dur a terme cada fase del processat a partir de sang de porc sencera fins a l'envasament del concentrat proteic.
2. Realitzar l'escalat industrial del procés.
3. Revisió del procés d'automatització mitjançant el software escollit per l'empresa.

4. Analitzar el producte obtingut a la planta pilot demostrativa per determinar que compleix els paràmetres higiènics desitjats i establerts per la legislació, realitzant-ne una caracterització fisicoquímica i microbiològica.
5. Dur a terme les certificacions pertinents, en col·laboració amb el Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural (DACC) de la Generalitat de Catalunya, permetent que la planta pilot sigui operativa a nivell comercial.
6. Definir el sistema d'Anàlisi de perills i punts de control crític (APPCC) a nivell de la planta demostrativa.

2.2. PLA DE TREBALL

A la figura 2.1 següent es pot observar l'esquema general de la tesi.

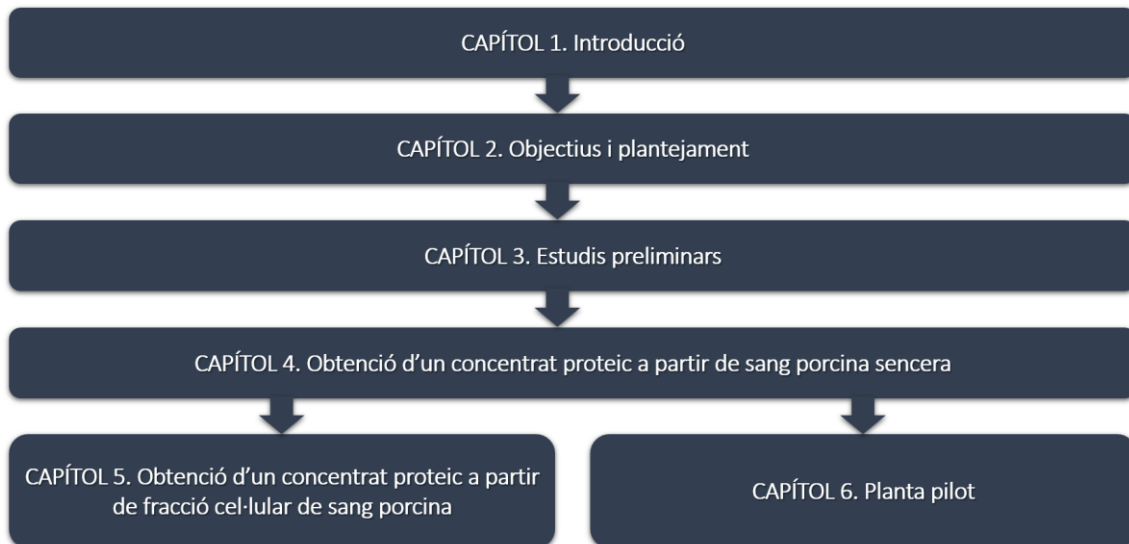


Figura 2.1. Esquema general de la tesi.

Per assolir els diferents objectius específics plantejats, el treball s'ha estructurat en 4 apartats diferenciats, corresponents als capítols 3, 4, 5 i 6. A continuació, a la figura 2.2, es mostra de forma esquemàtica el disseny experimental general d'aquests.

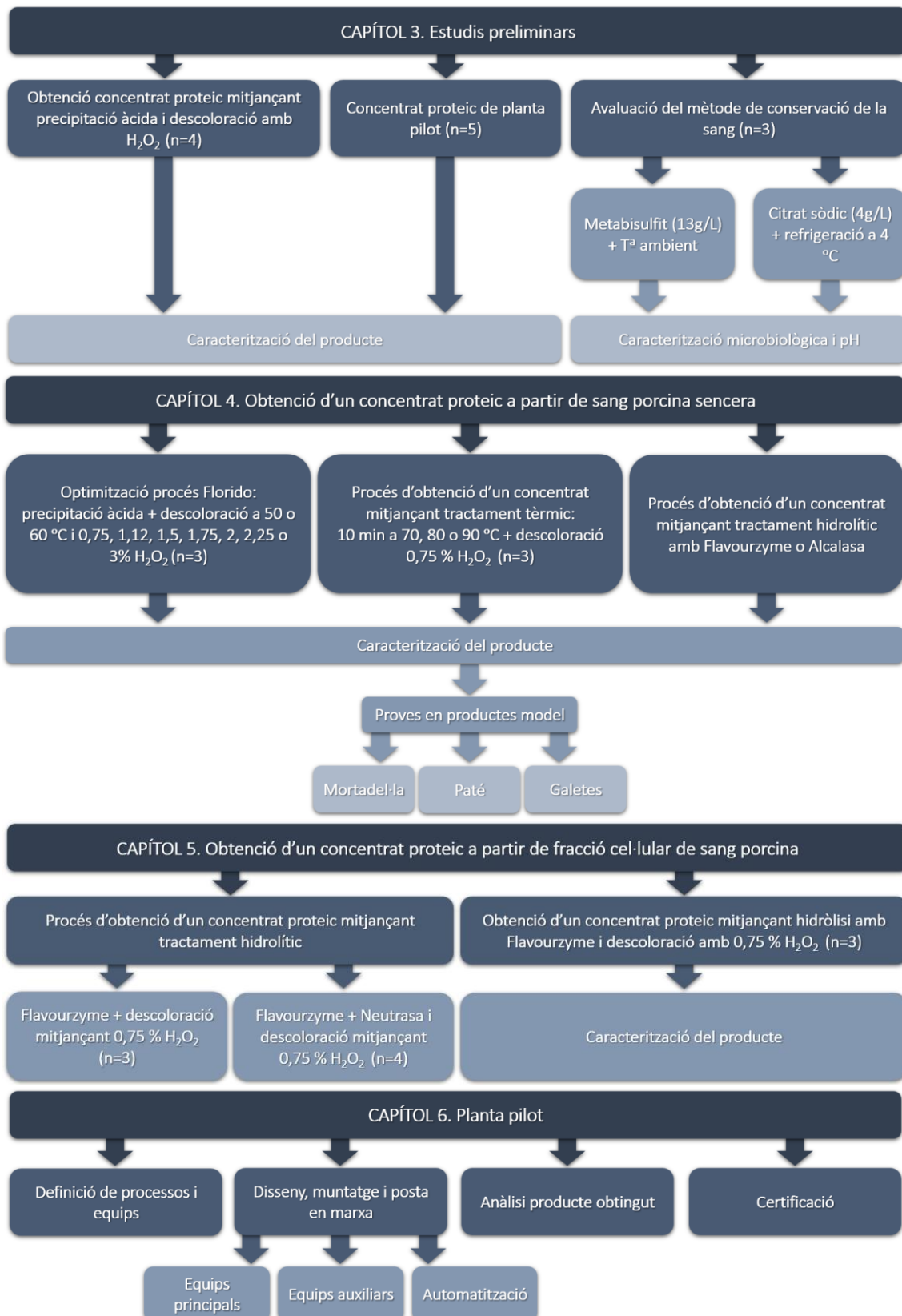


Figura 2.2. Esquema del disseny experimental dels 4 apartats de la tesi.

CAPÍTOL 3: ESTUDIS PRELIMINARS

CAPÍTOL 3. ESTUDIS PRELIMINARS

3.1. INTRODUCCIÓ

En un primer contacte entre l'empresa Tallerez Azuara S.L. i el grup de recerca de Tecnologia Alimentària de la Universitat de Girona es va decidir realitzar un estudi inicial del procés d'obtenció de concentrat proteic a partir de sang porcina, procés seleccionat per l'empresa Talleres Azuara S.L. i patentat per Florido (2008).

En aquesta valoració inicial es pretén conèixer el procés seleccionat a escala de laboratori, descrivint cada fase, l'objectiu d'aquestes i els seus paràmetres, i estudiar el producte que se n'obté, duent a terme una caracterització fisicoquímica general.

Per altra banda, en el marc del projecte europeu *HYDROBLOOD*, a la planta d'Azuara es van realitzar una sèrie de fabricacions a escala planta pilot de mida reduïda, i es va analitzar fisicoquímicament.

Conservació de la sang

Adicionalment, també és necessari estudiar la qualitat microbiològica de la matèria primera de partida, la sang conservada a temperatura ambient mitjançant l'addició de metabisulfit de sodi ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), utilitzat com a additiu conservant i anticoagulant tal com descriu el mètode de Florido (2008). Aquest compost és una substància química sòlida i cristal·lina o en forma de pols de color blanquinós amb una lleugera olor a sofre, obtinguda a partir de la combustió de minerals amb sofre; que en alimentació és considerat un conservant sintètic (E-223), utilitzat per prevenir l'acció o proliferació d'enzims o bacteris i eliminar la degradació del color en aliments com carns i vegetals. Es considera un reactiu d'alta toxicitat, que pot provocar irritació del tub digestiu i inactivació de la Vitamina B1 (Tiamina) en baixes concentracions (i consegüentment avitaminosis a llarg termini) i, en majors quantitats, també pot causar mal de cap, nàusees, vòmits, al·lèrgies, irritacions de bronquis i asma (Aditivos Alimentarios, 2019), a més a més d'haver-se detectat risc genotòxic en consums alts de la substància (Carvalho *et al.*, 2011).

Tot i els efectes adversos que pot provocar en la salut, el metabisulfit de sodi està permès a Europa en alimentació humana com a coadjuvant en alguns grups d'aliments i en unes dosis residuals màximes. Alguns exemples en són algunes fruites i hortalisses (de 10 a 2000 mg SO_2/kg), cereals (de 30 a 50 mg SO_2/kg), determinats productes càrnics (450 mg SO_2/kg o L), i begudes alcohòliques (de 20 a 260 mg SO_2/L) (Reglament (UE) nº 1129, 2011). Per altra banda, el seu ús com a conservant de la sang pel consum no està establert; alguns autors com Ockerman i Hansen (1988) en recomanaven la utilització només per finalitats

diferents al consum humà, i en dosis màximes de l'1%; essent aquesta una concentració inferior a l'1,3%, utilitzada en el procés de Florido (2008).

Degut a que el metabisulfit de sodi no està permès en tots els grups alimentaris, i al seu perill potencial per la salut humana, és imprescindible avaluar-ne l'eficàcia comparada amb els mètodes de conservació de la sang utilitzats habitualment pels escorxadors, per determinar si aporta algun avantatge significatiu respecte als mètodes de conservació convencionals.

3.2. OBJECTIUS

L'objectiu principal dels estudis preliminars és l'aplicació d'una metodologia d'obtenció d'un concentrat proteic a partir de sang porcina a escala de laboratori, així com la caracterització fisicoquímica i microbiològica dels diferents productes proteics que se n'obtenen.

Els objectius concrets dels estudis preliminars són:

1. Posar en marxa la metodologia utilitzada en l'obtenció d'un concentrat proteic a partir de sang sencera en el projecte *HYDROBLOOD* i caracteritzar fisicoquímicament i microbiològicament els productes obtinguts a escala de laboratori.
2. Caracteritzar fisicoquímicament i microbiològicament els productes proteics facilitats per l'empresa Talleres Azuara S.L., obtinguts a escala de planta pilot mitjançant la tecnologia descrita en el marc del Projecte Europeu *HIDROBLOOD Horizon 2020*.

Per altra banda, també s'ha plantejat un estudi per avaluar l'eficàcia de la conservació de la sang mitjançant metabisulfit de sodi a temperatura ambient, que és el mètode proposat a la patent de Florido, comparant-lo amb la metodologia convencional de conservació utilitzada pels escorxadors, que consisteix en l'addició d'una substància anticoagulant i la conservació en refrigeració.

3.3. MATERIAL I MÈTODES

3.3.1. Disseny experimental

En el primer assaig, per estudiar el procés patentat per Florido (2008) i el producte que se n'obtenia, es van produir un total de quatre mostres (n=4) de concentrat proteic descolorat mitjançant els equips dels que disposa el laboratori de Tecnologia dels Aliments de la UdG, en diferents dies però en les mateixes condicions (Figura 3.1). Aquests productes proteics es van obtenir a partir de tres mostres de sang de porc, provinents de femelles i mascles capats, a les que se'ls havia addicionat metabisulfit de sodi com a conservant i anticoagulant, tal com descriu la metodologia de Florido. Per altra banda, també es va obtenir una quarta mostra utilitzant sang provinent d'un 60 % de mascles enters i un 40 % de femelles i mascles castrats a la que se li va addicionar tripolifosfat sòdic com a anticoagulant, en substitució del metabisulfit de sodi; aquesta diferenciació pretenia determinar l'efecte del sexe de l'animal en l'aroma del producte i quines diferències implicava l'addició o no d'un reactiu de caràcter reductor.

De cada una de les quatre mostres se'n va analitzar l'activitat d'aigua, el contingut en humitat, cendres, proteïna, greixos i ferro. En la caracterització microbiològica es va determinar l'estat higiènic general del producte a partir dels recomptes de microorganismes aerobis mesòfils totals, Enterobacteris, i *Escherichia coli*, així com la presència o absència de Salmonel·la. Per determinar com afectaven les condicions del procés en el producte final i caracteritzar-ne la composició proteica, també es van realitzar anàlisis electroforètiques SDS-PAGE d'alta densitat.

Per determinar les possibles minves resultants del procés de rentat del producte proteic, també es van analitzar les aigües residuals obtingudes en cada etapa de rentat dels concentrats proteics, determinant-ne el percentatge d'extracte sec, cendres i proteïna.

En el segon assaig es van analitzar cinc mostres procedents de cinc lots diferents (n=5) i produïdes a escala de planta pilot per Talleres Azuara (Figura 3.1). De cada mostra se'n va determinar l'activitat d'aigua i els continguts d'humitat, cendres, proteïna, nitrogen no proteic (NNP), greix i ferro. Amb l'objectiu d'analitzar el perfil proteic, també es va realitzar l'electroforesi SDS-PAGE d'una de les mostres. A més, per completar la caracterització proteica, es va determinar el contingut en aminoàcids en un laboratori extern. Per determinar-ne l'estat higiènic, es van dur a terme els recomptes de microorganismes aerobis mesòfils, Enterobacteris, *E. coli*, i la presència o absència de Salmonel·la.

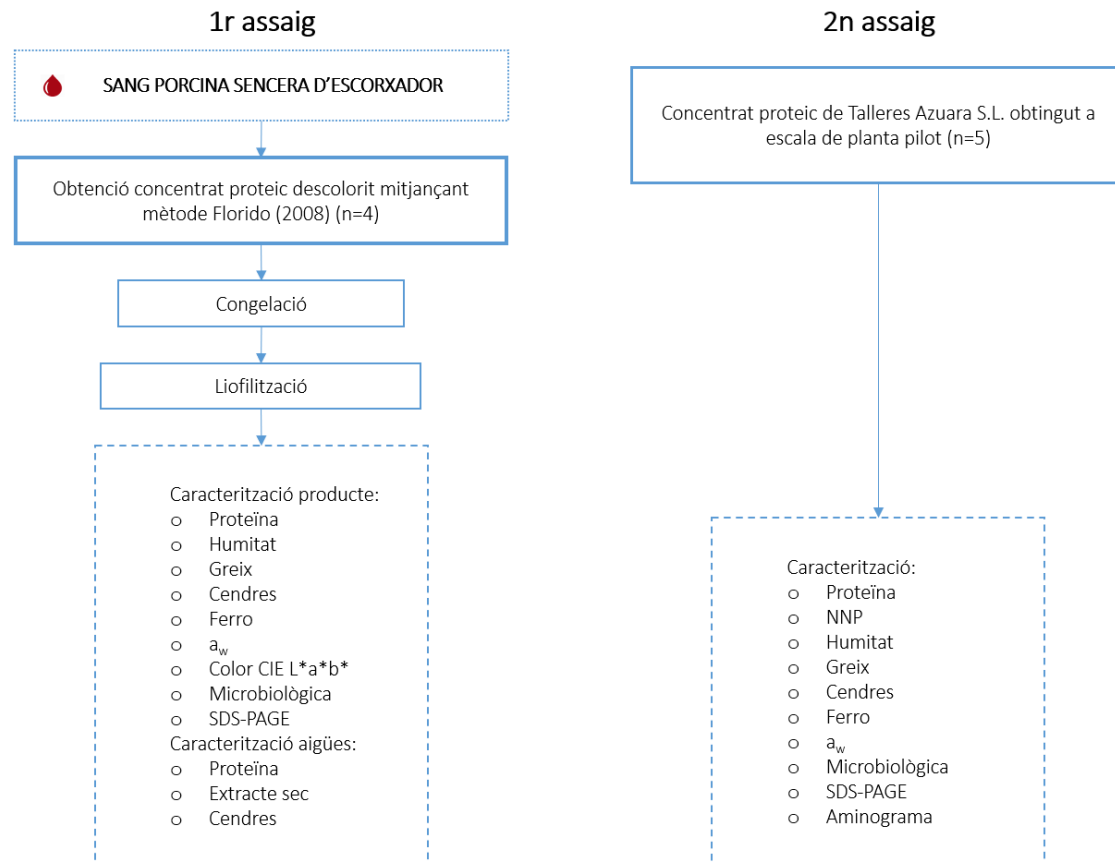


Figura 3.1. Disseny experimental dels assajos preliminars (1r i 2n assaig) per l'estudi i caracterització del concentrat proteic i el seu procés d'obtenció mitjançant el procés patentat per Florido (2008).

En el tercer assaig, per estudiar els efectes de la conservació de la sang a temperatura ambient mitjançant l'addició de metabisulfit de sodi respecte al sistema convencional d'addició d'un anticoagulant i emmagatzematge en refrigeració, es van recollir un total de tres mostres de sang de porc, en dies diferents però en les mateixes condicions (n=3). Cadascuna d'aquestes es va separar en dues alíquotes; a una se li va afegir metabisulfit sòdic (13 g/L) i es va mantenir a temperatura ambient amb agitació durant 14 dies, i a l'altra s'hi va afegir citrat sòdic (4 g/L), com anticoagulant, i es va conservar 7 dies en condicions de refrigeració a 4 °C. A la Figura 3.2 es mostra de forma esquemàtica el disseny experimental seguit en aquest estudi.

L'efectivitat dels mètodes de conservació de la sang es va avaluar mitjançant la realització d'anàlisis microbiològiques de cada mostra als 0, 1, 2, 4 i 7 dies, per la sang amb citrat, i als 0, 1, 2, 4, 7 i 14 dies, per la sang amb metabisulfit. El motiu pel que es van descartar les anàlisis de la sang amb citrat a dia 14 va ser l'evidència del deteriorament de la sang a curt termini i, tot i que al 4t dia de conservació ja presentava un aspecte i olor característics de deteriorament microbiològic, es va decidir realitzar-ne la caracterització fins la primera setmana i així conèixer el comportament de la microbiota contaminant. Es van determinar els

recomptes (en ufc/mL de sang) d'enterobacteris i aerobis mesòfils totals, el que permet estimar la degradació de la sang al llarg dels dies. Per obtenir unes dades complementàries al creixement microbiològic, també es va mesurar l'evolució del pH de les mostres al llarg del temps. Totes les determinacions es van realitzar per duplicat sobre cada mostra (n = 3).

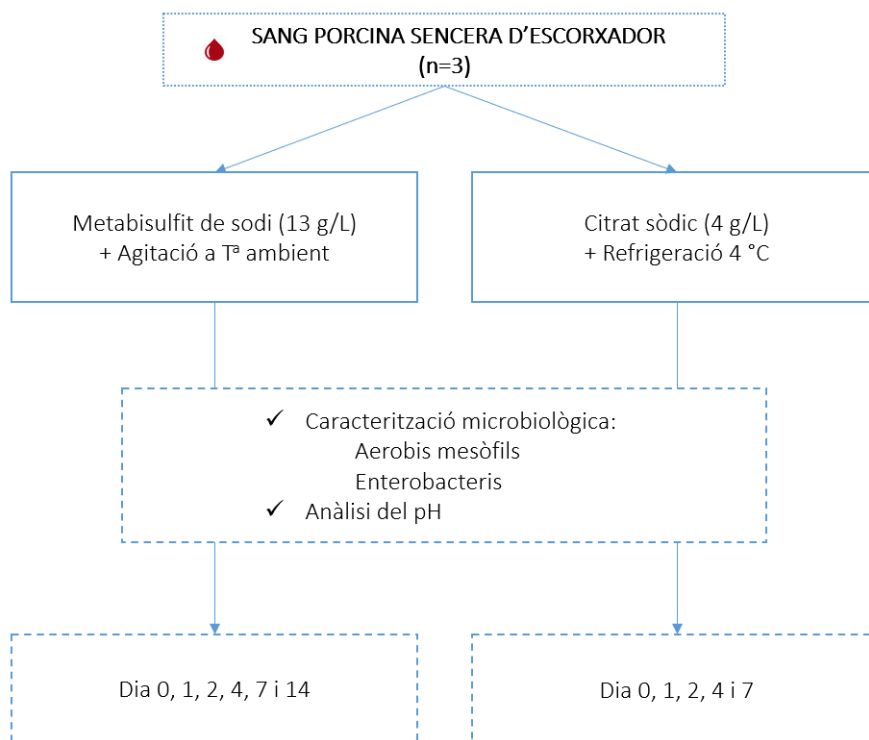


Figura 3.2. Disseny experimental seguit en l'avaluació del metabisulfit de sodi com a conservant de la sang envers al mètode convencional utilitzat en els escorxadors.

3.3.2. Procedència de les mostres

En el primer assaig, de les quatre mostres de sang porcina utilitzades, tres mostres procedien de l'escorxador Matadero Frigorífico del Cardoner S.A. (d'ara endavant "Mafrica"), situat a Sant Joan de Vilatorrada (Barcelona), recollides en dies diferents però en les mateixes condicions. Les principals races sacrificades eren creuaments de Large White, Landrace i Duroc i es tractava de femelles o mascles castrats. En aquest escorxador, el degollat i dessagnat dels animals es du a terme en posició vertical, amb un atordiment previ mitjançant diòxid de carboni. La sang és recollida en un sistema obert on se li addiciona un anticoagulant. Posteriorment, és refredada fins a 5 °C mitjançant un bescanviador de calor i es manté amb agitació en un tanc de refrigeració fins a ser recollida per una empresa especialitzada.

Les mostres eren enviades des de l'escorxador envasades en recipients estèrils en condicions de refrigeració. A aquestes se'ls havia addicionat, en el moment de recollida, metabisulfit de sodi (1,3 %), com agent anticoagulant i conservant, i sucre (0,2 %) tal com s'especifica en el mètode patentat (Florida, 2008).

Per altra banda, la quarta mostra de sang d'aquest primer estudi procedia de l'escorxador industrial Norfrisa (Riudellots de la Selva, Girona). Aquesta es va recollir per verificar si la utilització d'anticoagulant, a més de conservant (metabisulfit), afectava en el procés de descoloració.

En aquest escorxador la majoria d'animals sacrificats són mascles enters i femelles de creuaments de Large white, Landrace, Pietrain i Duroc. Aquests són sacrificats a l'edat de 6 mesos quan han assolit un pes aproximat de 100 kg. En aquest escorxador es du a terme el sacrifici utilitzant un sistema d'atordiment mitjançant diòxid de carboni i un degollat i dessagnat vertical.

La sang va ser recollida amb un sistema higiènic obert de doble canal, on se li va addicionar una solució anticoagulant de tripolifosfat de sodi al 4% (p/v) i, posteriorment, va ser refredada fins a 5 °C mitjançant un bescanviador de calor i es va mantenir en agitació en un tanc de refrigeració.

Les mostres de sang es recollien en un recipient estèril i es transportaven fins al laboratori en una bossa isotèrmica amb acumuladors tèrmics per mantenir la cadena de fred.

Les mostres d'aquest primer estudi van ser processades immediatament al laboratori el mateix dia de recollida.

En el segon estudi, es van analitzar cinc lots de concentrat proteic deshidratat proporcionats per Talleres Azuara. L'empresa va produir aquestes mostres a escala de planta pilot a partir del processament de sang porcina procedent de l'escorxador Mafrica. Aquest producte era suficientment estable per ser enviat en condicions de temperatura ambient en recipients hermètics estèrils fins als laboratoris de la UdG.

En el tercer assaig es va utilitzar mostres de sang conservades mitjançant metabisulfit de sodi o anticoagulant que procedien de l'escorxador Mafrica. La sang va ser recollida en garrafes de plàstic estèrils directament del degollat del porc, per així minimitzar la possible contaminació microbiològica. A cada alíquota se li afegia el metabisulfit sòdic (1,3 % p/v) o el citrat sòdic (0,4 % p/v) en el mateix escorxador. Aquestes mostres van ser transportades fins al laboratori de la universitat en bosses isotèrmiques amb acumuladors tèrmics per mantenir la cadena del fred.

3.3.3. Obtenció del concentrat proteic segons el mètode descrit per Florida (2008)

En el primer estudi, per obtenir les mostres dels concentrats proteics descolorits segons el mètode descrit per Florida (2008) a escala de laboratori, es va seguir el procés que es mostra a la Figura 3.3.

Inicialment es va partir de sang porcina sencera (amb un pH de 7,2-7,4) que es diluïa a parts iguals amb aigua de xarxa, per així produir l'hemòlisi dels eritròcits i aconseguir alliberar-ne l'hemoglobina.

Seguidament, per inactivar els enzims oxido-reductors de la sang, com la peroxidasa i la catalasa, s'afegia HCl (0,1 N) fins a arribar a un pH de 1,5, en condicions d'agitació per obtenir una bona homogeneïtzació. El producte es deixava reposar durant 30 min; seguidament, es reajustava el pH fins a un valor de 6 mitjançant l'addició de NaOH (20 % p/v). Amb aquest pas s'aconseguia la precipitació de les proteïnes de la sang i s'obtenien les condicions òptimes per la següent fase. En aquest punt es deixava establir la solució durant 30 min.

Seguidament, s'addicionava peròxid d'hidrogen (30 % v/v) a la solució fins a una concentració del 3 % (v/v) de peròxid respecte la sang i es deixava aproximadament 24 h en condicions d'agitació suau a temperatura ambient.

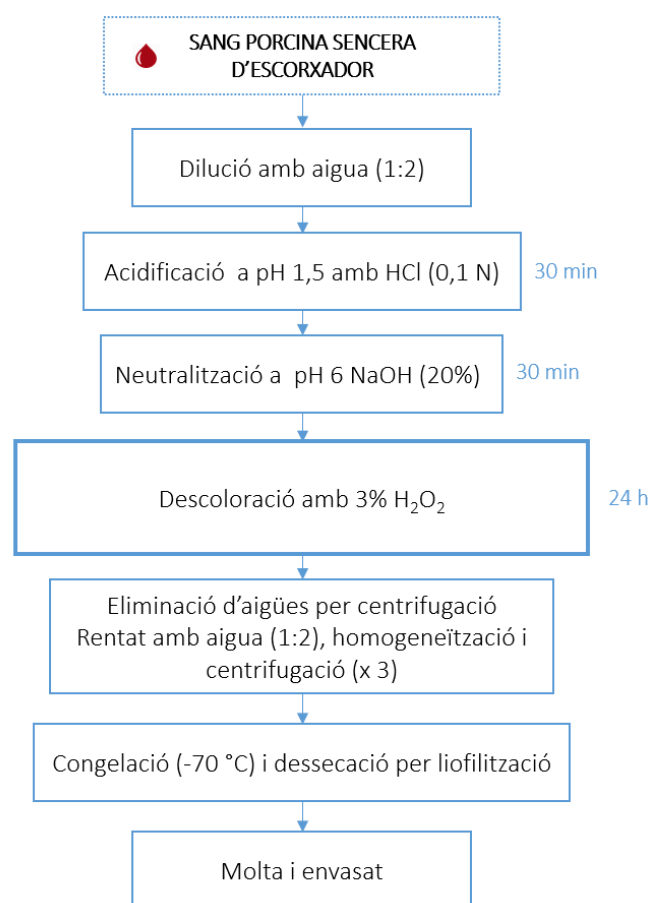


Figura 3.3. Diagrama de flux del procés d'obtenció d'un concentrat proteic deshidratat a partir de sang porcina sencera, segons el procediment descrit per Florido (2008).

Transcorregut el temps de descoloració, es procedia a separar la proteïna, insolubilitzada i descolorada, del sobrenedant mitjançant centrifugació a 12.500 x g durant 10 min i a 15-20 °C, en una centrífuga Sorvall RC-5C plus (Dupont Co, Newton, Connecticut, EUA). Seguidament, es recuperava el precipitat i se li addicionava

aigua (1:2) amb l'objectiu de dur a terme fins a tres etapes de rentat del producte final (eliminant l'aigua mitjançant centrifugació a $12.500 \times g$ durant 10 min, a $20 \text{ }^\circ\text{C}$) i així eliminar les sals formades durant el procés i el possible excés de reactius.

Finalment, el producte es dipositava en safates d'alumini i es congelava a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ per, posteriorment, ser assecat mitjançant liofilització, tal com es descriu en l'apartat 3.3.4. El producte liofilitzat era molt en un molinet de cafè i envasat en pots de plàstic amb tapa roscada, higienitzats prèviament amb una solució d'hipoclorit de sodi, per dur-ne a terme les anàlisis corresponents.

3.3.4. Deshidratació

El procés de dessecació escollit en el primer assaig a escala de laboratori va ser la liofilització, un mètode basat en la deshidratació a baixes temperatures (congelació) i en condicions de buit, per sota del punt triple de l'aigua ($T^{\text{a}} = 0,007 \text{ }^\circ\text{C}$ i $P = 4,6 \text{ Torr}$), donant lloc a la sublimació de l'aigua del producte. La liofilització no redueix la càrrega bacteriana dels productes, sinó que solament frena el creixement dels microorganismes degut a la disminució de l'activitat de l'aigua.

Es va decidir utilitzar aquesta tecnologia al laboratori, com a alternativa al tractament d'assecament escollit pel procés a escala de planta pilot o industrial, ja que es tractava del mètode més eficaç del que es disposava, permetent obtenir un producte sec caracteritzable i minimitzar les pèrdues que es poden produir en altres tecnologies d'assecat convencionals. Tanmateix, es tracta d'un procés molt car que augmenta en gran mesura el preu final del producte, pel que en la indústria alimentària normalment només s'utilitza en productes d'alt valor afegit.

Per assecar les mostres es va utilitzar un liofilitzador de laboratori VIRTIS UNITOP HL (Gardiner, Nova York, Estats Units). Tal com s'ha comentat anteriorment, el producte humit es va dipositar en safates d'alumini i es va congelar a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$. Es realitzava una primera etapa de dessecació (sublimació), sotmetent les mostres a 100 mT de buit a $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ durant 30 h, seguida d'una dessecació secundària (desorció) a 100 mT de buit i $15 \text{ }^\circ\text{C}$ durant 5 h més. Després, les mostres liofilitzades s'envasaven i s'emmagatzemaven a temperatura ambient fins que es duien a terme les anàlisis corresponents.

Per altra banda, les mostres proporcionades per Talleres Azuara, utilitzades en el segon estudi, van ser deshidratades per l'empresa mitjançant un assecador per convecció d'aire calent *Flash* RINA-JET (RINA Flash Dryer, Riera Nadeu, S.A., Granollers, Espanya). Es tracta d'un turbo-assecador en continu, o assecador tipus flash, que du a terme una deshidratació aplicant un tractament tèrmic a través de la injecció d'aire a altes temperatures sobre el producte humit i disgregat durant un període curt de temps, el que permet un assecament quasi instantani, automàtic i en continu, obtenint un producte en pols homogeni.

3.3.5. Caracterització fisicoquímica

3.3.5.1. Composició química

La determinació de la composició química dels productes es va dur a terme com a mínim per duplicat en cada mostra. Les determinacions realitzades van ser: contingut en humitat, cendres, proteïna, nitrogen no proteic (NNP), greix, cendres, ferro, i perfil aminoacídic, segons els procediments que es descriuran a continuació.

I. Humitat

El contingut en humitat es va determinar per gravimetria (ISO R-1442), mitjançant la dessecació de les mostres en una estufa de dessecació per convecció natural (Selecta, Abrera, Espanya) a 100 ± 2 °C *overnight* (fins assolir un pes constant). El resultat s'expressa en percentatge d'humitat a partir de la pèrdua de pes de la mostra.

II. Activitat de l'aigua

L'activitat de l'aigua (a_w) es va determinar a 25 °C en un higròmetre automàtic Novasina LabMaster a_w (Novasina AG, Lachen, Suïssa). L' a_w es defineix com el quocient entre la pressió parcial del vapor d'aigua que conté l'aliment i la pressió de l'aigua destil·lada en idèntiques condicions, representant la disponibilitat de l'aigua en un aliment. Es mesura en valors de 0 (mínim) a 1 (màxim).

III. Cendres

El contingut de sals minerals (cendres) es va determinar per gravimetria, duent a terme la incineració de les mostres després d'haver-les assecat a l'estufa a 100 °C, en una mufla (Naber D-2804, Lilienthal, Alemanya) a 600 °C durant tota la nit (per aconseguir la calcinació total de les mostres). El resultat s'expressa en percentatge de cendres sobre el pes de la mostra.

IV. Proteïna

Per determinar el contingut proteic de les mostres obtingudes es va utilitzar el mètode Kjeldahl (ISO R-937, 1978). Es van utilitzar un digestor Kjeldahl Gerhardt KB20 (Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Alemanya) i un destil·lador Kjeldahl BÜCHI K-314 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suïssa). Per obtenir el percentatge de proteïna es va utilitzar un factor de conversió de nitrogen a proteïna de 6,25.

V. Greix

El percentatge de greix de les mostres es va determinar a partir del mètode Soxhlet (ISO 1443, 1973), el qual du a terme una hidròlisi àcida de la mostra seguida d'una extracció del greix mitjançant dietilèter, el que permet recuperar el greix i calcular-ne el percentatge per gravimetria.

VI. Perfil aminoacídic

El contingut en aminoàcids es va determinar en un laboratori d'una empresa externa (Centre Tecnològic de Nutrició i Salut, Reus, Espanya) mitjançant cromatografia líquida acoblada a un espectròmetre de masses de triple quadrupol (7200 GC-qTOF/MS Series, Agilent Technologies, Sta. Clara, USA). La mostra de concentrat proteic en pols es va hidrolitzar mitjançant un procés d'acidificació amb àcid clorhídric encapsulat en N₂ i mantingut a 110 °C durant 24 h. Per la quantificació dels aminoàcids es va utilitzar un mix d'aminoàcids marcats com a estàndards interns (*Metabolomics amino acid mix Standard*). Degut a la tècnica emprada, no es va determinar la quantitat de triptòfan. La columna analítica utilitzada va ser una ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm 2,1 x 100 mm (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA). La separació cromatogràfica es va realitzar en un gradient d'acetat d'amoni 20 mM a pH 5 i acetonitril 80 %: aigua Mili Q (8:2) com a fase mòbil. Les determinacions d'aminoàcids es van dur a terme per triplicat.

VII. Nitrogen no proteic

La determinació del nitrogen no proteic respecte al nitrogen total es pot utilitzar com a mesura indicadora del grau d'hidròlisi d'un producte. Per valorar el nitrogen no proteic de les mostres en pols, aquestes es van dissoldre en hidròxid de sodi (1N) i es va induir la precipitació de les proteïnes mitjançant àcid tricloroacètic (TCA) al 12,5 % (p/v). La solució es va filtrar amb un filtre Whatman nº 1 de 150 mm de diàmetre i la solució recuperada es va digerir, destil·lar i valorar seguint el mètode Kjeldhal. El valor de nitrogen no proteic es va expressar com el percentatge de nitrogen en el filtrat després de la precipitació respecte el contingut en nitrogen total.

VIII. Determinació del ferro

La quantitat de ferro es va determinar a partir de les cendres digerides de les mostres a analitzar mitjançant espectrofotometria d'absorció atòmica. Les cendres de les mostres es van recuperar afegint HNO₃ (70 %) i HCl concentrat. Seguidament, es van digerir a 90 °C durant 20 min per, finalment, filtrar-les en filtres de paper Whatman Ashless (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Anglaterra) i diluir-les per determinar-ne el contingut en ferro.

Per les determinacions del ferro es va utilitzar un espectròmetre d'absorció atòmica SpectrAA Varian 50B (Agilent Technologies, Sta. Clara, EUA), mitjançant una làmpada multielemental Varian per a Cu, Cr, Fe, Ni i Mn. Les condicions d'anàlisi utilitzades van ser la flama d'absorció oxidativa, 10 mA de corrent de làmpada, acetilè com a combustible, un suport d'aire, una longitud d'ona de 248,3 nm (Fe), una obertura del lector de 0,2 nm (Slit) i un interval de 0,06 a 15 ppm. L'espectrofotòmetre es va calibrar mitjançant una solució patró de 2,5, 5, 10 i 15 ppm de ferro, 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.

IX. Digestibilitat *in vitro*

La digestibilitat del producte es va determinar mitjançant l'anàlisi de la digestibilitat *in vitro* de la proteïna total en una de les mostres obtingudes al laboratori (C1). Aquesta anàlisi es va dur a terme pel Centre Tecnològic de Nutrició i Salut (Reus) a partir del mètode de Boisen i Fernández (1994).

3.3.5.2. Determinació del color

La determinació del color de les mostres es va realitzar de forma instrumental mitjançant un colorímetre. Per poder distingir els colors dels objectes de forma objectiva s'utilitzen instruments de mesura capaços d'atorgar un valor numèric a cada color. Existeixen varis aparells capaços de determinar valors associats al color com serien els espectrofotòmetres esfèrics, multi-angle o colorímetres; el mètode més ràpid i pràctic per mesurar el color en aliments és el colorímetre. Aquest aparell és capaç d'emular la resposta de l'ull humà al color i la llum mitjançant tres filtres de color verd, vermell i blau, i transformar el senyal a valors de l'escala de color CIE $L^*a^*b^*$.

Aquests valors van ser definits per la Comissió Internacional de la Il·luminació (CIE), la institució responsable de les recomanacions internacionals per la fotometria i colorimetria. El 1931 aquesta comissió va estandaritzar els sistemes d'ordre del color especificant la llum, l'observador i la metodologia per determinar tres coordenades que situen un color en un espai determinat de color que inclou les escales CIE XYZ, CIE $L^*a^*b^*$ i CIE $L^*C^*h^\circ$ (X-Rite, 2002).

L'escala CIE $L^*a^*b^*$ es basa en la teoria que afirma que un color no pot estar format a la vegada per verd i vermell o groc i blau, pel que es poden definir els valors de a^* (vermell→ verd) i b^* (groc→blau), respectivament (de +60 a -60). Per altra banda, es defineix la component L^* (lluminositat), la qual va del negre (0) al blanc (100).

L'escala CIE $L^*C^*h^\circ$ defineix els valors de saturació o croma (C^*) descrits per l'equació $C^*=(a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$ i la tonalitat o matís (h°) descrit com a $h^\circ=\arctan(b^*/a^*)$. Així, aquests dos paràmetres permeten analitzar el color relacionant els valors d' a^* i b^* .

Tots aquests valors s'expressen en un espai tridimensional esfèric on es representa la lluminositat a l'eix de les y, verticalment, la saturació a l'eix de les x, horitzontalment, i la tonalitat envoltant la circumferència externa central (Figura 3.4).

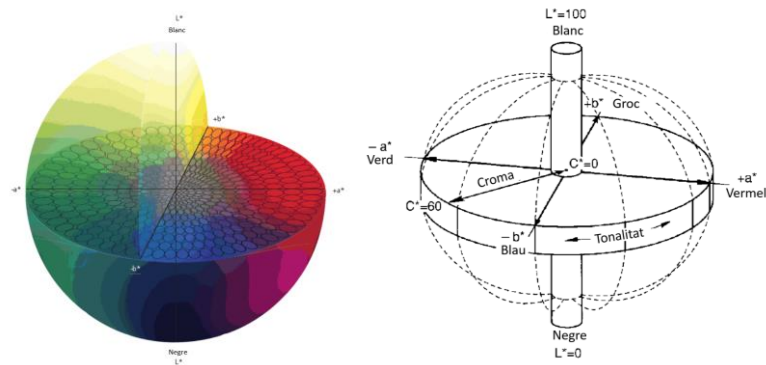


Figura 3.4. Representació tridimensional de l'espai CIE $L^*a^*b^*$ (esquerre) i CIE $L^*C^*h^\circ$ (dreta) del color (adaptat de X-Rite, Incorporated, 2002).

Per determinar els paràmetres CIE $L^*a^*b^*$ de color de les mostres es va utilitzar un colorímetre Minolta CR-300 (Minolta Co, Ltd, Osaka, Japó) que utilitza un sistema d'il·luminació difusa a través d'un con de projecció de 8 mm de diàmetre i un il·luminant universal estàndard D_{65} . El colorímetre es va calibrar mitjançant una placa patró de ceràmica corresponent al blanc. Cada determinació es va realitzar per triplicat.

3.3.6. Caracterització microbiològica

En els dos primers estudis es va dur a terme una caracterització microbiològica general dels productes. Es van determinar els recomptes d'aerobis mesòfils viables totals, Enterobacteris, *E. coli* i la presència o absència de Salmonel·la en 25 g de producte proteic.

Per dur a terme les anàlisis, es van realitzar les dilucions decimals pertinents de cada mostra en un volum de diluent estèril (Aigua de Tryptona: Solució salina 1% NaCl i 1% de peptona trípica de caseïna). Les anàlisis es van realitzar dins una cabina de flux laminar (Telstar BV-100), per evitar la possible contaminació de les plaques, seguint la metodologia establerta.

En l'estudi de l'efecte del metabisulfit sobre la conservació de la sang, les determinacions es van dur a terme per duplicat, mitjançant la dilució de la sang en un volum de solució estèril (Aigua de Tryptona: Solució salina 1% NaCl i 1% de peptona trípica de caseïna). Es van analitzar els aerobis mesòfils totals i els enterobacteris.

* Recompte d'aerobis mesòfils viables

Els aerobis mesòfils viables es van determinar mitjançant la sembra en massa (*Pour plate*) d'1 mL de les dilucions corresponents de cada mostra en el medi de recompte en placa *Plate Count Agar* (PCA)

(Scharlau, Scharlab S.L., Espanya) (ISO 4833, 2013). Les plaques es van mantenir en incubació a 30 ± 1 °C durant 72 h fins a realitzar el recompte de les colònies crescudes en l'interior i la superfície del medi.

* *Recompte d'Enterobacteris*

Els recomptes d'Enterobacteris es van determinar a partir de la tècnica de sembra en massa (*Pour plate*) i sobrecapa (ISO 7402, 1993), sembrant 1 mL de cada dilució corresponent en el medi Agar Cristall violeta-Roig neutre-Bilis-Glucosa (VRBG) (Oxoid Ltd., Thermo Fisher Scientific, Basingtoke, Anglaterra) i posterior incubació de les mostres a 37 ± 1 °C durant 24 h. Posteriorment, es va realitzar els recomptes de les colònies crescudes en l'interior del medi.

* *E. coli*

El recompte d'*E. coli* (ISO 16649-2, 2001) es va realitzar a partir de la sembra homogènia en superfície de la mostra sobre el medi Tryptone X-Glucurònid (TBX amb cromogen 5-brom-4-clor-3-indolil- β -D-glucurònid (X-Glucurònid) (Oxoid) i incubant les plaques durant 4 h a 37 ± 1 °C per recuperar les cèl·lules estressades i a 44 ± 1 °C durant 18-24 h per determinar les colònies amb una coloració blavosa-verda.

* *Detecció de Salmonella spp.*

La detecció de *Salmonella spp.* es va realitzar segons el mètode EN/ISO 6579 (2002) a partir d'un pre-enriquiment no selectiu de les mostres, incubant 25 g de producte en 250 mL d'aigua de peptona durant 16-20 h a 37 ± 1 °C. Seguidament, es va dur a terme un enriquiment selectiu en medis líquids de tetracionat i selenit verd brillant (Adsa-Micro S.A., ComercialLab, Vigo, Espanya), amb una incubació de 48 h a $42-43$ °C i 37 ± 1 °C, respectivament, i un aïllament selectiu en plaques d'agar Salmonella-Shigella (SS) (Scharlau, Scharlab S.L.) i agar Verd Brillant (BGA) (Oxoid), amb una incubació a 37 ± 1 °C durant 24 h. En cas d'haver detectat colònies sospitoses (colònies grogues amb un centre negre en SS i colònies vermell-rosades amb un halo vermell en BGA), se les hauria seleccionat per realitzar proves bioquímiques de confirmació (sembra en agar inclinat Kligler, LIA (Scharlau, Scharlab S.L.), medi per Indol i Nitrits o per confirmació a partir de proves bioquímiques ràpides en una galeria API®-20E (Biomérieux S.A., Marcy-l'Etoile, França)).

3.3.7. Electroforesi SDS-PAGE

Amb l'objectiu d'estudiar el perfil proteic dels productes analitzats es va realitzar una electroforesi SDS-PAGE en gel de poliacrilamida (20 %) mitjançant un equip d'electroforesi Mini-PROTEAN® Tetra System (BIO RAD, California, EUA).

Les mostres es van dissoldre *over-night* a la concentració òptima de proteïna en una solució d'urea 8 M i SDS al 4 % i es van desnaturalitzar mitjançant β -mercaptoetanol. Les condicions de separació del gel van ser de 500 V i 10 mA durant 2,5 h. Es van utilitzar marcadors de pes molecular d'alt (10 a 220 kDa; BenchMark™ Protein Ladder, Novex, EUA) i baix pes molecular (3,4 a 100 kDa; PageRuler™ Low Range Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific, EUA). Els gels resultants es van tenyir mitjançant una solució de Blau de Comassie (0,05 % p/v) que contenia metanol (50 % v/v) i àcid acètic (10 % v/v) durant 15 min, i es van destenyir *over-night* mitjançant una solució d'àcid acètic (7 % v/v). Finalment es van conservar mitjançant una solució de glicerol (10 % v/v) i àcid acètic (10 % v/v) i es van envasar en bosses al buit.

3.3.8. Tractament estadístic de les dades

L'anàlisi estadística dels resultats en l'estudi microbiològic de la sang amb diferents mètodes de conservació es va fer mitjançant el paquet estadístic *IBM SPSS Statistics* versió 25 (IBM SPSS Statistical software Inc., Chicago, IL, USA).

Degut a que no es complia el supòsit d'independència entre dades, es va comprovar l'esfericitat d'aquestes mitjançant una prova de Mauchy.

Degut a la falta de graus de llibertat, no va ser possible dur a terme una comparació dels tractaments al llarg del temps. La comparació entre aquests es va dur a terme mitjançant un anàlisi univariant de la variància (ANOVA) a dia 7 de conservació de la sang, considerant com a significatius els valors de probabilitat inferiors a 0,05. Es va considerar els factors fixos: temps (dia 7) i tractament (metabisulfit o anticoagulant); i les variables dependents: mostra i microorganismes (aerobis mesòfils o enterobactèries). L'homoscedasticitat de les dades es va comprovar aplicant el test de Levene.

3.4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.4.1. Caracterització dels productes obtinguts a escala de laboratori

3.4.1.1. Anàlisis fisicoquímiques

A la Figura 3.5 es mostra una imatge dels quatre productes obtinguts en les proves de laboratori mitjançant el procés descrit a l'apartat 3.3; aquests es presenten en forma de pols, més o menys homogènia, de color marró clar-daurat i amb un gust i olor més aviat neutres. Les primeres tres mostres (C1, C2 i C3) provenien de mostres de sang sencera de femelles i mascles capats amb l'addició de metabisulfit de sodi com a conservant i anticoagulant. La mostra C4 provenia de sang sencera de mascles i tripolifosfat de sodi com a anticoagulant.

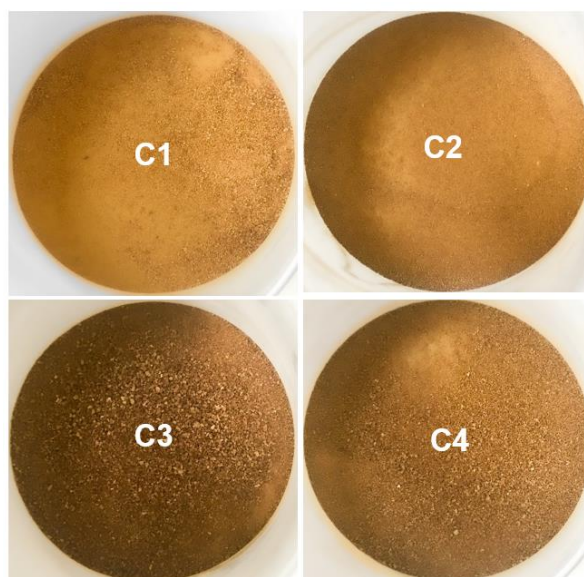


Figura 3.5. Productes proteics dessecats obtinguts a partir de sang de porc sencera a escala de laboratori mitjançant el procés descrit per Florido (2008).

A la Taula 3.1 es mostren els valors d'extracte sec, cendres, greix, proteïna, ferro i activitat d'aigua obtinguts en la caracterització dels productes liofilitzats. Els valors d'extracte sec per tots els productes són superiors al 93 %, com correspon a un producte deshidratat. Aquests valors són similars, però una mica superiors als reportats per Yang & Lin (1998) en fracció cel·lular descolorada amb H_2O_2 i assecada per liofilització. Les diferències observades entre els productes analitzats, amb una desviació del 1,56 %, són atribuïbles a dificultats en la reproductibilitat de les condicions de processat final (rentats i assecament del producte). Aquestes diferències també queden reflectides en els valors d' a_w , els quals són superiors en les mostres

amb més humitat. Tot i això, degut a que la liofilització és una de les tecnologies que permet un major grau de deshidratació, tots els valors d' a_w són molt baixos, el que comporta unes condicions òptimes de conservació del producte en pols enfront el creixement de microorganismes indesitjables. Tanmateix, els productes amb valors d' a_w molt baixa presenten tendència a guanyar aigua (higroscopicitat), així com a oxidar-se, fet que pot produir inestabilitat del producte al llarg del temps d'emmagatzematge. Com ja s'ha dit abans, a la indústria alimentària la liofilització només s'aplica a productes d'alt valor afegit, pel que no serà el mètode d'elecció per aquest concentrat proteic, pel que és molt probable que amb la tecnologia d'assecat escollida per la producció a escala industrial s'assoleixin valors d'humitat i a_w lleugerament superiors als obtinguts en aquest estudi.

Taula 3.1. Composició química dels productes proteics liofilitzats obtinguts a partir de sang porcina i produïts a escala de laboratori mitjançant el mètode patentat per Florido (2008). Es mostra el percentatge d'extracte sec, cendres, greix i proteïna, activitat d'aigua (a_w) i el contingut en ferro (mitjanes \pm DE).

Mostra	Extracte sec (%)	a_w (25°C)	Proteïna (%)	Greix (%)	Cendres (%)	Ferro (g/kg)
C1	93,54 \pm 0,02	0,18 \pm 0,01	92,12 \pm 0,97	1,23 \pm 0,07	1,27 \pm 0,04	2,10 \pm 0,01
C2	97,14 \pm 0,18	0,06 \pm 0,01	93,94 \pm 1,41	1,40 \pm 0,03	1,24 \pm 0,08	2,31 \pm 0,03
C3	96,44 \pm 0,06	0,07 \pm 0,01	93,78 \pm 1,92	1,42 \pm 0,18	0,82 \pm 0,06	2,19 \pm 0,09
C4	95,88 \pm 0,39	0,06 \pm 0,01	93,85 \pm 0,73	N/D ¹	1,12 \pm 0,08	N/D ¹
Mitjana \pm DE	95,75 \pm 1,56	0,09 \pm 0,06	93,42 \pm 0,87	1,35 \pm 0,10	1,11 \pm 0,21	2,20 \pm 0,11

¹N/D: valors no determinats.

El paràmetre més interessant d'analitzar en aquest producte és el contingut proteic, presentant-se en estat insoluble, amb una mitjana del 93,42 %. Aquest valor és superior al descrit per Yang & Lin (1998) en un producte similar. Els valors obtinguts en les anàlisis donen resultats pràcticament idèntics, excepte la primera mostra, en què és lleugerament inferior degut a que conté una mica més d'humitat, resultant en un percentatge superior de proteïna respecte a extracte sec. Així, es pot dir que no hi ha diferències entre mostres en quant al contingut en proteïna, que és amb molta diferència el component principal del producte.

Tal com s'esperava, s'ha determinat un baix contingut en greix ja que és un component en baix percentatge en la sang, amb una mitjana de l'1,35 %. Yang i Lin (1998) van trobar una concentració de greix de 0,9 %; la diferència a la baixa està en consonància amb el major contingut d'humitat de les seves mostres.

El baix contingut en greix i de sals minerals i l'alt percentatge de proteïna, aporta un valor afegit al producte a nivell nutricional, pel que es pot considerar una bona opció com a ingredient proteic en la formulació de productes alimentaris, tant per alimentació humana com animal.

El contingut en cendres de tots els productes és baix, amb un valor mitjà de l'1,11 %. Aquest valor és similar a l'obtingut en altres productes dessecats procedents de la sang com és el plasma, que conté un 1,4 % de sals (Casals Sánchez, 2011), però inferior al de la fracció cel·lular descolorada i liofilitzada descrita per Yang & Lin (1998), degut als rentats amb aigua aplicats a la nostra proteïna descolorada abans de l'assecamment. El contingut en cendres depèn de les diferents etapes de processat (quantitat de sals anticoagulants afegides a la sang, addició de reactius per ajustar les condicions de pH i per la descoloració, i neteja final), pel que és provable que a escala industrial també s'obtinguin resultats diferents.






Pel que fa al contingut en ferro de les mostres analitzades, aquestes presenten una mitjana de 2,2 g de ferro per kg de producte, valor comparable als trobats per Jamroz *et al.* (2011a) en fracció cel·lular i plasma deshidratats per atomització (1,77 i 0,998 mg/kg, respectivament), representant una font alimentària important de ferro; tan sols 4-8 g de producte proteic corresponen a 8-18 g de ferro, la ingesta diària recomanada per a un adult segons el *National Institute of Health* (NIH, 2016).

El ferro és un dels minerals essencials en l'alimentació degut a estar implicat en el funcionament òptim de la sang, pel que una dieta pobre en aquest element representa una gran problemàtica sobre la salut. La OMS va estimar que aproximadament 2000 milions de persones a tot el món patien anèmia deguda a la falta de ferro. Així, aquest producte, amb una alta presència del ferro hemínic (Fe-hemo), que presenta una elevada biodisponibilitat (Gaitán *et al.*, 2006; Guardia i Garrigues, 2015), podria representar una solució a un problema de salut creixent. Està descrit que la sang de porc és més rica en ferro hèmic que la sang d'altres espècies com la del pollastre, i similar a la de l'ànec (Sorapukdee *et al.*, 2017). A més, el Fe del grup hemo és molt més fàcilment absorbible que el Fe inorgànic present en fonts d'origen vegetal o sals ferroses utilitzades normalment en la fortificació d'aliments (In *et al.*, 2002; Lynch *et al.*, 2017).

Així, vista la composició, l'única limitació que pot presentar aquest producte per al seu ús com a ingredient alimentari és la insolubilitat de la proteïna de cares a les seves possibles aplicacions i utilització com a ingredient tecno-funcional.

A la Taula 3.2 es mostren els paràmetres CIE $L^*a^*b^*$ del color dels quatre productes proteics obtinguts; com es pot observar s'obté un producte amb una coloració marronosa-ocre molt semblant en totes les produccions. Aquests paràmetres difereixen dels trobats a la bibliografia per mostres descolorades i assecades amb la mateixa tecnologia, que obtenen una pols més fosca (L^* 33,16), la component a^* és força similar amb valors de 9,34 de mitjana, i una b^* molt inferior, de 7,23 (Yang & Lin, 1998). Per altra banda, el valor de L^* coincideix amb el trobat per Hicks *et al.* (2013), que utilitzaven una concentració de peròxid molt superior i els valors de les coordenades RGB s'aproximen molt als trobats per aquests mateixos autors amb sang tractada amb un 19% de peròxid (183, 141, 94), tot i que les condicions oxidants aplicades en el present treball són molt menys severes.

Taula 3.2. Paràmetres del color de les quatre produccions de concentrat proteic liofilitzat obtingudes a escala de laboratori a partir de sang porcina mitjançant el mètode patentat per Florido (2008). Es mostren els paràmetres CIE L* a* b* del color, els paràmetres de l'escala RGB, la representació del color per cada mostra proteica i la mitjana \pm DE.

Mostra	L* (lluminositat)	a* (coordenada vermella)	b* (coordenada groga)	RGB	
C1	64,13	7,96	29,60	182 150 103	
C2	55,14	9,29	24,57	158 126 90	
C3	52,33	9,01	20,00	149 119 91	
C4	53,07	8,61	26,98	152 121 80	
Mitjana \pm DE	56,17 \pm 5,44	8,72 \pm 0,58	25,29 \pm 4,08	160 129 91	

Si es valora els resultats de color de la mostra C4, procedent de sang amb anticoagulant, es pot observar que les diferències de color són mínimes, el que no es pot atribuir a la presència o no de metabisulfit.

Per altra banda, sí s'aprecien diferències de color entre la primera producció (mostra C1) i la resta: tant en el paràmetre L* (corresponent a la lluminositat) com en el b* (corresponent al groc) mostren valors superiors als de la resta de productes, el que equival a un producte amb un to més clar. Aquesta és la mostra que també presentava un valor més alt d'humitat, pel que no es pot descartar que el contingut en aigua afecti al color. En qualsevol cas, les diferències observades podrien explicar-se per les possibles variacions en el procés, que durava varies hores i que podria haver-se estès més en aquesta rèplica i, per tant, resultant en una major descoloració. Per altra banda, també es podria deure al propi estat de la sang abans de ser processada.

En la quarta mostra (C4), a més a més de la substitució del metabisulfit per polifosfat com anticoagulant, es va utilitzar sang de mascles enters. Aquesta modificació es va dur a terme per analitzar com afectava la utilització de sang de mascles no capats en la olor final del producte.

Està descrit que el consum de mascles no capats d'edat adulta representa una problemàtica per l'olor o gust desagradable característic que es pot percebre en els productes carnis derivats, bàsicament, per la presència d'androstenona i escatol, compostos que s'acumulen en el teixit adipós dels animals després d'arribar a la maduresa sexual (Font i Furnols, 2002).

L'anàlisi de l'olor de les mostres es va realitzar de manera subjectiva, i no es van apreciar diferències en l'aroma de les diferents mostres obtingudes. Cal destacar que tots els productes obtinguts presentaven un aroma suau, poc intens i força neutre, de manera que probablement el procés de descoloració també contribueix a causar un efecte desodoritzant o de neutralització dels compostos responsables de l'aroma animal.

Anàlisi de les aigües descartades durant el procés

Per determinar l'eficàcia del procés en l'extracció i recuperació de proteïna de la sang es va analitzar el sobrenedant descartat i les aigües de rentat.

A la Figura 3.6 es mostren les fraccions de sobrenedant recuperades en l'etapa d'eliminació d'aigües (o aigües mare) i aigües de rentat del producte proteic. Es pot observar la disminució del color d'aquestes fraccions a mesura que es duen a terme els diferents rentats, el que indica una menor concentració de substàncies dissoltes en cada etapa.



Figura 3.6. Fraccions de sobrenedant recollides en l'etapa d'eliminació d'aigües després del rentat del producte proteic procedent de sang porcina, obtingut a escala de laboratori mitjançant el mètode de Florido (2008). D'esquerre a dreta: tercer rentat, segon rentat, primer rentat, aigües mare (sobrenedant recuperat) i aigües generals mesclades.

L'anàlisi de les aigües mare permet conèixer l'eficàcia del procés en recuperar una major o menor quantitat de proteïna de la sang, mentre que l'anàlisi de les aigües de rentat evidencia les pèrdues de producte durant aquesta etapa. A la Figura 3.7 es mostren els resultats de la caracterització d'aquestes fraccions (percentatge de contingut d'extracte sec, cendres i proteïna).

S'observa que en les aigües mare es perd un 0,75 % de proteïna (p/v) i s'elimina un 1,75 % de sals (p/v). L'etapa de rentat del producte també representa un punt de pèrdua de proteïna, amb uns valors mitjans del 0,2 % (p/v). Així, el major percentatge d'extracte sec, cendres i proteïna s'eliminen amb les aigües mare del producte, disminuint progressivament amb cada rentat, el que es correlaciona directament amb el color observat en les fraccions.

Si s'analitzen totes les fraccions descartades (aigües generals) es pot observar que aquestes contenen un 1,51 % d'extracte sec, corresponent a un 0,87 % de cendres i un 0,48 % de proteïna. Aquest percentatge de pèrdua no representa una quantitat significativa de proteïna eliminada, tot i que cal remarcar que es va valorar en condicions de processat de laboratori; a escala industrial, la tecnologia seleccionada pot comportar majors pèrdues, repercutint en la rendibilitat del procés global, pel que serà imprescindible valorar aquest paràmetre en el procés d'escalat.

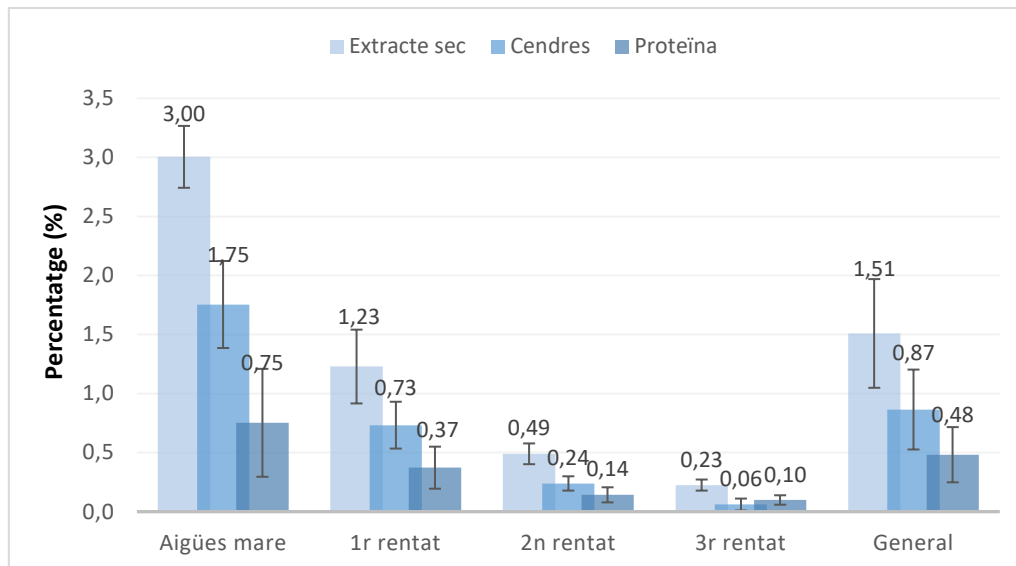


Figura 3.7. Percentatge d'extracte sec, cendres i proteïna en les aigües descartades en l'etapa de neteja del producte proteic obtingut a partir de sang porcina a escala de laboratori. Es mostren les mitjanes i desviació per cada anàlisi realitzada per duplicat.

Així, l'anàlisi de les aigües descartades mostra com una petita part del contingut proteic es perd en aquestes. Les aigües descartades són eliminades durant l'etapa de separació i neteja per centrifugació en *batch*, el mètode escollit a escala de laboratori. A nivell industrial caldrà utilitzar un procés en continu que permeti eliminar les aigües mare i realitzar el mínim d'etapes de rentat per obtenir el producte desitjat, minimitzant les pèrdues de proteïna, la despesa d'aigua i la generació d'efluents i eliminant la màxima quantitat de sals.

3.4.1.2. Anàlisis microbiològiques

Els resultats de les anàlisis microbiològiques dels productes estudiats es mostren a la Taula 3.3; en aquest cas només es van analitzar les tres mostres que contenien metabisulfit de sodi. La quarta mostra, que contenia polifosfat com anticoagulant, va ser descartada degut a no considerar-se representativa.

S'ha recomptat fins a 10^3 ufc/g d'aerobis mesòfils totals en les mostres analitzades. Aquests valors es troben propers al límit del que es consideraria un producte higiènicament acceptable, segons els criteris d'higiene per processos establerts pel Reglament (CE) nº 2077/2005, amb un valor de 3,5 log ufc/g. Val a dir que la legislació no estableix un valor màxim d'aerobis mesòfils en productes alimentaris, però la determinació d'aquest paràmetre permet disposar d'una eina directament relacionada amb l'estat higiènic general i la seguretat d'un aliment. Així, és un factor a tenir en compte en l'escalat industrial i vindrà

determinat per l'estat higiènic inicial de la sang, l'eficàcia del procés de descoloració en la higienització del producte i l'estat de la planta de producció (especialment en els punts crítics i de control), així com el sistema d'envasament (material i tecnologia d'envasament) i les condicions d'emmagatzematge, distribució i transport del producte final.

Taula 3.3. Recomptes de microorganismes en tres mostres de producte proteic liofilitzat obtingut a partir de sang porcina i produïts a escala de laboratori mitjançant el mètode de Florido (2008). Els valors s'expressen en ufc/g de mostra pels recomptes d'aerobis mesòfils, enterobacteris i E. coli, i la determinació de la presència/absència en Salmonella spp.

Mostra	Aerobis mesòfils (ufc/g)	Enterobacteris (ufc/g)	E. coli (ufc/g)	Salmonella spp.
C1	8 x 10	1,5	<10	Absència en 25g
C2	6,3 x 10 ³	30	<10	Absència en 25g
C3	8,7 x 10 ²	<10	<10	Absència en 25g

Els recomptes per *E. coli* presenten valors inferiors a 10 ufc/g de producte (essent 10 ufc/g el límit de detecció de la tècnica), el que es relaciona amb els baixos recomptes d'enterobacteris, obtenint un màxim de 30 ufc/g en una de les mostres analitzades.

Per altra banda, s'ha determinat l'absència de salmonel·la en 25 g de producte analitzat per totes les mostres. Aquest paràmetre és d'obligatori compliment en la majoria d'aliments; en aquest cas, es troba determinat en el Reglament (CE) nº 1774/2002.

Tot i que l'estat higiènic de les mostres estudiades no és òptim, es pot considerar que aquestes presenten unes condicions higièniques acceptables per ser utilitzades com a ingredient alimentari. El procés, dut a terme en condicions de laboratori, ha demostrat ser eficaç en la reducció de microorganismes contaminants de la sang, que tendeix a presentar uns valors de l'ordre de 10⁴ ufc/g sobre extracte sec d'aerobis mesòfils i 10²-10³ ufc/g d'enterobacteris (veure capítol 4), el que representa una reducció de 2-3 i 1-2 unitats logarítmiques, respectivament, respecte als recomptes en la sang d'escorxadors obtinguda per sistemes oberts.

Hi ha pocs treballs recents que hagin estudiat l'impacte d'un tractament àcid i/o alcalí i amb peròxid d'hidrogen de la sang sobre la contaminació microbiològica del producte resultant. Swingler *et al.* (1979a i 1979b) van trobar una reducció del 90 % dels microorganismes aplicant una extracció alcalina a pH 10, observant els millors resultats passades les 2 h de tractament. Estudis més recents sobre l'extracció de proteïna de peix en condicions alcalines de pH 12,5 han demostrat una reducció en els recomptes d'*E. coli* de fins a 4 unitats logarítmiques, tot i no aconseguir condicions de pasteurització total del producte (Lansdowne *et al.*, 2009a i 2009b). Alguns estudis apunten a diferències en l'efecte sobre els

microorganismes en funció del reactiu, àcid o base, utilitzat en el tractament (Otto *et al.*, 2011; Ronalghi *et al.*, 2016).

Així, tot i que el processat de subproductes mitjançant tractaments acidificants o alcalins no permeten obtenir un aliment en perfecte estat higiènic, sí que produeixen una certa descontaminació o disminució dels recomptes microbiològics, el que sembla que es pot optimitzar a partir del reactiu utilitzat, les condicions de pH aplicades, i el temps i la temperatura de reacció (Lynch *et al.*, 2018).

Cal tenir en compte que la tècnica de dessecació emprada, la deshidratació per liofilització, no té un efecte important sobre la supervivència dels microorganismes, mentre que altres sistemes han demostrat la reducció de fins a una unitat logarítmica sobre recomptes totals, com és el cas de la deshidratació mitjançant atomització (Toldrà *et al.*, 2002 i 2004). Així, caldrà valorar la capacitat de reducció microbiològica del sistema escollit per deshidratar el producte a escala industrial.

3.4.1.3. Anàlisi proteica

Finalment, per estudiar el perfil proteic del producte, es va realitzar una electroforesi SDS-PAGE d'alta densitat (20 % d'acrilamida); el gel obtingut es mostra a la Figura 3.8 i s'hi pot observar, d'esquerre a dreta, el marcador de pes molecular baix, les tres mostres analitzades (C1, C2 i C3) i el segon marcador.

Les bandes que s'esperaria trobar són les corresponents a les proteïnes majoritàries de la sang. Aquestes són, en ordre decreixent de presència, l'hemoglobina (amb 4 subunitats de 15-17 kDa), l'albumina (65 kDa), globulines (α , β i γ , 30-900 kDa), fibrinogen (340 kDa) i proteïnes minoritàries com les de l'estroma dels eritròcits (Marco i Riera, 2001; Toldrà *et al.*, 2019a).

La banda de més intensitat s'observa a l'alçada dels 15 kDa. Aquesta correspondria a la proteïna majoritària de la sang, l'hemoglobina, formada per quatre subunitats, dues α i dues β , amb un pes aproximat de 16 kDa cada una.

També s'observa una banda superior als 100 kDa a la part superior del gel. Degut a que el marcador de pes molecular utilitzat no indica valors majors a 100 kDa, no es pot verificar la mida real d'aquestes proteïnes. Es pot deduir que aquesta banda correspondria a proteïnes d'elevat PM presents a la sang, com les globulines, com l'alfa-1 lipoproteïna amb 200 kDa, l'alfa-2 macroglobulina amb 800 kDa, la ceruloplasmina amb 132 kDa, la betalipoproteïna amb 300 kDa o les immunoglobulines amb un pes de 150 a 190 kDa. Per altra banda, aquesta banda també es podria relacionar amb el fibrinogen, de 340 kDa (Marco i Riera, 2001; Toldrà *et al.*, 2011), o altres proteïnes de la sang associades a les membranes dels eritròcits (PM ~ 30–240 kDa) o del plasma (MW~30–150 kDa) (Howell & Lawrie, 1983; Luna & Hitt, 1992).

Finalment, també s'observa una banda tènue a l'alçada de 30 kDa, que es podria correspondre a l'eritropoetina o a la globulina fixadora d'hormones tiroidees (36,5 kDa), i bandes menors als 20, 10 i 5 kDa, que correspondria a proteïnes de menor presència en la sang (Marco i Riera, 2001).

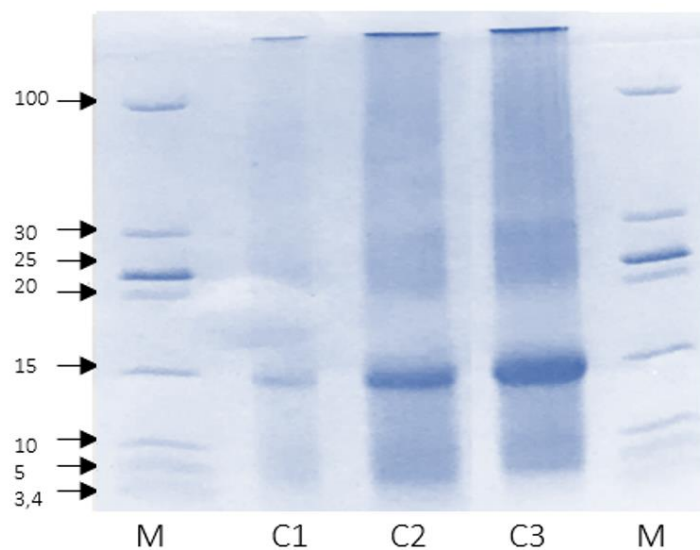


Figura 3.8. Gel obtingut en l'electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 20 % de mostres de producte proteic liofilitzat obtingut a partir de sang porcina i produït a escala de laboratori mitjançant el mètode de Florido (2008). Es poden observar les mostres (d'esquerre a dreta): M (marcador de pes molecular), C1, C2, C3, C4 i M.

A partir d'aquests resultats es pot deduir que no es dona un procés d'hidròlisi significatiu en els tractaments aplicats, doncs aquest comportaria l'aparició de bandes de major intensitat a la part inferior del gel de PM d'entre 3,4 i 10 kDa, corresponents a l'obtenció de pèptids de mida menor (Toldrà *et al.*, 2011).

Tot i això, al contrari del que s'esperaria en un producte de sang no hidrolitzada, no apareix cap banda clara a l'alçada de 67 kDa, el que correspondria a la seroalbúmina, proteïna majoritària del plasma sanguini (Ranken, 1980). Una possible explicació d'aquest fet és que la seroalbúmina romangui soluble en les condicions del tractament i sigui eliminada amb les aigües mare i de rentat, mentre que la resta de proteïnes precipiten, el que concordaria amb el 0,75% de proteïna que es perd en la primera centrifugació del producte després dels rentats.

3.4.1.4. Digestibilitat

A la Taula 3.4 es mostra el resultat obtingut en la determinació de la digestibilitat *in vitro* del producte proteic analitzat (C1). Només es va realitzar la determinació en una mostra degut a la complexitat de l'anàlisi, per obtenir robustesa en els resultats caldria dur a terme la determinació d'aquesta dada en més mostres del producte acabat.

Taula 3.4. Percentatge de digestibilitat *in vitro* per l'extracte proteic descolorat *Hydroblood*.

Producte proteic	Digestibilitat (%)
Extracte proteic descolorat <i>Hydroblood</i>	95,85

S'ha determinat una digestibilitat *in vitro* de 95,85 %. FEDNA (2010) exposa uns resultats majoritàriament inferiors per la digestibilitat *in vivo* en porcí de diferents ingredients proteics utilitzats en l'alimentació animal: determina una digestibilitat del 87 % en hemoglobina, 90 % en plasma animal, 75 % en farina de carn, 86 % en farina de peix, 87 % en farina de soja, 78 % en llavors de colza, 80 % en llavor de girasol i 87 % en concentrat proteic de pèsol, entre d'altres. Si es compara la digestibilitat d'aquests productes destinats al consum animal amb el valor de l'extracte *Hydroblood*, només un ingredient presenta una digestibilitat superior a la determinada en el producte descolorat estudiat, l'hidrolitzat de mucosa intestinal, amb un 99 % de digestibilitat.

Cal tenir en compte que la digestibilitat d'aquests ingredients és determinada *in vivo*, a diferència de l'anàlisi *in vitro* del producte proteic *Hydroblood*, pel que seria necessari dur a terme el mateix tipus d'anàlisi per poder comparar de manera fiable els resultats obtinguts.

3.4.2. Caracterització d'un concentrat proteic obtingut a escala de planta pilot

3.4.2.1. Anàlisis fisicoquímiques

A continuació es mostren els resultats obtinguts en la caracterització de 5 lots de producte proteic procedents de sang porcina, proporcionats per l'empresa Talleres Azuara, obtinguts a escala de planta pilot mitjançant els equips proposats per dur a terme el procés a escala industrial.

A la Taula 3.5 es mostren els resultats obtinguts en la caracterització fisicoquímica dels productes proteics, en els que s'ha determinat el percentatge d'extracte sec, cendres, greix, proteïna i NNP/NT, el valor d' a_w i la quantitat de ferro de cada mostra.

L'extracte sec mitjà de les mostres és de 88,99 %, un valor menor respecte a l'obtingut en les mostres produïdes al laboratori (95,75 %). El més probable és que aquesta disminució en l'extracte sec vingui determinat pel mètode d'asseccament emprant en la planta pilot, un turbo-assecat a partir d'injecció d'aire calent (RINA Flash Dryer). Aquest mètode presenta un menor cost que la liofilització però, per contra, té una menor capacitat de deshidratació. Així, les mostres assecades amb el turbo-assegador presenten uns valors d'humitat majors als de les mostres liofilitzades analitzades anteriorment.

Taula 3.5. Valors obtinguts en la caracterització dels 5 lots d'extracte proteic obtinguts a partir de sang porcina a escala de planta pilot proporcionats per Talleres Azuara. Es mostra el percentatge d'extracte sec, cendres, greix, proteïna i NNP/NT, l'activitat d'aigua (a_w) i el contingut en ferro.

Mostra (Lot)	Extracte sec (%)	a_w (25 °C)	Proteïna (%)	Cendres (%)	Greix (%)	Ferro (g/kg)	NNP/NT (%)
1	89,38 ± 0,12	0,55	85,30 ± 0,21	3,89 ± 0,13	0,90 ± 0,02	2,36 ± 0,01	9,22
2	91,19 ± 0,22	0,52	87,71 ± 0,63	2,27 ± 0,11	0,92 ± 0,14	2,21 ± 0,09	9,22
3	88,66 ± 0,15	0,60	85,66 ± 0,75	2,58 ± 0,01	0,95 ± 0,07	2,25 ± 0,0	9,20
4	88,96 ± 0,50	0,56	84,25 ± 0,72	3,23 ± 0,34	1,30 ± 0,09	2,20 ± 0,02	9,17
5	87,76 ± 0,22	0,56	80,56 ± 0,83	6,31 ± 0,001	1,19 ± 0,01	2,02 ± 0,03	9,69
Mitjana ± DE	88,99 ± 0,87	0,56 ± 0,03	84,66 ± 4,44	4,30 ± 1,69	1,06 ± 0,18	2,21 ± 0,12	9,30 ± 0,22

L'augment del percentatge d'humitat repercuteix directament en l'activitat d'aigua de les mostres, que presenten valors molt superiors als de les mostres de laboratori, arribant a una mitjana de 0,56. Tot i el notable increment d'aquest valor, aquest no representa una problemàtica sempre que no superi una a_w de 0,6, a partir del qual alguns microorganismes, com fongs osmòfils o halòfils són capaços de créixer, i aquest valor que es va assolir en la mostra número 3. Per tant, l' a_w és un paràmetre important a controlar en el procés de cares a l'escalat industrial.

Tot i que a valors d' a_w inferiors a 0,8 no s'observa creixement de microorganismes patògens, algunes soques osmòfiles i osmotol·lerants sí que són capaces de desenvolupar-se fins a valors de 0,6, com és el cas d'alguns fongs filamentosos (Troller, 1989; Vidal, 1991). Cal destacar que a partir de valors d' a_w inferiors a 0,2 es poden produir fenòmens d'oxidació lipídica o reaccions d'enfosquiment no enzimàtic (Derossi *et al.*, 2011).

Labuza *et al.* (1969) fa referència al càlcul de la humitat òptima per productes deshidratats a partir de l'equació de Brunauer Emmet Teller (BET) per obtenir la màxima vida útil possible de l'aliment sense que les seves propietats es vegin afectades.

Degut al sistema de deshidratació que es durà a terme a la planta pilot demostrativa, no es contempla la problemàtica d'obtenir un producte amb a_w massa baixa, pel que l'objectiu és el de no sobrepassar el valor llindar d' a_w de 0,6.

El percentatge de proteïna mitjà és del 84,66 %, un valor inferior a l'obtingut a nivell de laboratori. Aquest resultat, que es pot relacionar en part a un menor grau d'assecat de la mostra, també es veu condicionat pel major percentatge de cendres d'aquestes mostres, obtenint valors del 2,27 % fins al 6,31 %. L'elevada variabilitat en el contingut en cendres i alhora els valors superiors als observats en les mostres obtingudes a escala de laboratori, podria ser conseqüència d'una mala reproductibilitat en les condicions de reacció a la planta, doncs una major acidificació del producte seguit de la neutralització comporta un augment de les sals formades durant el procés. Per altra banda, també podria ser degut a les diferències en l'etapa de rentat, on es poden dur a terme més o menys repeticions i allargar l'etapa de neteja del producte. Així,

també serà clau optimitzar el procés de rentat en l'escalat industrial per obtenir un producte final amb una major homogeneïtat.

El contingut en greix és de l'1,06 %, valor similar a l'obtingut en les mostres de laboratori. El mateix s'observa en el contingut de ferro, amb una mitjana de 2,21 g de ferro per kg de producte, valor equivalent al del producte obtingut al laboratori.

En aquestes mostres també es va determinar el percentatge de nitrogen no proteic respecte al nitrogen total (NNP/NT) per comprovar si es produïa una hidròlisi de les proteïnes durant el procés d'obtenció del producte descolorat per les condicions intenses d'acidificació. El valor mitjà de NNP/NT és de 9,3 %, aquest valor coincideix amb els resultats obtinguts per Toldrà *et al.* (2011) en mostres de fracció cel·lular de sang de porc sense hidrolitzar, el que indica poca degradació de les proteïnes i, per tant, que el procés d'obtenció del concentrat proteic no comporta una hidròlisi àcida de les proteïnes de la sang.

3.4.2.2. Anàlisis microbiològiques

En la Taula 3.6 es mostren els resultats obtinguts en la caracterització microbiològica de les 5 mostres d'extracte proteic obtingudes a partir de sang de porc a escala de planta pilot, proporcionades per Talleres Azuara. Se'n va determinar les ufc per gram de mostra per enterobacteris, *E. coli*, aerobis mesòfils i la presència o absència de salmonel·la en 25 g.

Taula 3.6. Recomptes de microorganismes en cinc lots de producte proteic obtinguts a partir de sang de porc proporcionats per l'empresa Talleres Azuara. Aquests s'han obtingut mitjançant els equips proposats en la fabricació de la planta pilot de processat de sang. S'expressa els valors en ufc/g de mostra per enterobacteris, *E. coli* i aerobis mesòfils i determinació de la presència/absència en *Salmonella spp.* en 25g.

Mostra (lot)	Enterobacteris (ufc/g)	<i>E. coli</i> (ufc/g)	Aerobis mesòfils (ufc/g)	<i>Salmonella spp.</i>
1	<10	<10	1,5 x 10 ²	Absència en 25g
2	<10	<10	<10	Absència en 25g
3	<10	<10	<10	Absència en 25g
4	<10	<10	<10	Absència en 25g
5	<10	<10	<10	Absència en 25g

Es pot observar que no es van detectar *E. coli* ni altres enterobacteris per sobre del límit de detecció de la tècnica (<10 ufc/g). Pel que fa als recomptes d'aerobis mesòfils totals, només s'han trobat valors de l'ordre de 10² ufc/g en una de les mostres analitzades, que estan una unitat logarítmica per sota del que es

consideraria higiènicament acceptable. La resta de mostres presenten valors per sota del límit de detecció (<10 ufc/g). No s'ha detectat la presència de salmonel·la en 25 g per cap de les mostres analitzades.

Val a dir que aquests recomptes estan expressats en ufc/g de pols i, per tant, cal tenir en compte l'efecte de la concentració per la deshidratació.

Aquests resultats permeten valorar l'obtenció del producte proteic com un producte alimentari amb un bon estat higiènic. A més, indiquen que el procés dut a terme a escala de planta pilot, utilitzant els equips industrials proposats en la construcció de la planta demostrativa, és adequat per obtenir un producte alimentari segur pel consum. Mantenir les condicions higièniques a nivell industrial sol representar una dificultat, pel que serà un factor important a tenir en compte durant tot el procés d'escalat.

3.4.2.3. Anàlisi proteica

Per determinar el perfil proteic de les mostres, aquestes es van analitzar mitjançant electroforesi SDS-PAGE; els electroforogrames resultants es mostren a la Figura 3.9 on s'observa, d'esquerre a dreta, el marcador de pes molecular alt (M1), la sang de porc sencera com a mostra control, les mostres dels lots P1, P2, P3, P4 i P5 del producte proteic obtinguts a partir de sang de porc a escala de planta pilot i un últim marcador de PM baix (M2).

L'electroforograma és molt similar a l'obtingut en les produccions realitzades al laboratori (Figura 3.8). En totes les mostres es pot observar la presència de la banda majoritària d'alta intensitat, a l'alçada dels 15-16 kDa, corresponent a les subunitats α i β de l'hemoglobina.

També s'observen altres bandes de més baixa intensitat, als 5, 10, 25, 30 i 100 kDa, corresponents a altres proteïnes minoritàries de la sang, com l'eritropoietina, diferents globulines o lipoproteïnes (Marco i Riera, 2001).

Aquests resultats confirmarien, juntament amb els valors de NNP/NT i l'anàlisi electroforètica realitzada prèviament en l'estudi de les mostres de laboratori, que el procés estudiat no produeix una hidròlisi significativa de les proteïnes obtingudes.

Finalment, l'anàlisi del perfil aminoacídic de mostres de concentrat proteic obtingut a escala de planta pilot es mostra a la Taula 3.7, on es pot observar el percentatge de cada aminoàcid (degut a la tècnica emprada no s'ha determinat el triptòfan). Tal com s'ha exposat en el capítol 1 (apartat 1.3.1), la sang és rica en els aminoàcids essencials Leucina, Lisina, Fenilalanina, Tirosina, Treonina i Valina, pel que és d'alt interès avaluar com afecta el processat d'obtenció de proteïna a aquesta composició. S'observa que els valors per aquests aminoàcids són del 14,7, 9,9, 7,8, 2,0, 3,6 i 9,5 % respectivament, valors lleugerament superiors als observats en sang sencera de 9,66, 5,84, 8,54 (Phe+Tyr), 2,68 i 5,72 %, respectivament (Bracho *et al.*, 2001). Això podria ser degut a que altres aminoàcids es veuen afectats en major mesura pel tractament, tot i que també cal tenir en compte la desviació que suposa que no s'hagi determinat el Triptòfan.

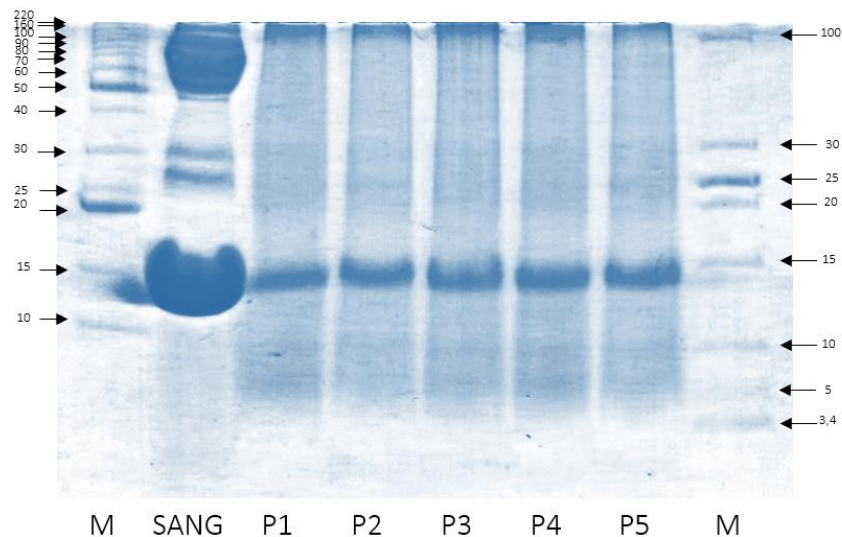


Figura 3.9. Gel obtingut mitjançant electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida (20%) de mostres de concentrat proteic de sang porcina proporcionats per l'empresa Talleres Azuara, obtingut mitjançant els equips proposats en la fabricació de la planta pilot. Es poden observar les mostres (d'esquerre a dreta): M1 (marcador de pes molecular 220 KDa), SANG sencera, P1 (lot 1), P2 (lot 2), P3 (lot 3), P4 (lot 4), P5 (lot 5) i M2 (marcador de pes molecular 100 KDa).

Per altra banda, tal com han determinat altres autors en sang sencera (Ockerman i Hansen, 1988; Fontes *et al.*, 2015), el percentatge dels aminoàcids essencials Metionina i Isoleucina és bastant baix (amb un 0,6 i 1,1 %, respectivament).

Considerant la ingesta diària recomanada per un adult de pes mitjà (capítol 1, apartat 1.3.1.), el consum de 50 g del producte obtingut representaria un 40 % Ile, >100 % Leu, >100 % Lys, 30 % Met + Cys, >100 % Phe + Tir, >100 % Thr i >100 % Val de la ingesta recomanable per cada aminoàcid essencial (FAO, 2007).

En la Figura 3.10 es mostra la composició en Isoleucina, Arginina, Lisina, Metionina, Treonina i Valina per diferents concentrats proteics utilitzats com a ingredients alimentaris pel consum animal i humà, d'origen animal (farina de sang, hemoglobina i plasma dessecats i caseïna) i vegetal (farina de soja) (FEDNA, 2020). Es pot observar que el producte *Hydroblood* analitzat destaca pel que fa als aminoàcids essencials Lisina i Valina. El contingut en Isoleucina i Metionina és bastant baix; està descrit que les proteïnes de la sang són deficientes en ambdós aminoàcids (Márquez *et al.*, 2005; Ockerman i Hansen, 2000), i els seus nivells en la sang poden variar en funció de l'espècie i l'edat de l'animal (Gorbatov, 1988; Sorapukdee *et al.*, 2017).

Els resultats obtinguts també coincideixen amb els descrits per Ramos-Clamont *et al.* (2003) per diferents fraccions proteiques derivades de sang porcina.

Taula 3.7. Contingut aminoacídic (%) del concentrat proteic de sang porcina proporcionat per l'empresa Talleres Azuara S.L., obtingut mitjançant els equips proposats en la fabricació de la planta pilot.

Aminoàcid	%
Alanina (Ala)	8,1
Arginina (Arg)	6,8
Àcid aspàrtic (Asp)	10,6
Cisteïna (Cys)	0,3
Àcid glutàmic (Glu)	8,5
Glicina (Gly)	4,3
Histidina (His)	3,9
Isoleucina (Ile)	1,1
Leucina (Leu)	14,7
Lisina (Lys)	9,9
Metionina (Met)	0,6
Fenilalanina (Phe)	7,8
Prolina (Pro)	4,0
Serina (Ser)	4,2
Treonina (Thr)	3,6
Triptòfan (Trp)	nd
Tirosina (Tyr)	2,0
Valina (Val)	9,5

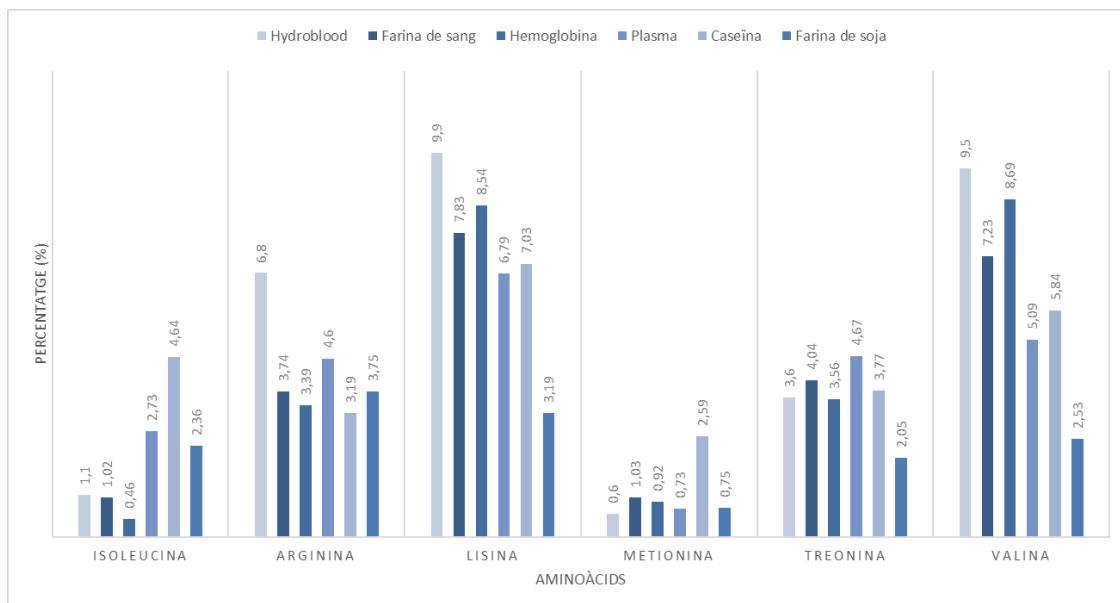


Figura 3.10. Comparació del contingut en aminoàcids essencials Isoleucina, Arginina, Lisina, Metionina, Treonina i Valina (en %), de diferents concentrats proteics: producte proteic hydroblood, farina de sang, hemoglobina dessecada, plasma dessecat, caseïna i farina de soja. Dades extretes de FEDNA (2020).

Tot i no ser considerat un aminoàcid essencial, és interessant destacar l'elevat percentatge d'Arginina en el producte *Hydroblood* respecte de les altres fonts proteiques. Aquest és considerat un aminoàcid

condicional, essencial en l'etapa juvenil i en persones que pateixen malalties diverses com malalties del cor o circulatòries, a més a més d'estimular el sistema immunològic (NIH, 2021).

Si es compara el producte estudiat amb els seus productes homòlegs, la farina de sang i l'hemoglobina dessecada, es poden observar diferències més o menys marcades, el que ve clarament condicionat pel tractament més o menys agressiu aplicat en cada metodologia d'obtenció.

3.4.3. Efecte de la utilització de metabisulfit de sodi per conservar la sang

En aquest apartat s'exposen els resultats obtinguts en la valoració de dues metodologies per la conservació de la sang: metabisulfit de sodi a temperatura ambient o addició de citrat sòdic com anticoagulant i refrigeració.

A la Figura 3.11 es mostra l'evolució dels recomptes d'aerobis mesòfils en mostres de sang de porc en funció de la substància conservant i/o anticoagulant afegida en el moment de la recollida a l'escorxador (metabisulfit de sodi a l'1,3 % o citrat sòdic al 0,4 % p/v). Es poden observar uns valors inicials de 10^3 ufc/mL en ambdós tipus de mostres. Aquests recomptes són molt inferiors als determinats per Ockerman i Hansen (1994) o per Parés *et al.* (2001) en mostres de sang de porc obtingudes mitjançant sistemes oberts de recollida de sang en escorxadors, amb requeriments higiènics poc estrictes, on trobaven valors d'aerobis mesòfils de fins a 10^5 - 10^6 ufc/mL. Per altra banda, els recomptes obtinguts en les mostres de sang del present treball coincideixen amb les reportades en altres estudis realitzats en sang recollida mitjançant sistemes tancats, amb valors de 10^3 ufc/mL (Nilsson, 1975 i Ockerman i Hansen, 1994), el que indica la idoneïtat del sistema utilitzat en la recollida higiènica de les mostres. Amb els sistemes tancats, la sang no queda exposada a l'aire o altres fonts de contaminació com la superfície dels animals (Parés *et al.*, 2011).

També s'ha observat que ambdós mètodes permeten la conservació de la sang en iguals condicions durant els primers dos dies, en els que no es produeix creixement d'aerobis mesòfils. Tanmateix, la sang amb metabisulfit de sodi presenta un creixement bacterià de tipus exponencial a partir del dia 2 de conservació fins a dia 4, quan s'arriba a uns recomptes de 10^6 ufc/mL i, a partir del qual, sembla donar-se una estabilització, augmentant només en una unitat logarítmica el nombre d'aerobis mesòfils en un període de 10 dies.

Per contra, la sang amb citrat sòdic conservada a 4 °C presenta un creixement lineal uniforme a partir del segon dia de conservació, passant d'uns recomptes de 10^3 fins a 10^8 ufc/mL en tan sols 5 dies, recomptes molt superiors als obtinguts als 14 dies de conservació de la sang amb metabisulfit i sense refrigeració. En les mostres amb citrat no es van determinar els recomptes més enllà del dia 7 de conservació, degut a la degradació evident que presentava, tal com s'ha exposat anteriorment.

Si es compara els dos tractaments a dia 7 de conservació, no s'observen diferències significatives, tot i que s'obté un nivell de significança de 0,059, valor poc distant al llindar ($P < 0,05$), el que indicaria que les diferències són mínimes.

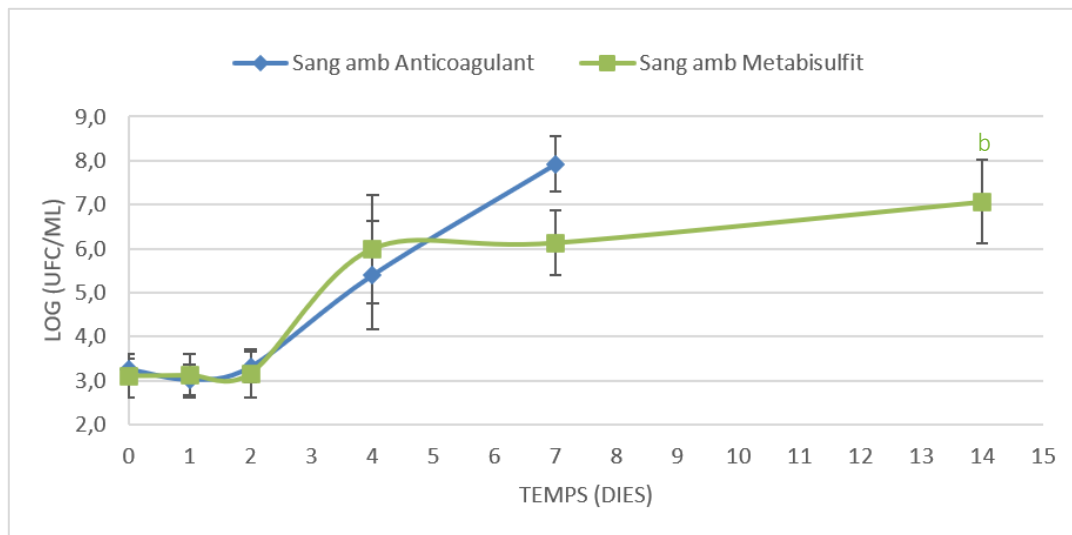


Figura 3.11. Evolució dels recomptes d'aerobis mesòfils totals en mostres de sang (log ufc/mL) amb citrat sòdic com a anticoagulant (blau) i amb metabisulfit sòdic com a conservant (verd). Mitjanes \pm DE ($n=3$).

Si s'analitza el creixement bacterià per enterobacteris (Figura 3.12), es pot observar una tendència molt diferenciada entre els 2 tractaments. En ambdós tractaments es parteix d'uns recomptes inicials d'entre 10^1 i 10^2 ufc/mL.

En el tractament de la sang amb anticoagulant, els recomptes no augmenten fins passat el segon dia de conservació, tal com s'observava en el cas dels aerobis mesòfils, a partir del dia 2 el creixement segueix una tendència lineal assolint uns recomptes de l'ordre de 10^7 ufc/mL el dia 7. L'anàlisi estadístic dels recomptes a dia 7 de conservació indiquen diferències significatives entre tractaments ($P < 0,05$). Aquests resultats confirmarien un clar efecte bacteriostàtic del metabisulfit de sodi sobre els enterobacteris.

Així, els resultats obtinguts pel tractament amb metabisulfit confirmen un efecte bacteriostàtic d'aquest additiu sobre enterobactèries, permetent controlar-ne el creixement, però no sobre aerobis mesòfils, que augmenten fins a 10^7 ufc/mL a dia 14, provocant la degradació microbiològica de la sang. L'aspecte visual de la sang amb metabisulfit, igual que la sang amb anticoagulant, no es manté constant al llarg dels dies, adquirint una coloració més fosca i una olor característica pel deteriorament microbiològic.

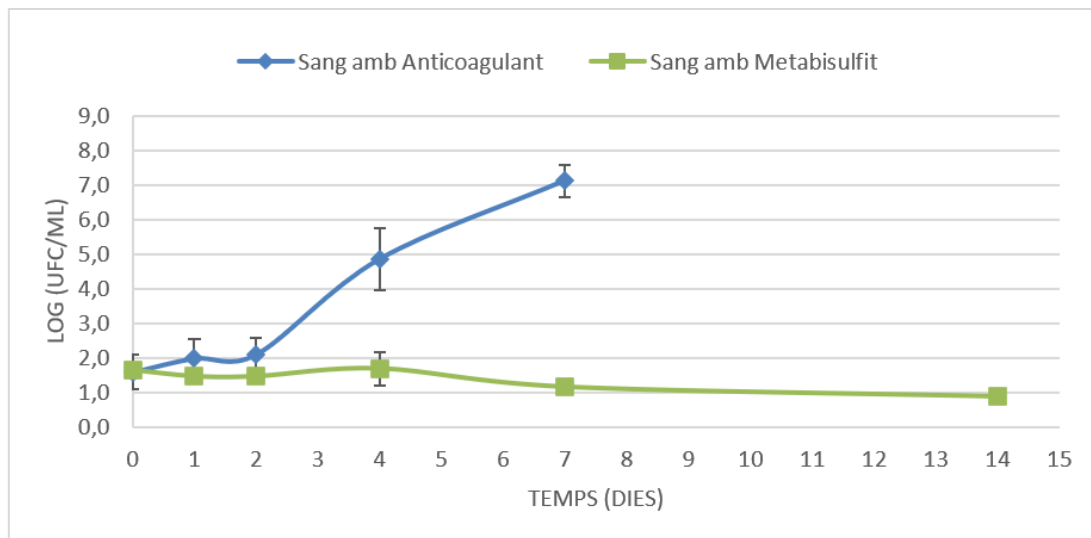


Figura 3.12. Evolució dels recomptes d'Enterobacteris en la sang (log ufc/mL) amb citrat sòdic com a anticoagulant (blau) i amb metabisulfit sòdic com a conservant (verd). Mitjanes \pm DE (n=3).

Pel que fa a la variació del pH al llarg del temps (Figura 3.13), es pot observar una linealitat dels valors durant l'emmagatzematge per ambdós tractaments. Tal com s'esperava, els valors de pH són inferiors en la sang amb metabisulfit, acidificada pel propi conservant, amb un valor mitjà de 6,7 a dia 0. Per altra banda, la sang amb citrat presenta un pH inicial de 7,4, valor estàndard de la sang (entre 7,35 i 7,45).

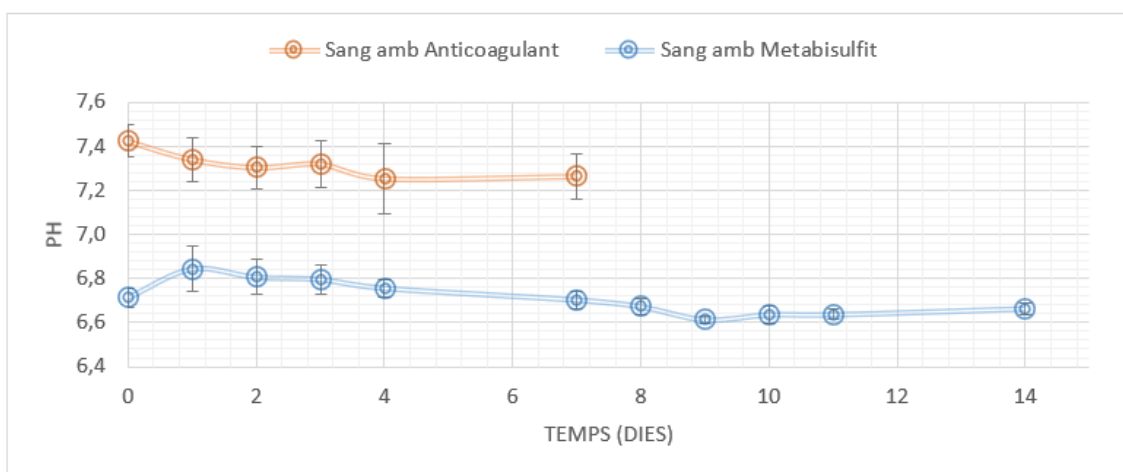


Figura 3.13. Evolució del pH en mostres de sang amb citrat sòdic com a anticoagulant (taronja) i amb metabisulfit sòdic com a conservant (blau). Mitjanes \pm DE (n=3).

Els resultats indiquen que no hi ha variació del pH al llarg del temps; això podria ser degut a l'efecte tampó del medi, pel que petits canvis en l'acidificació (per bacteris fermentatius) o alcalinització (per bacteris putrefactius) no produirien un canvi significatiu del pH. Aquests resultats són similars als observats per Zamora (2005) en inocular bacteris de l'àcid làctic a la sang d'escorxadors com a sistema de bioconservació.

Si s'analitzen els resultats globals, es pot concloure que el metabisulfit de sodi presenta un clar efecte de contenció de la proliferació de microorganismes, especialment en el cas dels enterobacteris. Tot i això, en les condicions assajades, aquest efecte no és suficient per impedir el creixement d'altres microorganismes, obtenint uns recomptes d'aerobis totals de fins a 10^6 ufc/mL a dia 4 de conservació de la sang.

Tenint en compte les limitacions legals d'ús del metabisulfit de sodi com a additiu, els avantatges que aquest reactiu aporta com a conservant de la sang sense refrigeració no són suficients, en les condicions proposades i assajades, per substituir el mètode de conservació de la sang utilitzat generalment pels escorxadors, basat en l'addició d'un anticoagulant, el refredament ràpid fins a una temperatura d'entre 2 i 4 °C i la conservació en refrigeració. Tanmateix, és important tenir en compte que la refrigeració de la sang pot permetre el desenvolupament de bacteris psicròtrofs proteolítics, com *Pseudomonas* sp. (Parés *et al.*, 2011). Per tant, és convenient realitzar un processament el més ràpid possible, en condicions higièniques, per estabilitzar el producte. A partir dels resultats obtinguts, no es recomana la utilització de metabisulfit en les condicions assajades i se'n descarta la seva aplicació.

3.5. CONCLUSIONS

1. S'ha aplicat la metodologia descrita en el projecte HYDROBLOOD per l'obtenció d'un concentrat proteic descolorat a partir de sang porcina sencera d'escorxador. Aquest procediment permet obtenir un producte proteic a partir d'una precipitació àcida de la sang i posterior descoloració amb peròxid d'hidrogen.
2. El producte obtingut consisteix en una pols seca homogènia i insoluble de color marró clar-daurat, amb valors dels paràmetres CIE L* (lluminositat): 56,17; a* (vermell): 8,72; i b* (groc): 25,29, i una olor neutra. Presenta un extracte sec del 95,75 %, i conté un 93,42 % de proteïna, un 1,35 % de greixos, un 1,11 % de cendres, i un contingut en ferro de 2,20 g/kg.
3. Els resultats de l'anàlisi microbiològica del producte garanteixen un estat higiènic acceptable segons la legislació alimentària vigent, amb recomptes inferiors a 10^5 ufc/g d'aerobis mesòfils, $<10^3$ ufc/g d'enterobacteris, <10 ufc/g per *E. coli*, i l'absència en 25 g per Salmonella, fent que sigui un producte apte tant pel consum animal com humà.
4. El producte obtingut a escala de planta pilot presenta diferències en l'extracte sec final respecte al producte obtingut a escala de laboratori molt probablement degut al mètode de deshidratació utilitzat. A més, també s'han observat diferències en el contingut de cendres atribuïdes a variacions en les condicions de tractament d'acidificació durant el processat de la sang. La qualitat higiènica d'aquest producte és millor que la dels productes obtinguts al laboratori.
5. L'anàlisi electroforètica mitjançant SDS-PAGE del concentrat proteic ha evidenciat la presència de proteïnes de la sang senceres, el que indica que no s'ha produït hidròlisi durant el processat de la sang.
6. El producte dessecat és ric en els aminoàcids essencials Leucina, Lisina, Fenilalanina, Tirosina, Treonina i Valina, però deficitari en Isoleucina i Metionina.
7. La utilització del metabisulfit de sodi a temperatura ambient, com a sistema de conservació de la sang, enlloc de l'addició d'un anticoagulant i la conservació en refrigeració, no disminueix el creixement de bacteris mesòfils, tot i que sí es mostra eficaç per evitar la proliferació d'enterobacteris durant 14 dies de conservació.
8. El tractament amb metabisulfit no evita el deteriorament de la sang, ni disminueix els recomptes totals als quatre dies de conservació, pel que es descarta la seva utilització com a sistema de conservació alternatiu al convencional degut al seu perill potencial per la salut humana.

CAPÍTOL 4.

OBTENCIÓ D'UN CONCENTRAT PROTEIC DESCOLORAT A PARTIR DE SANG SENCERA

CAPÍTOL 4. OBTENCIÓ D'UN CONCENTRAT PROTEIC DESCOLORAT A PARTIR DE SANG SENCERA

4.1. INTRODUCCIÓ

Tal com s'ha exposat en els estudis preliminars (capítol 3), l'aplicació del mètode descrit per Florido (2008) en el marc del projecte HYDROBLOOD de l'empresa Talleres Azuara S.L., permet l'obtenció d'un concentrat proteic a partir de sang porcina sencera d'escorxador. Aquest producte presenta unes característiques d'alt interès com són un alt contingut proteic, amb un 93,4 % de proteïna, un color ocre-groguenc i una olor força neutra, fet que permetria utilitzar-lo com a substitutiu o ingredient alimentari proteic en la formulació d'aliments tant pel consum animal com per l'humà.

Tanmateix, per aconseguir que aquest ingredient proteic sigui apte pel consum humà, és imprescindible avaluar les condicions d'obtenció i ajustar-les per obtenir un producte segur d'acord amb la normativa vigent. En aquest sentit, un dels punts més problemàtics del procés és la fase de descoloració amb peròxid d'hidrogen; així, és necessari disminuir la concentració d'aquest reactiu, utilitzat com a coadjuvant alimentari, fins a les condicions establertes com a segures per l'informe de l'AESAN (AESAN-2011-006), que són la utilització d'un 0,75 % (v/v) sobre sang sencera o fracció de la sang, amb un temps màxim de reacció de 30 min.

Les condicions de descoloració del procés estudiat en els estudis preliminars consistien en l'aplicació d'un 3 % de peròxid sobre sang sencera durant un temps de fins a 24 h a temperatura ambient, el que excedeix en gran mesura tant la quantitat de reactiu com el temps de reacció considerats com a segurs. Per això, es planteja l'opció de disminuir tant la concentració de peròxid (fins la quantitat màxima recomanada com a segura) com el temps de reacció, que es fixa en mitja hora, per aconseguir, a més, un procés amb major productivitat. Aquesta disminució comporta un menor grau de descoloració del producte obtingut, el que afecta directament en l'aplicabilitat d'aquest en alimentació humana. Per obtenir una major descoloració, es planteja accelerar la reacció augmentant la temperatura, el que hauria de permetre obtenir un producte amb una tonalitat més clara en menys temps.

Procés tèrmic

Així mateix, també es planteja la possibilitat que els enzims oxido-reductors presents en la sang no siguin totalment inactivats mitjançant el procés d'acidificació, el que comportaria una reducció dels efectes del peròxid, repercutint en la capacitat descolorant del reactiu. Per tant, una altra opció per augmentar la capacitat descolorant del tractament i optimitzar les condicions de processat és la cerca d'un tractament previ alternatiu a l'acidificació per aconseguir eliminar l'efecte indesitjat dels enzims de la sang. En aquest cas, s'ha escollit avaluar l'aplicació d'un procés basat en el descrit per Lee *et al.* (2000), que planteja un

tractament tèrmic previ a la descoloració de la sang, adaptant-lo a les limitacions d'ús del peròxid establertes.

Hidròlisi de la sang sencera

Finalment, també es vol estudiar l'aplicabilitat d'un procés d'hidròlisi sobre la sang sencera en combinació amb un tractament de descoloració mitjançant peròxid d'hidrogen, amb l'objectiu d'obtenir un producte precipitat final amb millors característiques fisicoquímiques.

La hidròlisi, tal com s'ha exposat en el capítol 1 (apartat 1.4.3), consisteix en dur a terme el trencament dels enllaços peptídics que uneixen el grup hemo amb la globina mitjançant enzims proteolítics. Per aconseguir-ho, s'ha decidit encarar l'estudi cap a l'anàlisi de l'efecte hidrolític sobre sang sencera dels enzims *Flavourzyme*, que ha demostrat tenir resultats molt prometedors en varis estudis d'hidròlisi sobre fraccions de la sang, i Alcalasa, el qual ha estat estudiat i utilitzat àmpliament en la producció d'hidrolitzats dins el sector alimentari. Aquests, consisteixen en una combinació de endo i exo peptidases d'origen fúngic, i han mostrat bons resultats en varis estudis, utilitzats sols o en combinació amb altres enzims (Finn *et al.*, 1983; Synowiecky *et al.*, 1996; Yang i Lin, 1998; In *et al.*, 2001; Wanasundara *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2018).

4.2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest capítol és la cerca de les condicions més adequades d'aplicació del procés d'obtenció d'un concentrat proteic descolorit a partir de sang sencera porcina d'escorxadador mitjançant una descoloració amb peròxid d'hidrogen.

S'han estudiat dos processos per obtenir un producte amb característiques similars però aplicables a diferents usos. D'una banda, s'ha treballat amb el sistema proposat per Florido (2008), ja explicat en el Capítol anterior, amb l'objectiu de millorar les condicions del procés, reduint tant la concentració del reactiu oxidant com el temps de tractament de la sang amb el peròxid d'hidrogen.

L'objectiu concret d'aquesta part ha estat:

Estudiar l'efecte de la concentració del peròxid d'hidrogen i de la temperatura de tractament en la descoloració de la sang sencera, reduint significativament el temps de reacció.

Per altra banda, també s'ha investigat un procés alternatiu, substituint el tractament àcid aplicat per la precipitació de la proteïna i la inactivació de l'enzim peroxidasa per un tractament tèrmic d'inactivació enzimàtica, previ a la descoloració amb peròxid.

Els objectius concrets van ser:

Obtenir un concentrat proteic descolorat mitjançant tractament tèrmic, seguit de la descoloració amb peròxid d'hidrogen, apte pel consum humà.

Caracteritzar el producte deshidratat obtingut a nivell fisicoquímic i microbiològic.

Avaluar la possible aplicabilitat del concentrat proteic mitjançant la realització de proves de concepte en productes alimentaris model, per substituir ingredients proteics ja utilitzats comercialment o per incrementar el contingut proteic final dels productes.

Finalment, també s'ha plantejat determinar els efectes d'un tractament d'hidròlisi enzimàtica sobre la sang sencera, seguit d'una descoloració amb peròxid d'hidrogen, per obtenir un concentrat proteic amb una major descoloració.

4.3. MATERIAL I MÈTODES

4.3.1. Disseny experimental

- a) Optimització de les condicions del procés d'obtenció d'un concentrat proteic descolorit a partir de sang porcina mitjançant tractament àcid o tractament tèrmic.

Per optimitzar el procés d'obtenció d'un concentrat proteic descolorat a partir de sang sencera porcina mitjançant decoloració amb peròxid d'hidrogen es van realitzar dos assaigs independents. A la Figura 4.1 es mostra de forma esquemàtica el disseny experimental seguit en els experiments realitzats.

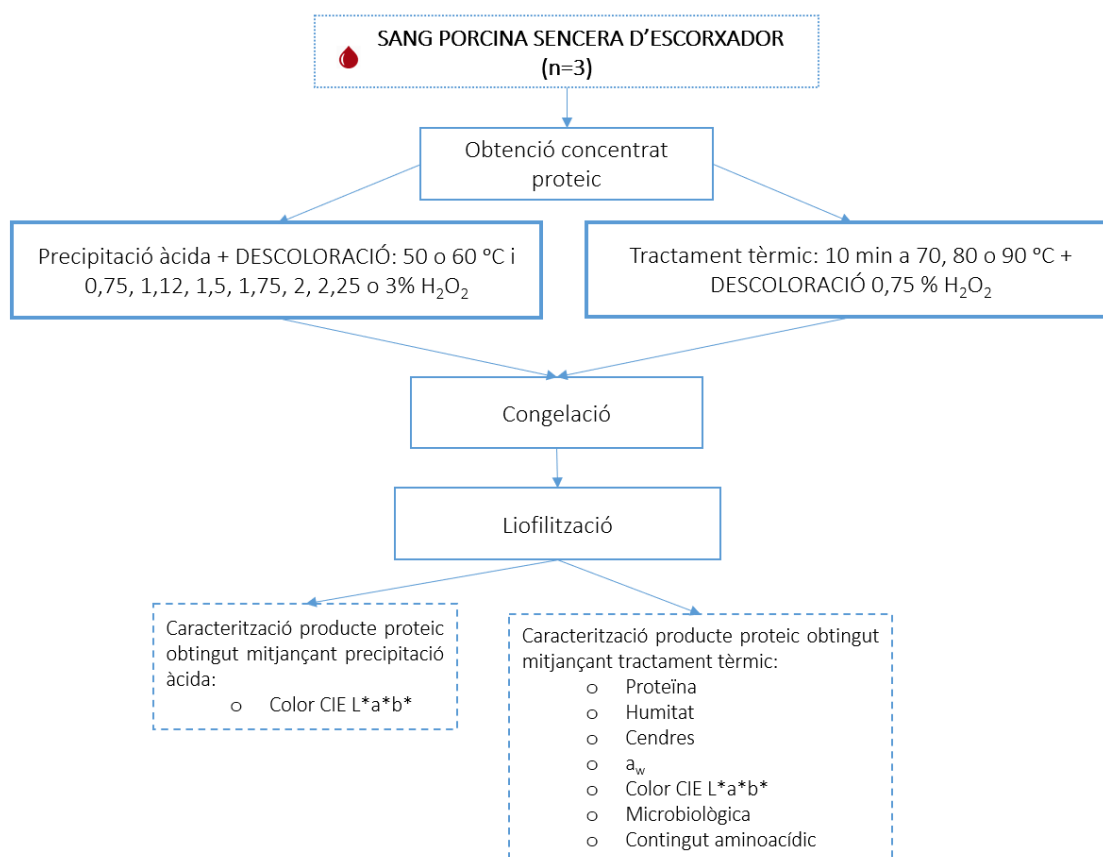


Figura 4.1. Disseny experimental del procés d'optimització del procediment d'obtenció d'un concentrat proteic descolorit a partir de sang porcina d'escorxadors mitjançant tractaments previs a la decoloració de precipitació àcida o bé tractament tèrmic.

Per tal de disminuir el temps de reacció necessari en el mètode de Florido (2008), es va estudiar l'efecte de la concentració de peròxid d'hidrogen i la temperatura de tractament. Es van realitzar una sèrie

d'experiments d'obtenció del concentrat proteic sobre tres mostres de sang de porc d'escorxador, recollides en diferents dies però en les mateixes condicions ($n = 3$). Sobre cada mostra es van assajar un total de set concentracions diferents de peròxid d'hidrogen (0,75, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25 i 3% (v/v)) durant un temps de descoloració de 30 min i a dues temperatures de reacció (50 i 60 °C).

En un segon assaig es va avaluar la possibilitat de substituir la precipitació per acidificació de la proteïna per un tractament tèrmic, segons un procés descrit en la patent de Lee *et al.* (2000). Es va assajar l'efecte d'un tractament d'inactivació tèrmica previ a la reacció amb peròxid a tres temperatures diferents (70, 80 i 90 °C) durant 10 min. L'experiment es va dur a terme per triplicat, sobre tres mostres de sang de porc recollides en diferents dies però en les mateixes condicions ($n = 3$). A cada mostra es van aplicar els tres tractaments tèrmics, seguits de la descoloració amb peròxid d'hidrogen al 0,75% durant 30 min.

El grau de descoloració assolit per l'efecte dels tractaments emprats es va avaluar determinant els paràmetres de color de les mostres dessecades per liofilització.

Els productes obtinguts mitjançant tractament tèrmic van ser caracteritzats mitjançant la determinació del contingut en humitat, sals minerals, proteïna, activitat de l'aigua i la composició aminoacídica. A més, també se'n va estudiar la qualitat microbiològica general determinant els recomptes d'enterobacteris i d'aerobis mesòfils totals.

Finalment, es va realitzar un estudi preliminar de proves de concepte per avaluar l'aplicabilitat del producte proteic obtingut mitjançant el tractament tèrmic en diferents matrius alimentàries. Es van elaborar dos productes carnis model tipus pastes fines (mortadel·la i paté) i dos productes de galeteria (galletes de farina de blat i de civada). Els productes obtinguts van ser caracteritzats: per la mortadel·la es va determinar contingut d'extracte sec, cendres, proteïna, % TEF (fluids totals extraïbles), % FAT (percentatge de greix dels fluïts totals extraïbles), % CRA (capacitat de retenció d'aigua), pH i color. Pel paté es va determinar el contingut d'extracte sec, cendres, proteïna, % TEF, % FAT i color. Per les galletes es va determinar el contingut d'extracte sec, cendres, proteïna i color. A la Figura 4.2 es mostra el disseny experimental.

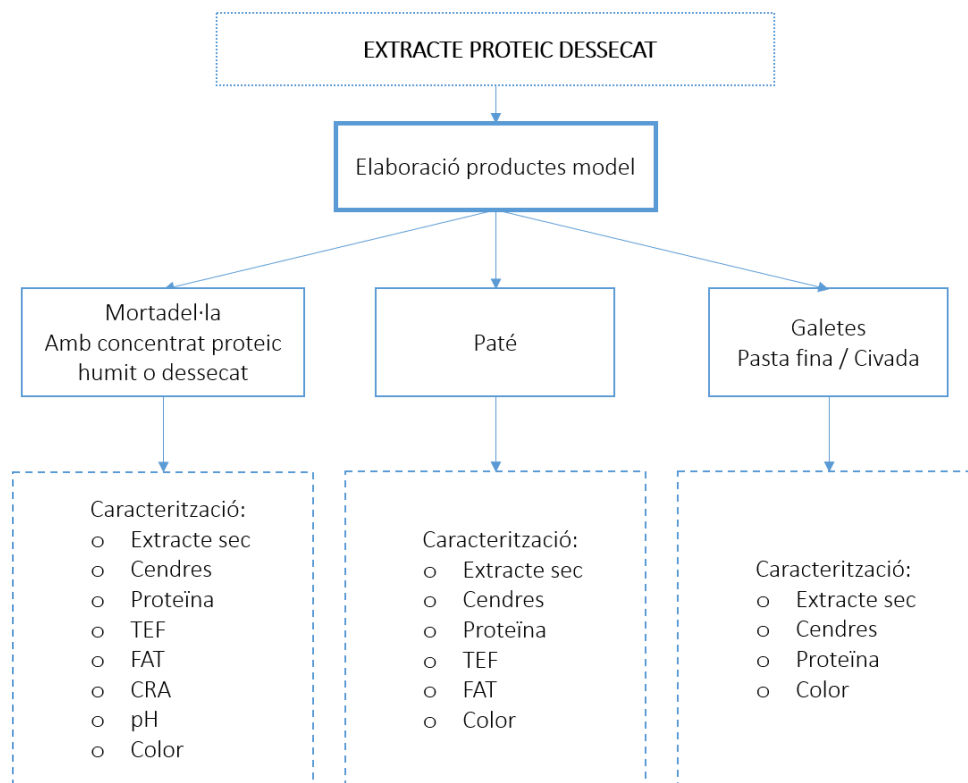


Figura 4.2. Disseny experimental de les proves de concepte d'elaboració de productes alimentaris model utilitzant el concentrat proteic procedent de sang porcina com a ingredient tecno-funcional i/o nutricional.

b) Estudi de l'aplicació d'un tractament d'hidròlisi sobre sang sencera combinat amb una descoloració mitjançant peròxid d'hidrogen.

En aquest assaig (Figura 4.3), seguint la línia d'investigació del tractament de sang sencera, es va estudiar l'efecte d'aplicar un tractament d'hidròlisi sobre la sang utilitzant Alcalasa i *Flavourzyme* com a enzims hidrolítics, a diferents punts del procés d'obtenció del concentrat proteic, per obtenir un concentrat proteic amb el major grau de descoloració possible. Per valorar l'efecte de la hidròlisi, també es van realitzar els experiments control, aplicant les mateixes condicions de processat a la sang i eliminant l'etapa d'hidròlisi.

El grau de descoloració assolit per l'efecte dels tractaments emprats es va avaluar determinant el color de les mostres de precipitat dessecades per liofilització (paràmetres CIE $L^*a^*b^*$, Cromà, Tonalitat i increment de color respecte a la mostra control). El grau d'hidròlisi (GH) es va determinar mitjançant el mètode del TNBS en els experiments que ho van permetre (experiments sense tractament tèrmic previ); per contra, el GH no es va poder determinar en els experiments amb un tractament tèrmic previ a la hidròlisi degut a la insolubilització de les proteïnes.

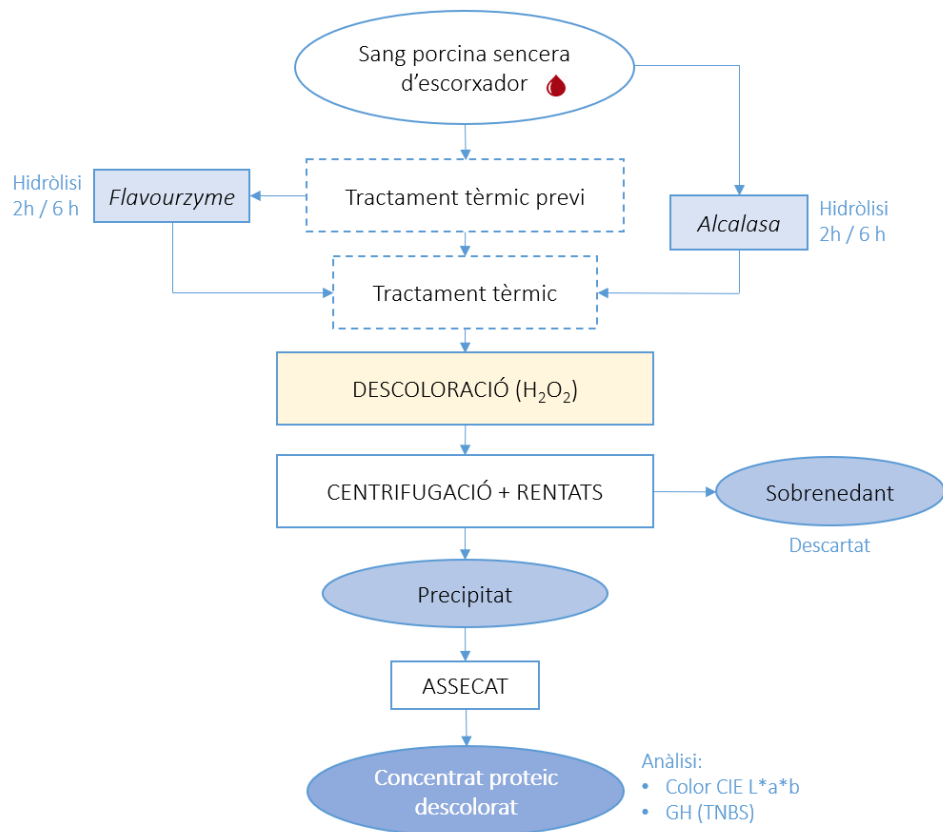


Figura 4.3. Disseny experimental de l'assaig per l'obtenció d'un concentrat proteic dessecat amb tractament hidrolític sobre sang sencera abans de la descoloració.

4.3.2. Procedència de les mostres

Les mostres de sang de porc utilitzades per l'obtenció dels concentrats proteics procedien de l'escorxador industrial NORFRISA (veure Capítol 3, apartat 3.2.2). La sang es recollia en recipients de plàstic estèrils i es transportava en bosses isotèrmiques amb acumuladors tèrmics per mantenir les condicions de refrigeració. Les mostres es van processar en el marge de màxim dos dies per evitar-ne el deteriorament, bàsicament degut a l'alta contaminació microbiològica que presenta la sang després de ser recollida en les condicions permeses durant el sacrifici.

4.3.3. Obtenció del concentrat proteic

a) Efecte de la concentració de peròxid i de la temperatura durant la descoloració:

En el primer assaig, per l'obtenció d'un concentrat proteic descolorit a partir d'una precipitació àcida, es va seguir el procediment descrit per Florido (2008), tal com s'ha explicat en l'apartat 3.3.3 del Capítol anterior, representat a la Figura 4.4.

Quan el pH de la sang s'havia estabilitzat a 6, s'afegia peròxid d'hidrogen a diferents concentracions (0,75, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25 i 3 %), i es desenvolupava la reacció aplicant un tractament d'escalfament a 50 i 60 °C durant la descoloració, amb l'objectiu d'accelerar la velocitat de la reacció. Un cop transcorreguts els 30 min de descoloració, les mostres es centrifugaven, se'ls feia tres cicles de rentat i s'assecaven per liofilització, en iguals condicions que les descrites a l'apartat 3.3.4. El producte final obtingut es presentava en forma de pols insoluble, insípida i inodora.

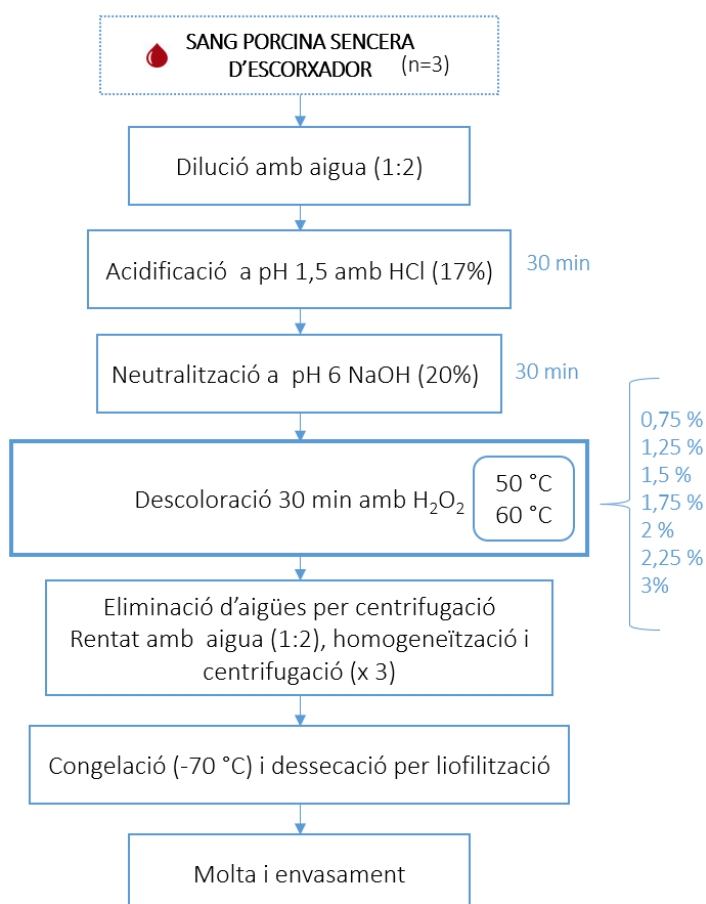


Figura 4.4. Diagrama de flux del procediment d'obtenció d'un concentrat proteic a partir de sang sencera mitjançant el mètode descrit per Florido (2008), aplicant diferents concentracions de peròxid d'hidrogen i dues temperatures (50 i 60 °C) durant la reacció de descoloració.

b) Efecte d'un tractament tèrmic d'inactivació enzimàtica previ a la descoloració:

En el segon assaig, per l'obtenció d'un concentrat proteic descolorit mitjançant tractament tèrmic es va seguir el mètode descrit en la patent de Lee *et al.* (2000) i seguint les recomanacions pel que fa a dosi de peròxid i temps de tractament (AESAN-2022-006). Per estudiar el procés d'obtenció del concentrat proteic mitjançant aquest segon mètode es va seguir el procediment descrit a la Figura 4.5.

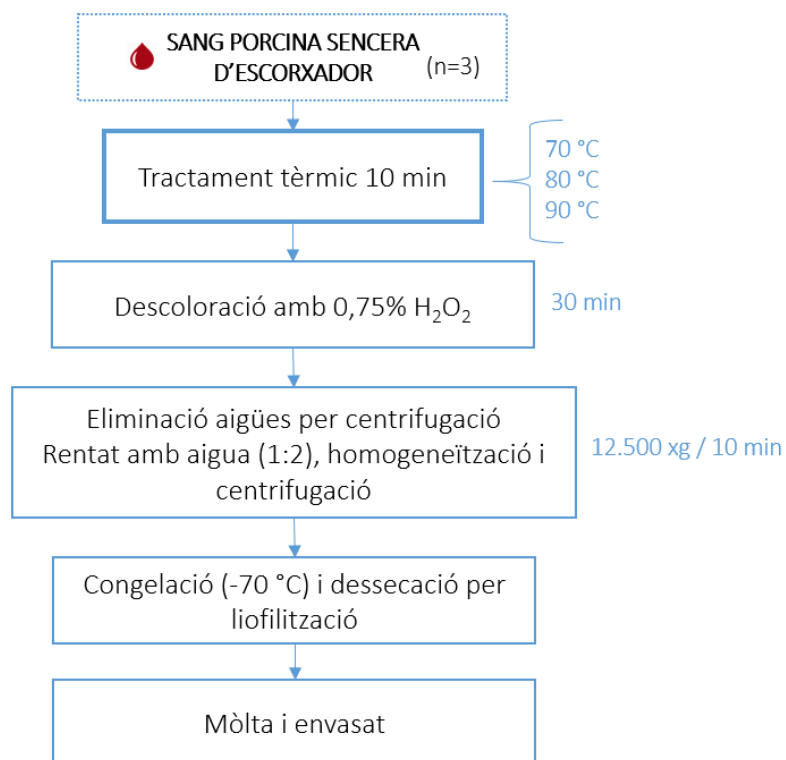


Figura 4.5. Diagrama de flux de la metodologia emprada per l'obtenció d'un concentrat proteic a partir de sang sencera mitjançant inactivació enzimàtica i precipitació de les proteïnes per tractament tèrmic seguit d'una descoloració amb peròxid d'hidrogen al 0,75% durant 30 min.

Primerament, es realitzava un tractament tèrmic de la sang sencera, a 70, 80 o 90 °C, mitjançant un bany proveït de resistència i termòstat, durant un temps de manteniment de 10 min, en agitació constant. Amb aquest tractament s'hauria d'aconseguir la inactivació de la peroxidasa de la sang i la precipitació de la proteïna, alhora que es produïa una reducció de la càrrega microbiana. S'addicionava aigua de xarxa a temperatura ambient (1:1) per diluir la mostra i s'homogeneïtzava amb l'ajut d'una batidora MultiMix M880 (Braun, Alemanya), el que permetia reduir ràpidament la temperatura fins a 30-40 °C. Després, s'iniciava l'etapa de descoloració mitjançant l'addició de peròxid d'hidrogen a una concentració del 0,75% respecte la sang (v/v) durant 30 min. Durant tot el procés, la solució també es mantenia en agitació constant per assegurar l'homogeneïtat durant la descoloració. A partir d'aquí, es procedia a la separació, rentat i

asseccament, igual com s'ha descrit en els experiments anteriors. El producte final obtingut es presentava en forma de pols insoluble, insípida i amb una lleugera olor d'ingredient d'origen carni.

c) Efecte d'un tractament d'hidròlisi enzimàtica de la sang previ a la descoloració:

Les hidròlisis es van dur a terme mitjançant els enzims Alcalasa i Flavourzyme. Les característiques i condicions òptimes d'aquests es mostren a la Taula 4.1.

Taula 4.1. Condicions òptimes i tipus d'activitat proteolítica dels enzims utilitzats en l'obtenció d'un concentrat proteic descolorit a partir de sang porcina.

Enzim	Activitat	Temperatura òptima (°C)	pH òptim
Alcalasa	Serina endo-peptidasa	30-65	7-9
Flavourzyme	Endo i exopeptidasa	50	5-7

Alcalase® (E.C. 3.4.21.62) 2,4 L de Novozymes (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) amb una activitat declarada de 2,4 UA/g (una UA hidrolitza 1 miliequiivalent de tirosina). Es tracta d'un enzim amb una àmplia activitat endopeptidasa produït per varies soques de *Bacillus subtilis* i espècies *Bacillus*.

Flavourzyme® 1000 L de Novozymes amb una activitat declarada de 1000 LAPU/g (un LAPU és igual a la quantitat d'enzim que hidrolitza 1 µm de L-leucina-p-nitroanilida per minut). Es tracta d'un complex de proteases i peptidases fúngiques amb activitat endo i exopeptidasa produïdes per la fermentació d'una soca seleccionada d'*Aspergillus oryzae*.

En aquest assaig es va obtenir el concentrat proteic descolorit mitjançant la hidròlisi de sang sencera amb Flavourzyme o Alcalasa a diferents punts del procés, tal com s'ha descrit en l'apartat 4.3.1 (c). Les condicions es mostren a la Taula 4.2.

En el procés d'obtenció del concentrat es va combinar una hidròlisi de 2 o 6 h amb Alcalasa o Flavourzyme amb un tractament tèrmic a 90 °C durant 10 min i una descoloració amb peròxid d'hidrogen al 0,75 % sobre sang sencera. De cada fracció se'n va determinar el color i el grau d'hidròlisi (en les mostres que ho van permetre).

Taula 4.2. Condicions assajades en els experiments per l'obtenció d'un concentrat proteic descolorit a partir de sang porcina d'escorxadador, mitjançant hidròlisi amb Alcalasa i Flavourzyme.

Enzim (E/S)	Tractament	Condicions assajades					
		1r	2n	3r	4t	5é	6é
Flavourzyme (5 %)	1	Hidròlisi sang 50 °C + aigua (1:1) 6h	Tractament tèrmic 90 °C 10 min	Descoloració 0,75% H ₂ O ₂ 30 min	Eliminació aigües per centrifugació, rentat amb aigua (1:1), homogeneïtzació i eliminació aigua (12.500 xg) 10 min)	Congelació (-70 °C) i dessecació per liofilització.	Molta i envasat.
	2	Hidròlisi sang 50 °C + aigua (1:1) 2h	Tractament tèrmic 90 °C 10 min	Descoloració 0,75% H ₂ O ₂ 30 min			
	3	Tractament tèrmic 90°C 10 min	Hidròlisi sang 50 °C + aigua (1:1) 2h	Descoloració 0,75% H ₂ O ₂ 30 min			
	4	Tractament tèrmic 90°C 10 min	Dilució amb aigua (1:1) i descoloració 0,75% H ₂ O ₂ 30 min	Hidròlisi 2h 50 °C			
Alcalasa (2 %)	5	Hidròlisi sang 50 °C + aigua (1:1) 6 h	Tractament tèrmic 90 °C 10 min	Descoloració 0,75% H ₂ O ₂ 30 min			
	6	Hidròlisi sang 50 °C + aigua (1:1) 2h	Tractament tèrmic 90 °C 10 min	Descoloració 0,75% H ₂ O ₂ 30 min			

4.3.4. Deshidratació per liofilització

El procés de deshidratació utilitzat per les mostres de concentrats proteics va ser la liofilització, descrit en el Capítol 3 (apartat 3.2.4). Aquest permet dessecar les mostres fins a un extracte sec i una a_w que n'assegurin l'estabilitat a llarg termini del producte envasat a temperatura ambient. Tal com s'ha comentat anteriorment, aquesta tecnologia de deshidratació no es correspon amb el mètode escollit per la planta demostrativa del projecte HYDROBLOOD, pel que els resultats obtinguts, tant en la caracterització fisicoquímica com en la microbiològica, no seran exactament reproduïbles en els productes obtinguts a escala industrial.

En el procés d'obtenció del concentrat es va combinar una hidròlisi de 2 o 6 h amb Alcalasa o Flavourzyme amb un tractament tèrmic a 90 °C durant 10 min i una descoloració amb peròxid d'hidrogen al 0,75 % sobre sang sencera. De cada fracció se'n va determinar el color i el grau d'hidròlisi (en les mostres que ho van permetre).

4.3.5. Caracterització fisicoquímica dels concentrats proteics

4. Composició química

La caracterització fisicoquímica dels concentrats proteics descolorits i liofilitzats es va realitzar en cada una de les mostres obtingudes. Els paràmetres analitzats van ser l'activitat d'aigua, el percentatge d'humitat, cendres i proteïna (veure Capítol 3, apartat 3.2.5.1). Totes les anàlisis es van fer com a mínim per duplicat.

5. Composició aminoacídica

El percentatge d'aminoàcids de les mostres analitzades va ser determinat per una empresa externa (Centre Tecnològic de Catalunya, Girona, Espanya) mitjançant cromatografia líquida acoblada a un espectròmetre de masses de triple quadrupol (LC-QqQ) (UHPLC 1290 Infinity II Series acoblat a QqQ/MS 6490 Series, Agilent Technologies, Sta Clara, CA, USA). Per quantificar els aminoàcids, es va utilitzar un mix d'aminoàcids estàndards (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, MA, EUA). La mostra analitzada va ser el concentrat proteic obtingut mitjançant el tractament tèrmic a 90 °C i descolorat amb un 0,75 % de peròxid d'hidrogen durant mitja hora. Per determinar els aminoàcids totals (excepte el triptòfan) es van hidrolitzar 10 mg de la mostra amb HCl 6 M i atmosfera de N₂ durant 24 h a 110 °C. Seguidament, es va barrejar 100 µL de mostra amb 80 µL de NaOH 6 M, 25 µL d'estàndard i 795 µL d'aigua, i es va centrifugar a 15000 rpm (a 4 °C) durant 5 min.

Per determinar el triptòfan, es van hidrolitzar 10 mg de la mostra de concentrat proteic amb 1 mL de NaOH 4,2 M i 2,5 µL de Tiodietanol en atmosfera de N₂ durant 20h a 110 °C. 100 µL del sobrenedant obtingut es van barrejar amb 50 µL de HCl 6 M, 25 µL d'estàndard i 825 µL d'aigua que es van centrifugar a 15000 rpm (a 4 °C) durant 5 min.

Finalment, per ambdues determinacions, es van recuperar 10 µL del sobrenedant i es van derivatitzar afegint 70 µL de tampó borat i 20 µL de reactiu AQC (Waters) dissolt en acetonitril. La mostra es va vortejar i es va escalfar durant 10 min a 55 °C per finalment ser analitzades mitjançant cromatografia.

Es va utilitzar una columna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm 2,1 x 100 mm (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA). La separació cromatogràfica es va realitzar per gradient d'acetat d'amoni 20 mM a pH 5 i acetonitril 80 %: aigua Mili Q (8:2) com a fase mòbil. Totes les determinacions es van dur a terme per triplicat.

6. Caracterització dels paràmetres CIE L*a*b* del color

Els paràmetres CIE L*a*b* del color es van determinar mitjançant un colorímetre Minolta CR-400 (Minolta Co, Ltd, Osaka, Japó) (veure Capítol 3, apartat 3.2.6). Cada determinació es va realitzar per triplicat.

7. Caracterització microbiològica

Es van realitzar els recomptes d'aerobis mesòfils viables (ISO 4833, 2013) i dels enterobacteris (ISO 7402, 1993) (veure Capítol 3, apartat 3.2.7). Aquests grups de microorganismes són considerats uns bons indicadors de les condicions higièniques del procés d'obtenció, de la vida útil i de la seguretat potencial de l'aliment.

Els concentrats proteics obtinguts mitjançant el mètode de precipitació tèrmica es van analitzar per duplicat, just després d'haver assecat totes les mostres en un mateix procés de liofilització. També es va analitzar la qualitat microbiològica de la sang utilitzada com a matèria primera (n=3).

4.3.6. Grau d'hidròlisi

Es va determinar el grau d'hidròlisi després del tractament enzimàtic en les mostres de sang sencera mitjançant el mètode de l'àcid trinitro-benzen-sulfònic (TNBS) descrit per Adler-Nissen (1974) que permet la determinació de la concentració de grups α -amino alliberats en el trencament dels enllaços peptídics. Aquests grups reaccionen amb el reactiu TNBS adoptant una coloració groguenca que es pot mesurar mitjançant espectrofotometria per determinar-ne la concentració a partir d'una corba patró, en aquest cas, amb un patró de L-Leucina (Scharlau, Scharlab S.L., Sentmenat, Barcelona).

Les mostres de sang hidrolitzades es refredaven amb gel per aturar la hidròlisi i es guardaven fins a realitzar les determinacions. Les mostres analitzades van ser les obtingudes en els assajos sense tractament tèrmic previ ja que aquest comportava la precipitació i insolubilització de les proteïnes.

Per determinar el grau d'hidròlisi es dissolia 1 mL de la mostra en 200 mL de dodecil sulfat sòdic a l'1 % (SDS, Panreac Química Sau, Castellar del Vallès, Barcelona), el que corresponia a una concentració entre 0,25 i $2,5 \times 10^{-3}$ equivalents amino / L. Seguidament es mesclava dins d'un tub d'assaig 0,25 mL de la solució amb 2 mL de tampó fosfat (pH 8,2) i 2 mL d'àcid TNBS a una concentració de 0,1 % (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, Estats Units) i s'incubava a la foscor a 50 ± 1 °C durant una hora. Per aturar la reacció es reduïa la temperatura dels tubs mitjançant un bany d'aigua freda i s'addicionaven 4 mL d'àcid clorhídric 0,1 N. Finalment, es llegia l'absorbància de les mostres a la longitud d'ona de 340 nm mitjançant un espectrofotòmetre CE 7400 (Cecil Instruments, Cambridge, Anglaterra) enfront una solució d' SDS 1 %.

El grau d'hidròlisi (GH) es va determinar seguint la fórmula:

$$GH = \frac{h}{h_{total}} \times 100$$

On:

h = equivalents d'hidròlisi o meq/g de proteïna de L-aminoàcids formats durant la hidròlisi, determinats a partir d'una corba patró amb L-Leucina.

h_{tot} = equivalents d'hidròlisi en la hidròlisi total de proteïna o aminoàcids (suma del contingut d'aminoàcids individuals en 1 g de proteïna). En el cas de l'hemoglobina és 8,38 meq/g de proteïna (Olsen, 1985).

4.3.7. Tractament estadístic de les dades

Les dades es van analitzar mitjançant el paquet estadístic *IBM SPSS Statistics* versió 25 (IBM SPSS Statistical software Inc., Chicago, IL, USA).

Per determinar l'efecte de la concentració de peròxid i l'augment de temperatura en la descoloració i la contaminació microbiològica de les mostres assecades, es va realitzar una anàlisi univariant de la variància (ANOVA), considerant com a significatius els valors de probabilitat inferiors a 0,05. L'homoscedasticitat de les dades es va comprovar aplicant el test de Levene. En el primer assaig, mitjançant precipitació àcida, es van considerar els factors fixes: temperatura i concentració de peròxid; i les variables dependents: mostra i components CIE L^* , a^* i b^* . En el segon assaig, mitjançant precipitació tèrmica, es va considerar el factor fix: temperatura; i les variables dependents; humitat, cendres, proteïna, a_w , CIE $L^*a^*b^*$, recomptes d'enterobactèries i aerobis mesòfils.

Les mitjanes es van comparar per parells mitjançant el test de Tukey-Kramer amb una significació del 95%. Per analitzar els resultats corresponents als recomptes microbiològics les dades es van transformar a escala logarítmica.

4.3.8. Obtenció de productes model

4.3.8.1. Productes model carnis

En aquest apartat es van realitzar unes proves de concepte per l'obtenció de productes carnis model tipus pasta fina. El Real decret 474/2014, del 13 de juny (BOE 147 de 18 de juny), pel qual s'aprova la norma de qualitat de derivats carnis, defineix una pasta fina com un elaborat càrnic a partir de trossos de carn no identificables anatòmicament o a partir de carn o carnis i greix que s'han sotmès a un procés de picat més o menys groller, o bé un picat intens fins a formar una pasta fina i homogènia, i posterior embotició o

envasat. La normativa estableix que la carn podrà ser del mateix tipus en la seva totalitat o ser una barreja de diferents procedències, naturaleses, parts anatòmiques o espècies animals.

Per poder obtenir un producte assequible per a tota la població, és necessari optimitzar les fórmules dels elaborats càrnics alterant al mínim les seves propietats nutricionals i organolèptiques, introduint matèries primeres alternatives a la carn com a tal per reduir els costos de producció o augmentar-ne els marges de benefici, tot i que alguns comporten desavantatges respecte a l'ús de la carn. En són exemple la carn separada mecànicament (obtinguda dels retalls que no s'han separat dels ossos) o extensors carnis com són la proteïna làctia o la proteïna de soja, aquests dos últims considerats proteïnes potencialment al·lèrgiques.

a) Producte tipus mortadel·la

L'objectiu és provar la substitució de la proteïna de soja utilitzada en l'elaboració d'un producte carni cuit tipus pasta fina (mortadel·la) pel concentrat proteic descolorat de sang, amb el que es pretén eliminar el risc d'al·lèrgenicitat associat a la soja mantenint el valor nutricional proteic de l'aliment.

En la Taula 4.3 es mostra la fórmula utilitzada per l'elaboració de la mortadel·la, extreta de treballs previs del grup de Tecnologia dels Aliments de la UdG (González, 2017). Es van elaborar una mostra sense concentrat proteic (control) i dues mostres assaig amb concentrat proteic humit i concentrat proteic dessecat (P1), per avaluar l'aplicabilitat del producte proteic en els dos estats. La formulació de les mortadel·les assaig es va establir substituint la soja pel concentrat proteic descolorat, ajustant la fórmula a partir de la quantitat de proteïna desitjada i compensant la quantitat d'aigua per no alterar la composició final. En la Figura 4.6 es mostra el diagrama de flux del procés d'elaboració dels productes.

Per elaborar les mortadel·les es va utilitzar un robot de cuina Thermomix TM-31 (Vorwerk, Alemanya) que disposa de 10 velocitats (amb velocitat màxima equivalent a 10.000 rpm) per mesclar i picar els diferents ingredients. Primer es va picar el magre de porc, prèviament descongelat durant 2 h a la nevera, a velocitat 10 durant 60 segons. Seguidament se li va afegir la sal, el nitrit, el polifosfat i aproximadament un terç del gel i es va barrejar a velocitat 1 durant 10 segons i picar a velocitat 10 durant 1 min i mig. S'afegia la farina de soja (control) o concentrat proteic (assaig), el carragenat i la resta de gel i es barrejava (velocitat 1 durant 10 segons) i picava (velocitat 10 durant 1 min i mig). S'afegia el greix i es picava a velocitat 8 durant un minut i mig, i s'afegia la resta d'ingredients (colorant, aroma, ascorbat i fècula), barrejant-ho a velocitat 1 durant un minut i mig. Per finalitzar l'emulsió, la pasta càrnia es treballava a velocitat 2 durant dos min i mig.

Taula 4.3. Formulació utilitzada en les proves de concepte de fabricació de producte carni tipus mortadella control i assaig (P1) amb el concentrat proteic humit i deshidratat procedent de sang ($g \cdot kg^{-1}$).

	CONTROL	P1	
		Concentrat proteic humit	Concentrat proteic dessecat
Carn magra	396	396	396
Papada	200	200	200
Aigua/gel	325	236,3	324,58
Sal	15	15	15
Polifosfat	3	3	3
Farina de soja	25	-	-
Concentrat proteic	-	111,5	23,05
Ascorbat	0,5	0,5	0,5
Nitrit de sodi	0,15	0,15	0,15
Carragenat	3	3	3
Fècula de patata	30	30	30
Cotxinilla 10 %	3	3	3
Aroma de mortadella	2	2	2
TOTAL	1.002,65 g	1.000,45 g	1.000,28 g

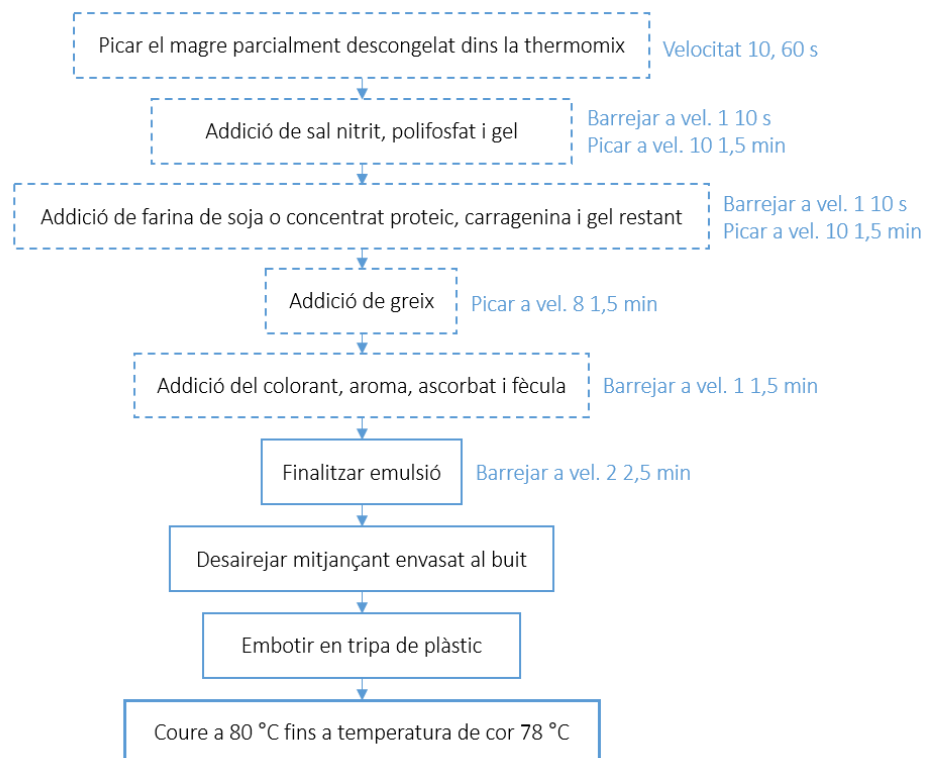


Figura 4.6. Diagrama de flux del procés d'elaboració dels productes carnis tipus mortadella.

La massa era desairejada mitjançant un envasat al buit en una envasadora de campana de sobretaula EVT-7-TD (Tecnotrip, Terrassa, Espanya). Seguidament, s'embotia en tripa de plàstic de 50 mm de diàmetre (multilayer polymer casings, ®Nalobar, Kalle GmbH/Casings, Wiesbaden, Alemanya) mitjançant una embotidora manual de pistó RCWF-3L-H (1504) (Royal Catering, Madrid, Espanya) i es tancava mitjançant fil de cotó a cada extrem de peça. Finalment, la cocció de les mortadelles es duia a terme en un bany d'aigua calenta a $80\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durant el temps necessari per arribar a una temperatura al cor de les peces de 78 °C durant 5 min. Es va registrar la temperatura al cor durant tota la cocció per validar la letalitat del tractament de pasteurització (valor P_{70}). Després de la cocció, les mostres es refredaven en un bany d'aigua freda i es guardaven en refrigeració fins que es realitzaven les anàlisis corresponents.

b) Paté

El paté és un producte de procedència francesa elaborat a partir de matèries càrnies, tot i permetre l'addició d'un gran ventall d'ingredients de diferent naturalesa i procedència tals com espècies, licors, vi, etc. Es sol elaborar a partir d'una base de carn magra, fetge i greix, tot i que se li poden afegir altres tipus de vísceres com ronyons, pulmons o cor. La textura d'aquests sol ser la d'una pasta fina emulsionada fàcilment untable a temperatura ambient. És degut a aquestes característiques que permet l'addició d'ingredients alimentaris alternatius als típicament utilitzats.

En aquest assaig es pretenia provar la substitució d'un ingredient comunament utilitzat com agent emulsionant en l'elaboració del paté, el caseïnat sòdic, pel concentrat proteic de sang descolorat. A la Taula 4.4 es mostra la formulació utilitzada en l'elaboració del paté control (CONTROL) i paté producte (P). En la Figura 4.7 es mostra el procés d'elaboració del paté segons el procediment descrit per Hurtado *et al.* (2010).

L'elaboració del paté també es va dur a terme mitjançant una Thermomix TM-31 (Vorwerk, Alemanya). Primer de tot es va realitzar un escaldat del greix en aigua a 100 °C durant 10 min en una placa calefactora. El greix amb l'aigua procedents de l'escaldament es van avocar al robot de cuina juntament amb el caseïnat o el concentrat proteic i es va barrejar (1 min a cada velocitat: 1, 2, 3 i 4) i picar (1 min a velocitat 5 i 15 segons a velocitat 10). Seguidament, es van afegir el fetge de porc pre-salat, nitrit, ascorbat, pebre negre i blanc, nou moscada i sucre i es va barrejar (a velocitat 1, 2, 3 i 4 durant 30 segons) i picar (1 min a velocitat 10). Els productes obtinguts es van envasar en recipients de vidre en porcions de 50 g, tancats hermèticament, i es van coure en un bany d'aigua calenta a 75 °C durant 25 min. Al finalitzar, es va comprovar que el cor del producte havia assolit la temperatura de 70 °C . A més, es va registrar la temperatura durant la cocció per validar la letalitat del procés de cocció-pasteurització. Les mostres es van refredar en un bany d'aigua freda i es van guardar en refrigeració fins que es duien a terme les anàlisis.

Taula 4.4. Formulació utilitzada en l'elaboració dels patés control i assaig (P) amb el concentrat proteic deshidratat procedent de sang (g·kg⁻¹).

	CONTROL	P
Fetge	300 g	300 g
Greix	500 g	500 g
Caseïnat	44,4 g	-
Concentrat proteic	-	38.8 g
Aigua	230 g	229 g
Sal	14 g	14 g
Nitrits	0,1 g	0,1 g
Ascorbat	0,5 g	0,5 g
Pebre negre	2 g	2 g
Pebre blanc	2 g	2 g
Nou moscada	1 g	1 g
Sucre	5,5 g	5,5 g
TOTAL	1.099,5 g	1.092,9

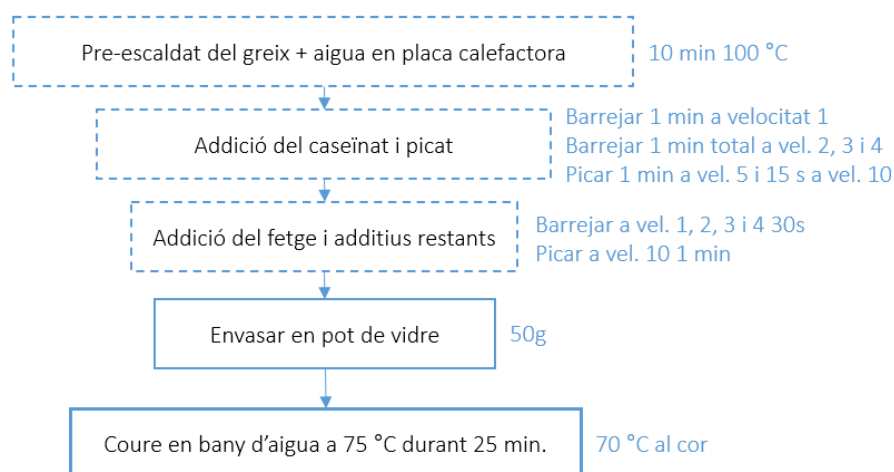


Figura 4.7. Diagrama de flux del procés d'elaboració del paté.

Letalitat dels tractaments de cocció

La validació de la letalitat dels tractaments de cocció dels productes carnis model representa un mètode útil per assegurar la reducció de càrrega microbiològica de l'aliment a nivells acceptables pel consum humà.

En ambdós productes s'ha dut a terme una pasteurització, en la que s'ha valorat l'assoliment de la seguretat i l'estabilitat adquirida, prenent com a referència els microorganismes indicadors: *Listeria monocytogenes* (patogen) i *Enterococcus spp.* (alterant), amb una reducció de 6 unitats logarítmiques (amb una constant de resistència tèrmica $z=7,5$) i de 10 logs ($z=10$), respectivament (Bover-Cid *et al.*, 2015).

Els criteris de procés per aquests microorganismes són de 70 °C durant 2 min per la reducció de *L. monocytogenes* i 70 °C durant 40 min per la reducció d'*Enterococcus spp.* El registre de la temperatura de cocció permet calcular la letalitat parcial i acumulada per cada cas, i així determinar la seguretat i estabilitat del producte obtingut. Per calcular la taxa de letalitat es va utilitzar la fórmula següent:

$$L = 10^{(T-T_{ref})/z}$$

T: temperatura al cor del producte.

T ref: temperatura a assolir per obtenir la reducció del microorganisme (70 °C en ambdós casos).

z: constant de resistència tèrmica.

Es va calcular la letalitat parcial seguint la fórmula:

$$L_{parcial} = (t_2 - t_1)L$$

t₂-t₁: diferència de temps entre cada lectura de temperatura.

Finalment, es va realitzar el sumatori de les letalitats parcials obtingudes per determinar els valors de pasteurització (P₇₀) i el punt en el que s'assolien les condicions de seguretat i estabilitat dels productes.

4.3.8.2. Proves d'aplicació en galeteria

En aquest apartat es pretenia realitzar unes altres proves de concepte d'aplicació del concentrat proteic descolorat en un aliment d'ús comú de galeteria amb una aportació superior de proteïna i ferro, amb l'objectiu d'aconseguir un producte alimentari amb un valor nutritiu superior per suplementar dèficits de proteïna en grups de risc com nens i gent gran, o per aportar un suplement nutricional a grups amb necessitats dietètiques específiques com són els esportistes.

Per provar l'addició del concentrat proteic en galetes es van escollir dos tipus de productes (galleta de farina de blat tipus *Maria* i galleta de civada) amb ingredients comuns, als que se'ls va addicionar dues aportacions de diferent quantitat del producte proteic de sang, obtenint en ambdós casos les galetes control, les galetes P1 amb una menor aportació del concentrat proteic (2,5 i 5,5 %) i les galetes P2 amb una aportació major (5 i 7 %). La quantitat de producte proteic afegida es va calcular en funció de l'acceptació de la mateixa massa i sobre la massa total tal com s'indica en la Taula 4.5.

Taula 4.5. Formulació (g/g) utilitzada en les galetes tipus maria i de civada control i assaig amb 2 aportacions de proteïna diferent utilitzant el concentrat proteic de sang (P1 -2,5 a 5,5%- i P2 -5 a 7%-).

GALETES DE FARINA DE BLAT (tipus <i>Maria</i>)			
	CONTROL	P1	P2
Farina de blat	375 g	375 g	375 g
Impulsor	7,5 g	7,5 g	7,5 g
Sal	2 g	2 g	2 g
Sucre	125 g	125 g	125 g
Oli d'oliva	120 g	120 g	120 g
Ou	1	1	1
Llet	5 mL	5 mL	5 mL
Concentrat proteic	-	16 g (2,5%)	32 (5%)
GALETES DE CIVADA			
	CONTROL	P1	P2
Farina de blat	100 g	100 g	100 g
Farina de civada	230 g	230 g	230 g
Sal	2 g	2 g	2 g
Sucre morè	150 g	150 g	150 g
Ou	2	2	2
Oli d'oliva	150 mL	150 mL	150 mL
Concentrat proteic	-	37 g (5,5%)	48 g (7%)

A la Figura 4.8 es mostra el diagrama de flux del procediment de fabricació de les galetes.

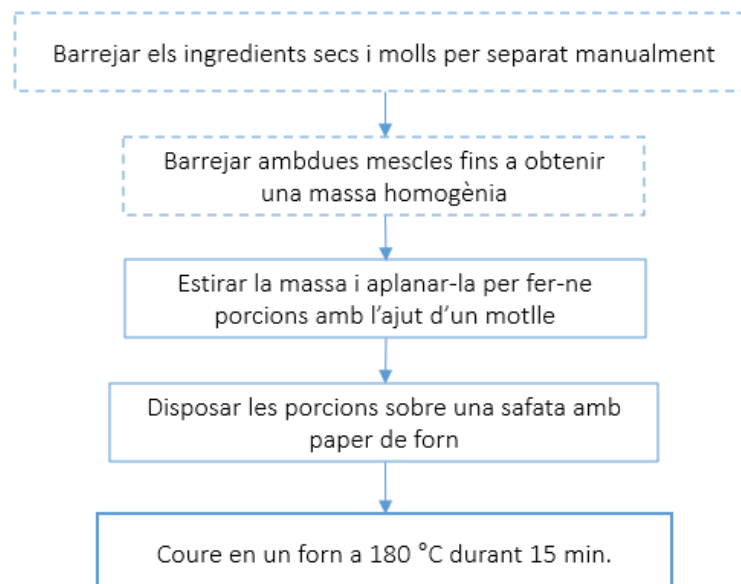


Figura 4.8. Procés d'elaboració de galetes.

Per elaborar les galetes, els ingredients secs (farina, llevat, sal, sucre i/o concentrat proteic) i humits (ou, llet i oli d'oliva) es van barrejar manualment per separat i es van mesclar fins a obtenir una massa homogènia. La massa es va estirar fins a obtenir un gruix d'aproximadament 1 cm i se'n van fer porcions mitjançant un motlle circular. Finalment, es van disposar en una safata i es van coure en un forn Moulinex B200 (Moulinex, França) a 180 °C durant 15 min. Després es van refredar a temperatura ambient i es van emmagatzemar en un recipient tancat fins que es realitzaven les anàlisis corresponents.

4.3.9. Caracterització fisicoquímica dels productes model

5. *Composició química*

Els paràmetres fisicoquímics determinats en els productes model van ser el percentatge d'extracte sec, cendres i proteïna (veure Capítol 3, apartat 3.2.6). Les mostres van ser picades mitjançant una picadora clàssica Moulinex A327R1 (Moulinex S. A., França) per així homogeneïtzar-les. Cada determinació es va fer per duplicat.

6. *pH*

El pH de la mortadella es va determinar mitjançant un pHmetre GLP22 amb elèctrode per a productes semi-sòlids (Crison Instruments S.A., l'Hospitalet de Llobregat, Espanya). Cada determinació es va dur a terme per triplicat.

7. *Estabilitat de l'emulsió: fluids totals extraïbles (TEF i FAT)*

El paràmetre fluids extraïbles totals (TEF -*Total Expressible Fluid*-) permet determinar l'estabilitat d'una emulsió càrnia a partir de la pasta crua del producte abans del procés de cocció, determinant-ne la quantitat de fluids alliberats durant la cocció seguida d'una centrifugació. El FAT es determina a partir del procediment pel TEF i permet conèixer el percentatge de sòlids, principalment greix, que ha exsudat durant la cocció i centrifugació de la pasta crua. Per determinar aquests paràmetres, es va seguir el mètode descrit per O'Flynn *et al.* (2014); es van pesar uns 25 g de pasta crua i es van dipositar en tubs de centrifuga. Les mostres es van centrifugar en una centrífuga SORVALL RC-5C PLUS (DuPont, Newton, EUA) durant 1 min a 2430 x g i a 20° C. Seguidament, les mostres es van sotmetre a cocció en un bany d'aigua calenta a 70 °C durant 30 min i després es van tornar a centrifugar 3 min a 2430 x g, a 20° C. Les dues fraccions recuperades (pellet i fluid alliberat) va ser pesades, el que va permetre calcular el TEF. Seguidament, els fluids exsudats es van assecar a 100 °C ± 2 °C *overnight* en una estufa per calcular-ne el FAT per gravimetria.

Els percentatge de TEF i FAT es van calcular segons les equacions següents:

$$TEF = (Pes\ tub + mostra) - (Pes\ tub + pellet)$$

$$\% TEF = \frac{TEF}{pes\ de\ la\ mostra} \times 100$$

$$FAT = \frac{(Pes\ gressol + sobrenedant\ assecat) - (Pes\ gressol)}{TEF} \times 100$$

8. Capacitat de retenció d'aigua (CRA)

La capacitat de retenció d'aigua (CRA) indica la capacitat del producte de retenir l'aigua que conté en aplicar-li un tractament (tal com escalfament o centrifugació). Aquest paràmetre es troba directament relacionat amb les característiques organolèptiques de l'aliment, com són la textura, fermesa o sucositat del producte.

Per determinar la CRA dels productes carnis cuits es va utilitzar el mètode descrit per Kochev i Foegeding (1993) i modificat per Parés *et al.* (1998); es va pesar una porció del producte cuit que es va introduir en un pot de vidre tancat hermèticament. La mostra es va coure, per duplicat, en un bany a $90\ ^\circ\text{C} \pm 2\ ^\circ\text{C}$ durant 10 min i es va recuperar, embolcallar amb una gassa i introduir en un tub de centrifuga. Es va centrifugar la mostra durant 10 min a $9000 \times g$, i a $20\ ^\circ\text{C}$, i es va pesar el residu líquid, descartant la mostra en el farcell, per així determinar la pèrdua d'aigua per gravimetria. El percentatge d'aigua de la mostra, necessari pel càlcul de la CRA, es va determinar tal com s'indica en l'apartat de composició química de l'aparat 3.2.8. La CRA es va calcular seguint l'equació següent:

$$CRA = 1 - \frac{(Pes\ inicial\ de\ la\ mostra - Pes\ de\ la\ mostra\ després\ de\ centrifugar)}{Aigua\ total\ de\ la\ mostra} \times 100$$

9. Caracterització dels paràmetres CIE $L^*a^*b^*$

El color intern dels productes tipus mortadella es va determinar mitjançant la mesura dels paràmetres CIE $L^*a^*b^*$ del color amb un colorímetre Minolta CR-300 (Minolta Co, Ltd, Osaka, Japó) (veure Capítol 3, apartat 3.2.6) sobre llesques de 2 cm de gruix. Cada determinació es va realitzar per triplicat sobre cada mostra.

4.4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.4.1. Concentrat proteic obtingut mitjançant precipitació àcida

A continuació s'exposen els resultats obtinguts en l'assaig d'obtenció del concentrat proteic mitjançant precipitació àcida, aplicant diferents concentracions de peròxid d'hidrogen i dues temperatures de tractament en l'etapa de descoloració. A la Figura 4.9 es mostren els valors dels paràmetres del color instrumental dels diferents concentrats proteics.

Es pot observar una clara tendència a l'augment dels valors de L^* i b^* a mesura que s'afegeix més quantitat de peròxid, amb un augment de més de 30 unitats per la lluminositat (L^*) i més de 20 per la coordenada b^* (groc), amb un 3% de peròxid respecte del 0,75%, el que representa un aclariment i un increment del color groc. L'ANOVA va mostrar diferències significatives ($P < 0,05$) per l'efecte de la temperatura de tractament a totes les concentracions de peròxid, observant-se una major descoloració a major temperatura, mentre que la concentració de peròxid afecta de manera diferent depenent dels casos, tal com es discutirà a continuació.

Per alta banda, en contra del que s'esperava, no s'observa una tendència clara pel paràmetre a^* (vermell), que es corrobora en els resultats de l'ANOVA, no observant-se diferències significatives ($P > 0,05$) per l'efecte de la concentració d'agent oxidant. Això indica que no hi ha una variació en la tonalitat vermella del producte, pel que la descoloració sols afecta als paràmetres L^* i b^* . En canvi, la temperatura de tractament sí que afecta significativament ($P < 0,05$) en totes les concentracions de peròxid assajades; s'observa un augment del paràmetre a^* en els tractaments a 60 °C respecte els 50 °C, a excepció del primer tractament amb un 0,75 % de peròxid d'hidrogen, que s'observa un efecte contrari, el qual podria ser degut a una rèplica que dista de la resta, el que es reflecteix directament en l'alta desviació del grup.

Cal destacar que els resultats de l'ANOVA van indicar un efecte significatiu de la mostra en el cas dels paràmetres L^* i a^* , el que podria afectar directament a l'estudi de la variació del factor a^* , que presenta una gran variabilitat en varis tractaments i podria induir a una detecció errònia de les diferències, encara que petites, entre tractaments en funció del peròxid.

Hicks *et al.* (2013), que van dur a terme una descoloració de farina de sang a temperatura ambient mitjançant concentracions de peròxid del 19 al 50 % (v/v), van obtenir resultats similars als observats en el present estudi amb tant sols un 1,5 % de peròxid a 60 °C, el que indica la importància dels tractaments d'acidificació i neutralització previs a la descoloració aplicats en el mètode estudiat. Si s'analitza cada paràmetre del color, aquests autors van mostrar uns resultats similars als nostres pel que fa a l'augment de la lluminositat a mesura que incrementa la dosi de peròxid, estabilitzant-se en valors al voltant de 70, tal com s'observa en el present estudi. Per altra banda, no observaven variació en els paràmetres a^* i b^* a

mesura que augmentava la concentració de reactiu, establint-se en valors d'aproximadament 8-9 i 30 respectivament, molt similars als observats en el nostre cas.

Aquests resultats semblen indicar una tendència més forta a la variació de color a una concentració inicialment més baixa de peròxid, que s'estabilitza en augmentar-la fins a arribar als valors de 70 per L*, 7-8 per a* i 30 per b*, tot i que per aquests dos últims paràmetres s'observi en menor grau.

Si s'analitzen els resultats obtinguts per l'efecte de les dues temperatures de tractament, es pot observar una tendència a l'augment de tots els paràmetres en augmentar 10 °C la temperatura, passant de 50 a 60 °C. L'anàlisi estadística confirma les diferències significatives ($P < 0,05$) per tots els productes tractats amb igual concentració de peròxid. Aquest resultat s'explica per l'augment de la velocitat de reacció en augmentar la temperatura durant el procés de descoloració, obtenint productes amb major lluminositat (L*) i un to més proper al groc (corresponent a un augment de b*). Altres autors com Hicks *et al.* (2013) no observaven diferències significatives en descolorar farina de sang mitjançant 30 % de peròxid (v/v) a temperatura ambient envers a una temperatura de 40 °C; aquestes diferències podrien ser donades pel diferent tractament d'obtenció (temperatura d'assecat no especificada) de la farina de sang respecte al producte obtingut en aquest assaig o, per altra banda, degut a l'alta quantitat de peròxid utilitzat.

A la Taula 4.6 es mostren els valors CIE L*a*b* de les mostres obtingudes i els valors de la mostra control (concentrat proteic obtingut en els assaigs preliminars mitjançant precipitació àcida i una descoloració *overnight* amb un 3 % de peròxid d'hidrogen i a temperatura ambient). Es pot observar una clara tendència a la disminució de la tonalitat del producte en augmentar la concentració de peròxid d'hidrogen i a una major temperatura de reacció (60 respecte 50 °C).

S'aconsegueix un producte més similar al control amb unes condicions d'un 1,25 % de peròxid a 60 °C o bé amb un 1,5 % de peròxid a 50 °C, el que demostra la possibilitat d'obtenir una descoloració eficaç reduint el percentatge de peròxid i en un temps de reacció molt menor a l'assajat en els estudis preliminars, passant d'aproximadament 24 h a mitja hora. A més, s'observa una descoloració molt major a una concentració de peròxid del 3% a qualsevol d'ambdues temperatures aplicades.

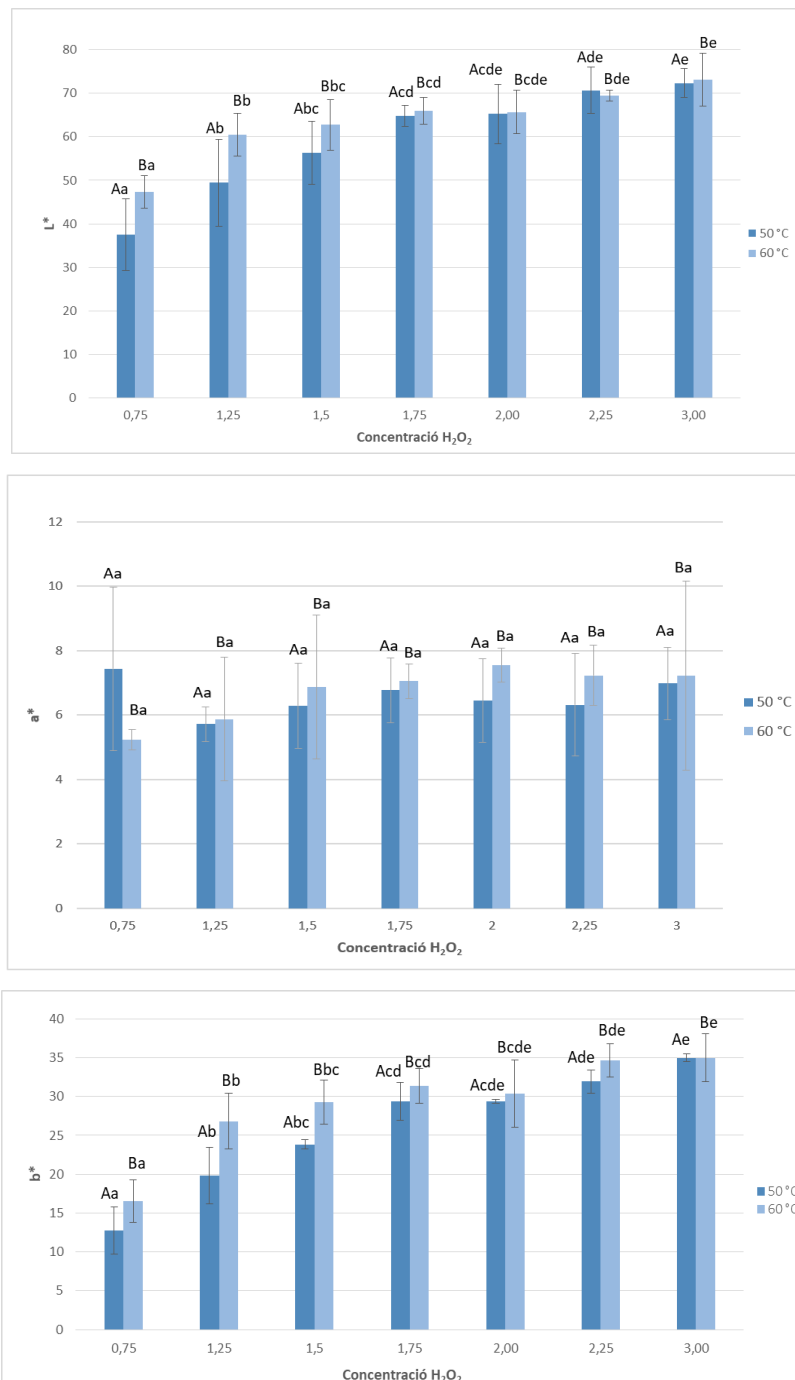

















Figura 4.9. Paràmetres CIE L*, a* i b* del color dels concentrats proteics descolorats a dues temperatures de tractament (50 o 60 °C) en funció de la concentració de peròxid d'hidrogen (0'75, 1'25, 1'5, 1'75, 2, 2'25 o 3% p/v) i deshidratats per liofilització. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard de les mitjanes per cada grup (n = 3). Les lletres diferents mostren les diferències significatives per l'efecte de la temperatura (majúscula) i la concentració de peròxid (minúscula) (P < 0,05).

Taula 4.6. Color obtingut en cada concentrat proteic assecat per liofilització segons la concentració de peròxid utilitzada i la temperatura aplicada durant el tractament de descoloració (n=3). Es mostra els valors de l'escala CIE L*a*b* per cada tractament.

	H ₂ O ₂ (% sobre sang sencera)	Temperatura (°C)	L*	a*	b*	Color*
Assajos preliminars (control)	3	NA	56,17 ± 5,44	8,72 ± 0,58	25,29 ± 4,08	
Optimització del procés de Florida (2008)	0,75	50	37,49 ± 8,30	7,44 ± 2,54	12,76 ± 2,99	
		60	47,32 ± 3,79	5,22 ± 0,31	16,57 ± 2,72	
	1,25	50	49,46 ± 9,97	5,72 ± 0,54	19,83 ± 3,67	
		60	60,49 ± 4,94	5,87 ± 1,92	26,82 ± 3,57	
	1,5	50	56,28 ± 7,26	6,28 ± 1,32	23,85 ± 0,58	
		60	62,75 ± 5,81	6,86 ± 2,24	29,27 ± 2,84	
	1,75	50	64,80 ± 2,38	6,43 ± 1,01	29,39 ± 2,41	
		60	66,03 ± 3,12	7,05 ± 0,53	31,38 ± 2,21	
	2	50	65,26 ± 6,81	6,45 ± 1,31	29,40 ± 0,23	
		60	65,71 ± 5,04	7,54 ± 0,52	30,37 ± 4,36	
	2,25	50	70,70 ± 5,37	6,31 ± 1,59	31,91 ± 1,45	
		60	69,47 ± 1,26	7,23 ± 0,93	34,69 ± 2,14	
	3	50	72,37 ± 3,38	6,98 ± 1,12	34,99 ± 0,48	
		60	73,10 ± 6,07	7,22 ± 2,94	34,98 ± 3,09	

(*) Imatge del color de les mostres obtinguda mitjançant la conversió dels paràmetres de l'escala CIE L*a*b* a l'escala RGB.

Així, les condicions més adequades per obtenir un concentrat proteic descolorat apte pel consum animal amb unes característiques similars a les obtingudes en els concentrats proteics dels assajos preliminars serien l'aplicació d'un tractament de 30 min amb un 1,25% de peròxid d'hidrogen sobre sang sencera a una temperatura de 60 °C o un tractament de 30 min amb un 1,5% de peròxid a 50 °C. Aquestes condicions permetrien obtenir el producte proteic acceptable des del punt de visat del grau de descoloració, reduint remarcablement el temps total del procés més de 23 h.

Per contra, s'observa una descoloració menys efectiva en els productes amb un 0,75 % de peròxid d'hidrogen, condicions màximes aplicables per obtenir un producte apte pel consum humà. Tot i l'optimització del procés, les condicions segures de processat de la sang per aquest mètode encara no permeten obtenir un concentrat proteic òptim per ser utilitzat com a ingredient alimentari pel consum humà. Així, es confirma que és necessari estudiar processos alternatius que permetin obtenir un producte amb un grau adequat de descoloració complint alhora les condicions considerades com a segures.

4.4.2. Concentrat proteic a partir de sang sencera obtingut mitjançant tractament tèrmic previ a la descoloració

A continuació es mostren els resultats obtinguts en l'estudi d'obtenció dels concentrats proteics descolorits i deshidratats obtinguts mitjançant el mètode descrit per Lee *et al.* (2000), basat en una inactivació tèrmica de la peroxidasa prèvia a la descoloració amb peròxid, i la corresponent caracterització fisicoquímica i microbiològica dels productes obtinguts.

4.4.2.1. Efecte del tractament tèrmic sobre els paràmetres CIE L*a*b* del color del concentrat proteic

A la Figura 4.10 es poden observar les imatges dels productes proteics obtinguts en les diferents condicions de tractament tèrmic assajades i les representacions del color determinat instrumentalment. Es pot apreciar una lleugera diferència entre el color dels tres concentrats proteics obtinguts, a partir d'un tractament tèrmic a 70, 80 o 90 °C, durant 10 min, previ a la descoloració amb un 0,75 % de peròxid d'hidrogen (v/v) sobre sang sencera durant 30 min. Per determinar objectivament aquestes possibles diferències es van analitzar els paràmetres CIE L*a*b* del color (Taula 4.7).



Figura 4.10. Imatges dels concentrats proteics descolorits i deshidratats per liofilització obtinguts a partir d'un tractament tèrmic a 70, 80 o 90 °C durant 10 min (d'esquerra a dreta), prèvia a la descoloració amb peròxid, i representació del color en l'escala RGB a partir dels valors en l'escala CIE L*a*b* (part inferior de cada figura) (n=3).

El major grau de descoloració de la sang s'ha obtingut en les mostres tractades a 90 °C, amb valors superiors tant de la lluminositat ($L^* = 61$), com del color groc ($b^* = 26$), respecte de les mostres tractades a les temperatures inferiors (Taula 4.7). L'ANOVA va indicar un efecte significatiu de la temperatura ($P < 0,05$)

sobre aquests dos paràmetres (L^* i b^*); essent les mostres tractades a 90 °C més clares i més grogues que les altres dues, mentre que no hi havia diferències entre els tractaments de 70 i 80 °C. En el cas del color vermell (a^*), no hi havia diferències significatives ($P > 0,05$) per l'efecte de la temperatura. Així, tal com es va observar en l'estudi anterior, la descoloració amb peròxid d'hidrogen només afecta als valors L^* i b^* del color.

Taula 4.7. Paràmetres CIE $L^*a^*b^*$ del color dels concentrats proteics obtinguts mitjançant un tractament tèrmic de la sang a 70, 80 o 90 °C durant 10 min, amb una posterior descoloració amb un 0,75% de peròxid d'hidrogen, durant 30 min (Mitjanes \pm DE, $n=3$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives entre tractaments ($P<0,05$).

Temperatura tractament tèrmic (°C)	L^*	a^*	b^*
70	50,18 \pm 3,32 ^a	6,18 \pm 0,64	20,88 \pm 3,20 ^a
80	52,17 \pm 5,40 ^a	5,66 \pm 0,45	20,53 \pm 2,47 ^a
90	61,52 \pm 3,01 ^b	5,77 \pm 0,82	25,86 \pm 1,11 ^b

Si es comparen els valors dels paràmetres CIE $L^*a^*b^*$ amb els obtinguts en els anteriors assajos, es pot observar com el producte obtingut en aquest assaig presenta més semblances amb el concentrat proteic obtingut en els assajos preliminars amb un 3% de peròxid (amb uns valors de L^* 62,32; a^* 9,24; b^* 29,15) que a l'obtingut mitjançant un 0,75% de peròxid a una temperatura de 60 °C (producte obtingut en l'assaig anterior del present Capítol, amb uns valors de L^* 47,32; a^* 5,22; b^* 16,57). Això indicaria una major eficàcia del tractament tèrmic de la sang que del tractament amb precipitació àcida. Aquests resultats es podrien relacionar amb una major eficàcia del tractament tèrmic per inactivar la peroxidasa de la sang respecte a la capacitat d'inactivació mitjançant l'acidificació, ambdós tractaments previs a la descoloració amb peròxid d'hidrogen.

El grau de descoloració assolit mitjançant aquest mètode és superior que els resultats obtinguts anteriorment per Yang *et al.* (1998), que observaven una descoloració bastant inferior provant l'efecte descolorant de diferents tractaments sobre la fracció cel·lular tals com la descoloració amb sodi-carboximetilcel·lulosa (L^* 20,41; a^* 10,73; b^* 4,99), àcid-acetona (L^* 41,66; a^* 5,34; b^* 12,11), peròxid d'hidrogen al 0,35% durant 20h (L^* 33,16; a^* 9,34; b^* 7,23), o un tractament hidrolític amb l'enzim Alcalasa (L^* 24,81; a^* 13,29; b^* 7,19).

Per altra banda, Hicks *et al.* (2013) van aconseguir una elevada descoloració (L^* 61-69; a^* 8-10; b^* 29-33) mitjançant quantitats de peròxid d'hidrogen molt superiors a les utilitzades en aquest estudi (des del 19 fins al 50 % v/v), però no van aconseguir millors resultats amb tractaments previs a la descoloració per rehidratar la farina de sang amb aigua, àcid fòrmic, àcid acètic, àcid propiònic, urea o SDS. A posteriori, també van assajar una descoloració mitjançant àcid perfòrmic, àcid peracètic i àcid propiònic en equilibri

amb peròxid d'hidrogen, obtenint millors resultats utilitzant una concentració de 3 o 5,6 % d'àcid peracètic (L^* 75-86; a^* -1-4; b^* 39-40). Aquests bons resultats els van atribuir a l'apolaritat del reactiu, el que li confereix la capacitat d'accedir a les regions apolars de l'hemoglobina, on el grup hemo quedaria confinat, després de ser sotmesa a un tractament tèrmic i d'asseccament. Tot i això, la concentració de peròxid d'hidrogen en la solució d'àcid peracètic en equilibri utilitzada per aquests autors és major a l'1,3 %, el que excedeix el valor llindar estudiat per aquest reactiu de 0,75 %.

Així, es pot considerar que les condicions òptimes per obtenir un concentrat proteic segur pel consum humà amb un major grau de descoloració serien aplicar un tractament tèrmic de 90 °C durant 10 min amb una posterior descoloració amb peròxid d'hidrogen al 0,75 % (v/v) durant un temps total de 30 min. Aquest tractament permet obtenir un producte amb major lluminositat (L^*) i un to més groc (major b^*) que el producte obtingut per precipitació àcida i una descoloració amb un 0,75 % de peròxid (v/v) durant 30 min i a 60 °C. El valor referent a la coloració vermella (a^*), no varia significativament en cap dels tractaments.

Tot i l'augment en la descoloració del producte proteic mitjançant tractament tèrmic i descoloració amb un 0,75% de peròxid d'hidrogen, el producte obtingut continua presentant una coloració marronosa-groga intensa; aquest resultat podria ser degut a una insuficiència en l'efectivitat per inactivar la peroxidasa en les condicions utilitzades, pel que els enzims oxido reductors continuarien consumint part del peròxid utilitzat i es reduiria així la capacitat descolorant del tractament. Per altra banda, el tractament tèrmic podria haver alterat l'estructura de l'hemoglobina, dificultant així l'accessibilitat del peròxid.

4.4.2.2. *Composició química del concentrat proteic obtingut mitjançant tractament tèrmic*

Els resultats obtinguts en la determinació de la composició química del concentrat proteic s'exposen a la Taula 4.8, on es poden observar els percentatges d'humitat, proteïna i cendres i l'activitat d'aigua (a_w) de les mostres liofilitzades.

La variació en el contingut d'aigua pels diferents tractaments és baixa, no observant-se diferències significatives entre tractaments ($P > 0,05$), obtenint de mitjana valors d'humitat del $4,09 \pm 0,43$ %, similars als obtinguts per Tybor *et al.* (1975) en el tractament de globina descolorada amb acetona acidificada i assecada mitjançant atomització, amb una humitat mitjana del 3,41 %.

L'activitat d'aigua mitjana obtinguda és de $0,13 \pm 0,03$, i tampoc es van trobar diferències significatives entre tractaments ($P > 0,05$). Aquests valors d' a_w garanteixen l'estabilitat del producte, implicant la proliferació de microorganismes.

Taula 4.8. Composició química i activitat de l'aigua dels concentrats proteics descolorits i deshidratats per liofilització obtinguts mitjançant un tractament tèrmic (a 70, 80 o 90 °C) durant 10 min, previ a la descoloració amb un 0,75% de peròxid d'hidrogen, durant 30 min. Es mostren les mitjanes \pm DE (n=3).

Temperatura tractament tèrmic (°C)	Paràmetre			
	Humitat (%)	Proteïna (%)	Cendres (%)	Activitat de l'aigua (a_w) a 25 °C
70	3,63 \pm 1,03	95,74 \pm 1,10	2,17 \pm 0,32	0,11 \pm 0,03
80	4,48 \pm 1,28	94,32 \pm 0,60	2,34 \pm 0,20	0,16 \pm 0,06
90	4,17 \pm 0,30	94,65 \pm 2,13	2,52 \pm 0,72	0,13 \pm 0,03
MITJANA \pm DE	4,09 \pm 0,43	94,90 \pm 0,74	2,34 \pm 0,17	0,13 \pm 0,03

El percentatge de cendres és similar en totes les mostres, amb una mitjana del 2,34 \pm 0,17 %, en les que tampoc es van trobar diferències significatives ($P > 0,05$) per l'efecte de la temperatura. Aquest valor representa el doble de l'obtingut en el procés de Florido, el que podria ser degut a la utilització d'una sang amb una major concentració de sals anticoagulants, procedent d'un escorxador diferent a la sang utilitzada en els assajos preliminars. Per altra banda, aquests valors representen un 1 % menys dels determinats per Gómez-Juárez *et al.* (1999) en hemoglobina dessecada mitjançant atomització (3,22 \pm 0,25 %), mentre que representen el doble del determinat en el mateix estudi en la descoloració de la globina amb NaOCl, amb un valor de cendres del 0,98 \pm 0,03 %. Aquestes diferències poden ser degudes al tipus i/o concentració de sals anticoagulants utilitzades, o als reactius acidificants o alcalinitzants addicionats per ajustar les condicions de pH pels tractaments.

El percentatge de proteïna determinat en els concentrats proteics, del 94 a 96 %, no presenta diferències significatives entre tractaments ($P > 0,05$), el que indica que una major intensitat de tractament tèrmic no implica l'obtenció d'una major o menor concentració de proteïna total, tot i que sí pot influir en el grau de desnaturalització i la composició en aminoàcids d'aquesta. Aquest paràmetre és similar a l'obtingut per Tybor *et al.* (1975) en el tractament de globina descolorada, amb uns valors mitjans de 91,22 %. La FAO especifica una IDR de 30 a 50 g de proteïna per adult (FAO, 2007), valors que s'assolirien amb tan sols la ingesta de 32-53 g del producte obtingut.

Si es comparen aquests valors amb els obtinguts en el procés mitjançant precipitació àcida, es poden observar clares diferències en la concentració de proteïna, passant d'aproximadament el 93% al 95% (sobre concentrat proteic sec), el que seria conseqüència de la disminució en la concentració de sals en el producte obtingut per tractament tèrmic, el qual no utilitza l'àcid i la base per inactivar la peroxidasa comportant la formació de sals que romanen al producte final.

Per altra banda, ambdós processos presenten uns valors d'humitat similars (aproximadament del 4 %), el que també es veu reflectit en l'activitat d'aigua, obtenint valors de 0,09 en el mètode per precipitació àcida,

i de 0,13 en el mètode tèrmic, valors d' a_w molt baixos que impedirien la proliferació microbiana en ambdós productes liofilitzats.

4.4.2.3. Composició aminoacídica

A la Taula 4.9 s'exposen els resultats obtinguts en la determinació de la composició en aminoàcids del concentrat proteic obtingut mitjançant tractament tèrmic a 90 °C durant 10 min amb posterior descoloració amb un 0,75 % de peròxid d'hidrogen durant 30 min i una dessecació mitjançant liofilització.

Taula 4.9. Contingut en aminoàcids (%) del concentrat proteic de sang porcina obtingut mitjançant tractament tèrmic i increment ($\Delta\%$) respecte al concentrat proteic obtingut mitjançant precipitació àcida (determinat en els estudis preliminars).

Aminoàcid	%	$\Delta\%$
Alanina (Ala)	9,7	1,54
Arginina (Arg)	4,8	-1,99
Àcid aspàrtic (Asp)	12,5	1,92
Cisteïna (Cys)	0,8	0,46
Àcid glutàmic (Glu)	9,8	1,28
Glicina (Gly)	5,3	0,94
Histidina (His)	5,8	1,87
Isoleucina (Ile)	0,9	-0,24
Leucina (Leu)	11,5	-3,23
Lisina (Lys)	7,6	-2,24
Metionina (Met)	0,9	0,32
Fenilalanina (Phe)	4,9	-2,88
Prolina (Pro)	4,4	0,35
Serina (Ser)	5,4	1,19
Treonina (Thr)	4,4	0,77
Triptòfan (Trp)	0,7	nd*
Tirosina (Tyr)	1,2	-0,74
Valina (Val)	9,4	-0,03

nd*: Valor no determinat.

Pel que fa als aminoàcids essencials abundants en sang, la Leucina, Lisina, Fenilalanina, Tirosina, Treonina i Valina, se n'han determinat uns valors de 11,5, 7,6, 4,9, 1,2, 4,4 i 9,4 %, respectivament, observant una

major concentració respecte a la sang sencera en el cas de Leucina, Lisina i Valina, mentre que hi ha una disminució del percentatge de Fenilalanina + Tirosina i Treonina. Cui *et al.* (2013) van reportar valors similars en plasma i globines de sang bovina pels aminoàcids Lisina (6,6-7 %), Fenilalanina (4,6-5 %) i Treonina (6,2-7,4 %), mentre que mostraven valors lleugerament inferiors per la Leucina (7,6-9,3 %) i Valina (6,4-7,5 %) i lleugerament superiors per la quantitat de Tirosina (4,8-5 %).

Si es comparen aquestes dades amb les observades en el concentrat proteic obtingut mitjançant precipitació àcida (representat com a increment del percentatge en cada aminoàcid - Δ%- a la Taula 4.7) es poden observar, en general, unes oscil·lacions molt baixes entre ambdós tractaments, determinant-se una diferència màxima d'un 3 % en Leucina i Fenilalanina. Aquests resultats indiquen un lleu efecte del tractament tèrmic en la disminució d'alguns aminoàcids essencials (Lys, Phe, Tyr, Leu i Ile), mentre que d'altres es conserven en major percentatge (Cys i Met).

Considerant la ingesta diària recomanada per un adult de pes mitjà (Capítol 1, apartat 1.3.1.), un consum de 50 g del producte proteic obtingut representa la ingesta diària recomanada del 35 % de Ile, 50 % de Met+Cys i 100 % de Leu, Lis, Fen+Tyr, Thr i Val.

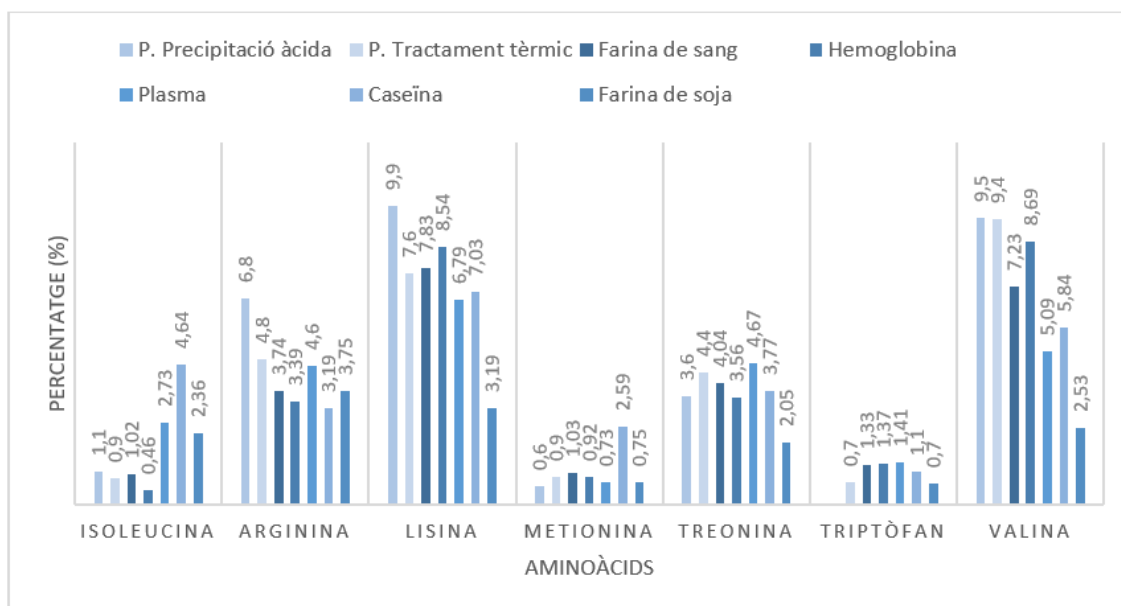


Figura 4.11. Contingut dels aminoàcids essencials Isoleucina, Arginina, Lisina, Metionina, Treonina i Valina (en %), en diferents concentrats proteics: producte proteic obtingut per precipitació àcida, producte proteic obtingut mitjançant tractament tèrmic, farina de sang, hemoglobina dessecada, plasma dessecat, caseïna i farina de soja). Dades extretes de FEDNA (2020).

Si es compara l'aminograma obtingut amb altres productes proteics utilitzats pel consum (Figura 4.11), s'observen diferències lleus entre aminoàcids essencials: s'aprecien altes concentracions per la Lisina i Valina, mentre que la composició per la Metionina i Treonina és similar a altres productes tals com la farina de sang, hemoglobina, plasma o farina de soja. Per altra banda, el producte proteic descolorat presenta menor quantitat de Triptòfan i Isoleucina que alguns dels productes proteics valorats (FEDNA, 2020). Finalment, tot i no ser un aminoàcid essencial, és interessant destacar una major concentració d'Arginina (aminoàcid condicional).

4.4.2.4. Anàlisis microbiològiques del concentrat proteic obtingut mitjançant tractament tèrmic

Per últim, també es va determinar l'efecte de la temperatura utilitzada en el tractament tèrmic previ a la descoloració sobre la contaminació microbiològica del concentrat proteic després de ser liofilitzat.

Per conèixer la contaminació microbiològica de partida de la sang utilitzada com a matèria primera, es va realitzar un estudi microbiològic general, determinant els recomptes d'aerobis mesòfils totals i enterobacteris; els resultats es mostren a la Taula 4.10.

Taula 4.10. Recòmptes d'enterobacteris i aerobis mesòfils de la sang utilitzada en l'obtenció del concentrat proteic (expressats en logaritmes de les ufc/mL sang i ufc/g respecte extracte sec). Mitjanes \pm DE (n=3).

Microorganisme	Log ₁₀ ufc/mL sang	Log ₁₀ ufc/g extracte sec sang
Enterobacteris	3,71 \pm 0,73	4,43 \pm 0,73
Aerobis mesòfils	4,46 \pm 0,43	5,18 \pm 0,73

Si es comparen els resultats obtinguts en els recomptes microbiològics de la sang utilitzada amb els estudis previs realitzats per Parés (2001) en mostres de sang porcina d'escorxadors industrials, es poden observar uns valors similars per enterobacteris, que reportava recomptes de l'ordre de 10^3 - 10^4 ufc/mL de sang. En canvi, s'obtenen recomptes menors d'aerobis mesòfils, de 10^4 - 10^5 ufc/mL sang, mentre que Parés (2001) detectava valors de fins a 10^6 ufc/mL. Aquesta diferència indica que el sistema de recollida utilitzat per obtenir la sang en aquest estudi és més higiènic que el que s'utilitzava en les mostres de sang analitzades per Parés (2001); això podria ser degut a l'augment del control higiènic exigut en les indústries alimentàries, i a millores introduïdes en els sistemes oberts de recollida, augmentant d'un a dos canals de recollida, pel que les mesures higièniques actuals permetrien obtenir la sang en un millor estat microbiològic general.

Els resultats referents als recomptes d'enterobacteris i aerobis mesòfils pels concentrats proteics obtinguts mitjançant tractament tèrmic (70, 80 o 90 °C) es mostren a la Taula 4.11 (es mostren les ufc/g d'extracte sec).

L'ANOVA no va mostrar diferències significatives en els recomptes microbiològics. Els recomptes d'enterobacteris són de l'ordre de $10^2 - 10^3$ ufc/g d'extracte sec, xifres superiors a les establertes legislativament per aquest tipus de producte (fins a 10^2 ufc/g). Per aerobis mesòfils, s'han determinat recomptes de l'ordre de $10^3 - 10^5$ ufc/g, valors que també són superiors als recomanats, de $<10^5$ ufc/g, tot i que no exigits per la legislació.

Taula 4.11. *Recomptes d'enterobacteris i aerobis mesòfils (en Log_{10} ufc/g extracte sec) dels concentrats proteics descolorits i deshidratats per liofilització segons el tractament tèrmic (70, 80 i 90 °C), previ a una descoloració amb un 0,75% de peròxid d'hidrogen, durant 30 min. Es mostren les mitjanes \pm DE (n=3). Les lletres diferents indiquen diferències significatives entre tractaments ($P < 0,05$).*

		Enterobacteris	Aerobis mesòfils
Tractament	70 °C	2,16 \pm 0,93	4,06 \pm 0,01
	80 °C	2,66 \pm 1,02	4,45 \pm 0,09
	90 °C	1,89 \pm 0,90	3,94 \pm 0,40

Tanmateix, els recomptes obtinguts són relativament inferiors als recomptes de la sang de partida expressats sobre extracte sec, el que significa que, tot i l'efecte de concentració de la sang en el producte proteic dessecat, s'obté una reducció notable dels microorganismes contaminants de la sang mitjançant el tractament emprat. Tot i això, els resultats indiquen que els tractaments tèrmics aplicats són insuficients per obtenir una higienització significativa.

Un factor que pot afectar al procés d'higienització és la tècnica emprada per a la dessecació: a nivell de laboratori s'ha utilitzat la liofilització, un mètode que no afecta gaire a l'estabilitat dels microorganismes. Tal com s'ha comentat en el Capítol anterior, degut a l'alt cost d'aquest procés, a escala industrial es planteja utilitzar un mètode alternatiu, la deshidratació mitjançant un assecador turbo RINA-JET que aplica aire a altes temperatures per aconseguir l'evaporació de l'aigua del producte i que pot provocar a una lleugera disminució de la càrrega bacteriana. Tanmateix, alguns autors han demostrat que alguns processos utilitzats en el processament *downstream* de la sang i altres hemoderivats, com la concentració per ultrafiltració o evaporació, o la deshidratació per atomització, no redueixen significativament la càrrega microbiològica (Dailloux *et al.*, 2002; Lynch *et al.*, 2017; Parés *et al.*, 1998). Per tant, és essencial una bona qualitat microbiològica de la sang i un processament higiènic.

Pel que fa al consum humà, tot i la millora en la descoloració de la sang, no s'han obtingut els resultats desitjats mitjançant un tractament tèrmic previ a la descoloració de la sang. La descoloració obtinguda en les condicions establertes com a segures encara és insuficient pel que fa als objectius plantejats inicialment, el que dificulta les possibilitats d'ús del concentrat proteic com a ingredient alimentari, reduint les seves aplicacions a un grup menor d'aliments. Tot i això, es va decidir provar l'aplicació del concentrat proteic en alguns aliments model per valorar-ne la possible aplicabilitat. Es van dur a terme algunes proves de concepte, els resultats de les quals es mostren a continuació.

4.4.2.5. *Obtenció d'aliments model*

A continuació es mostren els resultats obtinguts en les proves de concepte realitzades per assajar la possible substitució d'ingredients alimentaris convencionals pel concentrat proteic descolorat provinent de sang en aliments model.

Productes carnis de pasta fina

a) *Mortadel·la*

En la Figura 4.12 es mostren els productes carnis tipus mortadel·la obtinguts en l'assaig de la substitució de la farina de soja pel concentrat proteic descolorat (humit i deshidratat).



Figura 4.12. Mortadel·les obtingudes a partir d'una fórmula tradicional (CONTROL) i substituint la soja per concentrat proteic descolorat de sang porcina en estat humit (inferior) i dessecat (superior).

Per validar l'efectivitat del procés de cocció-pasteurització per l'obtenció de productes segurs pel consum es va controlar l'evolució de la temperatura al cor dels productes cada minut durant la cocció en les dues produccions (Figura 4.13). S'observa l'assoliment de 78 °C de temperatura al centre del producte en ambdós produccions, temperatura que es va mantenir durant 5 min abans de retirar el producte del bany. A partir de les dades de temperatura al cor durant la cocció es va poder calcular el factor P_{70} per cada producció, assolint en ambdós casos tant la seguretat, calculada com a reducció de 6 logs per *L. monocytogenes* (als 4 i 5 min), com l'estabilitat, calculada com a reducció de 10 logs per *Enterococcus spp* (als 9 i 11 min).

La composició general de les mortadel·les control i assaig (Taula 4.12), no presenta diferències notables, obtenint resultats similars en el contingut d'aigua, cendres i proteïna entre els dos tractaments, tal com s'esperava donat que les formulacions es van ajustar tenint en compte les diferències d'humitat i proteïna entre els dos ingredients. La composició mitjana determinada per totes les mortadel·les és de $35,52 \pm 1,25$ % d'extracte sec, $11,54 \pm 0,25$ de proteïna, i $2,27 \pm 0,11$ % de cendres. Els valors de proteïna són molt semblants als obtinguts per Pereira *et al.* (2014), que van reportar entre un 11 i un 12 % de proteïna en els assaigs d'incorporació de sang porcina tractada i sense tractar amb monòxid de carboni en mortadel·les, o als reportats per Toldrà *et al.* (2019c), determinant un 10,86 % de proteïna en la substitució de farina de soja per un extracte proteic de melses porcines en l'elaboració de salsitxes de pasta fina.

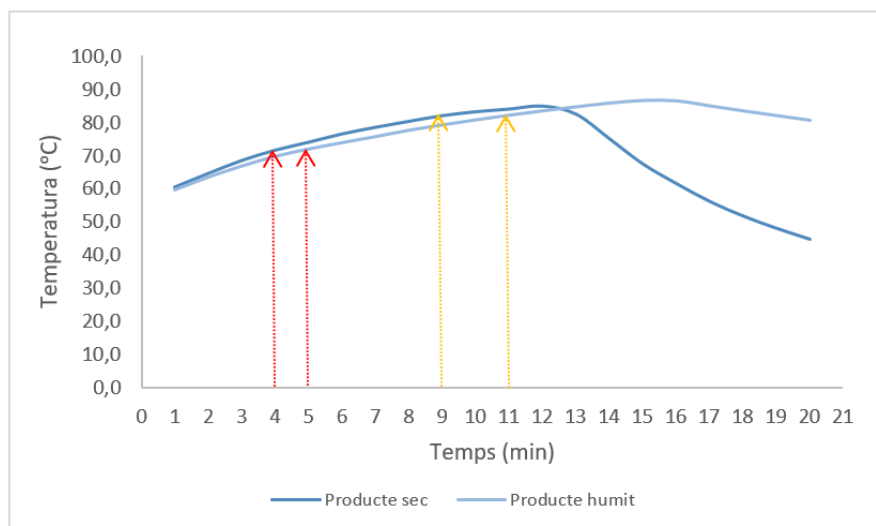


Figura 4.13. Evolució de la temperatura al cor de les mortadel·les elaborades amb concentrat proteic descolorat durant la cocció. S'indica el temps on s'assoleix la seguretat i l'estabilitat en base a la reducció de *L. monocytogenes* (fletxes en vermell) i d'*Enterococcus spp* (fletxes en groc), respectivament.

Taula 4.12. Resultats de la caracterització de les mortadel·les control i assaig amb producte humit i dessecat. Es mostra el percentatge d'humitat, cendres i proteïna, el percentatge de fluids extraïbles (TEF), percentatge de greix del TEF (FAT) en pasta crua i la capacitat de retenció d'aigua (CRA), i els paràmetres CIE $L^*a^*b^*$ del color de les salsitxes cuites. Mitjanes \pm DE ($n = 2$).

Paràmetre	Producció 1:		Producció 2:	
	Producte humit		Producte dessecat	
	Assaig	Control	Assaig	Control
Extracte sec (%)	35,59 \pm 0,37	37,19 \pm 0,52	34,19 \pm 0,19	35,13 \pm 0,14
Cendres (%)	2,39 \pm 0,37	2,29 \pm 0,10	2,12 \pm 0,07	2,27 \pm 0,11
Proteïna (%)	11,84 \pm 0,03	11,31 \pm 0,39	11,36 \pm 0,03	11,66 \pm 0,39
pH	6,79	6,69	6,66	6,63
TEF (%)	1,67 \pm 0,44	1,17 \pm 0,35	4,15 \pm 0,63	2,09 \pm 0,33
FAT (%)	3,42 \pm 1,77	1,40 \pm 1,04	7,49 \pm 2,75	3,41 \pm 0,68
CRA (%)	99,78 \pm 0,06	99,71 \pm 0,02	99,71 \pm 0,02	99,75 \pm 0,04
Color	L *	61,47 \pm 0,29	66,62 \pm 0,33	62,14 \pm 0,38
	a*	7,95 \pm 0,03	11,32 \pm 0,40	10,10 \pm 0,03
	b*	13,69 \pm 0,23	6,78 \pm 0,13	10,90 \pm 0,51
Escales RGB				

Si s'observa l'aspecte visual de les mortadel·les es poden apreciar diferències notables entre les mostres control i assaig, les quals presenten una coloració més fosca i marronosa. Aquest factor es veu reflectit en els paràmetres colorimètrics dels productes, amb uns valors de L^* : 62, a^* : 8-10 i b^* : 11-14, el que representa una lluminositat (L^*) inferior, una disminució en el color vermell (a^*) i un augment del color groc (b^*) respecte a les mortadel·les control, amb valors de L^* : 67-68, a^* : 11-12 i b^* : 7. Aquest enfosquiment es pot atribuir fonamentalment a la coloració marronosa que aporta l'increment en pigment metahemoglobina, que no queda emmascarat per la presència del colorant (cotxinilla) afegit a la formulació.

La disminució de la lluminositat també ha estat determinada per varis autors en altres estudis d'addició de sang i els seus derivats en productes tipus mortadel·la (Pereira *et al.*, 2014), salsitxes de porc (Zhou *et al.*, 2012) o empanades de carn de vedella (Guzmán *et al.*, 1995). Pereira *et al.* (2014) no observaven diferències significants en el paràmetre a^* (vermell) en les mortadel·les amb l'addició de sang sencera tractada amb CO, però sí que van trobar que l'addició de sang no tractada produïa un augment d'aquest paràmetre. Referent al paràmetre b^* , Guzmán *et al.* (1995) també van detectar una disminució del color groc en afegir sang en empanades de vedella, tot i que altres autors, com Zhou *et al.* (2012), van exposar un efecte contrari, observant un augment significatiu del paràmetre b^* en salsitxes a les que havien introduït carboxi-hemoglobina.

Tal com s'observa en la Figura 4.14, en la massa de les mortadel·les assaig s'aprecien clarament les partícules de producte proteic amb un color marró fosc degut a la insolubilitat de la proteïna de sang descolorada. Tot i això, no s'ha detectat un canvi apreciable en la textura en boca de les mortadel·les assaig respecte les control, el que s'hauria de determinar de manera més objectiva amb una anàlisi del perfil de textura instrumental o en un panell de tast.



Figura 4.14. Aspecte d'un tall transversal de les mortadel·les obtingudes. Es mostra la mortadel·la assaig amb concentrat proteic (esquerra) i control (dreta).

Si s'analitzen els resultats de les anàlisis de fluids totals extraïbles (TEF) i percentatge de greix del TEF (FAT) es pot observar un increment, tan del TEF com del FAT, pel producte assaig obtingut mitjançant l'addició de producte proteic dessecat, passant d'uns valors de 1-2 % de TEF i 1-3 % de FAT a 4 % i 7 %, respectivament. Això podria ser degut a una menor capacitat de retenció dels líquids per part del concentrat proteic durant el procés de cocció respecte a la soja, segurament degut a la baixa solubilitat del producte afegit, el que a més podria dur a una menor homogeneïtat i, per tant, menor estabilitat de l'emulsió de la pasta càrnia crua, duent a una major pèrdua de greixos (reflectit en el paràmetre FAT). Per contra, sembla donar-se una major estabilitat de l'emulsió en l'assaig amb producte proteic no dessecat, probablement degut a que la proteïna hidratada del concentrat proteic presentaria una major solubilitat i capacitat emulsionant, permetent una major estabilització de l'emulsió. Tot i això, caldria realitzar un estudi complet per determinar la significació entre tractaments. Toldrà *et al.* (2019c) van obtenir resultats diferents en la substitució de la soja en salsitxes tipus mortadel·la per un extracte proteic de melses porcines, on no observaven una variació dels valors de TEF i FAT, directament lligat a les propietats funcionals de l'ingredient utilitzat.

Els valors de la capacitat de retenció d'aigua (CRA) no presenten variacions entre tractaments, el que indica que no hi hauria afectació per pèrdues de qualitat per exsudació d'aigua durant la vida útil del producte assaig, pel que sembla que les característiques organolèptiques relacionades amb la CRA del mateix no quedarien alterades per aquest factor.

b) Paté

A la Figura 4.15 es mostra el producte carni model tipus paté obtingut mitjançant la substitució del caseïnat sòdic pel concentrat proteic descolorit i dessecat.

Per validar una correcta cocció del paté també es va registrar l'evolució de la temperatura al cor del producte durant la cocció en un bany d'aigua a 75 °C, assolint tant la seguretat com l'estabilitat del producte, als 17 i 26 min, respectivament (Figura 4.16).

A la Taula 4.13 es pot observar la composició fisicoquímica dels patés control i assaig. El percentatge d'extracte sec, cendres i proteïna d'ambdós patés no mostra diferències notables tal com s'esperava, amb uns valors mitjans de $53,28 \pm 2,48 \%$, $1,35 \pm 0,21 \%$ i $10,59 \pm 0,57 \%$, respectivament, degut a que la fórmula pel paté assaig va ser estandarditzada amb l'objectiu d'utilitzar la mateixa quantitat d'aigua i proteïna per cada fórmula.

Els valors són semblants als obtinguts per Viana *et al.* (2005), que van introduir globina i/o plasma en paté de pernil, determinant un percentatge de proteïna del 9 a l'11 % i unes cendres d'aproximadament l'1,2 %. Per contra, obtenien un major extracte sec que al nostre estudi, amb uns valors que van del 64 al 72 %.



Figura 4.15. Patés obtinguts a partir d'una fórmula tradicional (control) i substituint el caseïnat per concentrat proteic descolorat de sang (P).

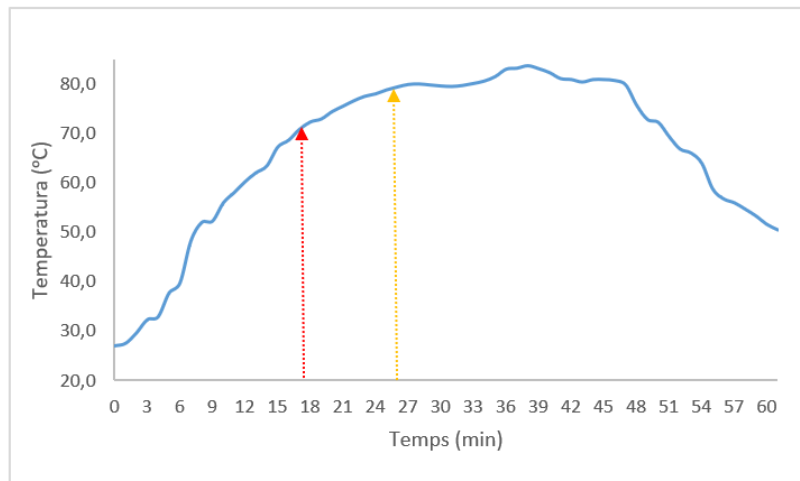


Figura 4.16. Evolució de la temperatura al cor del paté durant el procés de cocció. S'indica el temps on s'assoleix la seguretat en base a la reducció de *L. monocytogenes* (en vermell) i on s'assoleix l'estabilitat del producte en base a la reducció de *Enterococcus spp* (en groc).

Pel que fa als fluids totals extraïbles (TEF) i la quantitat de greix d'aquests (FAT), es poden observar diferències importants entre el tractament i la mostra control: els fluids totals alliberats durant el procés de cocció augmenten fins a 5 vegades en la mostra assaig respecte la mostra control, el que pot comportar una alteració en la textura del producte acabat degut a la deshidratació del mateix. D'aquest 15% d'exsudat, un 50% representa greix (FAT), el que podria ser causa d'una menor capacitat emulgent de l'ingredient envers el caseïnat, el que podria afectar més directament a la textura untuable del paté. Aquests resultats evidencien la poca funcionalitat de l'ingredient proteic provat envers el caseïnat substituït, que s'utilitza comunament per les seves bones propietats emulgents.

Taula 4.13. Composició fisicoquímica (humitat i proteïna), % TEF, % FAT i paràmetres CIE L^*a^*b del color dels patés obtinguts (Control i Producte (P)) (mitjana \pm DE, $n=2$).

	CONTROL	P
Extracte sec (%)	51,58 \pm 1,92	54,21 \pm 1,73
Cendres (%)	1,2 \pm 0,31	1,5 \pm 0,45
Proteïna (%)	10,18 \pm 0,10	10,99 \pm 0,02
TEF (%)	2,87 \pm 0,73	15,43 \pm 8,09
FAT (%)	5,05 \pm 2,18	50,98 \pm 0,75
Color	L*	65,21 \pm 0,19
	a*	11,93 \pm 0,22
	b*	13,74 \pm 0,43
Escala RGB		

Si es compara l'aspecte d'ambdós patés, es pot observar com el paté control presenta una aparença més uniforme amb un color més rosat; per contra, el paté assaig presenta una coloració més marronosa a més d'observar-s'hi la proteïna insoluble afegida (puntejat de color marronós). Això es veu reflectit en els resultats dels paràmetres CIE L^*a^*b , obtenint en la mostra assaig (P) una lluminositat (L^*) i una tonalitat vermellova (a^*) inferiors a la mostra control, però una tonalitat groga (b^*) similar.

Galetes

Els resultats obtinguts en l'elaboració de dos tipus de galetes (maria i civada) amb concentrat proteic descolorat de sang de porc es poden observar en la Figura 4.17 i Taula 4.14.

Globalment, es pot observar que l'addició de concentrat proteic altera el color del producte final, passant a unes tonalitats més fosques, el que es reflecteix en els paràmetres del color obtenint una menor lluminositat (L^*) i una disminució del color de la tonalitat groga (b^*) respecte les mostres control (Taula 4.12). Per contra, la tonalitat vermella (a^*) sembla comportar-se diferent entre els dos models, augmentant a mesura que s'afegeix més concentrat proteic en galetes tipus maria i sense canvis en les galetes de civada. En ambdós casos es pot apreciar com l'aspecte granulós augmenta amb l'addició de producte proteic, el que pot tenir un valor afegit en les característiques organolèptiques dels productes finals. Tot i no haver-se realitzat un panell de tast complet, en les proves de tast realitzades al laboratori es va detectar una alteració mínima del gust i olor de les galetes amb concentrat proteic afegit, aspecte clau en els productes elaborats.

Si ens fixem en la composició fisicoquímica dels productes de galetaria obtinguts es pot observar que, tal com s'esperaria, el percentatge proteic de les galetes augmenta proporcionalment amb l'addició de concentrat proteic descolorat, obtenint uns valors de proteïna de fins a 12 % i 16 % en galetes maria amb un 5 % de concentrat afegit i en les galetes de civada amb un 7 % afegit, respectivament, el que representa l'augment del 4 al 6 % del contingut proteic respecte al producte control. Aquests resultats són similars als que van obtenir Ikasari *et al.* (2020) en introduir un 5 i 10 % d'un extracte proteic procedent de subproductes de peix en galetes, passant d'un 7 % de proteïna en galetes control fins a un 9 i 11 % en els productes amb concentrat de proteïnes de peix.

Els valors d'humitat de cada assaig fluctuen del 5 al 9%, degut a que no es van tenir en compte la compensació de l'aigua en la formulació en funció de la quantitat de producte proteic afegit. Per altra banda, es pot observar una petita fluctuació en el percentatge de cendres entre tractaments, valors insignificants, tot i que seria necessari estudiar-los en futures possibles aplicacions industrials a major escala.

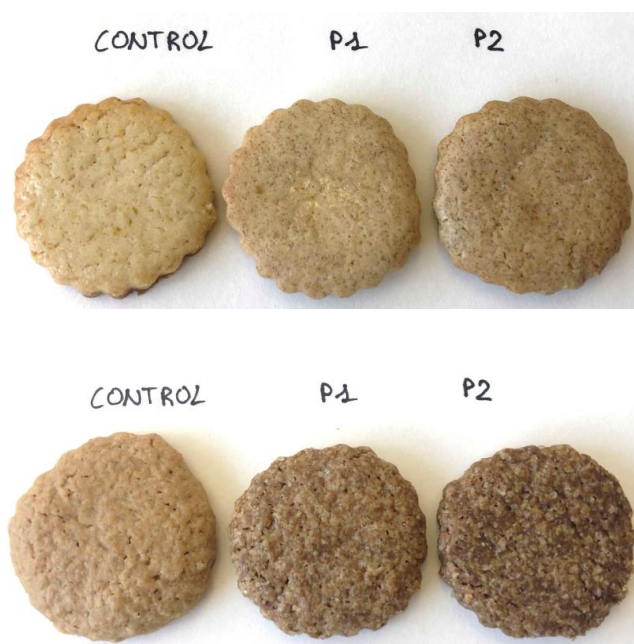


Figura 4.17. Galetes obtingudes a partir d'una fórmula tradicional de galeta tipus "Maria" (imatge superior i d'esquerre a dreta: control, amb un 2,5% de concentrat proteic (P1) i amb un 5% de concentrat proteic(P2)) i galetes de civada (imatge inferior, d'esquerre a dreta: control, amb un 5,5% de concentrat proteic (P1) i amb un 7% de concentrat proteic (P2)).

Taula 4.14. Composició fisicoquímica (humitat, cendres i proteïna) i color del les galetes obtingudes (Control, P1 i P2 de galetes de farina de blat i galetes de civada) (mitjana \pm DE, n=3).

	GALETES DE FARINA DE BLAT			GALETES DE CIVADA		
	CONTROL	P1 (2,5%)	P2 (5%)	CONTROL	P1 (5,5%)	P2 (7%)
Humitat (%)	6,77 \pm 0,04	4,76 \pm 0,17	5,64 \pm 0,06	5,14 \pm 0,11	7,33 \pm 0,30	8,77 \pm 0,64
Cendres (%)	0,92 \pm 0,00	0,95 \pm 0,09	1,10 \pm 0,00	1,50 \pm 0,00	1,19 \pm 0,04	1,29 \pm 0,06
Proteïna (%)	7,27 \pm 0,76	9,14 \pm 0,03	11,61 \pm 0,05	7,53 \pm 0,19	10,87 \pm 0,07	14,60 \pm 0,21
L *	67,56 \pm 1,38	65,27 \pm 0,31	58,47 \pm 0,62	50,69 \pm 1,68	42,39 \pm 0,47	39,03 \pm 0,62
a*	2,93 \pm 0,26	4,92 \pm 0,23	6,70 \pm 0,05	8,07 \pm 0,14	8,25 \pm 0,44	8,15 \pm 0,07
Color b*	27,96 \pm 0,19	23,96 \pm 0,66	22,66 \pm 0,60	25,21 \pm 0,31	20,10 \pm 0,77	17,37 \pm 0,70
Escala RGB						

Aplicabilitat

Després d'analitzar els resultats obtinguts en l'elaboració de productes model amb el concentrat proteic descolorat es fan evidents les limitacions que comporta la utilització d'un ingredient amb una reduïda funcionalitat, bàsicament deguda a la baixa solubilitat del producte obtingut i una coloració encara massa fosca malgrat el tractament de descoloració aplicat.

L'aplicabilitat del producte proteic com a substitutiu de la farina de soja en mortadel·la és millor en el cas d'utilitzar l'extracte no deshidratat respecte al liofilitzat, tot i que en ambdós casos repercuteix directament en les característiques organolèptiques, obtenint unes mortadel·les amb una coloració clarament més fosca, adquirint una tonalitat marronosa i observant-se partícules de l'ingredient proteic no dissoltes en la massa del producte acabat. En un futur, es podria plantejar assajar l'aplicació de la proteïna en productes carnis crus fermentats curats, tipus fuet o llonganissa, en els quals el color marronós que aporta el concentrat proteic de sang podria quedar més emmascarat.

Els resultats de l'assaig realitzat en patés mostren una baixa funcionalitat del producte proteic estudiat en aquest tipus de pasta fina càrnia emulsionada, que s'evidencia en una baixa capacitat emulgent del producte envers al caseïnat sòdic, resultant en un 15 % de fluid exsudat amb un 51 % de greix respecte al 3 % i 5 % respectius del control. Aquests resultats implicarien un impacte econòmic negatiu en el producte, pel que es descarta l'ús del producte proteic com a substitutiu dels ingredients i/o additius emulsionants convencionals.

Finalment, la introducció del producte proteic dessecat en productes de pasta seca tals com les galetes ha demostrat ser una de les millors opcions. Les galetes presenten una coloració més fosca en afegir el concentrat proteic, tot i que no representa una gran problemàtica en aquest tipus d'aliments, ja que l'enfosquiment és uns dels efectes que es busquen en el procés d'enfornat a través de les reaccions de Maillard i la caramel·lització dels sucres. Per altra banda, aquest tipus de productes de galetaria es podrien utilitzar com a suplement alimentari per certs grups de la població amb dèficit proteic o dèficit de ferro. Així, si l'empresa ho considerés pertinent, en un futur, seria interessant provar-ne l'aplicació en el desenvolupament de fórmules a escala industrial i duent a terme assajos amb una caracterització completa tant fisicoquímica com organolèptica per obtenir significació en els resultats.

4.4.3. Caracterització dels hidrolitzats descolorats obtinguts mitjançant Flavourzyme o Alcalasa

A la Taula 4.15 es mostren les dades obtingudes en la caracterització del color i el grau d'hidròlisi (GH) dels concentrats proteics obtinguts en els experiments realitzats mitjançant diferents processos i enzims sobre sang sencera porcina, hidrolitzats amb Flavourzyme o Alcalasa, i posterior descoloració amb peròxid.

Comparant els colors de les mostres hidrolitzades amb els controls sense hidròlisi, es pot veure que en tots els casos la descoloració és millor en el corresponent tractament control, en els que s'observen valors més alts de lluminositat i més baixos de component vermella (a^*) i croma, per tant, sembla que la hidròlisi prèvia de la sang no millora la descoloració, sinó que la disminueix: s'observa que l'efecte del peròxid és més eficaç sobre la sang sencera sense hidrolitzar que sobre els hidrolitzats en tots els tractaments aplicats.

La comparació entre els mateixos tractaments amb dos temps d'hidròlisi (2 h i 6 h) confirma aquesta afirmació, ja que els tractaments més llargs, que porten a valors de grau d'hidròlisi superiors (taula 4.16), mostren menys descoloració que els més curts.

També hi ha una correlació entre la descoloració de cada tractament i el seu control, és a dir, quan el control presenta valors de L* més alts i a* més baixos, a l'hidrolitzat passa el mateix, pel que sembla que la mostra i el procés tenen algun efecte sobre el resultat, tenint en compte que cada parell de control-tractament correspon a la mateixa matèria primera i la producció es va fer en iguals condicions. En altres experiments ja s'havia observat variabilitat entre tractaments de la que no es podia justificar la causa.

Taula 4.15. Caracterització del color dels concentrats proteics obtinguts a partir de sang sencera, descolorats mitjançant un procés d'hidròlisi i peròxid d'hidrogen, i dessecats mitjançant liofilització. Es mostren els valors pels paràmetres L*, a*, b*, cromà (C*), tonalitat (H) i color en l'escala RGB pels concentrats TRACTAMENT (Taula superior) i CONTROL (Taula inferior).

TRACTAMENT							
Enzim	Tractament	Color					RGB
		L*	a*	b*	C*	H (°)	
Flavourzyme	1 6 h hidròlisi 50 °C + 90 °C + H ₂ O ₂	27,03	6,97	10,21	12,36	55,68	
	2 2 h hidròlisi 50 °C + 90 °C + H ₂ O ₂	47,25	6,31	18,56	19,60	71,22	
	3 90 °C + 2h hidròlisi 50 °C + H ₂ O ₂	31,37	6,76	11,11	13,00	58,68	
	4 90 °C + H ₂ O ₂ + Hidròlisi 2h 50 °C	39,67	8,74	19,82	21,66	66,20	
Alcalasa	5 6h hidròlisi 50 °C + 90 °C + H ₂ O ₂	48,96	6,92	24,47	25,43	74,21	
	6 2h hidròlisi 50 °C + 90 °C + H ₂ O ₂	44,24	6,72	21,87	22,88	72,92	
CONTROL							
Enzim	Tractament	Color					RGB
		L*	a*	b*	C*	H (°)	
Flavourzyme	1 6 h hidròlisi 50 °C + 90 °C + H ₂ O ₂	41,88	5,24	17,1	17,88	72,96	
	2 2 h hidròlisi 50 °C + 90 °C + H ₂ O ₂	56,78	3,63	19,82	20,15	79,62	
	3 90 °C + 2h hidròlisi 50 °C + H ₂ O ₂	33,90	5,59	13,90	14,98	68,09	
	4 90 °C + H ₂ O ₂ + Hidròlisi 2h 50 °C	39,65	7,88	19,51	21,04	68,01	
Alcalasa	5 6h hidròlisi 50 °C + 90 °C + H ₂ O ₂	44,58	7,38	24,42	25,51	73,18	
	6 2h hidròlisi 50 °C + 90 °C + H ₂ O ₂	53,71	5,28	23,56	24,14	77,37	

Comparant els diferents tractaments d'hidròlisi es veu que el valor de lluminositat més elevat s'aconsegueix en el tractament 5 amb Alcalasa, amb L* = 48,96, bastant allunyat de l'obtingut amb un tractament a 90 °C, que arribava a una lluminositat de 61,52, aquest és l'únic tractament en que l'hidrolitzat és lleugerament més lluminós que el control corresponent. Pel que fa al paràmetre a*, les diferències són menors, però

amb els tractaments tèrmics es van obtenir valors entre 5,66 i 6,18, essent en tots els casos inferiors als assolits amb els tractaments enzimàtics, que van de 6,31 a 8,74. En tot cas, tant visualment com pels paràmetres $L^*a^*b^*$, els tractaments 2 i 6 porten a resultats força similars, en tots dos casos correspon a la hidròlisi durant 2 h i amb el tractament tèrmic posterior a l'enzimàtic. També es veu que la descoloració és millor quan el procés es fa d'aquesta manera, ja que quan el tractament tèrmic es fa abans de la hidròlisi (experiments 3 i 4), els valors de L^* són més baixos i els d' a^* iguals o superiors.

S'observa el mateix si comparem els valors de l'escala CIE $L^*a^*b^*$, exposats a la Taula 4.15, amb els valors obtinguts en l'apartat 4.4.3.1 (Taula 4.5), on es descolorava la sang sencera després d'un tractament tèrmic. Es pot observar que cap dels tractaments hidrolítics aplicats aconseguix el nivell de descoloració assolit per tractament amb peròxid després d'un tractament tèrmic. Els valors de lluminositat i de la component vermella són millors quan s'aplica un tractament tèrmic, fins i tot a la temperatura més baixa assajada (70 °C), on s'assoleixen valors de $L^* = 50,18$ i $a^* = 6,18$, el que confirma el fet que la hidròlisi prèvia de la sang no millora en cap cas el grau de descoloració.

A la Taula 4.16. es pot observar el grau d'hidròlisi (% GH) determinat en els extractes proteics obtinguts. Com ja s'ha comentat anteriorment, no s'ha pogut determinar el GH de les mostres 3 i 4 perquè la seva insolubilitat va impedir la lectura espectrofotomètrica.

Taula 4.16. Grau d'hidròlisi (% GH) dels concentrats proteics obtinguts mitjançant la hidròlisi i descoloració de sang sencera porcina.

Enzim		Tractament	GH (%)
Flavourzyme	1	6 h hidròlisi + 90 °C + H ₂ O ₂	19,73
	2	2 h hidròlisi + 90 °C + H ₂ O ₂	10,62
	3	90 °C + 2h hidròlisi + H ₂ O ₂	ND ¹
	4	90 °C + H ₂ O ₂ + Hidròlisi 2h	ND ¹
Alcalasa	5	6h hidròlisi + 90 °C + H ₂ O ₂	45,05
	6	2h hidròlisi + 90 °C + H ₂ O ₂	16,68

¹ND: Valor no determinat degut a la insolubilització del producte obtingut.

Es pot observar que el major GH s'obté en la mostra hidrolitzada amb Alcalasa durant 6 h (tractament 5), amb un valor de 45,05 %, que baixa a 16,68 % en disminuir el temps d'hidròlisi a 2 h (tractament 6). Aquest primer resultat és similar al que va obtenir Toldrà (2002) en hidrolitzar hemoglobina amb Alcalasa a una concentració d'1 % E/S durant 2 h, obtenint un GH de 41,6. % Per altra banda, obtenia un 25,8 % de GH en utilitzar una concentració de 0,5 % E/S durant 1 hora. En canvi, Sun *et al.* (2010) van obtenir un grau

d'hidròlisi màxim del 22-23 % en hidrolitzar hemoglobina porcina durant 8,5 h, segurament degut a una concentració menor d'enzim (0,2 % E/S). Synowiecki *et al.* (1996) van assolir un grau d'hidròlisi similar a aquests últims, fins a un 25 %, en hidrolitzar hemoglobina porcina amb Alcalasa, sense detallar els paràmetres de reacció, tot i que van concloure que el producte obtingut presentava una amargor intensa.

Per altra banda, als resultats obtinguts amb el Flavourzyme, es poden observar uns valors de GH del 19,73 % i 10,62 %, amb temps de tractament de 6 i 2 h, respectivament (tractaments 1 i 2). Aquests valors, bastant inferiors als dels hidrolitzats amb Alcalasa, són superiors als determinats per Sun *et al.* (2010), que van obtenir hidrolitzats d'hemoglobina porcina amb GH del 6-7 %, en unes condicions hidrolítiques de 8,5 h de reacció amb una proporció d'enzim del 0,5 % (E/S).

Si relacionem el grau d'hidròlisi amb la descoloració obtinguda es pot concloure que el tractament amb Flavourzyme condueix a una descoloració comparable al procés dut a terme amb l'Alcalasa, realitzat en les mateixes condicions, però amb un grau d'hidròlisi inferior. Seria necessari analitzar les característiques fisicoquímiques de cada producte obtingut per determinar quin producte seria de més interès.

Els resultats obtinguts determinen una ineficàcia del procés d'hidròlisi i descoloració aplicat a la sang envers als controls, obtenint una descoloració similar o menor en la sang hidrolitzada, pel que es descarta el tractament de la sang sencera en aquestes condicions. A més, cal considerar que tractant la sang completa amb els enzims abans de la descoloració, també estem hidrolitzant les proteïnes del plasma, el qual presenta un color rosat neutre. Aquest es pot separar prèviament per poder ser processat i aprofitat directament sense necessitat de cap tractament de descoloració.

4.5. CONCLUSIONS

1. Les condicions que permeten obtenir una major descoloració de l'extracte proteic de sang porcina són un tractament amb un 1,25% de peròxid i a una temperatura de 60 °C durant 30 min, o bé amb un 1,5% de peròxid a 50 °C durant 30 min. Tanmateix, aquestes condicions no són adequades per obtenir un producte apte per ser utilitzat en alimentació humana, perquè superen la dosi de peròxid (0,75 %) al temps de reacció autoritzats (30 min).
2. L'aplicació d'un tractament tèrmic previ sobre la sang, a 90 °C durant 10 min, i una posterior descoloració amb un 0,75 % de peròxid durant 30 min, permet obtenir un producte final amb grau de descoloració acceptable, essent unes condicions considerades com a segures pel consum humà.
3. L'ingredient proteic obtingut per aquest mètode és una pols insoluble, amb un alt contingut proteic (94,9 %). Tanmateix, no s'aconsegueix una descoloració prou intensa, amb uns valors dels paràmetres CIE L*: 50,18; a*: 6,18; i b*: 20,88, fet que limita les seves possibilitats d'ús en la formulació de molts aliments.
4. Les proves de concepte d'incorporació de l'ingredient proteic en productes carnis tipus pastes fines emulsionades (mortadella i paté) no han presentat resultats favorables, mostrant una baixa funcionalitat com a ingredient estabilitzant de l'emulsió càrnia alhora que el producte final presenta una coloració massa fosca.
5. S'han obtingut resultats satisfactoris en la producció de galetes, mostrant que el producte en pols es podria utilitzar com a ingredient proteic i/o suplement de ferro hèmic en aquests tipus d'aliments.
6. El tractament d'hidròlisi enzimàtica aplicat sobre sang sencera, amb els enzims *Alcalasa* i *Flavourzyme*, combinat amb la descoloració amb peròxid d'hidrogen, no millora la descoloració de la proteïna de la sang. En tots els casos s'obté una major descoloració en el tractament control sense hidròlisi prèvia, pel que es descarta la utilització d'aquesta metodologia.

CAPÍTOL 5. OBTENCIÓ D'UN CONCENTRAT
PROTEIC DESCOLORAT A PARTIR DE FRACCIÓ
CEL·LULAR DE SANG MITJANÇANT HIDRÒLISI

CAPÍTOL 5. OBTENCIÓ D'UN CONCENTRAT PROTEIC DESCOLORAT A PARTIR DE FRACCIÓ CEL·LULAR DE SANG MITJANÇANT HIDRÒLISI

5.1. INTRODUCCIÓ

En els capítols anteriors s'ha estudiat l'obtenció d'un concentrat proteic descolorat a partir de sang sencera porcina mitjançant mètodes que indueixen a la precipitació de les proteïnes de la sang sencera (acidificació i augment de temperatura), el que comporta l'obtenció d'un producte amb unes característiques d'alta insolubilitat. Aquestes característiques no representen una problemàtica per l'ús de l'ingredient en l'alimentació animal, però sí que representen una limitació a nivell d'alimentació humana com a ingredient en la formulació d'aliments. Per altra banda, el producte obtingut en aquests assaigs presenta una descoloració insuficient per ser utilitzat en la majoria de formulacions alimentàries, el que en representa una de les majors problemàtiques.

A partir d'aquests resultats, es decideix reorientar la línia d'investigació cap a una metodologia alternativa que permeti millorar les propietats tecno-funcionals de l'ingredient obtingut, mantenint l'objectiu d'aïllar i descolorar les proteïnes de la sang per obtenir un concentrat proteic en pols. Així, es planteja valoritzar separadament el plasma, tenint en compte que a diferència de la fracció cel·lular, és la fracció de la sang que té un color i flavor bastant neutres i presenta més possibilitats d'utilització a la indústria alimentària, i per altra banda, processar la fracció cel·lular mitjançant un tractament hidrolític en combinació amb la descoloració amb peròxid d'hidrogen,.

Fu *et al.* (2019) van estudiar l'efecte de diferents enzims (Proteasa A, Proteasa P, ProteAX, Flavourzyme, Alcalasa, Papaïna, Bromelanina, Protemax, Neutrasa i Sumizina BNP-L) sobre plasma porcí i múscul boví per determinar quin procés hidrolític permetia obtenir un producte amb menor sabor amarg, característic dels hidrolitzats, observant els millors resultats utilitzant Proteasa A i relacionant-ho amb l'activitat endo i exo peptidasa, activitat que també presenta en menor grau el Flavourzyme.

Per altra banda, Wanasundara *et al.* (2002) van estudiar l'efecte combinat o per separat de l'Alcalasa i el Flavourzyme sobre plasma boví desfibrinat, obtenint un major grau d'hidròlisi (fins el 43 %) utilitzant el Flavourzyme per separat, el que permetia obtenir pèptids amb un pes menor de 1,04 kDa.

Cui *et al.* (2013) van obtenir hidrolitzats a partir de sang bovina (plasma, globulina i albúmina), melsa, fetge proteïna miofibril·lar i múscul ovins mitjançant l'aplicació seqüencial d'Alcalasa, Flavourzyme i Neutrasa, el que els va permetre obtenir uns productes amb una digestibilitat de fins el 99 %.

Zheng *et al.* (2018a i 2018b) van dur a terme la hidròlisi de la fracció cel·lular de sang d'ànec mitjançant la combinació de Flavourzyme i Neutrasa, obtenint un producte amb alta solubilitat, bones propietats emulsionants i escumants, amb activitat antioxidant i alta concentració d'aminoàcids essencials.

La hidròlisi de fraccions de la sang mitjançant Flavourzyme també ha estat estudiada per diferents autors amb l'objectiu de determinar activitats funcionals específiques dels pèptids presents als hidrolitzats que podrien ser útils en el tractament de d'algunes patologies humanes. Algunes d'aquestes característiques, determinades en hidrolitzats procedents de diferents materials animals o vegetals, són la capacitat de regulació immunològica (Cross i Gill, 2000), activitat ECA inhibidora (inhibició de l'enzim conversiu de l'angiotensina, útil en el tractament de la hipertensió) (Maruyama *et al.*, 1985; Pan *et al.*, 2005), activitat anti-genotòxica (Park i Hyun, 2002) o activitat antioxidant (Je *et al.*, 2005). Janitha *et al.* (2002) van descriure l'obtenció d'un producte amb activitat inhibidora de l'ECA mitjançant la hidròlisi de plasma boví amb Flavourzyme. Chang *et al.* (2007) van estudiar la hidròlisi d'hemoglobina porcina mitjançant Alcalasa, seguit de Flavourzyme, per obtenir un producte que va demostrar un elevat poder reductor (activitat antioxidant) i alta capacitat quelant de l'ió ferrós. Per altra banda, Wei *et al.* (2009) van obtenir pèptids bioactius amb activitat antihipertensiva i antioxidant a partir d'hidrolitzats de fracció cel·lular de sang porcina mitjançant diferents enzims, entre ells la combinació d'Alcalasa i Flavourzyme.

En aquest capítol, es planteja un estudi de la hidròlisi de la fracció cel·lular mitjançant Flavourzyme en combinació amb la Neutrasa, seguint els bons resultats obtinguts per Zheng *et al.* (2018b) en el seu estudi per l'obtenció d'un hidrolitzat de sang d'ànec descolorat amb peròxid d'hidrogen. Així, es descarta transformar la fracció plasmàtica, que habitualment ja es valoritza, amb diverses aplicacions a la indústria alimentària (Viana *et al.*, 2005; Hurtado *et al.*, 2010 i 2012; Parés *et al.*, 2014; Álvarez *et al.*, 2021).

5.2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest capítol és la cerca de les millors condicions hidrolítiques sobre la fracció cel·lular de sang porcina d'escorxador, mitjançant la utilització d'un o dos enzims, prèviament a la descoloració amb peròxid per obtenir un concentrat proteic descolorat apte pel consum humà. Així, s'estableixen els objectius específics de:

1. Estudiar l'efecte de dos tractaments hidrolítics, sols amb Flavourzyme o en combinació amb Neutrasa, sobre la fracció cel·lular aplicant un tractament posterior descolorant mitjançant peròxid d'hidrogen.
2. Estudiar els efectes del tractament hidrolític sobre la fracció cel·lular amb els millors resultats, determinat en l'assaig anterior, i caracteritzar els concentrats proteics obtinguts.

5.3. MATERIAL I MÈTODES

5.3.1. Disseny experimental

El procés d'hidròlisi de la fracció cel·lular s'ha estudiat en dos assaigs diferenciats per cercar el tractament hidrolític que permeti obtenir un concentrat proteic amb major grau de descoloració.

1r assaig

En un primer assaig (Figura 5.1) es va provar, per triplicat ($n=3$), l'obtenció d'un concentrat proteic mitjançant la hidròlisi de la fracció cel·lular de sang segons el mètode descrit per Zheng *et al.* (2014); aquest utilitza *Neutrasa* i *Flavourzyme* com a enzims hidrolítics. En l'assaig es va considerar l'ús combinat d'aquests enzims, tal com descriu l'estudi, o sols l'ús del *Flavourzyme*. A diferència del mètode descrit per Zheng *et al.* (2014), s'ha decidit descartar la fracció precipitada de l'hidrolitzat, que no presentava una notable descoloració mitjançant peròxid d'hidrogen a les concentracions estudiades. Per altra banda, s'ha decidit determinar l'efecte de la descoloració de la fracció sobrenedant, descolorant la meitat de la fracció recuperada amb un 0,75 % de peròxid. Les dues fraccions recuperades (sobrenedant descolorant i no descolorat) es van deshidratar per atomització.

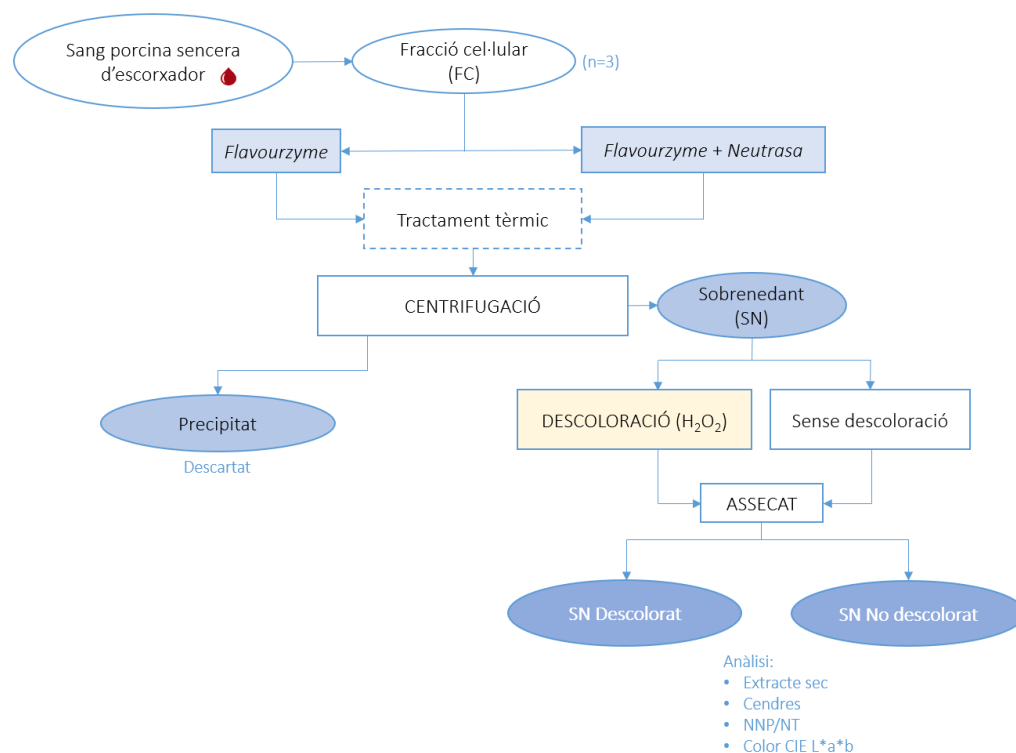


Figura 5.1. Disseny experimental del primer assaig per l'obtenció d'un concentrat proteic dessecat amb tractament hidrolític sobre la fracció cel·lular.

Per caracteritzar els productes obtinguts es va determinar el percentatge de sobrenedant i precipitat obtinguts en cada tractament, i es va realitzar la caracterització fisicoquímica dels concentrats proteics en pols, determinant el percentatge d'extracte sec, cendres, proteïna, nitrogen no proteic sobre nitrogen total (NNP/NT) i els paràmetres CIE L*a*b* del color.

2n assaig

En el segon assaig (Figura 5.2) es va produir el concentrat proteic descolorat obtingut mitjançant la metodologia d'hidròlisi que havia mostrat millors resultats en el primer assaig (tractament amb *Flavourzyme*). Els experiments es van realitzar per triplicat sobre mostres de fracció cel·lular obtingudes en dies diferents en les mateixes condicions (n=3). Els productes obtinguts van ser caracteritzats a nivell fisicoquímic per determinar-ne el percentatge de cada fracció recuperada, el rendiment en el sobrenedant, el percentatges d'extracte sec, cendres i proteïna i l'activitat d'aigua. El color va ser estudiat mitjançant els paràmetres CIE L*, a*,b*, cromà i tonalitat. Es va determinar el grau d'hidròlisi mitjançant el mètode del TNBS. A més, per estudiar el perfil proteic dels hidrolitzats dessecats obtinguts es va realitzar una anàlisi electroforètica mitjançant SDS-PAGE.

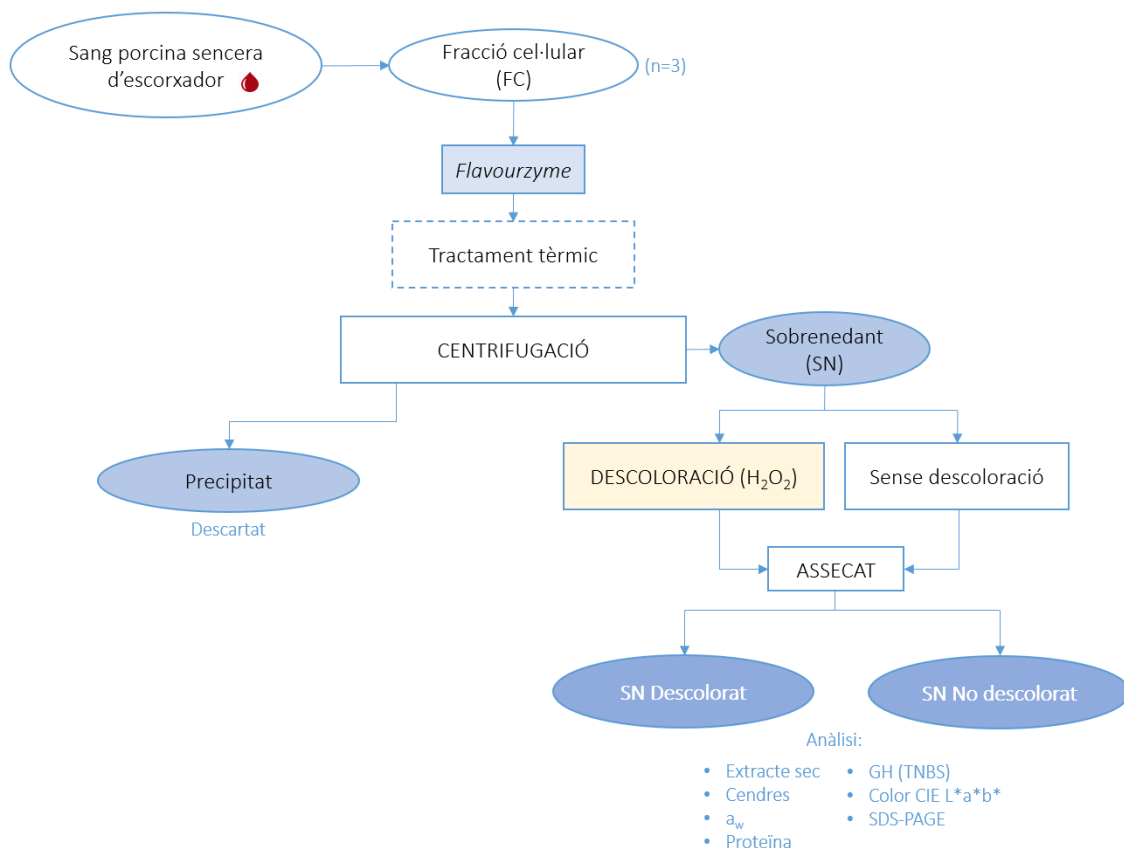


Figura 5.2. Disseny experimental del segon assaig per l'obtenció d'un concentrat proteic dessecat amb tractament hidrolític amb *Flavourzyme* sobre fracció cel·lular.

5.3.2. Procedència de les mostres

Les mostres de sang de porc procedien de l'escorxador industrial NORFRISA (Riudellots de la Selva, Girona). Aquestes van ser recollides en recipients de plàstic estèrils i transportades en bosses isotèrmiques amb acumuladors tèrmics per mantenir la temperatura de refrigeració. Les mostres es van processar durant els primers dos dies després de recollir-les per evitar-ne el deteriorament.

La sang es va centrifugar el mateix dia de recollida a 2.500 x g durant 15 min en una centrífuga Sorvall RC-5C plus (Dupont Co, Newton, Connecticut, EUA) i se'n va guardar la fracció cel·lular en refrigeració (4 °C) *over night* fins a ser processada el dia següent. La fracció plasmàtica va ser descartada.

5.3.3. Obtenció del concentrat proteic

Les hidròlisis assajades es van dur a terme mitjançant els enzims Flavourzyme i Neutrasa. Les condicions òptimes (temperatura i pH) d'aquests es mostren a la Taula 5.1.

Taula 5.1. Condicions òptimes i tipus d'activitat proteolítica dels enzims utilitzats en l'obtenció d'un concentrat proteic descolorit a partir de sang porcina.

Enzim	Activitat	Temperatura òptima (°C)	pH òptim
Flavourzyme	Endo i exopeptidasa	50	5-7
Neutrasa	Metal·loproteasa	40-50	7

Les característiques dels enzims utilitzats es descriuen a continuació:

Flavourzyme®: descrit en el capítol 4 (4.3.3).

Neutrasa® (E.C.3.4.24.28) 0,8 L de Novozymes amb una activitat declarada de 0,8 L (unitats AU-N/g). Es tracta d'una zinc-metal·lo-endopeptidasa obtinguda a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* que hidrolitza a l'atzar enllaços peptídics interns i facilita la síntesi enzimàtica d'oligopèptid per la reacció inversa de proteòlisi mitjançant zinc com a co-catalitzador.

El tractament d'hidròlisi i descoloració de la fracció cel·lular es va dur a terme seguint el procés descrit per Zheng *et al.* (2014), representat en la Figura 5.3. La fracció cel·lular obtinguda per centrifugació de la sang va ser acidificada mitjançant l'addició d'àcid clorhídric 0,1 M en una relació de 3:2 i es mantenia en agitació mitjançant un agitador de vareta Heidolph RZR 2051 control (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemanya)

durant 40 min a 40 °C, mitjançant un bany proveït de resistències tèrmiques i termòstat. Seguidament, la solució es neutralitzava mitjançant hidròxid de sodi 20 % (p/v) fins a arribar a un pH de 7. La solució s'ajustava a 14 g de proteïna per cada 100 mL afegint aigua de xarxa.

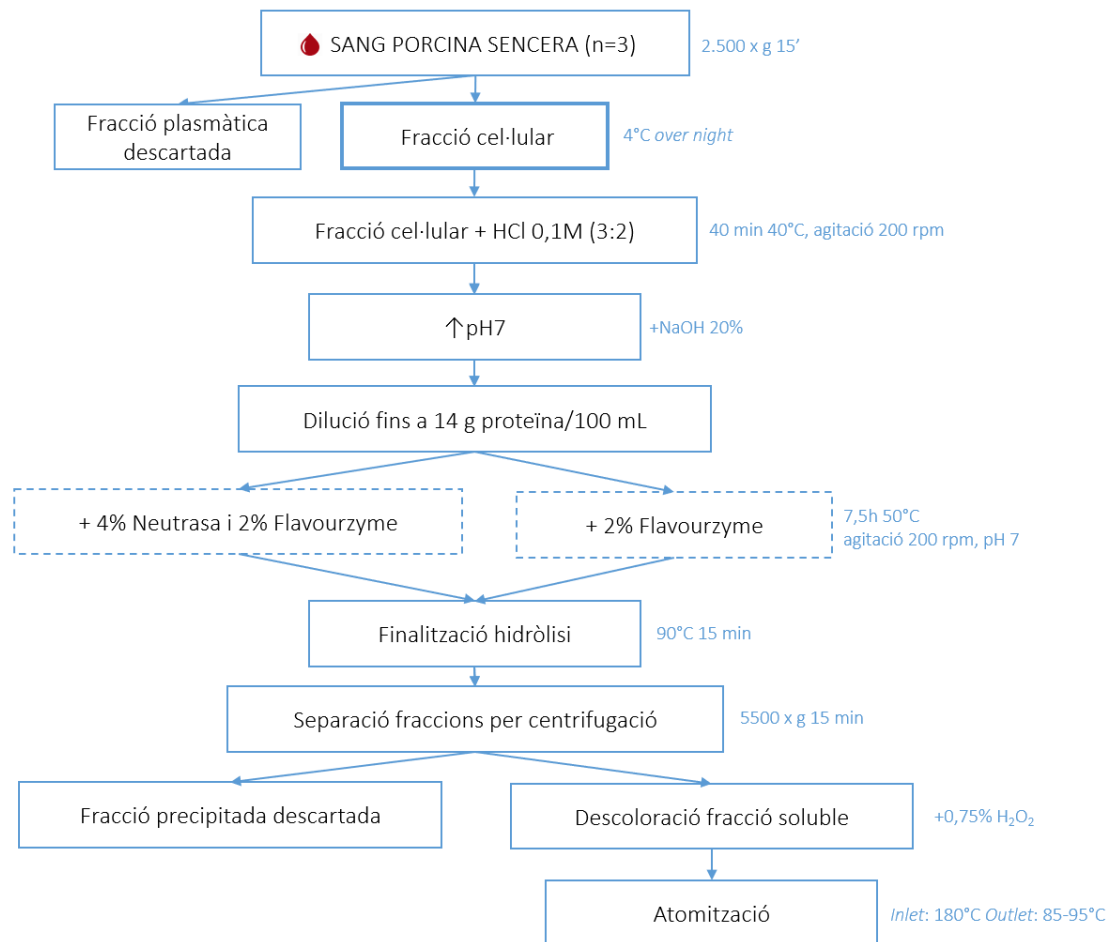


Figura 5.3. Diagrama de flux del procés per l'obtenció d'un concentrat proteic deshidratat a partir de fracció cel·lular de sang mitjançant hidròlisi amb Neutrasa i Flavourzyme i descoloració amb peròxid d'hidrogen.

Seguidament, la solució es duia a 50 °C i s'afegien els enzims per iniciar la hidròlisi. Es va provar la hidròlisi amb Neutrasa 4 % (v/v) i Flavourzyme 2 % (v/v) o només amb Flavourzyme 2 % (v/v). La hidròlisi es duia a terme durant 7,5 h, en condicions d'agitació suaus i controlant el pH cada mitja hora aproximadament, per mantenir-lo a 7. Una vegada transcorregut el temps de reacció, la hidròlisi es finalitzava augmentant la temperatura fins a 90 °C durant 15 min en el reactor.

Seguidament, la fracció cel·lular hidrolitzada es centrifugava a $5.500 \times g$ durant 15 min, obtenint una fracció precipitada, que es descartava, i una fracció soluble. Aquesta última es descolorava mitjançant tractament amb un 0,75 % de peròxid d'hidrogen (v/v) durant 30 min i s'assecava per atomització.

En el segon assaig, per caracteritzar el producte amb millors característiques, es va obtenir, per triplicat, un concentrat proteic a partir de la hidròlisi de fracció cel·lular mitjançant Flavourzyme, amb el procés desenvolupat en l'assaig anterior.

5.3.4. Deshidratació per atomització

El mètode d'assecat aplicat a la fracció sobrenedant després de la hidròlisi i descoloració va ser la deshidratació per atomització o *spray drying* mitjançant un equip BÜCHI Mini Spray Dryer B-191 (Buchi Ibérica S.L.U., Espanya) (Figura 5.4). Aquesta tecnologia consisteix en injectar a pressió la solució o producte desitjat a través d'un orifici petit, juntament amb la injecció d'aire, el que en provoca la nebulització del líquid. Les micro-gotes formades entren dins d'una cambra on es posen en contacte amb un flux d'aire calent, de manera que es produeix una deshidratació molt ràpida per l'elevada superfície de transferència de calor i de matèria. El flux d'aire condueix les partícules deshidratades cap a un cicló separador i, a continuació, són recollides en forma de pols en una cambra adjacent.

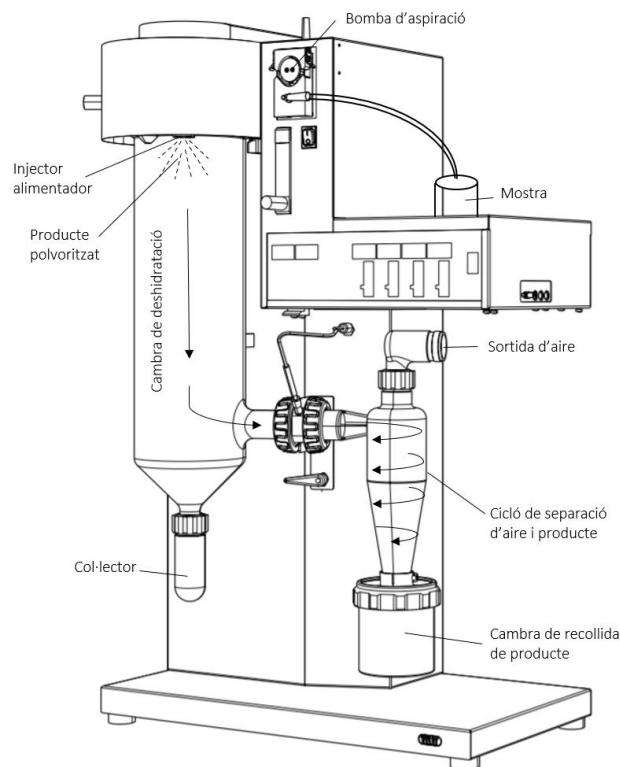


Figura 5.4. Representació d'un deshidratador per atomització d'escala laboratori.

Figura modificada a partir de BUCHI Mini Spray Dryer B-290.

El producte resultant no es veu afectat en gran mesura per l'alta temperatura a causa de la ràpida evaporació de l'aigua, que absorbeix gran part d'aquesta calor, el que permet obtenir un producte d'alta qualitat.

En aquest estudi, per dessecar el producte proteic, es va utilitzar les següents condicions: temperatura d'entrada de l'aire (*Inlet*): 160 °C; temperatura de sortida de l'aire (*Outlet*): 78-82 °C; Cabal d'alimentació del producte: 652-787 mL/h. Les mostres deshidratades es van envasar en envasos de plàstic tancats i a temperatura ambient fins que es realitzaven les anàlisis corresponents.

5.3.5. Caracterització fisicoquímica dels concentrats proteics

5.3.5.1. Composició química

La caracterització fisicoquímica general dels concentrats proteics descolorits i atomitzats es va realitzar en cada una de les mostres obtingudes. Els paràmetres analitzats van ser la humitat, activitat de l'aigua, cendres, proteïna, nitrogen no proteic i grau d'hidròlisi (NNP/NT). Totes les anàlisis es van fer per duplicat.

* Humitat

El contingut en humitat es va determinar per gravimetria tal com es descriu en el Capítol 3, apartat 3.2.5.1.

* Activitat de l'aigua

L'activitat de l'aigua (a_w) es va determinar a 25 °C en un higròmetre automàtic Novasina LabMaster aw (Novasina AG, Lachen, Suïssa).

* Cendres

El contingut de sals minerals (cendres) es va determinar per gravimetria tal com es descriu en el Capítol 3, apartat 3.2.5.1.

* Proteïna

Per determinar el contingut proteic de les mostres obtingudes es va utilitzar el mètode Kjeldahl (ISO R-937, 1978) tal com s'explica en el Capítol 3, apartat 3.2.5.1.

* Nitrogen no proteic

Per determinar el nitrogen no proteic de les mostres en pols es va dissoldre aproximadament 0,4 g o 10 mL de mostra en 25 mL d'hidròxid de sodi 1N. D'aquesta solució se'n va mesurar 10 mL i se li va afegir 12,5 mL d'àcid tricloroacètic (TCA) ($\text{Cl}_3\text{C}_2\text{O}_2\text{H}$) al 25%, que es va enrasar a 25 mL amb aigua

destil·lada, per obtenir una concentració final de TCA del 12,5%. La solució es va filtrar amb un filtre Whatman nº 1 de 150 mm de diàmetre. La solució recuperada es va analitzar mitjançant el mètode Kjeldahl (ISO R-937, 1978). Per obtenir una estimació del grau d'hidròlisi, es va calcular el percentatge de nitrogen no proteic sobre el nitrogen total valorat pel mètode Kjeldahl.

5.3.5.2. Rendiment de la hidròlisi

El rendiment obtingut en els hidrolitzats es va determinar en la fracció sobrenedant com a percentatge de proteïna recuperada sobre el contingut total de proteïna de la mostra hidrolitzada.

5.3.5.3. Determinació dels paràmetres CIE $L^*a^*b^*$ del color

La determinació dels paràmetres CIE $L^*a^*b^*$ de color de cada mostra es va fer utilitzant un colorímetre Minolta CR-400 (Minolta Co, Ltd, Osaka, Japó), a més a més dels paràmetres Croma i Tonalitat (veure Capítol 3, apartat 3.2.6, i Capítol 4, apartat 4.3.5). El colorímetre es va calibrar mitjançant una placa patró referent al blanc. Cada determinació es va realitzar per triplicat sobre cada mostra.

5.3.5.4. Grau d'hidròlisi

El grau d'hidròlisi es va determinar mitjançant el mètode de l'àcid trinitro-benzen-sulfònic (TNBS) (veure Capítol 4, apartat 4.3.6). Les mostres de fracció cel·lular hidrolitzades es refredaven amb gel per aturar la hidròlisi i es guardaven en fred fins a realitzar les determinacions.

5.3.6. Electroforesi SDS-PAGE

Per analitzar el perfil electroforètic dels productes obtinguts mitjançant la hidròlisi amb Flavourzyme es va realitzar una electroforesi SDS-PAGE en gel de poliàcrilamida d'alta densitat (20 %) mitjançant un equip Mini-PROTEAN® Tetra System (BIO RAD, Califòrnia, EUA). Es va seguir el protocol descrit en l'apartat 3.2.7, Capítol 3.

5.3.7. Tractament estadístic de les dades

Els resultats del segon assaig es van analitzar mitjançant el paquet estadístic *IBM SPSS Statistics* versió 25 (IBM SPSS Statistical software Inc., Chicago, IL, USA).

Per determinar els efectes de l'aplicació d'un tractament de descoloració mitjançant peròxid sobre la fracció hidrolitzada recuperada en la composició fisicoquímica i el color, es va dur a terme una anàlisi univariant de la variància (ANOVA), considerant com a significatius els valors de probabilitat inferiors a 0,05. L'homoscedasticitat de les dades es va comprovar aplicant el test de Levene. Es van considerar el factor fix: tractament i les variables dependents: mostra, extracte sec, a_w , proteïna, cendres, i paràmetres CIE L^* , a^* i b^* del color.

5.4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

A continuació s'exposen els resultats obtinguts en els dos assaigs realitzats per investigar els efectes d'un procés hidrolític de la fracció cel·lular mitjançant enzims, prèviament a la descoloració.

5.4.1. Caracterització dels hidrolitzats obtinguts mitjançant Flavourzyme o Flavourzyme i Alcalasa

Partint de resultats anteriors del grup de recerca en que s'havien estudiat els efectes descolorants de diversos enzims i combinacions d'enzims sobre la fracció cel·lular (Toldrà, 2002; Toldrà et al., 2011), en aquest cas es van realitzar els tractaments enzimàtics, i tal com s'havia fet abans, es van recuperar tant la fracció soluble, sobrenedant de la centrifugació, com el pellet.

A continuació es mostren els resultats obtinguts en la caracterització dels hidrolitzats de fracció cel·lular mitjançant Flavourzyme o Flavourzyme + Neutrasa, seguint el mètode descrit per Zheng *et al.* (2014). A la Taula 5.2 es mostren els resultats obtinguts en la determinació del color dels concentrats proteics obtinguts a partir del sobrenedant; es mostren els valors de L*, a*, b*, cromà, tonalitat i color RGB. La fracció precipitada o pellet va ser descartada degut a la seva alta insolubilitat i una coloració marró fosc-negre.

Si s'analitza el color obtingut en els hidrolitzats obtinguts amb Flavourzyme (mostres indicades com a FL), s'observa una bona reproductibilitat en els resultats de les tres rèpliques; la fracció sobrenedant recuperada presenta una descoloració notable, amb uns valors mitjans de L*: $79,90 \pm 1,89$; a*: $7,62 \pm 2,53$ i b*: $17,72 \pm 2,53$. Així, s'obté una major descoloració que la que obtenien Zheng *et al.* (2014) en hidrolitzar fracció cel·lular i descolorant-ne el precipitat, amb uns valors de L*: $60,74 \pm 0,36$; a*: $8,04 \pm 0,01$ i b*: $27,86 \pm 0,13$, però semblant a l'obtinguda per Synowiecki *et al.* (1995), amb uns valors de L*: 73,6; a*: 0,7 i b*: 19,1.

















El color obtingut després de la descoloració amb H₂O₂ del sobrenedant es presenta encara més clar, amb uns valors de L*: $90,42 \pm 0,78$; a*: $0,93 \pm 0,69$ i b*: $14,37 \pm 1,20$, essent la major descoloració obtinguda en aquest estudi.

Per altra banda, si s'analitzen els resultats de color obtinguts en els hidrolitzats amb Flavourzyme i Neutrasa (mostres FN), es poden observar diferents tendències en les quatre rèpliques realitzades; FN1, FN3 i FN4 no presenten una descoloració significativa en el sobrenedant sense tractament de descoloració recuperat, però FN1 sí obté una descoloració intensa en el sobrenedant descolorat amb peròxid. Per altra banda, la mostra FN2 presenta resultats diferents als observats en la resta de rèpliques; tant el sobrenedant com el sobrenedant descolorat presenten una coloració molt més clara. Tanmateix, aquesta mostra és la que ha

presentat un percentatge de sobrenedant més baix, el que podria ser indicatiu de que s’ha donat alguna variació no controlada en el processat de la sang, pel que aquest resultat no es pot tenir en consideració.

Malgrat la dispersió dels resultats, sembla que la utilització conjunta dels dos enzims no aporta cap millora pel que fa a la descoloració, pel que l’opció més adequada seria la hidròlisi utilitzant només Flavourzyme seguida de descoloració amb peròxid.

Taula 5.2. Paràmetres de color dels concentrats proteics obtinguts mitjançant hidròlisi de la fracció cel·lular de sang amb Flavourzyme o Flavourzyme i Neutrasa (indicat com a FL i FN respectivament). Es mostren els valors dels paràmetres CIE L*a*b*, el cromà, la tonalitat i els valors i representació de l’escala RGB. Es mostren les mitjanes ± DE (n=3).

Tractament		Paràmetres color							
		L*	a*	b*	Cromà	Tonalitat	RGB		
Flavourzyme	FL1	S ¹	76,84 ± 0,12	6,13 ± 0,10	16,32 ± 0,12	17,43	69,41	210 185 160	
		SD ²	91,18 ± 0,45	0,25 ± 0,05	15,25 ± 0,43	15,25	89,06	239 229 200	
	FL2	S	75,04 ± 0,25	10,54 ± 0,15	20,64 ± 0,11	23,18	62,95	214 177 147	
		SD	90,46 ± 0,13	0,90 ± 0,04	14,86 ± 0,10	14,89	86,53	238 226 199	
	FL3	S	78,81 ± 0,10	6,18 ± 0,06	16,21 ± 0,14	17,35	69,13	215 191 165	
		SD	89,63 ± 0,11	1,63 ± 0,05	13,01 ± 0,24	13,11	82,86	236 224 201	
Flavourzyme + Neutrasa	FN1	S	44,18 ± 0,44	22,59 ± 0,47	20,33 ± 0,30	30,39	41,99	146 89 72	
		SD	75,60 ± 0,31	3,80 ± 0,07	22,65 ± 0,31	22,97	80,48	205 183 145	
		P ³	38,91 ± 0,73	9,20 ± 0,21	11,98 ± 0,06	15,10	52,48	111 86 73	
	FN2	S	81,90 ± 1,03	3,03 ± 0,10	18,75 ± 0,21	18,99	80,82	220 201 169	
		SD	92,50 ± 0,23	-0,50 ± 0,05	16,90 ± 0,25	16,91	88,31	243 233 202	
		P	29,64 ± 0,23	10,38 ± 0,19	13,36 ± 0,52	16,92	52,15	90 64 50	
	FN3	S	39,32 ± 0,79	18,20 ± 0,59	17,62 ± 0,07	25,33	44,07	126 81 65	
		SD	47,74 ± 0,78	7,65 ± 0,37	19,49 ± 0,32	20,94	68,57	134 108 81	
		P	ND ⁴	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	FN4	S	45,97 ± 0,21	12,46 ± 0,19	11,20 ± 0,27	16,75	41,95	134 101 91	
		SD	59,74 ± 0,31	5,16 ± 0,12	16,28 ± 0,14	17,08	72,41	161 140 115	
		P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

¹S: sobrenedant no descolorat

²SD: sobrenedant descolorat

³P: precipitat

⁴ND: color no determinat degut a la recuperació d’una quantitat insuficient de mostra.

A la Taula 5.3 s’observa el percentatge recuperat de cada fracció de l’hidrolitzat, precipitat i sobrenedant. Es pot apreciar que s’obté aproximadament un 30 % de precipitat i un 70 % de sobrenedant en els

hidrolitzats amb Flavourzyme, mentre que s'ha observat una dispersió molt alta entre els percentatges resultants dels hidrolitzats obtinguts a partir de Flavourzyme + Neutrasa, on s'obté entre un 5 % i un 30 % de precipitat. Aquests resultats es podrien relacionar amb la dificultat de reproductibilitat de les condicions assajades.

Taula 5.3. Percentatge de les fraccions recuperades dels concentrats proteics obtinguts mitjançant hidròlisi de la fracció cel·lular de sang amb Flavourzyme o Flavourzyme i Neutrasa.

Enzims utilitzats		Fracció recuperada (%)	
		Precipitat	Sobrenedant
Flavourzyme	FL1	31	69
	FL2	32	68
	FL3	30	70
Flavourzyme + Neutrasa	FN1	15	85
	FN2	32	68
	FN3	4	96
	FN4	12	88

A la Taula 5.4 es mostren els resultats de la caracterització fisicoquímica dels hidrolitzats dessecats per atomització.

L'extracte sec obtingut en tots els concentrats proteics és major al 90 %, a excepció d'alguna rèplica, que no baixa del 86 %. Aquestes dades són les esperades en l'aplicació de la deshidratació per atomització com a mètode d'assecat, permetent reduir en gran quantitat la humitat del producte. Zheng *et al.* (2014), en hidrolitzats obtinguts combinant els enzims Neutrasa i Flavourzyme, també van observar un extracte sec molt similar al determinat en aquest estudi, amb un valor del $91,43 \pm 0,10$ %.

Els valors d' a_w oscil·len del 0,175 al 0,552, valors que varien en funció del contingut d'humitat residual del producte, que es pot haver vist afectat per les condicions ambientals (temperatura i humitat). Tanmateix, cap d'aquests valors sobrepassa l' a_w de 0,6, a partir del qual es poden desenvolupar certs fongs filamentosos (Troller, 1989) i altres microorganismes, el que assegura una adequada conservació i vida útil dels ingredients obtinguts, sempre que s'envasin i es conservin en les condicions d'estanqueïtat adequades.

Si s'analitza el contingut en cendres del concentrat obtingut a partir del sobrenedant, es poden observar dues tendències clarament diferents segons el tractament aplicat; les mostres obtingudes mitjançant un sol enzim (FL) presenten valors del 10,63 al 14,86 % de cendres, mentre que les mostres obtingudes mitjançant hidròlisi amb dos enzims (FN) presenten uns valors del 5,17 al 6,18 %. Aquests resultats es deuen

a la diferent quantitat d'hidròxid sòdic utilitzat durant la reacció d'hidròlisi per mantenir el pH de la solució. Així, seria necessari dur a terme un control de la quantitat de NaOH gastat en cada procés per verificar-ho. Els resultats de cendres pels dos tipus de tractaments són lleugerament diferents als determinats per Zheng *et al.* (2014), amb un $8,46 \pm 0,01$ %. Si s'analitza el contingut de cendres de la fracció precipitada, en les dues mostres analitzades, s'observa un percentatge de 3,52 a 4,66%, valor lleugerament inferior al determinat en la fracció sobrenedant, el que indica que un major contingut de sals minerals es troben en solució en aquesta última fracció.

El contingut de nitrogen no proteic es pot relacionar amb un major o menor grau d'hidròlisi. En el tractaments amb Flavourzyme s'observa un valor més o menys estable que va del 31,1 al 36,1 %. Per altra banda, en els tractaments amb Flavourzyme i Neutrasa, s'observen valors molt diferents entre les mostres; per una banda, dues mostres presenten un NNP/NT de 12,8 a 15 %, mentre que les dues restants presenten un 84,06 a un 96,88 %. Els resultats de més proporció de NNP coincideixen amb dues de les mostres que van donar més rendiment en la fracció sobrenedant, el que és lògic perquè la hidròlisi afavoreix la solubilització de la proteïna. La mostra FN1, però, és un cas discordant, amb una quantitat elevada de sobrenedant, mostrant el mínim valor de NNP. Aquests resultats no són els esperats, i semblen indicar una mala reproductibilitat de les condicions assajades, que podria ser conseqüència d'utilitzar simultàniament dos enzims amb activitat endo i exo-peptidasa, de manera que és probable que aquests s'hidrolitzin entre ells, obtenint resultats dispersos.

El contingut de proteïna dels extractes obtinguts a partir de sobrenedant va del 74,27 al 81,79 % en el tractament amb un sol enzim, i del 76,75 al 89,39 % en els concentrats obtinguts mitjançant dos enzims. Aquesta petita disminució del contingut proteic en els productes obtinguts amb Flavourzyme és deguda a l'augment del percentatge de cendres, el que fa que el percentatge de proteïna sigui proporcionalment menor. En les dues fraccions precipitades procedents del tractament amb dos enzims s'observa un contingut proteic del 79,44 al 83,18 %, valors molt similars als obtinguts en les fraccions sobrenedants. Zheng *et al.* (2014) van determinar un contingut proteic del $72,69 \pm 0,38$ en el producte recuperat a partir de sobrenedant i precipitat, valor lleugerament inferior als obtinguts en aquest assaig.

A partir dels resultats d'aquest primer assaig es va escollir el tractament d'hidròlisi de la fracció cel·lular utilitzant només Flavourzyme ja que ha demostrat ser el tractament més efectiu en la descoloració de l'hemoglobina, objectiu principal d'aquest estudi.

Taula 5.4. Composició química dels concentrats proteics obtinguts mitjançant hidròlisi de la fracció cel·lular de sang amb Flavourzyme o Flavourzyme i Neutrasa. Es mostren les mitjanes \pm SD ($n=3$) per l'extracte sec, a_w , cendres, proteïna i NNP (nitrogen no proteic).

Tractament		Extracte sec (%)	a_w	Cendres (%)	Proteïna (%)	NNP/NT (%)	
Flavourzyme	FL1	S	92,63 \pm 0,10	0,175	10,63 \pm 0,16	75,77 \pm 0,23	36,10
		SD	92,95 \pm 0,15	0,166	10,89 \pm 0,17	74,27 \pm 0,16	ND
	FL2	S	91,69 \pm 0,08	0,446	14,86 \pm 0,17	77,35 \pm 0,16	31,10
		SD	91,28 \pm 0,09	0,435	14,79 \pm 0,02	76,87 \pm 0,26	ND
	FL3	S	92,01 \pm 0,02	0,247	13,72 \pm 0,17	79,95 \pm 0,65	33,72
		SD	91,33 \pm 0,51	0,210	13,59 \pm 0,29	81,79 \pm 3,21	ND
Flavourzyme + Neutrasa	FN1	S	87,50 \pm 0,18	0,513	5,51 \pm 0,10	89,39 \pm 1,21	12,80
		SD	92,38 \pm 0,03	0,480	5,64 \pm 0,14	80,42 \pm 0,48	ND
		P	94,22 \pm 0,57	0,503	3,52 \pm 0,02	83,18 \pm 0,01	ND
	FN2	S	86,24 \pm 0,73	0,511	5,22 \pm 0,06	77,17 \pm 0,30	15,00
		SD	87,81 \pm 0,15	0,457	5,63 \pm 0,12	76,75 \pm 0,06	ND
		P	87,63 \pm 0,10	0,552	4,66 \pm 0,10	79,44 \pm 0,53	ND
	FN3	S	95,54 \pm 0,02	0,267	6,18 \pm 0,04	87,87 \pm 1,19	96,88
		SD	95,39 \pm 0,06	0,256	6,03 \pm 0,01	87,46 \pm 0,30	ND
		P	ND	ND	ND	ND	ND
	FN4	S	91,99 \pm 0,02	0,297	5,93 \pm 0,01	89,98 \pm 1,02	84,06
		SD	90,71 \pm 0,27	0,229	5,17 \pm 0,03	82,91 \pm 0,75	ND
		P	ND	ND	ND	ND	ND

S: sobrenedant no descolorat

SD: sobrenedant descolorat amb H_2O_2

P: precipitat

ND: dada no determinada

5.4.2. Caracterització dels hidrolitzats obtinguts mitjançant Flavourzyme

En aquest apartat es mostren els resultats de la caracterització dels tres hidrolitzats obtinguts en el segon assaig, mitjançant hidròlisi de la fracció cel·lular amb Flavourzyme i posterior descoloració de la fracció sobrenedant recuperada amb peròxid d'hidrogen.

Caracterització fisicoquímica

A la Taula 5.5 es mostra el percentatge de fracció recuperada i el rendiment del sobrenedant. Es pot observar que en les tres rèpliques s'obté aproximadament un 20 % de precipitat, fracció que es descarta

per al seu ús alimentari, i un 80 % de sobrenedant, en aquest cas la fracció d'interès. Aquests valors són similars als determinats per Toldrà (2002) en hidrolitzats d'hemoglobina porcina després d'un procés d'hidròlisi amb Alcalasa.

Taula 5.5. Percentatge de cada fracció obtinguda (precipitat i sobrenedant) en hidrolitzats de fracció cel·lular de sang mitjançant Flavourzyme, i rendiment en sobrenedant, expressat com % de proteïna recuperat.

		F1	F2	F3	Mitjana \pm DE (n=3)
Fracció recuperada (%)	Precipitat	22,54	19,40	19,40	20,45 \pm 1,81
	Sobrenedant	77,46	80,60	79,79	79,28 \pm 1,63
Rendiment sobrenedant (%)		37,42	47,39	31,81	38,87 \pm 7,89

Si ens fixem en els rendiments del sobrenedant obtinguts, s'observen uns valors que van del 31,81 % al 47,39 %, del contingut proteic recuperat respecte al contingut proteic total de la mostra hidrolitzada abans de separar-ne les fraccions. La dispersió de les dades és segurament deguda al mètode de separació de les fraccions (centrifugació i decantació). Així, aquests valors representen una pèrdua del 52,61 al 68,19 % de proteïna de la fracció cel·lular, proteïna que queda en la fracció precipitada i és descartada, donant un rendiment de procés molt baix. Per contra, tant l'efecte de la descoloració com la major solubilitat d'aquestes proteïnes podria suposar aplicacions interessants en la indústria alimentària.

A la Taula 5.6 es pot observar el grau d'hidròlisi (GH). El GH és un paràmetre clau dels hidrolitzats proteics, essent el percentatge d'enllaços peptídics escindits. S'observa un valor mitjà d'un 27,37 \pm 1,91 %, valor similar al que va determinar Zheng *et al.* (2018) en hidrolitzar fracció cel·lular amb Neutrasa i Flavourzyme durant 10 h, amb un valor d'aproximadament el 35 %. Per altra banda, Fu *et al.* (2018) van determinar fins a un 20 % de GH en hidrolitzats de plasma porcí amb Flavourzyme durant 5 h. Tanmateix, un elevat grau d'hidròlisi sol anar associat a un augment del sabor amargant dels hidrolitzats, pel que seria de gran interès estudiar aquest paràmetre en proves d'aplicació en productes alimentaris.

En la Taula 5.7 es pot observar la composició química dels hidrolitzats obtinguts; tal com s'esperava, no s'observen diferències significatives ($P > 0,05$) entre els valors d'extracte sec, activitat d'aigua, cendres o proteïna de la fracció soluble i la mateixa fracció descolorada. El percentatge d'extracte sec presenta valors del 88,58 al 92,58 %; aquesta lleugera variació és segurament deguda a les condicions de l'assecat mitjançant atomització, que poden variar en funció de les condicions ambientals. Aquest valor és lleugerament inferior al determinat en els productes obtinguts en els Capítols 3 i 4, que era del 95,75 i 95,91 % respectivament, degut a que aquests productes van ser liofilitzats, el que va permetre una major deshidratació.

Taula 5.6. Grau d'hidròlisi (%) dels concentrats proteics obtinguts mitjançant hidròlisi de la fracció cel·lular de sang amb Flavourzyme. Es mostren les mitjanes \pm DE ($n = 3$).

Mostra	GH (%)
F1 total	28,69 \pm 0,00
F1 descolorat	27,05 \pm 0,00
F2 total	28,61 \pm 0,00
F2 descolorat	28,92 \pm 2,64
F3 total	23,86 \pm 0,77
F3 descolorat	27,05 \pm 0,00
Mitjana	27,37 \pm 1,91

Paral·lelament, l'activitat d'aigua presenta uns valors de 0,234 a 0,343, valors més baixos als obtinguts en l'assaig d'hidròlisi anterior, amb una a_w màxima de 0,446. Aquests valors permetrien garantir una gran estabilitat del producte a llarg termini si s'envasa en condicions d'estanqueïtat. Per altra banda, aquests valors d' a_w són superiors als trobats en els capítols anteriors, amb una a_w mitjana de 0,09 en el producte precipitat per àcid i 0,13 en el precipitat per escalfament. Aquestes diferències també són degudes a la menor quantitat d'humitat residual obtinguda amb la liofilització.

Taula 5.7. Composició química dels concentrats proteics obtinguts a partir de la hidròlisi de fracció cel·lular de sang mitjançant Flavourzyme. Es mostren les mitjanes \pm DE ($n=3$).

Fracció	Extracte sec (%)	a_w (25 °C)	Cendres (%)	Proteïna/extracte sec (%)	
S	1	92,55 \pm 0,69	0,244	8,73 \pm 0,10	85,70 \pm 0,05
	2	90,54 \pm 0,13	0,310	8,44 \pm 0,09	88,34 \pm 0,00
	3	90,32 \pm 0,10	0,343	8,13 \pm 0,02	87,10 \pm 0,88
SD	1	92,58 \pm 0,13	0,234	8,40 \pm 0,03	85,15 \pm 0,15
	2	90,49 \pm 0,06	0,266	8,43 \pm 0,10	87,50 \pm 0,21
	3	88,58 \pm 0,16	0,335	8,09 \pm 0,06	87,04 \pm 0,17
P	1	35,66 \pm 0,64	ND	0,70 \pm 0,02	94,58 \pm 0,60
	2	29,91 \pm 1,19	ND	0,78 \pm 0,03	103,17 \pm 0,79
	3	34,56 \pm 0,06	ND	0,76 \pm 0,00	99,38 \pm 0,46

S: sobrenedant deshidratat mitjançant atomització

SD: sobrenedant descolorat i deshidratat mitjançant atomització

P: precipitat sense tractament de deshidratació

Si ens fixem en el contingut de cendres, es pot observar una baixa variabilitat entre rèpliques, amb uns valors del 8,09 al 8,73 %, que són lleugerament inferiors als obtinguts en l'estudi hidrolític inicial, que presentava un contingut del 10-15 %. Aquesta variació es pot relacionar amb la variabilitat del propi tractament d'hidròlisi, en el que s'afegeix NaOH per neutralitzar la solució a mesura que avança la reacció. Els resultats obtinguts en els capítols 3 i 4 són de 1,11 i 2,34 %, valors molt inferiors degut a la metodologia emprada. Tot i que en el mètode de precipitació àcida també s'afegeix NaOH durant el procés, en aquell cas recuperem la fracció proteica insoluble, mentre que la major part de les sals que es formen són eliminades en l'etapa de rentat que es du a terme posteriorment, que no es pot realitzar en els hidrolitzats degut a que es conserva la fracció solubilitzada. Així, aquest alt contingut en cendres pot restar valor a l'ingredient proteic obtingut, tot i que es podria considerar la possibilitat d'eliminar-les amb una etapa de diafiltració o una ultrafiltració, prèvia a la deshidratació.

El contingut en proteïnes varia entre un 85,15 i un 88,34 % sobre l'extracte sec, valors similars als observats en els assajos anteriors, entre 79,9 i 89,99 respecte a EST, però amb una variabilitat menor. En tot cas, el percentatge de proteïnes és inferior al que s'obtenia en els productes descolorats sense hidròlisi, de 97,57 i 98,94 % pels descolorats amb precipitació àcida i tèrmica, respectivament. Com ja s'ha comentat, aquesta diferència s'explica per la major quantitat de sals presents en els hidrolitzats, que fa disminuir proporcionalment la concentració de proteïna en el producte final.

Pel que fa al precipitat, tot i que es va descartar el seu ús alimentari, es podria destinar a altres aplicacions com ara l'alimentació animal, pel que no es va sotmetre a descoloració. Els resultats de les anàlisis de composició mostren un alt contingut en proteïna, que va del 95 a quasi el 100 % sobre l'extracte sec. Els valors pel contingut en cendres són del 0,70 al 0,78 %, que, expressat sobre extracte sec, representa un 1,96 a un 2,6 %. Aquests valors evidencien la pèrdua d'una quantitat important de proteïna en aquesta fracció, que representa aproximadament un 20 % de la proteïna total que conté l'hidrolitzat sencer obtingut, per tant, seria imprescindible poder valoritzar aquesta fracció per fer econòmicament viable el procés. D'aquesta manera, poder valoritzar les dues fraccions pot suposar un benefici mediambiental i econòmic per l'empresa.

Zheng *et al.* (2014), van recuperar el sobrenedant sense dur-ne a terme la descoloració, i el deshidrataven mitjançant atomització juntament amb la fracció precipitada i descolorada, obtenint un concentrat proteic amb un $72,69 \pm 0,38$ % de proteïna, un extracte sec del $91,43 \pm 0,10$ %, unes cendres de $8,46 \pm 0,01$ % i un percentatge de lípids de $1,61 \pm 0,12$ %. Aquests valors són molt similars als obtinguts en les fraccions dessecades en aquest treball, tot i que el contingut en proteïna és relativament superior, amb un 79 % de proteïna aproximat sobre producte sencer. Gómez-Juárez *et al.* (1999) obtenien un hidrolitzat a partir de fracció cel·lular de sang bovina amb Papaïna amb un percentatge de proteïna del 75%, valor molt semblant al determinat en aquest estudi, tot i que el percentatge de cendres, de l'1 %, era molt menor.

Caracterització del color

A les figures 5.8 i 5.9 es mostren els resultats obtinguts en la determinació del color de les fraccions sobrenedant i precipitat procedents dels hidrolitzats de fracció cel·lular amb Flavourzyme.

Tal com es mostra en la Taula 5.8, s'obté una descoloració significativa ja immediatament després de la hidròlisi, una amb bona reproductibilitat entre els colors de les rèpliques. Aquests resultats representen una gran millora en el producte final obtingut respecte als obtinguts en el Capítol 4, en la hidròlisi de la sang sencera, on s'obté un producte a partir de la fracció precipitada amb una coloració molt fosca.









L'anàlisi estadística ha determinat diferències significatives ($P < 0,05$) entre els hidrolitzats amb o sense tractament de descoloració mitjançant peròxid per tots els paràmetres del color de l'escala CIE $L^*a^*b^*$, el que determina que l'ús del peròxid en les condicions assajades permet l'obtenció d'un producte amb més lluminositat i una tonalitat menys vermella i menys groga; en general, un color més clar.

Si es comparen els resultats amb els obtinguts en el mètode no hidrolític de precipitació àcida mitjançant un 0,75 % de peròxid d'hidrogen a una temperatura de 60 °C (millors condicions de descoloració mitjançant aquest mètode) (Capítol 4), on s'observa uns paràmetres del color de L^* : 47,32; a^* : 5,22 i b^* : 16,57, s'observa una major lluminositat tant per S com per SD. Respecte al paràmetre a^* , és major que en la fracció S i menor en la fracció SD, el que indica un clar efecte descolorant del peròxid sobre el color vermell, i més eficàcia en el producte hidrolitzat. Pel paràmetre b^* , s'observen valors similars en la fracció obtinguda per precipitació àcida respecte l'hidrolitzat descolorat SD.

Per altra banda, els resultats obtinguts en el mètode per precipitació tèrmica amb un tractament a 90 °C (condicions idònies pel que fa al color) són de L^* : 61,52; a^* : 5,77 i b^* : 25,85. Aquests representen menor lluminositat que S i SD, un to vermell intermedi entre S i SD, i una b^* més similar al producte S que a SD, indicant una coloració menys groga el producte hidrolitzat descolorat.

En l'estudi de la hidròlisi de la fracció de la sang no s'ha valorat la utilització de la fracció precipitada degut a que no presentava suficient grau de descoloració utilitzant concentracions baixes de peròxid. Tot i això, es va determinar el color de la fracció sense deshidratar (Taula 5.9), que presentava una baixa lluminositat (L^* : 16,22), un to vermellós similar al del sobrenedant (a^* : 14,28), una b^* bastant baixa (b^* : 4,85) i un cromà similar a la fracció de sobrenedant descolorada (C^* : 15,07), el que indica la mateixa saturació del color. Aquests resultats mostren que no hi ha una descoloració acceptable i, a més, aquesta és molt inferior als obtinguts al capítol 4 en recuperar la fracció insoluble dels hidrolitzats de sang sencera.


Taula 5.8. Color dels concentrats proteics obtinguts mitjançant hidròlisi de la fracció cel·lular de sang amb Flavourzyme. Es mostra les mitjanes \pm DE ($n = 3$) dels paràmetres CIE $L^*a^*b^*$, croms, tonalitat i els valors i representació de l'escala RGB del sobrenedant, el sobrenedant descolorat (S i SD respectivament) i la mitjana de les 3 repeticions. Les lletres diferents indiquen diferències significatives entre tractaments ($P < 0,05$).

Rèplica		Paràmetres color						
		L^*	a^*	b^*	Croma	Tonalitat	RGB	
F1	SD	86,08 \pm 0,15 ^a	2,11 \pm 0,11 ^a	15,89 \pm 0,53 ^a	16,03	82,45	228 213 185	
	S	72,40 \pm 0,03 ^b	12,20 \pm 0,13 ^b	18,82 \pm 0,16 ^b	22,43	57,04	209 169 144	
F2	SD	79,55 \pm 0,09 ^a	3,24 \pm 0,11 ^a	18,26 \pm 0,29 ^a	18,55	79,19	213 194 164	
	S	62,63 \pm 0,13 ^b	18,96 \pm 0,06 ^b	21,82 \pm 0,06 ^b	28,90	79,94	192 138 114	
F3	SD	83,94 \pm 0,28 ^a	2,38 \pm 0,17 ^a	18,55 \pm 0,46 ^a	18,70	79,20	224 207 174	
	S	66,71 \pm 0,30 ^b	16,20 \pm 0,16 ^b	20,74 \pm 0,17 ^b	26,32	52,00	199 151 126	
Mitjana	SD	83,19 \pm 3,33	2,58 \pm 0,59 ^a	17,57 \pm 1,46 ^a	17,76 \pm 1,50	81,69 \pm 1,52	222 205 174	
	S	67,25 \pm 4,91	15,79 \pm 3,40 ^b	20,46 \pm 1,52 ^b	25,88 \pm 3,26	52,59 \pm 4,06	200 153 128	

S: sobrenedant

SD: sobrenedant descolorat

Taula 5.9. Color de la fracció precipitada dels concentrats proteics obtinguts mitjançant hidròlisi de la fracció cel·lular de sang amb Flavourzyme. Es mostra les mitjanes \pm DE ($n = 3$) dels paràmetres de l'escala CIE $L^*a^*b^*$, el croms, la tonalitat i els valors i representació de l'escala RGB.

Color precipitat						
L^*	a^*	b^*	Croma	Tonalitat	RGB	
16,22 \pm 0,35	14,28 \pm 0,46	4,85 \pm 0,31	15,08	18,76	60 32 34	

Així, els resultats obtinguts en aquest últim experiment han mostrat eficàcia en l'obtenció d'un producte amb una notable major descoloració que la resta de tractaments analitzats en aquesta línia, utilitzant el procés d'hidròlisi de la fracció cel·lular seguit de la descoloració amb peròxid d'hidrogen per obtenir un producte proteic dessecat descolorat. La fracció obtinguda que no se li ha aplicat el tractament amb peròxid d'hidrogen no ha mostrat un resultat desitjable de cares a la coloració final.

Zheng *et al.* (2014), en el seu assaig on recuperaven el sobrenedant i descoloraven el precipitat obtingut, van determinar un color de L^* : 60,74 \pm 0,36; a^* : 8,04 \pm 0,01 i b^* : 27,86 \pm 0,14, el que representa un producte amb menor lluminositat, un color més grogós i vermellós respecte els dos productes obtinguts en aquest estudi.

Electroforesi SDS PAGE

Els resultats per l'estudi del perfil proteic dels hidrolitzats de fracció cel·lular mitjançant gel SDS-PAGE d'alta densitat es mostren a la Figura 5.5, on es poden observar les diferents bandes de proteïnes presents en els gels de poliacrilamida. En la fracció precipitada és on s'observen més bandes, les més marcades a l'alçada de 30 i 15 kDa, el que correspondria a proteïnes del plasma o de la membrana dels glòbuls vermells com l'eritropoetina o a la globulina fixadora d'hormones tiroides (36,6 kDa) (Marco i Riera, 2001) i a les subunitats α i β de l'hemoglobina (16 kDa), respectivament.

En els sobrenedants, la banda corresponent a les subunitats de l'hemoglobina es troba menys marcada, el que indica una menor quantitat d'aquesta en relació a la fracció precipitada de l'hidrolitzat. La banda de 30 kDa també s'aprecia, però en una intensitat molt menor. Per altra banda, s'observen bandes que no estan presents en el precipitat, a l'alçada de 220, 50, 60 i 70 kDa, a més a més d'altres bandes tènues que sí apareixien en el precipitat, a l'alçada de 30, 10, 5 i 3,4 kDa. Aquests resultats són similars als determinats per Zheng *et al.* (2014). Les bandes de major pes podrien correspondre a proteïnes no hidrolitzades, o proteïnes d'alt pes molecular poc hidrolitzades que romanen dissoltes en el sobrenedant. Les bandes de més baix pes molecular corresponen a pèptids més petits producte de la hidròlisi.

Finalment, si ens fixem en els resultats del sobrenedant descolorat, es pot observar l'obtenció de pràcticament les mateixes bandes que s'observen en el sobrenedant sense descolorar però bastant més atenuades, especialment la banda que correspondria a les subunitats de l'hemoglobina, a l'alçada dels 15 kDa que queda bastant difuminada.

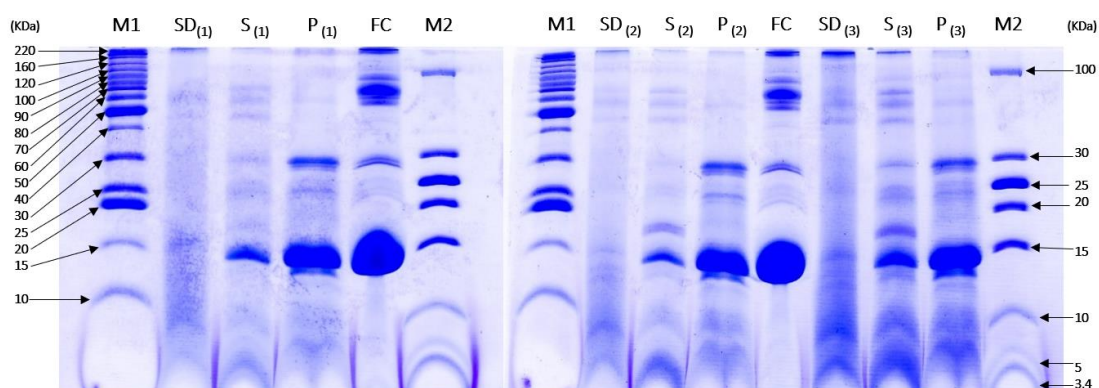


Figura 5.5. Electroforogrames obtinguts mitjançant electroforesi SDS-PAGE en gel de poliacrilamida d'alta densitat (20 %) de diferents fraccions procedents de fracció cel·lular de sang porcina hidrolitzada i descolorada. M1 (marcador de pes molecular de 10 a 220 kDa), M2 (marcador de pes molecular de 3,4 a 100 kDa), SD (sobrenedant descolorat), S (sobrenedant no descolorat), P (precipitat) i FC (fracció cel·lular de sang porcina control). El subíndex (Núm.) indica la rèplica.

Un aspecte que no s'ha estudiat en aquest assaig és el grau d'amargor de l'hidrolitzat obtingut, que sol ser bastant alt en aquest tipus de productes i representa un dels majors inconvenients en la seva utilització com a ingredient nutricional i/o tecno-funcional en productes alimentaris. L'amargor associada a la hidròlisi és un atribut no desitjat. Es creu que està causada per pèptids d'una certa mida amb aminoàcids hidrofòbics terminals. Les exopeptidases degraden els pèptids amargs. És per això que, normalment, es recomana una barreja d'endo- i exo-peptidases per reduir l'amargor dels hidrolitzats amb alts valors de GH (Novozymes, 2022). Zheng *et al.* (2014) van determinar que els hidrolitzats que obtenien a partir de sang d'ànec no presentaven una amargor significativa, degut a utilitzar endo i exopeptidases en el procés d'hidròlisi (proteasa neutra i Flavourzyme). En aquest assaig s'ha utilitzat el Flavourzyme, que conté endo i exopeptidases, pel que s'esperaria una menor intensitat de l'amargor del producte. Així, en un futur, si l'empresa ho considera, seria necessari dur a terme un estudi per determinar-ho.

Per altra banda, també és de gran interès l'estudi de les possibles propietats tecno-funcionals de la fracció hidrolitzada i descolorada, com serien la capacitat escumejant, emulgent, de retenció d'aigua, viscositat, sorció, etc. El producte final en pols obtingut ha demostrat tenir una alta tendència higroscòpica, hidratant-se amb molta facilitat en contacte amb l'ambient i perdent l'estabilitat, formant aglomerats densos. És per això que caldria assegurar un envasat hermètic, amb un material eficient com a barrera per la humitat, per mantenir estables les característiques del producte en pols. Per altra banda, es tracta d'un producte amb una alta solubilitat, el que facilitaria la seva aplicació en la formulació d'aliments.

Addicionalment, una altra característica d'interès a estudiar en aquest producte seria l'activitat biològica donada per la presència de pèptids bioactius. Les potencials activitats fisiològiques dels pèptids bioactius podrien incrementar el valor afegit del producte final obtingut. Aquests pèptids poden presentar característiques antioxidants, antimicrobianes i antihipertensives, entre d'altres, descrites en molts hidrolitzats procedents de l'hemoglobina, la fracció cel·lular, així com d'altres proteïnes de la sang (Verma *et al.*, 2018a i 2018b; Beaubier *et al.*, 2021).

5.5. CONCLUSIONS

1. El tractament d'hidròlisi enzimàtica aplicat sobre la fracció cel·lular que ha mostrat un major grau de descoloració ha estat el dut a terme utilitzant l'enzim *Flavourzyme*, a 50 °C i pH 7 durant 7,5 h, i l'aplicació d'un tractament de descoloració mitjançant peròxid d'hidrogen.
2. S'ha descartat l'aplicació combinada dels enzims *Neutrasa* i *Flavourzyme* degut a presentar pitjors resultats en quant al grau de descoloració.
3. El concentrat proteic obtingut mitjançant *Flavourzyme* es presenta en forma de pols seca d'alta solubilitat, amb una coloració marró clara-beix. Els paràmetres de color assolits (L*: 83,19; a*: 2,58; i b*:17,57) mostren que aquest és el procediment que permet la màxima descoloració de tots els mètodes assajats en aquest treball. La composició química d'aquest producte és d'un mínim del 85 % de proteïna, un 8-9 % de cendres, i un extracte sec de més del 90 %.
4. S'obté un grau d'hidròlisi d'aproximadament el 27 %. En l'anàlisi electroforètica s'observen pèptids de baix i alt pes molecular, entre ells pèptids de 15 kDa que corresponen a les dues subunitats de l'hemoglobina no hidrolitzades.
5. El rendiment que s'obté en el processat de la sang mitjançant aquest mètode és molt baix, oscil·lant entre un 30 i un 50 % de proteïna recuperada, el que suposa una limitació important en l'aplicació d'aquesta metodologia a escala industrial. Així, només seria econòmicament viable donant valor a la fracció insoluble no descolorada.

CAPÍTOL 6: PLANTA PILOT

CAPÍTOL 6. PLANTA PILOT

6.1. INTRODUCCIÓ

La construcció d'una planta pilot demostrativa per la producció d'un ingredient proteic descolorat a partir de sang d'escorxadors, per part de l'empresa Talleres Azuara, S.L., està englobada dins d'un projecte del programa d'investigació i innovació SMI *Horizon 2020* de la Unió Europea amb nº 766747, amb títol "Hydroblood".

Aquest projecte, titulat "Planta de processament innovadora per la producció òptima de Proteïna Hidrolitzada i Descolorada (PHD)", pretén presentar al mercat una solució que permeti optimitzar el procés de producció de proteïnes pel consum animal i humà, en un procés rendible que alhora redueixi l'impacte ambiental de la sang produïda pels escorxadors, permetent fabricar dos productes: un extracte proteic per a alimentació animal, obtinguda a partir de sang tècnica (sang recuperada amb contaminació microbiològica, no apte pel consum humà), i un concentrat proteic destinat a l'alimentació humana, a partir de sang higiènica (sang recuperada en condicions higièniques, apte pel consum humà). Per aconseguir aquest objectiu es planteja construir una planta pilot industrial en base a la planta pilot de mida reduïda de la que ja disposava Talleres Azuara S.L., per així poder presentar la tecnologia a potencials clients interessats.

El principal avantatge al·legat és la disposició d'una tecnologia que milloraria la reducció de residus generats als escorxadors, permetent la revaloració d'un subproducte animal generat en gran volum com és la sang, obtenint alhora un producte proteic d'alt interès degut a les seves propietats d'alta digestibilitat, alt contingut proteic i unes característiques fisicoquímiques interessants per ser utilitzat com a ingredient alimentari en la formulació de diferents aliments.

Procés productiu de la proteïna hidrolitzada i descolorada (PHD) del Projecte Hydroblood:

Per obtenir el producte proteic a partir de sang sencera s'ha partit del procés patentat i definit per Florido (2008), descrit en el Capítol 2, apartat 3.3.3. Aquets procés permet:

- Obtenir un concentrat proteic descolorat sense la necessitat d'utilitzar un procés tèrmic sobre la sang.
- Extreure un 65 % més de proteïna en comparació a productes procedents de plasma (192 g/L de proteïna enfront 67 g/L). El producte obtingut conté fins a un 95 % de proteïna d'alta digestibilitat, mentre que altres productes com el plasma només en contenen un 75-80 %.
- Disminuir en gran mesura l'impacte ambiental que comporta el gran consum d'energia associat a processos d'escalfament i refrigeració per transformar la sang en aliments aptes pel consum

animal, els quals poden arribar a suposar del 45 al 90 % del consum elèctric total del procés de recuperació.

Per poder demostrar l'eficàcia de la tecnologia estudiada pel tractament de sang sencera d'escorxador, es van establir els següents objectius generals dins del projecte *Hydroblood*:

- Construcció, escalat i optimització d'un prototip de planta pel processat de sang d'escorxador: es va establir un escalat de la planta pilot de 150 L de capacitat a una planta industrial demostrativa amb capacitat per tractar 4000 L diaris de sang en diferents lots. Aquesta serà construïda en una nau industrial situada dins les instal·lacions de l'escorxador Mafrica (Sant Joan de Vilatorrada, Espanya).
- Automatització del procés per assegurar la qualitat del producte obtingut, implementant un sistema de control remot.
- Autorització sanitària de la planta industrial per produir producte tant pel consum animal com humà.
- Definició d'un pla de negoci, estratègia de comercialització, estudi de costos i beneficis i estudi i estratègia de mercat.

Aquests objectius s'han englobat dins de l'actual capítol, per seguir amb la línia de recerca de la tesi i, a la vegada, dur a terme el projecte *Hydroblood*.

6.2. OBJECTIUS

L'objectiu era contribuir en el disseny i la posta en marxa d'una planta pilot demostrativa per obtenir un concentrat proteic descolorat a partir del tractament de sang porcina d'escorxadors mitjançant la metodologia seleccionada i optimitzada a nivell de laboratori, en el marc del conveni de Doctorat Industrial entre l'empresa Azuara S.L. i el grup de Tecnologia Alimentària de la UdG.

Els objectius específics van ser:

1. Contribuir en la selecció dels equips més adients per dur a terme cada fase del processat a partir de sang de porc sencera fins a l'envasament del concentrat proteic.
2. Realitzar l'escalat industrial del procés.
3. Revisió del procés d'automatització mitjançant el *software* escollit per l'empresa.
4. Analitzar el producte obtingut a la planta pilot demostrativa per determinar que compleix els paràmetres higiènics desitjats i establerts per la legislació, realitzant-ne una caracterització fisicoquímica i microbiològica.
5. Dur a terme les certificacions pertinents, en col·laboració amb el Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural (DACC) de la Generalitat de Catalunya, permetent que la planta pilot sigui operativa a nivell comercial.
6. Definir el sistema d'Anàlisi de perills i punts de control crític (APPCC) a nivell de la planta demostrativa.

6.3. MATERIAL I MÈTODES

6.3.1. Disseny experimental

Aquest capítol s'ha dividit en 4 parts diferenciades i consecutives, que s'han dut a terme en col·laboració amb les diferents empreses i institucions implicades en el projecte *Hydroblood*. A la Figura 6.1 es mostra el pla de treball dut a terme per assolir els objectius de construir la planta pilot demostrativa per l'obtenció del concentrat proteic descolorat a partir de sang de porc d'escorxador. A continuació es descriu com es van dur a terme les diferents fases d'aquest capítol.

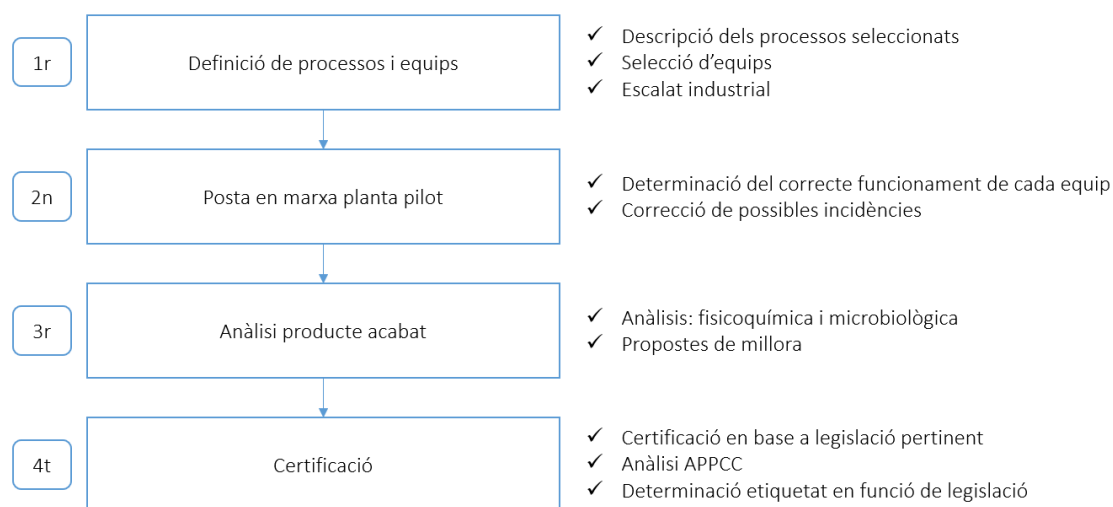


Figura 6.1. Diagrama del pla de treball corresponent a les diferents fases dutes a terme en la construcció, posta en marxa i validació de la planta pilot demostrativa.

6.3.2. Definició dels tractaments i equips de processat

Inicialment es va dur a terme la fase de definició de processos i equips, on es van descriure els processos seleccionats per obtenir els productes proteics desitjats i es va discutir quines eren les millors opcions en quan a les tecnologies i l'equipament per dur a terme cada etapa del procés. Aquesta fase es va desenvolupar mitjançant reunions periòdiques amb l'equip de Talleres Azuara S.L. i tècnics de l'enginyeria Ateknea Solutions Catalonia S.A., on es va realitzar l'escalat del procés segons les dades extretes de les proves de laboratori realitzades a la Universitat de Girona. Es van definir les diferents opcions de processat i maquinària de les que es disposava per dur a terme cada etapa del procés i, una vegada seleccionats els equips, es van establir les característiques de cada un: material, capacitat de volum, potència, material

auxiliar necessari, etc. Aquesta fase del projecte es va realitzar en el període del novembre del 2017 al maig del 2019.

A més, també es va dissenyar la millor opció per automatitzar i controlar el procés industrial mitjançant un software, definint els requeriments i processos necessaris de control de la producció a cada punt de la planta pilot. El programa utilitzat va ser l'aplicació software SCADA (*Supervisory Control And Data Acquisition*).

6.3.3. Posta en marxa de la planta pilot

En una segona fase, una vegada definits els equips a utilitzar en cada etapa del procés i les característiques de cada un, es va dur a terme el muntatge de la planta pilot, per part de cada proveïdor i dirigit per Talleres Azuara, i la posta en marxa de la mateixa. Aquesta fase va tenir una durada de 9 mesos (del juliol del 2019 al març del 2020) on es va provar cada equip per separat amb aigua i, posteriorment, amb mostres de sang d'escorxador, per així determinar el correcte funcionament de cada component de la planta i detectar els possibles errors i correccions a aplicar per obtenir el producte amb les característiques desitjades. Per aconseguir-ho, es van definir les característiques que havia de tenir el producte en cada etapa en funció dels resultats obtinguts en les proves de laboratori: característiques visuals, paràmetres de pH, temperatura, etc., i es van aplicar les correccions pertinents a cada equip fins a obtenir uns resultats satisfactoris.

Per dur a terme aquesta fase es va tenir en compte la documentació i els requeriments i procediments establerts per l'escorxador Mafrica; prevenció de riscos laborals (mòdul bàsic, segons normativa) (UEC, 2019) i la guia per a la implantació d'un sistema d'autocontrol (DARP, 2017).

6.3.4. Caracterització fisicoquímica i microbiològica del producte obtingut a la planta demostrativa

En una tercera fase es va analitzar el producte final obtingut, amb l'objectiu de determinar l'estat d'aquest i poder dur a terme les correccions de processat pertinents. Aquesta anàlisi del producte va consistir en una primera caracterització fisicoquímica, duta a terme per un laboratori extern (Biotechveg - Laboratorios de análisis agroalimentarios, Alacant, Espanya), que va encarregar l'empresa Azuara S.L. Les anàlisis van consistir en determinar el contingut nutricional: energia (càlcul teòric), greixos (mètode de Wijkstrom mitjançant un equip DOSI-FIBER), àcids grassos saturats (GC-FID), sucre (volumetria), fibra total (extracció àcida i mètode Soxhlet), proteïna (mètode Kjeldahl), sal (NaCl, volumetria), humitat (gravimetria) i cendres

(gravimetria), hidrats de carboni (càlcul per diferència), i l'aminograma d'una mostra de producte higiènic, apte pel consum humà, i una mostra de producte tècnic, destinat al consum animal (mitjançant HPLC-UV). A més, també es va realitzar la caracterització microbiològica de 5 mostres de producte tècnic, degut a que era un producte del primer procés que s'havia validat, determinant els recomptes d'aerobis mesòfils, enterobacteris i presència o absència de *Salmonella*. Aquesta primera anàlisi es va fer per tenir una primera aproximació de l'estat higiènic del producte obtingut.

Seguidament, una vegada es van ajustar les condicions del procés d'obtenció del producte higiènic, i per dur a terme un estudi més exhaustiu d'aquesta línia, es van recollir un total de 5 mostres, obtingudes en diferents dies a la planta demostrativa (n=5), que es van caracteritzar fisicoquímicament als laboratoris de la Universitat de Girona, determinant-ne el contingut en humitat, proteïna, greixos, cendres, ferro, calci i l'activitat d'aigua. Les determinacions fisicoquímiques es van realitzar utilitzant els procediments descrits a l'apartat 3.3.5.1 (Capítol 3). Totes les anàlisis es van realitzar com a mínim per duplicat sobre cada rèplica. També es van determinar els paràmetres CIE $L^*a^*b^*$, tal com s'ha descrit en l'apartat 3.3.5.2 (Capítol 3). A més, es va realitzar una caracterització microbiològica més completa d'aquestes mostres, determinant els recomptes totals d'aerobis mesòfils, enterobacteris, bacteris esporulants, Clostridis Sulfit Reductors, *Staphylococcus Coagulasa Positiuus*, *Listeria monocytogenes* i la presència o absència de *Salmonella*.

Els recomptes d'aerobis mesòfils viables (ISO 4822, 2013), enterobacteris (ISO 7402, 1993), *E. coli* (ISO 16649-2, 2001) i detecció de *Salmonella spp.* (EN/ISO 6579, 2002) es van realitzar tal com es descriu en el Capítol 3 (apartat 3.3.6). Per la resta de microorganismes es va seguir la següent metodologia:

* *Detecció i recompte de microorganismes esporulats i Clostridium sulfit reductors*

Un dels microorganismes esporulats més presents en els aliments contaminats és el *Bacillus cereus*, un bacteri gram positiu, anaeròbic facultatiu. Degut a la seva alta capacitat per créixer en un ampli interval de temperatures, juntament a la capacitat esporulant, fa que sigui un microorganisme difícil de controlar. Aquest es sol trobar present en aliments deshidratats, com l'analitzat en aquest treball.

El *Clostridium perfringens* és un bacil gram-positiu anaerobi facultatiu amb capacitat esporulant. Es sol trobar en aliments crus degut a contaminació per restes fecals i causa toxi-infeccions degut a la formació d'endotoxines.

En general, el grup de microorganismes *Clostridium* sulfit reductors s'utilitza com a indicadors de contaminació fecal en els aliments. La detecció i recompte de microorganismes esporulats (ISO 7932, 2014) es va realitzar preparant un banc de dilucions de la mostra en aigua de triptona (Oxoid Ltd., Basingstoke, Anglaterra). Aquestes, prèviament, es sotmetien a un xoc tèrmic en un bany a 80 ± 1 °C durant 5 min per dur a terme la germinació de possibles espores. Seguidament, les diferents dilucions es sembraven en massa en plaques amb medi PCA (Oxoid Ltd.) fos i temperat i s'incubaven a 31 ± 1 °C durant 72 h. Finalment, es feia el recompte de totes les colònies presents.

La detecció de *Clostridium* sulfít-reductors (ISO 7937, 2004) es duia a terme a partir de les mateixes dilucions anteriors amb xoc tèrmic. S'inoculava 1 mL d'aquestes dins de tubs d'assaig amb medi Agar Sulfít-Polimixina-Sulfidiazina (SPS) (Sharlab S.L., Espanya) a pH 7, líquid i temperat. Aquests es cobrien amb 1 mL de parafina estèril, per aconseguir condicions d'anaerobiosi, i s'incubaven durant 24-48 h a 46 ± 1 °C. Finalment, es comptaven les colònies negres.

* *Recompte d'Staphylococcus Coagulasa positius*

Els estafilococs són un grup de bacteris gram positius aerobis, representats per aproximadament 30 espècies. Una de les característiques de l'espècie *S. aureus* és que presenta activitat coagulasa, el que representa un gran perill per l'ésser humà, a més a més per la seva virulència, ja que poden produir enterotoxines termoresistents en els aliments, pel que és necessari el seu control en el sector alimentari. A més, *S. aureus* és un dels microorganismes més resistents a valors d'activitat d'aigua baixos (Condalab, 2021), essent un indicador de falta d'higiene durant el processament i contaminació provinent dels manipuladors.

El recompte d'*Staphylococcus* (ISO 6888-1, 2 i 3, 1999/2003) es va dur a terme a partir d'una suspensió inicial de la mostra en pols 10^{-1} . D'aquesta, se'n sembrava 0,1 mL en plaques de medi Baird Parker (Oxoid Ltd.) amb suplement d'emulsió estèril de rovell d'ou i tel·lurit potàssic (Oxoid Ltd.), i s'incubava a 35-37 °C durant 48 h. Per la confirmació, s'inoculaven 5 colònies en tubs de Brou Cervell i Cor (BHI) i s'incubava a 35-37 °C durant 24 h. Seguidament, es dipositaven 0,1 mL de les solucions en 0,3 mL de Plasma de Conill i s'incubava a 35-37 °C durant 4-6 h. La confirmació era positiva en els tubs que el coàgul format era major a la meitat original del líquid.

* *Recompte de Listeria monocytogenes*

El gènere *Listeria monocytogenes*, catalasa positiva, no esporulada i anaeròbia facultativa, forma part d'un grup de 6 espècies gram-positives amb morfologia de bacil. Aquesta, es troba habitualment en les plantes de processament d'aliments degut a que creix en un ampli interval de temperatures, el que comporta un major perill degut a la seva capacitat per causar malalties toxi-infeccioses, pel que el seu control és de vital importància.

El recompte de *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-1 i 2, 2017) es va realitzar a partir d'un enriquiment selectiu primari on es diluïa el producte proteic 1:10 en aigua peptonada tamponada (Sharlab S.L., Espanya) durant 1 h a 20 ± 1 °C. Seguidament, es sembrava en estria 1 mL de la solució en plaques de medi Listeria agar (Sharlab S.L., Espanya) i s'incubaven a 37 ± 1 °C durant 24 h. Finalment, en cas de detecció de colònies sospitoses (de color blau-verdoses), es duïen a terme les proves de confirmació mitjançant proves d'Api específiques per Listeria (Biomerieux S.A., França).

6.3.5. Autorització sanitària de la planta pilot i aplicació del sistema APPCC

En una última fase, es va dur a terme l'autorització sanitària de la planta pilot pel processament de la sang tècnica, apte pel consum animal, en base a l'estudi de la legislació corresponent, realitzat en l'apartat 1.3.4 (Capítol 1). En aquest apartat, també es va revisar i completar el Pla d'Anàlisi de Perills i Punts de Control Crític (APPCC) de la planta pilot industrial pel processament de sang higiènica, apte pel consum humà, realitzat per una empresa externa (Enginyeria i Consultoria Costa S.L., Barcelona, Espanya) a nivell general, per determinar els paràmetres i condicions lliandar en cada punt del procés d'obtenció del producte a la planta pilot.

Per poder dur a terme una anàlisi complementària acurada d'aquest pla APPCC es va utilitzar la documentació sobre "Aplicació pràctica del Sistema APPCC" facilitada per MCA Network Group, així com la Guia per a l'aplicació de l'autocontrol basat en el Sistema d'Anàlisi de Perills i Punts de Control Crític (APPCC), que es tracta d'un manual de referència editat per l'Agència Catalana de Seguretat Alimentària (ACSA), l'objectiu de la qual és ajudar als responsables d'empreses alimentàries i de pinsos a elaborar el seu Sistema d'APPCC i homogeneïtzar els criteris de la seva supervisió per part dels inspectors. Totes les empreses del sector alimentari han de garantir la seguretat dels seus productes en les fases de la cadena alimentària de les quals siguin responsables, des de la producció fins a la venda al consumidor final (ACSA, 2004). També es va utilitzar el Manual de seguretat alimentària del sector carni porcí: com gestionar els principals perills (INNOVACC, 2014).

Finalment, també es va dur a terme un estudi de l'etiquetat dels dos productes obtinguts a partir de sang tècnica i higiènica, en base a la documentació facilitada per l'Escola Agrària de l'Empordà en el "Curs taller d'etiquetatge per a petits elaboradors alimentaris", dins del Fons Europeu Agrícola de Desenvolupament Rural (2019). A partir d'aquest estudi es van desenvolupar unes propostes d'etiquetes comercials per aquests dos tipus de productes.

6.4. DEFINICIÓ DE PROCESSOS I EQUIPS

El disseny inicial de la planta pilot es va especificar per treballar en un sol *batch* al dia de 4000 L de sang, que era aproximadament el volum mitjà diari generat per l'escorxador. Aquest volum s'havia de processar en un reactor de 21000 L degut al gran volum d'escuma formada durant el procés. Tals capacitats de volum es justificaven en la limitació de temps de tractament necessari, amb una durada total de 10 a 12 h, pel que era indispensable la utilització d'un tanc de grans dimensions per poder assolir la producció prevista.

Després de l'optimització a escala de laboratori del procés estudiat, es va reduir el temps de tractament de la sang a unes 3 h, el que permetia una gran millora en l'eficiència i un procés més ràpid, permetent treballar varis *batch* per dia.

Per altra banda, també es va definir i estudiar el procés alternatiu per la transformació de la sang higiènica en un producte proteic apte pel consum humà.

Degut a l'alt interès de l'empresa per tractar tant la sang higiènica com la tècnica, es va decidir dissenyar una planta pilot que permetés processar ambdós tipus de sang, treballant amb dos processos específics ben diferenciats. Això va permetre definir equips compartits per ambdós processos, dissenyant dues línies de tractament de sang diferenciades que confluen en un punt de la línia de tractament. A continuació es descriuran les dues línies de processament de la sang.

6.4.1. Procés de transformació de sang tècnica

El processat de la sang tècnica es va establir seguint el procés patentat per Florido (2008), que permet obtenir un producte proteic a partir del tractament àcid de la sang, seguit d'una descoloració amb peròxid d'hidrogen a una concentració mínima del 3 %.

Aquest procés, bastant agressiu degut a les condicions d'acidesa i quantitat de peròxid d'hidrogen utilitzat, permet una major higienització de la sang, reduint en gran mesura la càrrega microbiològica de partida de la sang tècnica.

Per altra banda, degut al tractament amb àcid i base, és inevitable la formació d'una gran quantitat de sals, que hauran de ser eliminades mitjançant un major nombre de rentats.

Tot i això, aquest procés permet obtenir un producte alimentari apte pel consum animal a un cost final competitiu i menor al d'altres alternatives de tractament.

6.4.2. Procés de transformació de sang higiènica

El processat de la sang higiènica es va definir seguint el procés patentat per Lee *et al.* (2000), que s'havia posat a punt al laboratori de la UdG. Aquest es basa en aplicar un tractament tèrmic a la sang abans de ser descolorada mitjançant peròxid d'hidrogen amb una concentració del 0,75%, tal com es descriu en el capítol 4 (apartat 4.3.3).

Aquest procés implica un major cost respecte al processat de sang tècnica degut a l'aplicació d'altres temperatures (fins a 90 °C), però permet obtenir una major descoloració de la sang utilitzant la quantitat màxima de peròxid d'hidrogen establerta com a segura pel tractament de sang pel consum humà. A més, degut a que no es necessita l'addició d'àcids i bases durant el procés, el producte obtingut presenta un menor percentatge final de sals.

6.4.3. Línies de tractament

Es distingeixen dues línies de processat en funció de la matèria primera utilitzada, que pot ser sang de porc tècnica o higiènica.

La sang tècnica és recollida per l'escorxador de forma automatitzada en una canal durant el degollat dels animals (capítol 1, apartat 1.3.2), i és enviada directament a un tanc refrigerat i en agitació amb l'addició d'anticoagulant. Aquesta sang, que actualment no es tracta *in situ*, és recollida diàriament per ser processada per una empresa externa.

Degut a que l'escorxador Mafrica no disposa de la instal·lació d'un sistema tancat per recollir la sang higiènica, aquesta s'ha recollit utilitzant un sistema portàtil compost per un ganivet tubular que bombeja la sang directament a un tanc, on s'afegeix l'anticoagulant. Aquest mètode permet obtenir petites quantitats de sang de forma manual. Aquesta sang es conserva en refrigeració, en un tanc de 1000 L amb agitació, durant un màxim de 48 h abans de ser processada.

Cada tipus de sang és tractada a la planta pilot en tancs diferenciats per obtenir la precipitació i descoloració de la proteïna. A partir d'aquest punt, els processos conflueixen en la centrifugació, assecat i ensacat, el que impedeix la producció d'ambdós tipus de producte alhora, però sí que permet escollir elaborar el producte desitjable segons la disponibilitat de matèria primera.

Descripció del procés de tractament de sang higiènica

A la Figura 6.2 es pot observar l'esquema del procés seguit en el processat de la sang higiènica i els equips de la planta pilot industrial necessaris per a cada etapa del procés. Les diferents etapes del procés es descriuen a continuació:

1. Hemòlisi de la fracció cel·lular: el procés s'inicia amb el traspàs de la sang higiènica del tanc pulmó, on roman en refrigeració i agitació fins a 48 h després del degollat, fins al *triagi* (equip format per un tanc amb un sistema d'agitació i camisa de vapor que permet l'escalfament del producte). En aquest, s'hi afegeix la mateixa quantitat d'aigua que de sang, per així produir l'hemòlisi i alliberar el contingut proteic de l'interior dels eritròcits.

2. Tractament tèrmic: la barreja de sang i aigua és escalfada mitjançant la camisa de vapor del *triagi* fins a 90 °C, mantenint la temperatura durant 10 min quan és assolida. Durant aquest procés, s'activen els dos mecanismes de pales que agiten el producte en direccions contràries, a més a més de rascar les parets mitjançant unes pales laterals, per evitar que la sang es sobreescalfi per acumulació de calor a les parets del tanc. Si és necessari, s'activa l'homogeneïtzador a intervals, situat a la part inferior del mateix *triagi*, per disgregar els possibles coàguls formats.

3. Descoloració: un cop transcorreguda l'etapa de 10 min a 90 °C, el producte es traspassa a un dels dos tancs pulmó connectats lateralment al *triagi*, de 500 L cada un. Seguidament, s'afegeix un 0,75 % de peròxid d'hidrogen (al 50 % v/v) sobre sang sencera per descolorar el producte que ha adquirit un color marró fosc. Perquè la descoloració sigui homogènia és important mantenir el producte en agitació constant mitjançant l'agitador en hèlix de cada reactor. La fase de descoloració no pot superar els 30 min de durada, doncs un temps major d'exposició de la sang al peròxid d'hidrogen podria comportar la formació de reactius d'oxidació perillosos pel consum.

A la Taula 6.1 es poden observar els paràmetres mitjans que es van utilitzar en les primeres tres etapes (hemòlisi, tractament tèrmic i descoloració) del processat de la sang higiènica, partint de 100 L de sang:

Taula 6.1. Paràmetres utilitzats en el processat de sang higiènica en la planta pilot industrial.

Processat sang higiènica (1 batch)	
Paràmetre	
Sang higiènica	100 L
Aigua de xarxa	100 L
Peròxid d'hidrogen (50%)	1,5 L
Volum total	201,5 L
Temperatura	90 °C

Es pot observar que, de mitjana, es tracten 100 L de sang per *batch*. Aquest volum ve delimitat per la capacitat del *triagi*, de dimensions reduïdes. És per aquest motiu que es va optar per utilitzar dos reactors pulmó que permetessin descolorar producte seqüencialment i així poder augmentar la productivitat.

A més a més del volum, un altre factor limitant del procés higiènic és el temps del tractament tèrmic del producte, que pot arribar a ser de fins a una hora en total, en funció del funcionament òptim de l'equip.

Si no es tenen en compte les desviacions de temps per manipulació, el processat de la sang higiènica, fins a entrada de centrifuga, té una durada aproximada de 1,5-2 h.

4. Neteja: Un cop transcorreguts els 30 min de descoloració, es buida el tanc i el producte és expulsat directament a les parets del tambor de la centrifuga en funcionament, separant les aigües residuals, que contenen les restes de peròxid d'hidrogen, del producte precipitat. Seguidament, i sense parar la centrifuga, es renta el producte abocant aigua directament a les parets. Quan s'acaba la fase de neteja, un rascador fa caure el producte de la centrifuga, per gravetat, a una tremuja situada a la part inferior.

5. Assecat: el producte que ha caigut a la tremuja és conduït cap a un extrusor, amb l'ajut d'unes pales, on és disgregat i dosificat directament dins l'assecador tipus JET. Aquest escalfa les partícules disgregades de producte durant un temps mínim, suficient perquè el producte s'assequi sense cremar-se i, seguidament, allibera el producte i el condueix fins a un filtre de mànigues. El filtre permet separar les partícules seques de l'aire d'assecat.

6. Micronització: una vegada separades les partícules de producte deshidratat de l'aire d'assecat, es condueix cap a un molí micronitzador mitjançant un alimentador vis sens fi. El producte només és micronitzat si es detecta heterogeneïtat de grandària de partícula.

7. Ensacat: finalment, el producte cau per gravetat a una petita tremuja que condueix a l'ensacadora manual, on és introduït en sacs que seran segellats hermèticament.

PROCÉS HIGIÈNIC

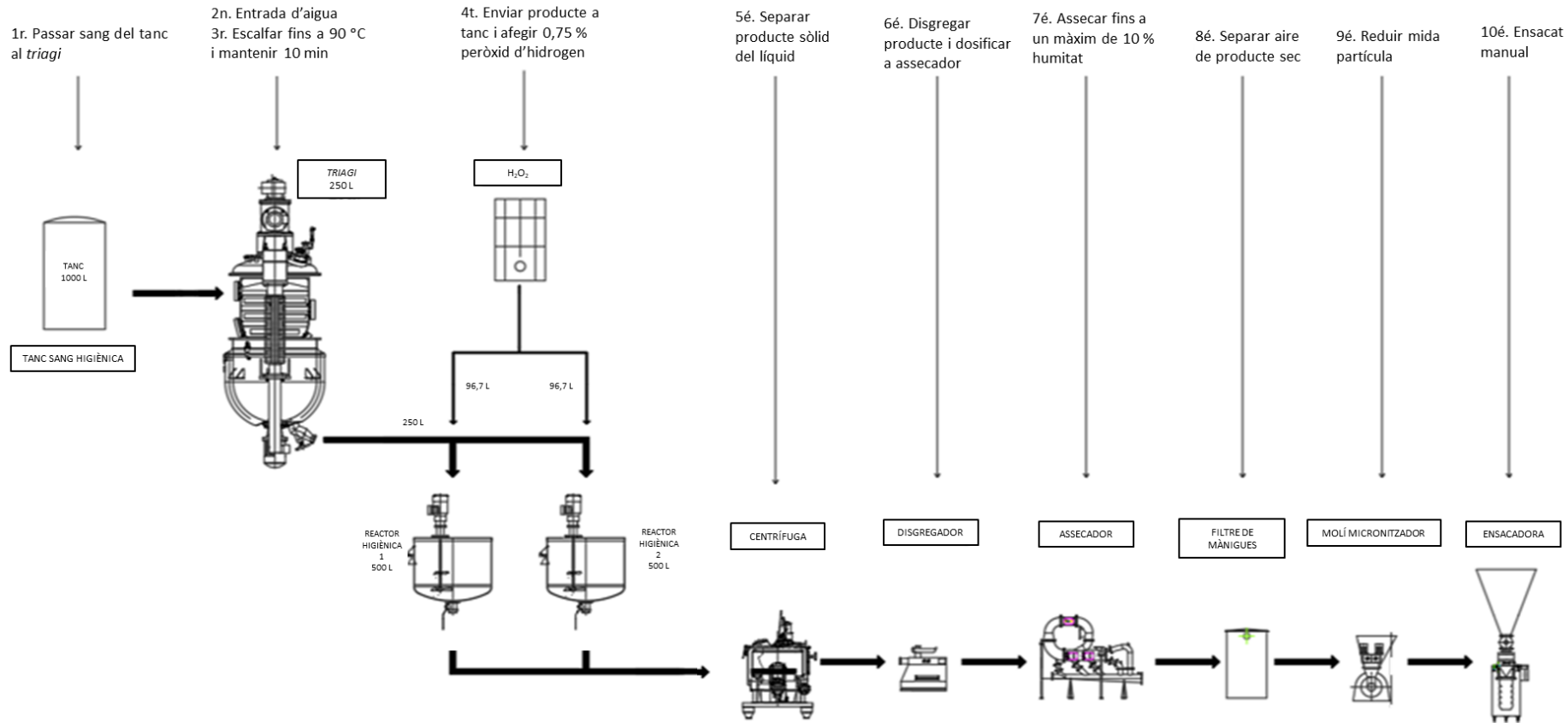


Figura 6.2. Esquema del procés i equips utilitzats en el processat de sang higiènica. Imatge modificada a partir d'Azuara S.L. (2019).

Descripció del procés de tractament de sang tècnica

A la Figura 6.3 es pot observar l'esquema del procés seguit en el processat de la sang tècnica i els equips de la planta pilot industrial necessaris per a cada etapa. Les diferents etapes del procés es descriuen com:

1. Hemòlisi: el procés s'inicia amb el traspàs de la sang tècnica des del tanc de l'escorxadador (on la sang roman en refrigeració i agitació fins a 24 h després del degollat) fins a un dels dos tancs pulmó de 4000 L de capacitat total. Seguidament, s'afegeix la mateixa quantitat d'aigua per aconseguir l'hemòlisi dels eritròcits.

2. Acidificació i neutralització: s'afegeix àcid clorhídric al 18 % (v/v) per disminuir el pH de la solució fins a un valor de $1,5 \pm 0,5$. Aquest pas es du a terme en condicions d'agitació constant mitjançant un agitador de doble hèlix del que disposa el tanc. Una vegada aconseguit el pH desitjat, es manté el producte en agitació durant 15 min. Transcorregut aquest temps, es procedeix a neutralitzar el pH del producte amb l'addició d'hidròxid de sodi al 50 % (v/v) fins a un valor de $6 \pm 0,5$.

3. Descoloració: després del procés de neutralització fins al pH desitjat, sempre en constant agitació del producte, s'incorpora el peròxid d'hidrogen al 50 % (v/v) a una concentració final del 3 % de peròxid sobre sang sencera. El procés de descoloració mínim és de mitja hora, tot i que si es desitja es pot allargar fins a varies hores per obtenir una major descoloració sense la necessitat d'utilitzar majors quantitat de peròxid. Cal destacar que com més peròxid s'utilitza, més volum d'escuma es genera, el que representa una problemàtica tant pel volum que suposa respecte a la capacitat total del tanc, com per la dificultat de treballar amb escuma en una planta industrial.

A la Taula 6.2 es poden observar les quantitats mitjanes de productes i reactius utilitzats pel processat de la sang tècnica en les 3 primeres etapes del procés:

Taula 6.2. Paràmetres utilitzats en el processat de sang tècnica en la planta pilot industrial.

Processat sang tècnica (1 batch)	
Paràmetre	
Sang tècnica	350 L
Aigua de xarxa	350 L
Àcid clorhídric (18 %)	15 L / pH 1,5
Hidròxid de sodi (50 %)	17 L / pH 6
Peròxid d'hidrogen (50 %)	25 L
Volum total	755 L

Com es pot observar, es processa una mitjana de 350 L de sang per tanc/*batch*, valor molt inferior a l'inicialment estimat, de 700 L. Aquesta diferència és conseqüència de la formació de grans volums d'escuma durant el procés de descoloració; l'escuma es forma per la pròpia reacció del peròxid d'hidrogen amb el producte que, a més, es veu accentuada per l'agitació intensa. És per aquest motiu que es va afegir

un segon tanc pulmó on preparar producte seqüencialment, per així poder alimentar la centrífuga de forma semi-contínua i augmentar la productivitat del procés. El processat de la sang tècnica, fins a l'entrada de centrífuga, dura una mitjana d'1,5 h.

4. Neteja, assecat, micronització i ensacat: Un cop acabat el temps de descoloració, el producte és dirigit a la centrífuga, seguint el mateix procés utilitzat per la sang higiènica. D'igual manera, el producte passarà per gravetat a la tremuja inferior de la centrífuga, serà disgregat, deshidratat, micronitzat en el cas que sigui necessari i, finalment, ensacat i segellat.

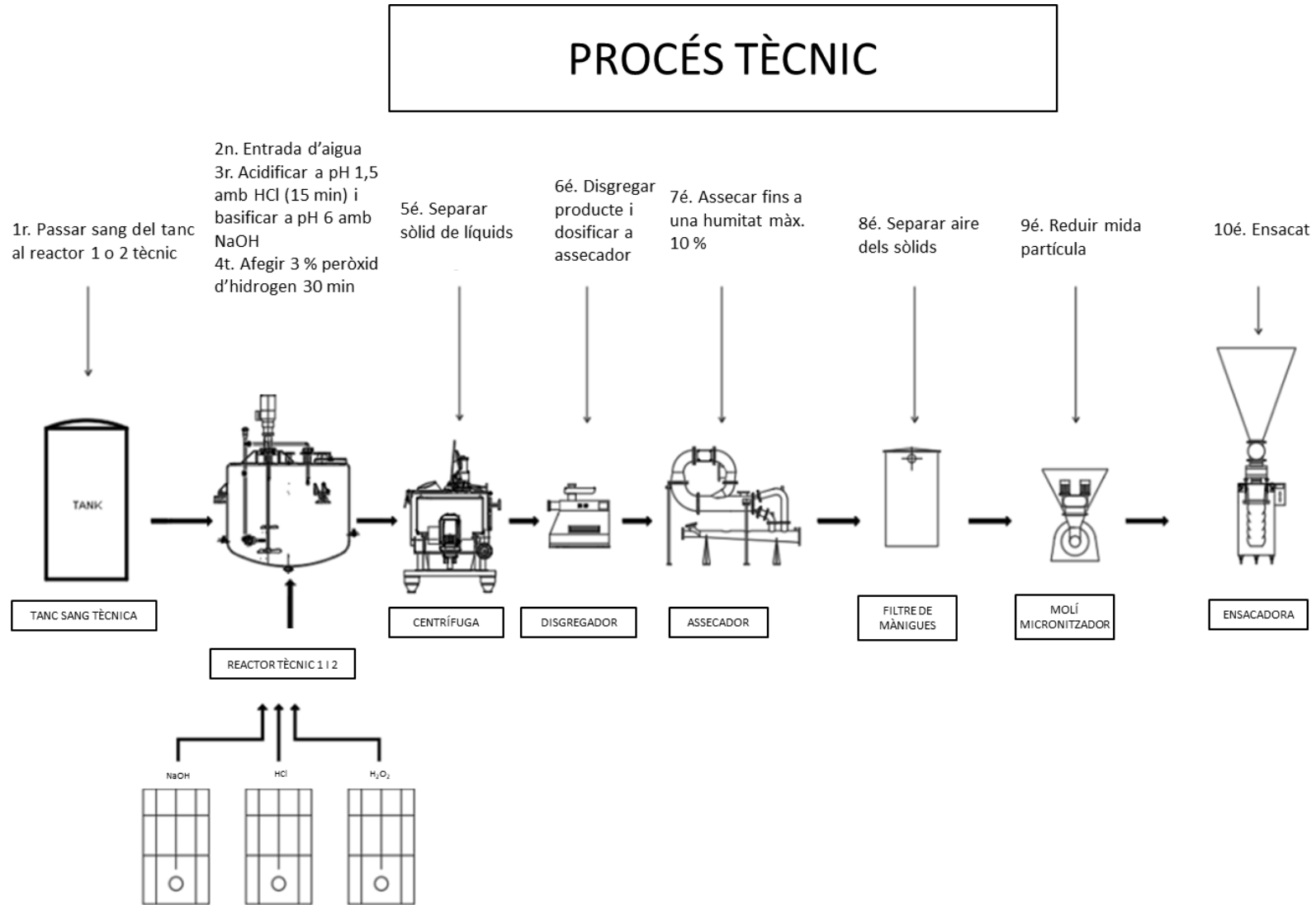


Figura 6.3. Esquema del procés i els equips utilitzats en el processat de sang tècnica. Imatge modificada a partir d'Azuara S.L. (2019).

6.4.4. Aigua de procés

L'aigua utilitzada tant en el processat de la sang com en la neteja dels equips mitjançant CIP prové de les dues fonts de xarxa d'aigua de l'escorxador Mafrica. Es tracta d'aigua clorada provinent dels rius Cardener i Llobregat. A la Taula A2.1 (Annex 2) es mostren els paràmetres determinats analíticament per cada una.

L'aigua del riu Cardener es caracteritza per presentar una gran quantitat de sals (221 mg/L de clorurs i conductivitat de 1382 $\mu\text{S}/\text{cm}$), pel que té un preu inferior a l'aigua del Llobregat, amb un menor percentatge de sals (42 mg/L de clorurs i conductivitat de 434 $\mu\text{S}/\text{cm}$) i, per tant, una millor qualitat.

La utilització de l'una o l'altra pot afectar a la rendibilitat del procés, representant un major cost directe per l'ús d'una aigua de preu més elevat, o indirecte per l'ús d'una aigua amb major duresa que implicaria la necessitat d'un major nombre de rentats del producte o la necessitat d'un tractament d'aigües residuals més intens. Així, tot i que es desconeix com afectarà aquest paràmetre en les característiques finals del producte, serà important tenir-lo en compte en l'ajust del procés i els equips.

6.4.5. Components i característiques de la planta pilot

Tal com es descriu en els apartats anteriors, el disseny de la planta pilot s'ha dut a terme definint dues línies de processat diferenciades que conflueixen a partir del punt de centrifugat i neteja, el que implica la impossibilitat de processar ambdós tipus de producte alhora. Els equips seleccionats per aquestes línies es mostren de forma esquemàtica en la Figura 6.4:

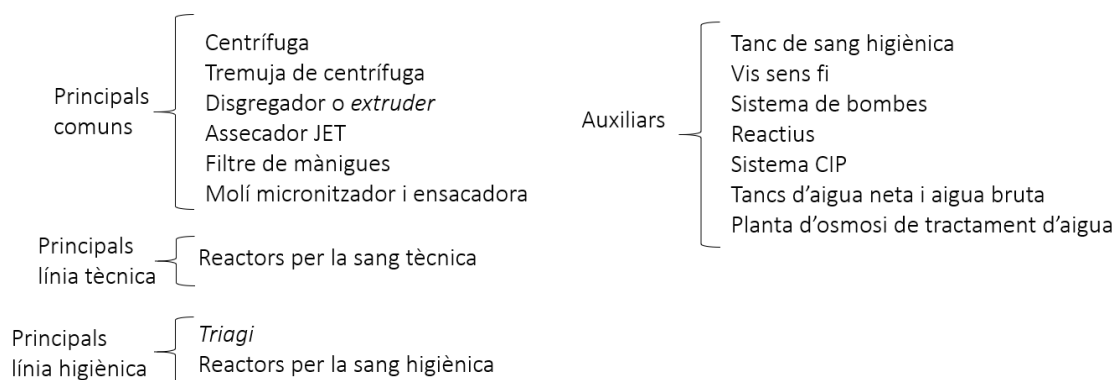


Figura 6.4. Equips seleccionats pel processament de la sang higiènica i la tècnica i equips i materials auxiliars dels processos.

A la Figura 6.5 es mostra l'esquema de l'estructura general de la planta industrial demostrativa; es pot observar com ambdues línies de processat, la higiènica en blau fosc i la tècnica en taronja, parteixen dels tancs d'emmagatzematge de sang, que mantenen la sang en refrigeració i agitació. El tanc de sang tècnica no es va haver de dissenyar degut a que l'escorxador ja en disposava d'un. La sang és enviada als respectius tancs mitjançant les diferents línies en iniciar cada procés. Després del tractament de la sang per obtenir el producte precipitat i descolorat, aquest és enviat a la centrífuga per ser netejat, on conflueixen les dues línies de processament. Seguidament, el producte és disgregat, assecat, separat de l'aire mitjançant el filtre de mànigues, micronitzat (sempre que és desitja) i ensacat.

En color blau clar es mostra la línia d'aigua de xarxa clorada utilitzada tant per processar la sang com per realitzar les diferents neteges dels equips mitjançant el sistema automatitzat de neteja de les instal·lacions CIP (*Cleaning In Place*).

A la Figura 6.6 es mostra un plànol de la planta general amb la distribució de les diferents zones de la planta pilot i la disposició dels equips industrials dins la nau construïda per instal·lar-hi la planta pilot de producció. Dins d'aquest espai es poden distingir diferents àrees: es delimita la zona principal on es distribueixen els equips més rellevants que conformen la planta pilot (part dreta de la Figura 6.6). Aquests es troben disposats en dos nivells en alçada; per una banda, a la part inferior, es distribueixen els dos tancs o reactors per a sang tècnica, l'assegador i l'ensacadora i, per altra banda, el *triagi*, dos reactors per sang higiènica, centrífuga, tremuja, filtre de mànigues i molí que es troben ubicats en una plataforma superior. Aquesta distribució permet aprofitar millor l'espai de la nau en alçada.

En una segona zona, situada a la part esquerra de la Figura 6.6, s'agrupen els dipòsits de reactius (HCl, NaOH, H₂O₂ i HNO₃), el tanc de sang higiènica, tanc d'aigua neta, un tanc petit i un gran d'aigua residual, el sistema de neteja CIP una planta de tractament osmòtic per tractar les aigües residuals. En una tercera zona, davant la planta pilot (part inferior de la Figura 6.6), s'han distribuït diferents espais per configurar la sala de control, el magatzem de producte acabat, un vestidor i lavabo. En un segon pis, sobre aquesta zona, es distribueixen dos espais destinats a una oficina i un petit laboratori que permeti dur a terme algunes anàlisis bàsiques de control de qualitat i del procés.

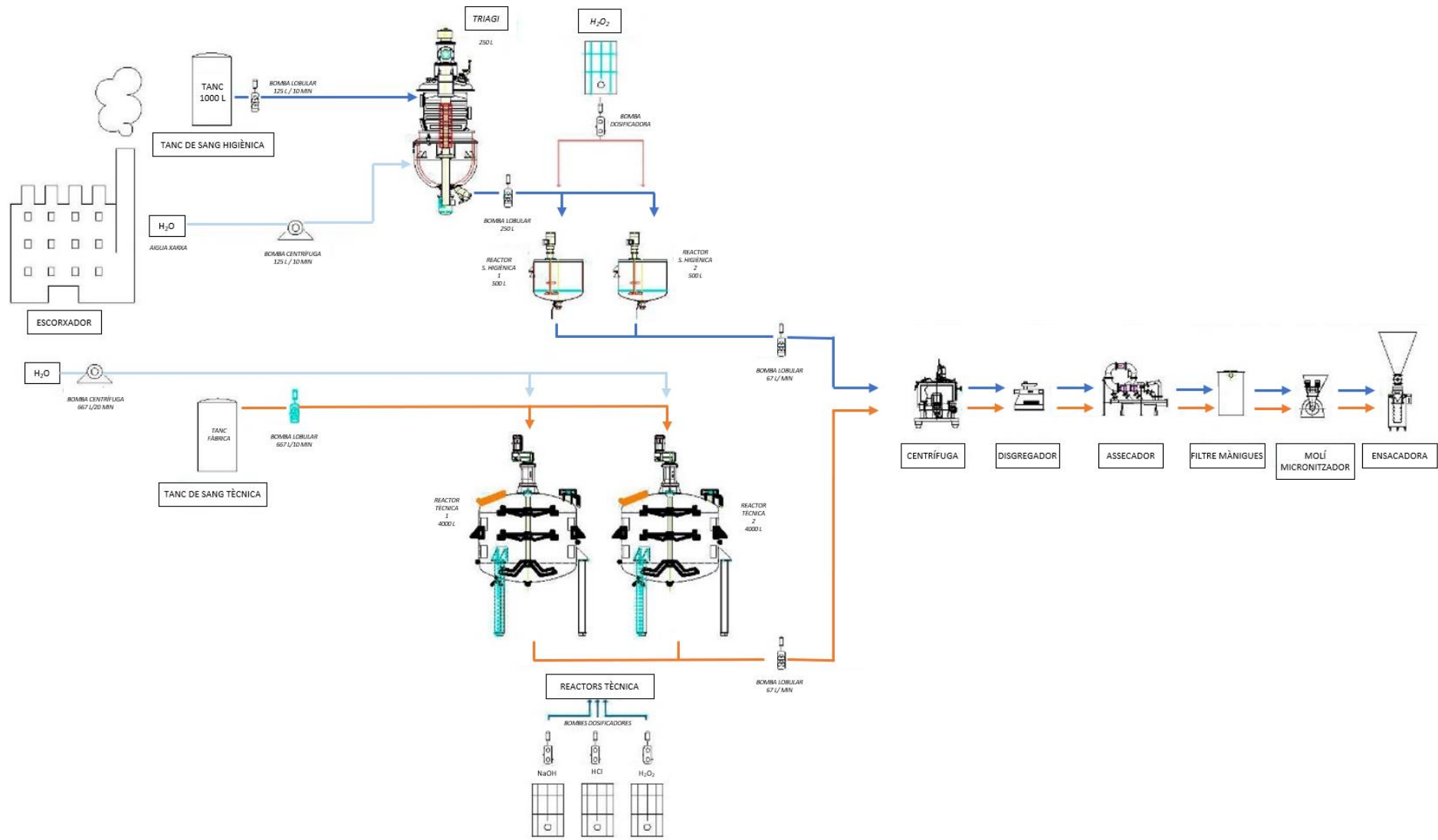


Figura 6.5. Esquema de l'estructura general de la planta pilot demostrativa. Es mostra, en blau fosc, la línia de processat de sang higiènica i, en taronja, la línia de processat de sang tècnica. A més, es mostra, en color blau clar, l'esquema de la xarxa d'aigua. Imatge modificada a partir d'Azuara S.L. (2019).

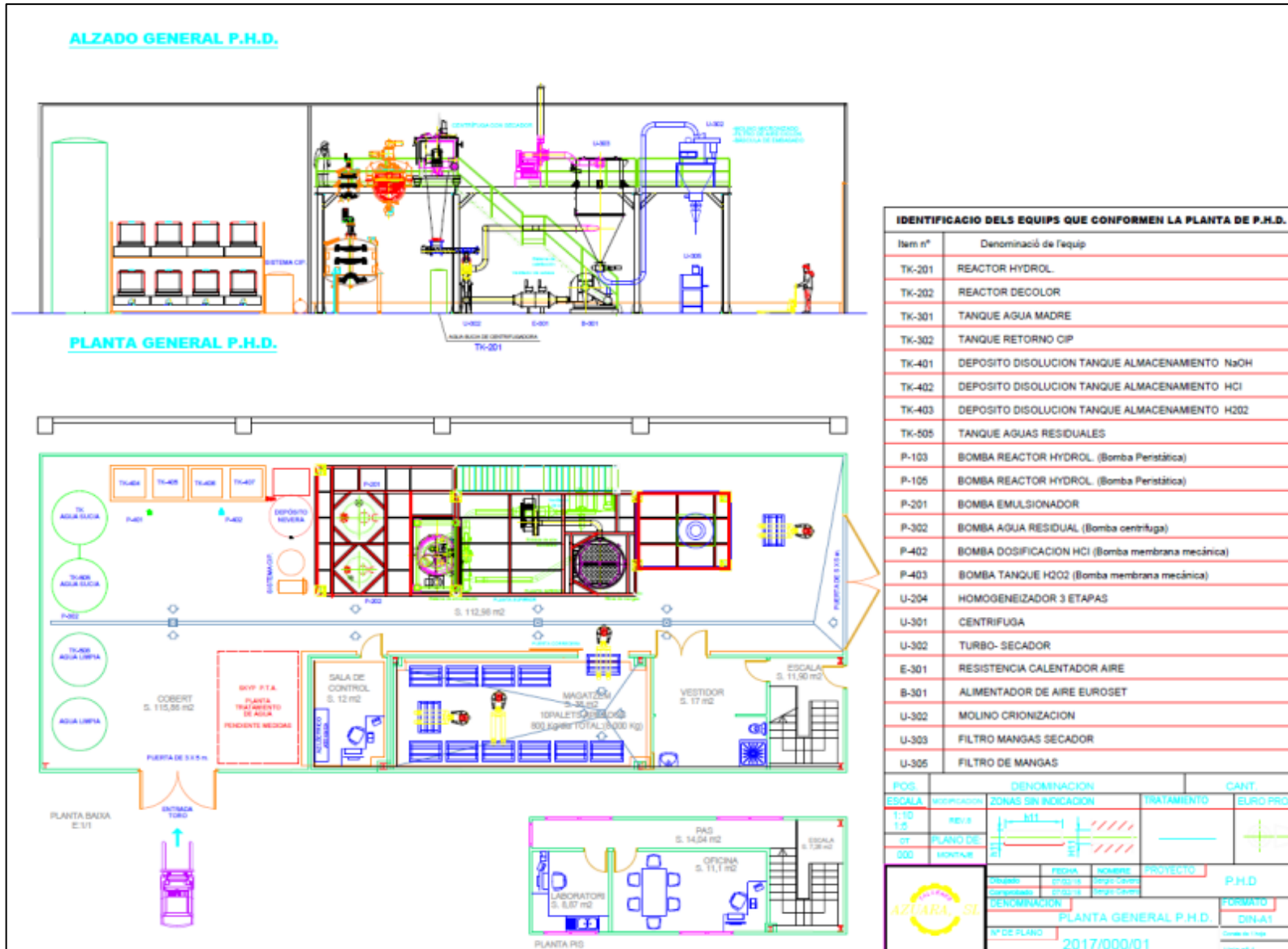


Figura 6.6. Distribució de la planta pilot dins la nau industrial situada a les instal·lacions de l'escorçador Mafrica. Imatge modificada a partir d'Azuara S.L. (2018).

6.5. DISSENY, MUNTATGE I POSTA EN MARXA DE LA PLANTA PILOT

6.5.1. Equips principals

A continuació es detallen les característiques, disseny, funcionament i optimització per cada element principal seleccionat de la planta pilot industrial, que s’han determinat en la primera i segona part d’aquest capítol.

a. Reactors de procés de sang tècnica

Amb l’objectiu de tractar una gran quantitat de sang de manera seqüencial, es van instal·lar dos reactors d’iguals dimensions i característiques que es van disposar sobre una petita plataforma, permetent una millor manipulació i control del procés. El disseny dels reactors i el muntatge final es mostren a les figures 6.7 i 6.8.

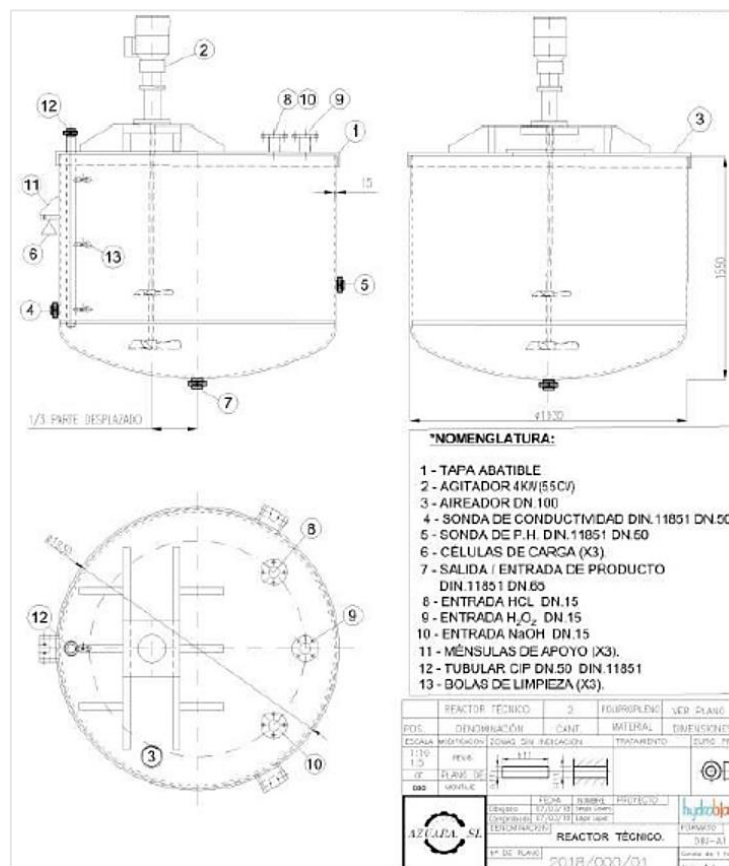


Figura 6.7. Disseny industrial dels reactors pel processat de sang tècnica. Extret d’Azura S.L. (2018).

Per obtenir el millor rendiment s'han tingut en compte tant els requeriments de volum com de procés i reactius a utilitzar. Aquests requeriments són: un volum total de 3000 L, agitació del producte, contacte amb àcids corrosius i bases, neteja mitjançant sistema CIP, facilitat de neteja (eliminació de cantonades problemàtiques) i acabat d'ús alimentari.

Cada reactor ha de disposar d'entrada de sang i sortida de producte, entrada d'aigua de xarxa, dosificació dels reactius HCl, NaOH i H₂O₂ i entrada i sortida de les dissolucions de neteja i aigües residuals del CIP. A més, s'ha de disposar de sensors de pH i cèl·lules de càrrega per controlar les variacions de pH durant el procés i el pes dels tancs en les entrades i sortides de matèria (tant en el processat com en les neteges mitjançant CIP).



Figura 6.8. Disposició dels reactors tècnics sobre la plataforma (esquerra) i acabat final (dreta). Figura esquerra extreta d'Azuara S.L. (2019).

Material

Inicialment es van dissenyar els reactors d'acer inoxidable 316 amb un acabat superficial de $Ra < 0,8 \mu\text{m}$, un material idoni per a requeriments alimentaris, però es va decidir canviar aquest material per un que no es veiés afectat per l'ús de l'àcid clorhídric, el qual no afectaria al material en el seu estat líquid, però sí que provocaria l'oxidació de l'acer en el seu estat gasós degut a l'alt potencial corrosiu que presenta. Així, s'ha escollit com a millor opció l'ús de polipropilè, un material resistent a la corrosió que no es veu afectat pel contacte amb àcids. Es va definir un gruix de les parets de 15 mm.

Dimensionat

El dimensionat dels tancs s'ha dut a terme en funció dels 4000 L de sang a processar proposats en el Projecte Europeu. Aquests 4000 L s'han repartit en 6 *batch* (667 L) durant un total de 9 h de treball, tenint en compte que es disposa de dos tancs reactors.

S'ha proposat treballar amb tancs d'aproximadament 3000 L de volum, en base als volums calculats a partir de les dades obtingudes a nivell de laboratori (Taula 6.3). A aquest volum se li ha afegit un 25 % de marge, pel que s'han dimensionat a un total de 4000 L de capacitat.

El diàmetre dels reactors s'ha calculat en funció a aquest volum per obtenir la millor homogeneïtzació del producte mitjançant agitació, definint un diàmetre de 1900 mm i una alçada de 1550 mm. Per facilitar l'homogeneïtzació del producte i la neteja del reactor, s'ha dotat d'un fons torisfèric tipus *klopper*, el que també permet concentrar el producte a la part inferior central i facilitar-ne l'expulsió.

Taula 6.3. Escalat del volum necessari pel processat de sang tècnica.

	PROCESSAT SANG TÈCNICA	
	LABORATORI	ESCALAT INDUSTRIAL
Sang tècnica	1 L	667 L
Aigua	1 L	667 L
HCl	0,07 L	50 L
NaOH	0,07 L	50 L
H ₂ O ₂	0,05 L	33 L
Escuma formada	2,5 L	1668 L
TOTAL	4,7 L	3135 L

Accessoris

Els accessoris seleccionats pels reactors de sang tècnica són:

- pHmetre: per poder mesurar el pH del producte s'hi ha instal·lat un pHmetre (DN 50 i DIN 11851) a un lateral inferior del reactor.
- Cèl·lules de càrrega: aquestes són col·locades a la part exterior-lateral del tanc, en el punt de suport del tanc amb la plataforma per determinar el pes total del reactor en cada moment del procés. Així, es pot determinar el volum aproximat entrant de cada component del procés en base al pes total del tanc.
- Boles CIP: el sistema de neteja dissenyat per aquest equip inclou 3 boles rotatòries de dispersió de solució de neteja (Figura 6.9) distribuïdes a la part superior dels reactors i connectades externament mitjançant peces amb qualitat DN15. Quan aquestes boles són alimentades pel

sistema CIP amb les dissolucions de neteja, roten sobre si mateixes permetent la neteja a l'interior del tanc en un angle de 360 °.



Figura 6.9. Bola rotatòria del sistema CIP. Extret d'Allen (2021).

- Connexions: l'entrada de sang i aigua es dona pel mateix punt, situat a la part inferior del tanc, el que permet eliminar zones de neteja conflictives. És per aquest punt que també té lloc la sortida de producte després de ser processat.
- Boca d'home i punt de mostreig: aquests dos orificis, situats a la part superior del tanc, permeten l'observació de l'interior del reactor, entrada en cas de manteniment, i un punt de recollida de mostres.
- Agitador en hèlix: degut a l'alta viscositat del producte, és necessari disposar d'una agitació suficientment eficaç per obtenir una bona homogeneïtzació en cada etapa del procés. Així, es va seleccionar una agitació amb dues hèlix sobre el mateix eix, una situada a la part inferior i l'altra a la part mitja del reactor, amb una velocitat de 450 rpm, permetent l'obtenció d'un vòrtex vertical i alhora horitzontal. Per optimitzar al màxim l'agitació, es va disposar l'eix a 1/3 del diàmetre del reactor.

Resolució de problemes

- Volum total processat: inicialment es va dissenyar el reactor amb un volum suficient per tractar fins a 669 L de sang tècnica per *batch*. En les proves inicials es va observar un excés de volum total degut a la formació de grans quantitats d'escuma, que sobresortien pels airejadors de la tapa del reactor. Així, es va decidir reduir el volum de sang tractada fins a 350 L per *batch*, el que a més permetia dur a terme proves més ràpides amb el volum suficient per provar el funcionament dels equips.
- Homogeneïtzació del producte: degut a la formació d'una gran quantitat d'escuma d'alta densitat quan s'addiciona el peròxid d'hidrogen, el sistema d'agitació dissenyat no és capaç d'homogeneïtzar correctament la solució, formant-se una capa densa d'escuma a la part superior. Es va observar que la mala agitació era deguda a que la conformació de les pales era incorrecta, el que provocava que el producte s'empenyés des del centre-inferior cap amunt amb una força

insuficient per trencar l'escuma en els extrems i que aquesta descendís. Així, degut a que canviar el sentit de gir del motor de l'agitador resultava problemàtic, es va decidir redissenyar les pales, fabricant-ne dues de noves amb el sentit de direcció invers a les primeres, per generar un flux axial que empenyés el producte des del centre-superior cap avall, aplicant més força en el punt de trencament de l'escuma. A més, ambdues hèlix es van col·locar a major distància entre elles per obtenir major força de flux (Figura 6.10).

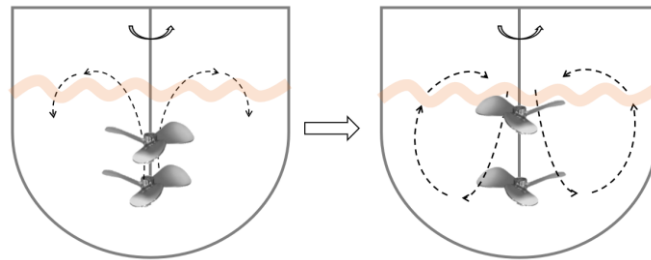


Figura 6.10. Modificació del disseny de les pales per millorar l'agitació del producte en els reactors de sang tècnica.

b. *Triagi*

El *triagi* (Figura 6.11) és l'equip escollit per processar la sang higiènica, subministrat per l'empresa ATPP Lleal® (Barberà del Vallés, Espanya); aquest consisteix en un reactor amb una camisa de vapor que disposa d'un sistema de pales que giren en contra direcció i alhora rasquen les parets del tanc per obtenir una millor homogeneïtzació del producte, evitant que es formin coàguls o que es sobreescalfi per acumulació de calor. A més, aquest equip disposa d'una turbina homogeneïtzadora a la part inferior, que permet disminuir la mida dels coàguls formats durant l'etapa d'escalfament. La capacitat d'aquest equip, de dimensió pilot amb una amplada de 1330 mm i alçada de 3050 mm, és de 300 L totals. Les dimensions més reduïdes d'aquest equip, envers als grans volums de sang tècnica amb els que es treballa, es deuen a que l'escorxador Mafrica no disposa d'un sistema automatitzat de recollida de sang higiènica, pel que els volums recollits per dur a terme les proves seran mitjançant un equip manual, recuperant el volum just de sang higiènica per poder realitzar les proves pilot.

Per escalfar la sang dins el *triagi*, s'injecta vapor dins la camisa a una pressió de 1 kg/cm^2 , el que augmentaria la temperatura de 4 °C a 90 °C en 15 min en condicions òptimes. Una vegada assolida la temperatura desitjada, l'equip deixa d'injectar vapor; el sistema es torna a activar quan la sonda de temperatura detecta que la temperatura ha disminuït 1 °C , i així seqüencialment fins a transcórrer el temps total de procés definit.



Figura 6.11. Disseny del triagi (esquerra) i equip instal·lat a la planta pilot (dreta). Figura esquerra extreta d'Azuara S.L. (2018).

Accessoris

- La neteja de l'equip es du a terme mitjançant 3 boles CIP distribuïdes dins el reactor, connectades externament a la línia del CIP (DN 50).
- L'entrada i sortida de sang i aigua es du a terme a través de la mateixa línia, situada a la part inferior del *triagi*. Aquesta línia té una qualitat DIN 11851 i DN 50.
- Es disposa d'una sonda de temperatura que permet determinar la temperatura del producte dins el *triagi* en cada moment.

Tots els paràmetres d'agitació, homogeneïtzació, temperatura i temps de procés es defineixen en el quadre independent adjacent a l'equip, que permet modificar-los en funció de l'acabat del producte desitjat.

Resolució de problemes

- Escalfament de la sang higiènica: perquè la sang passi de 4 a 90 °C durant el tractament tèrmic és necessari aplicar vapor a certa pressió i temperatura. Les proves de procés inicials van necessitar d'aproximadament 1 hora per assolir la temperatura desitjada, el que representa un alt cost, repercutint directament en l'eficiència del procés. Degut a que no era possible augmentar la temperatura del vapor subministrat directament per l'escorxador, que entra a 160 °C, es va decidir augmentar la pressió d'entrada d'1 a 1,8 bar. Així, es va aconseguir reduir el temps d'escalfament de la sang a un total de 30 min.
- Programació de les seqüències de processat del *triagi*: la seqüència del procés dut a terme en el *triagi* va ser enregistrada en el quadre elèctric de control del mateix *triagi*, a partir del que es modificaven els paràmetres d'interès com entrada i sortida de producte i aigua, velocitat d'agitació, augment de temperatura i activació/desactivació a intervals de l'homogeneïtzador. Així, el programari extern (*Scada*) només permet veure l'activació i seqüència per cada fase

(entrada de producte, escalfament i sortida), i la modificació d'aquest només es pot dur a terme en el quadre de l'equip. Tot i que aquest fet pot comportar el desavantatge d'haver de desplaçar-se cada vegada que es vol modificar un paràmetre del procés, permet minimitzar els errors de programació una vegada s'ha optimitzat el procés que es dona a l'equip.

c. Reactors per la sang higiènica

D'igual manera que el disseny dels reactors per la sang tècnica, s'han construït dos reactors pel tractament de sang higiènica. Aquests, es disposen a cada costat del *triagi* i sobre la seva mateixa plataforma superior als reactors tècnics. El disseny dels reactors i el muntatge final es mostren a les Figures 6.12 i 6.13, respectivament.

Per definir les característiques d'aquests dos tancs es van tenir en compte els requeriments de volum, agitació del producte, entrada de peròxid d'hidrogen, neteja mitjançant CIP i acabat d'ús alimentari.

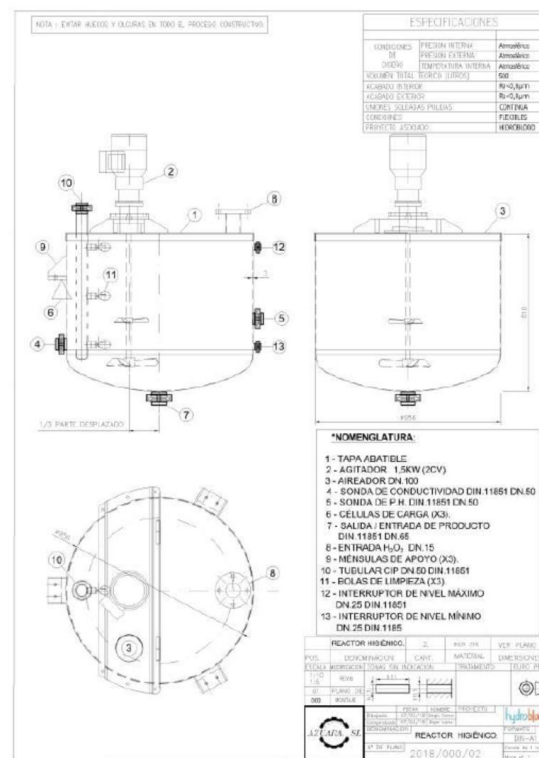


Figura 6.12. Disseny industrial dels reactors pel processat (precipitat i descoloració) de producte higiènic. Figura extreta d'Azuara S.L. (2018).

Material i dimensionat

Els dos reactors higiènics s'han definit tenint en compte el volum de producte provinent del *triagi* (de 300 L, corresponents a 150 L de sang i 150 L d'aigua) i l'augment de volum conseqüent a la fase de descoloració que té lloc en aquest punt (Taula 6.4). A més, s'ha afegit un marge de seguretat del 25 %. Així, s'ha determinat el disseny de dos tancs amb un volum útil de 500 L, un acabat d'acer inoxidable 316 amb 3 mm d'amplada (recomanat en tancs sense pressió) i acabat superficial de $Ra < 0,8 \mu\text{m}$.

Taula 6.4. Escalat del volum necessari pel processat de sang higiènica.

PROCESSAT SANG HIGIÈNICA		
	LABORATORI	ESCALAT INDUSTRIAL
Sang tècnica	1 L	150 L
Aigua	1 L	150 L
H ₂ O ₂	0,02 L	3 L
Escuma formada	0,6 L	90 L
TOTAL	2,6 L	390 L

La disposició dels dos tancs és vertical i cilíndrica, amb un fons tipus *klopper* que permet dipositar el producte al fons per on és recollit i enviat al següent equip. Aquest fons també facilita la neteja de l'equip mitjançant CIP ja que s'eliminen els angles rectes de difícil accés. A la Figura 6.13 es mostra un dels reactors de la línia higiènica.



Figura 6.13. Imatge d'un dels dos tancs de processat de producte higiènic situat a un lateral del *triagi*.

Accessoris

- L'entrada i sortida de producte es dona per la mateixa línia, situada a la part inferior del tanc, amb qualitat DIN 11851 i DN 50.
- La dosificació de peròxid d'hidrogen es dona per una línia d'entrada superior al tanc DN15.
- Es situen dos detectors de nivell, màxim i mínim, dins de cada tanc, instal·lats a la part superior i inferior del reactor.
- Per obtenir una homogeneïtzació òptima, s'implanta un eix a 1/3 del reactor amb un agitador d'hèlix que permet dur a terme una agitació adequada pel tipus de producte amb el que es treballa.
- La neteja dels reactors es dona mitjançant tres boles rotatòries connectades a la línia del CIP que es situen a la part superior del tanc.

d. Centrífuga

La centrífuga és l'equip que permet separar el producte precipitat de les aigües de producte a descartar. Es va seleccionar el model RINA 300F de dimensions 1250 x 625 mm subministrat per l'empresa Riera Nadeu (Granollers, Espanya).

Es tracta d'un model automàtic de centrífuga de cistella d'eix vertical que permet la separació de les fraccions dels productes en discontinu i en vertical (Figura 6.14). A més, permet dur a terme la neteja del producte separat per centrifugació mitjançant un raig d'aigua directe a les parets, on queda el producte incrustat.

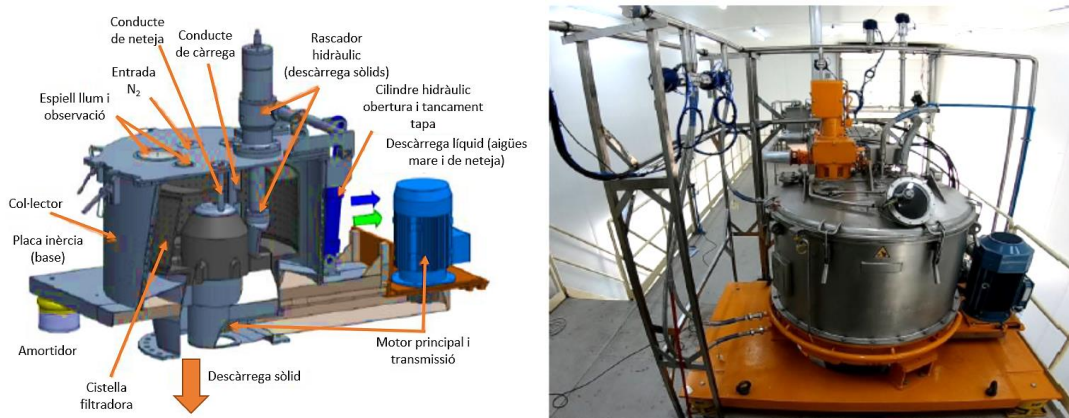


Figura 6.14. Esquema de la centrífuga RINA 300F (Riera Nadeu) (esquerra) i equip instal·lat (dreta). Figura esquerra modificada a partir d'Azuara S.L. (2018).

La mida d'aquesta centrífuga ve definida pel volum de producte que es vol tractar, amb una capacitat de fins a 3500 L per *batch*; les característiques tècniques es mostren a la Taula A2.2 (Annex 2).

El model seleccionat disposa d'una cistella filtrant que permet determinar la mida de partícula desitjada en funció del tamís utilitzat. En aquest s'hi acumula el producte formant una capa porosa, el que permetrà la neteja del mateix amb aigua a baixa pressió, seguit de la recuperació d'aquesta capa mitjançant una descàrrega per gravetat cap a la part inferior de la centrífuga.

El control del funcionament i paràmetres d'aquest equip es du a terme mitjançant un armari elèctric, que a la vegada controla la tremuja de centrífuga, el disgregador, l'assecador i el filtre de mànigues (Figura A2.1, Annex 2). Els paràmetres de cada etapa es poden modificar des del mateix quadre, el que permet no haver de dur a terme modificacions una vegada optimitzat el procés.

Les fases de l'etapa de centrifugació són les següents:

1. Càrrega producte: el producte és avocat directament a les parets de la centrífuga en marxa. En aquest punt la cistella té una velocitat de 600 rpm durant un total de 120 s.
2. Escorregut producte: per eliminar les aigües de producte la cistella va a una velocitat de 600 rpm durant 60 s.
3. Neteja: es ruixa aigua sobre el producte comprimit a les parets de la centrífuga que va a una velocitat de 600 rpm durant 300 s.
4. Escorregut: s'elimina l'aigua sobrant de neteja a una velocitat de 950 rpm durant 600 s.
5. Rascat: s'acciona el rascador de la centrífuga que es va apropant a les parets fins a desprendre tot el producte. La velocitat de la centrífuga és de 90 rpm durant 90 s.

Els diferents paràmetres de les etapes definides es poden modificar per optimitzar el procés de la centrífuga en funció del comportament del producte.

Resolució de problemes

- Presència d'aigua en la tremuja de centrífuga: es va detectar l'acumulació d'aigua a la tremuja inferior de la centrífuga, on s'acumula el producte abans de ser assecat. Això provocava l'entrada directe d'aigua a l'assecador, impossibilitant una correcta deshidratació del producte. L'anàlisi del procés va mostrar que aquesta aigua procedia en part de l'aigua de neteja que dosificava la pròpia centrífuga. Per corregir el problema, es va redirigir la boca d'entrada d'aigua uns 10 ° cap amunt, de tal manera que l'aigua de neteja era totalment avocada sobre el producte de la cistella filtradora. Aquesta correcció va permetre eliminar en part la presència d'aigua a la tremuja de centrífuga, tot i que encara en restava una part.
- Tamís: inicialment es va determinar la mida de partícula del producte en funció de les anàlisis realitzades a partir de producte obtingut al laboratori, a partir del que es va establir la mida de

porus del tamís. Es va observar que el tamís seleccionat es taponava pel mateix producte, el que impedia la correcta eliminació de les aigües de neteja que queien per gravetat dins la tremuja de centrífuga. Per eliminar l'aigua amb major eficàcia es va provar d'augmentar les rpm de la cistella de centrífuga en l'etapa de neteja, el que va resultar en una major compressió del producte, que a la vegada impedia en major grau l'eliminació de l'aigua. Així, es va optar per augmentar la mida de porus del filtre, assumint una major pèrdua de producte, però a la vegada augmentant l'eficàcia en l'eliminació de les aigües, el que permetia el correcte funcionament de la centrífuga en les diferents etapes sense la problemàtica de l'acumulació d'aigua de la tremuja de centrífuga.

- Recuperació del producte: el producte que queda compactat a les parets de la cistella és separat mitjançant un rascador. Degut a que aquest rascador no arriba a tenir contacte directe amb el filtre per així evitar malmetre'l, restava una fina capa de producte d'uns 8 mm aproximadament. Per poder-lo recuperar es va instal·lar una sortida d'aire comprimit a 6 MPa que permetés empenyer el producte restant des de fora cap a dins la centrífuga en l'última etapa del procés.

e. Tremuja de centrífuga

La tremuja de centrífuga és l'aparell, situat a la part inferior de la centrífuga, que permet recollir el producte resultant del procés, amb una capacitat total de 316 L. Aquest equip, d'acer inoxidable DIN 11951, disposa d'unes pales en forma cònica que empenyen el producte cap a la part inferior, on es situa el disgregador. A la Figura 6.15 es mostra el disseny de l'equip, i a la Figura 6.16 l'equip instal·lat en la planta pilot.

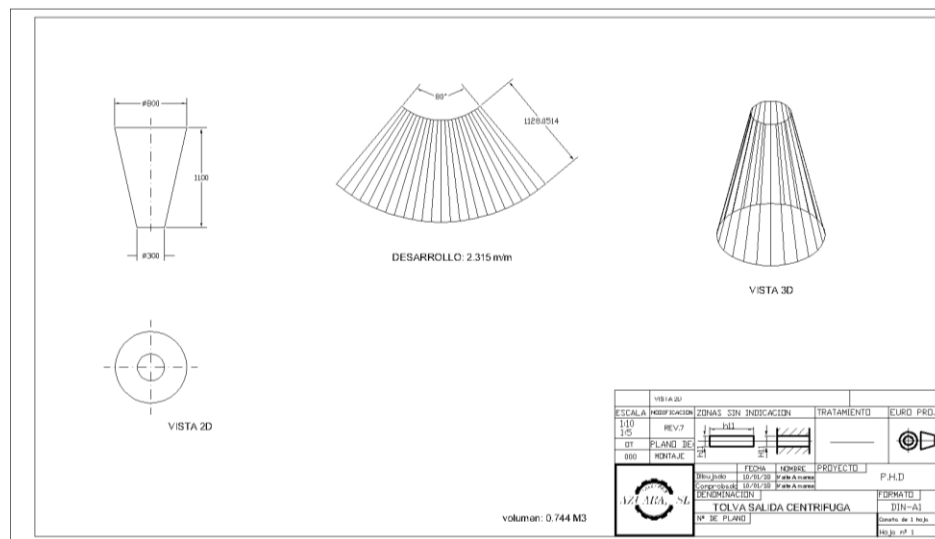


Figura 6.15. Disseny de la tremuja de centrífuga. Imatge modificada a partir d'Azuara S.L. (2018).

Entre la part inferior de l'equip i el disgregador es situa una vàlvula de papallona (en color vermell a la Figura 6.16) que permet alimentar el disgregador en el moment en que l'assecador es troba en funcionament. Per dur a terme un bon control del contingut de l'equip, s'han implantat dos sensors, un a la part inferior i l'altre a uns centímetres de la part superior, que permeten detectar el nivell mínim i màxim d'emplenat.



Figura 6.16. Tremuja de centrífuga.

f. Disgregador

El disgregador o extrusor (Figura 6.17) és el dispositiu, a continuació de la tremuja de la centrífuga i anterior a l'assecador, que permet disgregar el producte en porcions menors, d'aproximadament una granulometria de 5 mm, abans de ser avocat a l'assecador. Aquesta reducció de grandària facilita la transferència de calor i matèria i permet un assecament uniforme del producte.

Aquest equip, dissenyat en forma de T, consisteix en un vis sens fi on cau el producte que és empès en una direcció, obligat a passar per tres discs extrusors, cada un amb una mida de porus més petita, que permet obtenir unes tires fines de producte que cauen directament i en continu dins l'assecador. Aquest permet

regular la velocitat de disgregació, el que repercuteix directament en l'obtenció d'un major o menor assecat del producte. Les especificacions tècniques es mostren a la Taula A2.3 (Annex 2).



Figura 6.17. Representació del disgregador i detall de la sortida de producte. Figura modificada a partir d'Azuara (2018).

Resolució de problemes

- Acumulació de producte en tires allargades: degut a que es va dissenyar la sortida de l'extrusor en un angle de 90 °, el producte disgregat s'acumulava en l'espai anterior i era empès directament fins a la sortida d'aquest, el que provocava que fos dosificat en tires allargades que no es disgregaven correctament en entrar a l'assecador. Per solucionar-ho es va dissenyar una sortida més propera als discs extrusors en un angle de 45 °, el que permetia que el producte s'anés esmicolant a mesura que sortia i així es donava una dosificació de menor quantitat de producte de manera més homogènia.

g. Assecador JET

La deshidratació del producte es realitza mitjançant un turbo-assecador o assecador en JET, un equip que permet assecat en continu les partícules de producte de manera uniforme sense que aquest es malmeti per excés de temperatura. El model seleccionat és un deshidratador flash RINA-Jet Turbo S-806 (Figura 6.18 i 6.19) de Riera Nadeu S.A. (Granollers, Espanya). Es tracta d'un assecador continu per convecció d'aire calent que treballa mitjançant la dispersió de les partícules sòlides humides disgregades en una cambra d'assecat toroidal.

A la Figura 6.18 es pot observar la representació de l'equip; el producte, disgregat mitjançant el disgregador, cau dins l'assecador (indicat a la Figura com a 4). Aquest és empès pel corrent d'aire calent que entra per les obertures inferiors (1 i 2) que creen un règim turbulent dins la cambra d'assecat. Gràcies a la combinació de la turbulència creada amb la temperatura del fluid d'assecat, el producte es disgrega

del tot i, una vegada ha reduït el seu pes per l'evaporació de l'aigua, surt pel conducte adjacent (8) gràcies al disseny toroidal de l'equip, i permet l'obtenció d'una pols seca de granulometria fina (Riera Nadeu, 2018). Les especificacions tècniques es mostren a la Taula A2.4 (Annex 2).

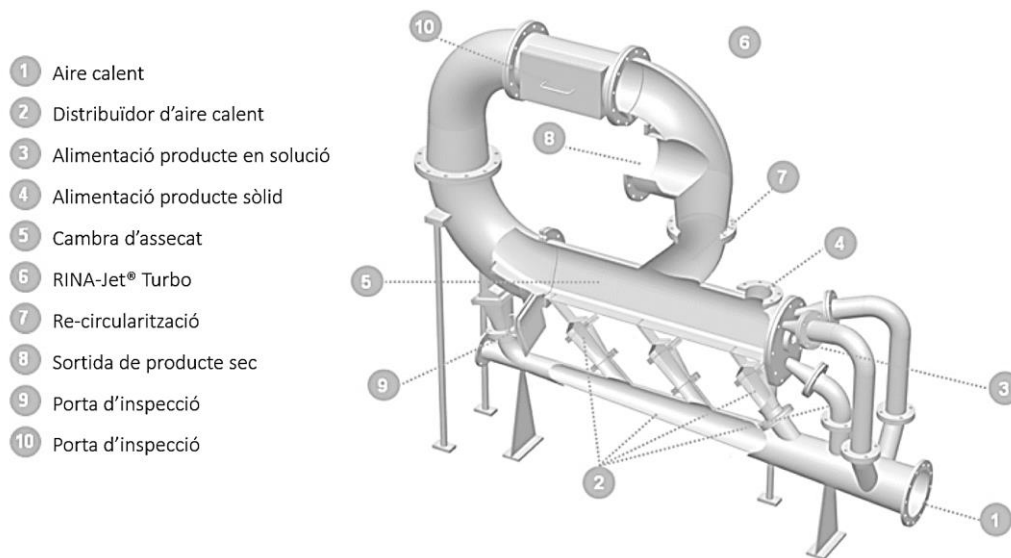


Figura 6.18. Assecador RINA-Jet Turbo (Riera Nadeu S.A., Granollers, Espanya). Imatge modificada a partir de RINA Flash Dryer (2021).

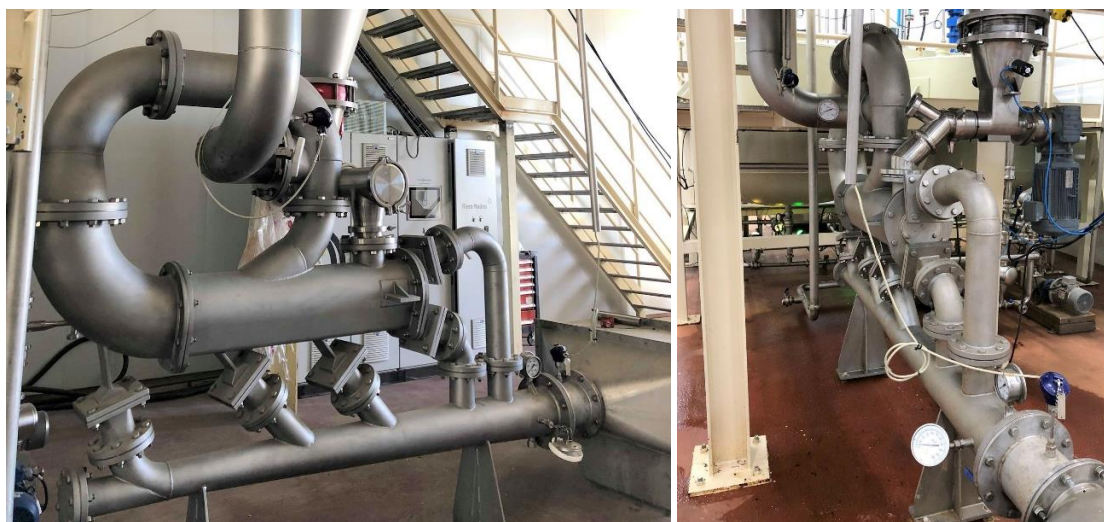


Figura 6.19. Assecador RINA-Jet Turbo instal·lat a la planta pilot industrial.

L'assecat final del producte ve donat tant per les característiques d'aquest abans d'entrar a l'assecador com pels paràmetres definits en el procés d'assecat. En funció del nivell de disgregació del producte i de la humitat restant després del procés de centrifugat, serà necessari aplicar una temperatura de l'aire més o menys alta que permeti obtenir un producte amb la humitat residual desitjada sense malmetre el producte, doncs un excés de temperatura podria disminuir-ne la qualitat nutricional i/o funcional i fins i tot, cremar les partícules.

Resolució de problemes

- Nivell de deshidratació: el percentatge d'humitat desitjat del producte final es va definir en un 10 %. Per assolir-lo es van provar diferents combinacions dels paràmetres de l'assecador (temperatura de la cèl·lula d'escalfament i de la sortida de l'assecador), a més de variar la velocitat en la que el disgregador alliberava el producte dins l'equip. Els paràmetres definits van ser: temperatura de la cèl·lula de 110 °C, temperatura de sortida de 80 °C i una alimentació del 25 %, obtenint producte amb un 11 % d'humitat. Aquests valors estaven lleugerament per sobre del valor establert com a objectiu del procés (10 % d'humitat). La humitat final resultant depèn directament del percentatge d'humitat del producte en sortir de la centrífuga, pel que un funcionament poc homogeni de l'equip repercuteix directament en el grau d'assecat final del producte. Així, no s'ajustaran els paràmetres de deshidratació fins que s'hagin pogut establir correctament els paràmetres de centrífuga.

h. Filtre de mànigues

El filtre de mànigues és l'equip que permet recollir el producte després de sortir de l'assecador. Es va escollir un filtre proporcionat per Riera Nadeu S.A. (Granollers, Espanya). En aquest, les partícules en pols de producte es separen de l'aire i la humitat residuals de l'etapa d'assecat mitjançant un total de 60 filtres verticals situats dins d'una tremuja d'acer inoxidable (Figura 6.20). A la Taula A2.5 (Annex 2) es mostren les especificacions tècniques per aquest equip.

Tal com es mostra a la Figura 6.20 (esquerra), el producte entra a la tremuja per un lateral i és impulsat contra els filtres interiors, que absorbeixen l'aire residual de l'assecador. El producte, que queda enganxat als filtres, és separat mitjançant aire comprimit que s'injecta des de la part superior dels filtres a intervals, per fer caure les partícules sòlides al fons de la tremuja.

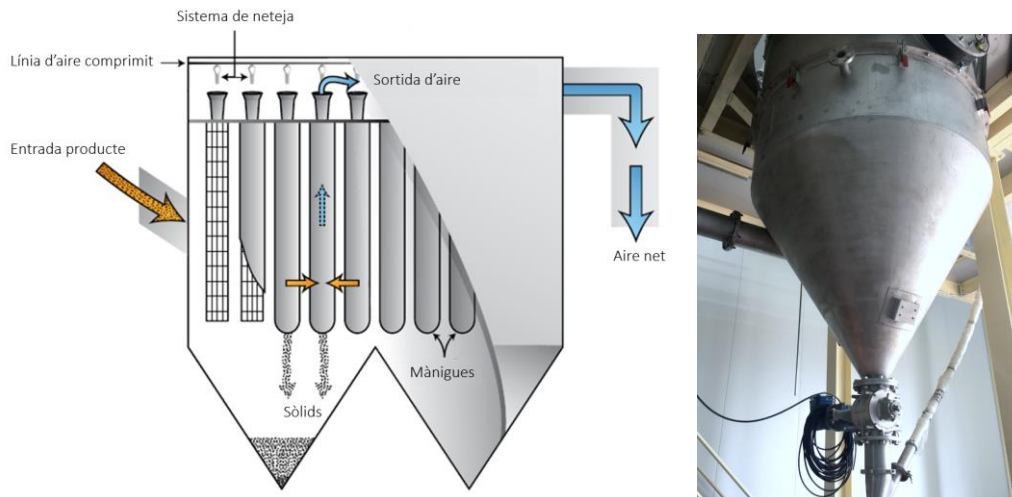


Figura 6.20. Esquema del funcionament del filtre de mànigues i instal·lació de l'equip a la planta. Imatge modificada a partir de Btech (2021).

i. Molí micronitzador i ensacadora

El molí micronitzador i l'ensacadora són els sistemes modulars seleccionats per disminuir la mida de partícula, en el cas que sigui necessari, i envasar el producte resultant.

El molí micronitzador (Figura 6.21), model IMF-60 (ATPP Lleal®, Barberà del Vallès, Espanya), que consisteix en una sèrie de discs rotatoris a alta velocitat amb dents (Figura 6.22), s'ha muntat sobre una base d'acer inoxidable AISI-316 que suporta tant el molí com la resta d'equips auxiliars necessaris pel funcionament d'aquest. Un d'aquests equips és el filtre de mànigues (FAM-12/600 de fins a 12 filtres) que separa l'aire del producte micronitzat i impulsa, mitjançant pressió inversa, el producte acumulat a les bosses cap a la tremuja inferior connectada amb l'ensacadora.

El producte molturat és descarregat directament en una tremuja amb forma tronco-piramidal d'acer inoxidable AISI-316, i dosificat cap a l'ensacadora mitjançant una vàlvula rotativa VDR-05.

L'equip seleccionat per envasar el producte és una ensacadora semi-automàtica DEP 5/100 (ATPP Lleal®, Barberà del Vallès, Espanya) (Figura 6.21); aquesta permet dispensar el producte en pols que entra per una obertura superior (connectada a la sortida del molí micronitzador) i que és redirigit a través d'un vis sens fi a una boca de sortida amb control de pes, on es col·loca l'envàs desitjat (bosses amb vàlvula, bosses amb boca oberta o caixes). Les especificacions tècniques per ambdós equips es mostren a la Taula A2.6 (Annex 2).

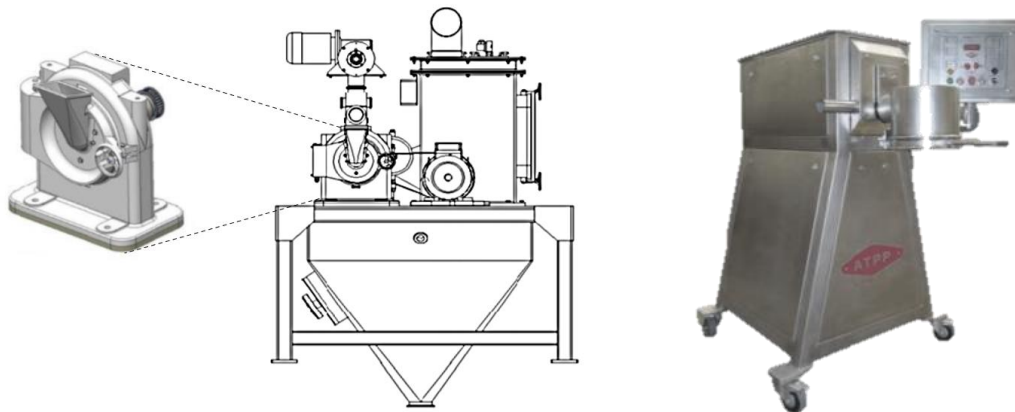


Figura 6.21. Molí micronitzador IMF-60 muntat sobre Taula de suport (esquerra) i ensadadora DEP 5/100 (dreta) (ATPP Lleal®, Barberà del Vallès, Espanya). Figura modificada a partir d'Azuara S.L. (2018).



Figura 6.22. Discs micronitzadors del molí i filtre de mànigues. Figura modificada a partir d'Azuara (2018).

6.5.2. Equips auxiliars

A continuació es mostren les especificacions pels diferents equips auxiliars de la planta.

a. Tanc de sang higiènica

El tanc de sang higiènica (Figura 6.23) s'ha seleccionat i instal·lat adjunt a la planta pilot degut a l'absència d'un sistema de recollida sistemàtica de sang higiènica i manteniment per part de l'escorçador. Aquest equip consisteix en un tanc de 1500 L de capacitat amb doble camisa, connectat a un equip de fred, que permet mantenir la sang en refrigeració (4 °C) i en agitació (a 34 rpm amb variador de freqüència). Les característiques de l'equip es mostren a la Taula A2.7 (Annex 2).

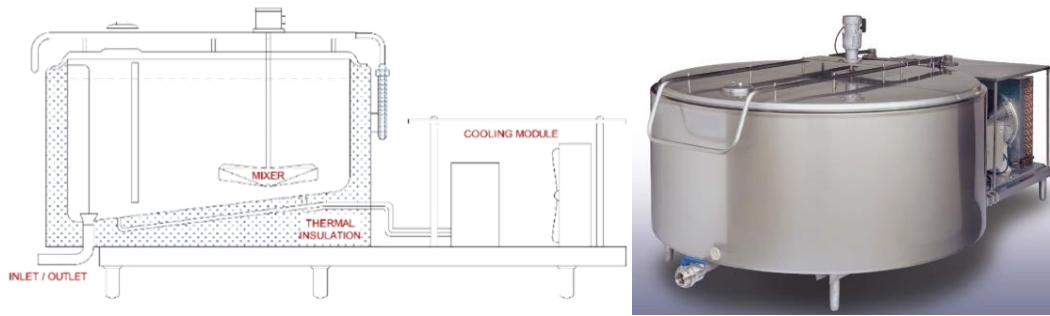


Figura 6.23. Disseny i representació del tanc de conservació de sang higiènica. Imatge extreta de Azuara S.L. (2018).

b. Vis sens fi

Per transportar el producte acumulat en el filtre de mànigues fins el molí micronitzador s'ha instal·lat un sistema mitjançant vis sens fi mecànic flexible (Figura 6.24).

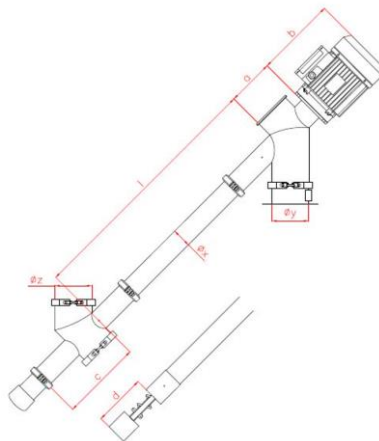


Figura 6.24. Esquema del vis sens fi per transportar producte sec. Imatge modificada a partir de Azuara S.L. (2018).

c. Sistema de bombes

Degut a les diferents característiques del producte i els reactius utilitzats en cada etapa del procés, s'han seleccionat diferents tipus de bombes per obtenir el millor funcionament en cada etapa segons el fluid a impulsar. S'han escollit un total de 16 bombes a diferents punts de la planta demostrativa que són controlades mitjançant un software per assegurar-ne el rendiment òptim.

Bomba de lòbuls

La bomba de lòbuls (Figura 6.25) va ser seleccionada per impulsar l'aigua, les solucions de neteja del sistema CIP i la sang, la qual presenta unes característiques d'alta viscositat. Aquest tipus de bomba desplaça el líquid en sentit positiu mitjançant un sistema rotatori de lòbuls d'acabat sanitari. Les especificacions tècniques per aquest tipus de bomba es mostren a la Taula A2.8 (Annex 2).



Figura 6.25. Bomba de lòbuls. Imatge extreta de Azuara S.L. (2018).

Bomba centrífuga

Les bombes centrífugues auto-encebadores (Figura 6.26; Taula A2.9 de l'Annex 2) van ser seleccionades per impulsar els líquids amb sòlids en suspensió, degut a la dificultat de succió que presenten.



Figura 6.26. Bomba centrífuga auto-encebadora. Imatge extreta de Talleres Azuara S.L. (2018).

Per altra banda, també es van seleccionar bombes centrífugues monobloc horitzontals per impulsar el producte obtingut després de processar la sang, el qual està format per una part líquida i una part de

partícules sòlides en suspensió de $\leq 200 \mu\text{m}$. Les especificacions tècniques es mostren a la Taula A2.10 (Annex 2).

Bomba dosificadora

La bomba dosificadora (Figura 6.27 i Taula A2.11 de l'Annex 2) va ser seleccionada per impulsar els diferents reactius químics utilitzats. Aquesta disposa d'una cambra separadora per evitar possibles fuites.

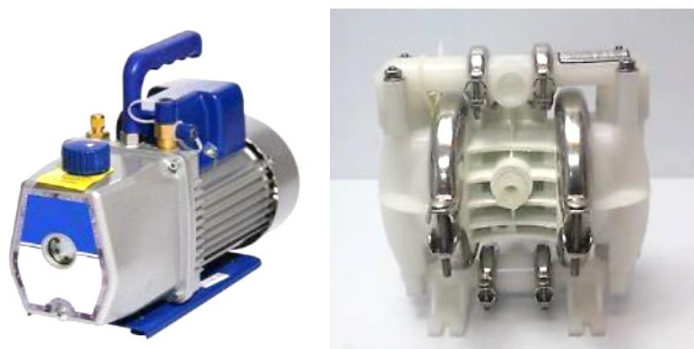


Figura 6.27. Bombes dosificadores. Imatge extreta de Talleres Azuara S.L. (2008).

d. Reactius

Els reactius, proporcionats per l'empresa Simar S.A. (Igualada, Espanya), són emmagatzemats en containers de 1000 L de IBC (tanc de polipropilè). Aquests són disposats en una prestatgeria situada en una àrea separada de la nau industrial per així complir la normativa APQ 7 (emmagatzematge de reactius líquids tòxics).

Cadascun dels 4 reactius utilitzats (NaOH , H_2O_2 , HCl i HNO_3) es disposa en dos tancs, situats verticalment sobre una cubeta de retenció que permetria recollir possibles fuites del reactiu (Figures 6.28 i 6.29).

Les connexions i bombes de dosificació, instal·lades en els tancs inferiors, es situen a la part posterior de la prestatgeria i encarades a la paret, el que permet una manipulació més segura mitjançant un carretó elevador per intercanviar els tancs quan algun reactiu s'hagi esgotat (Figura 6.29).



Figura 6.28. Tanc de 1000 L de IBC. Imatge extreta de Talleres Azuara S.L. (2018).

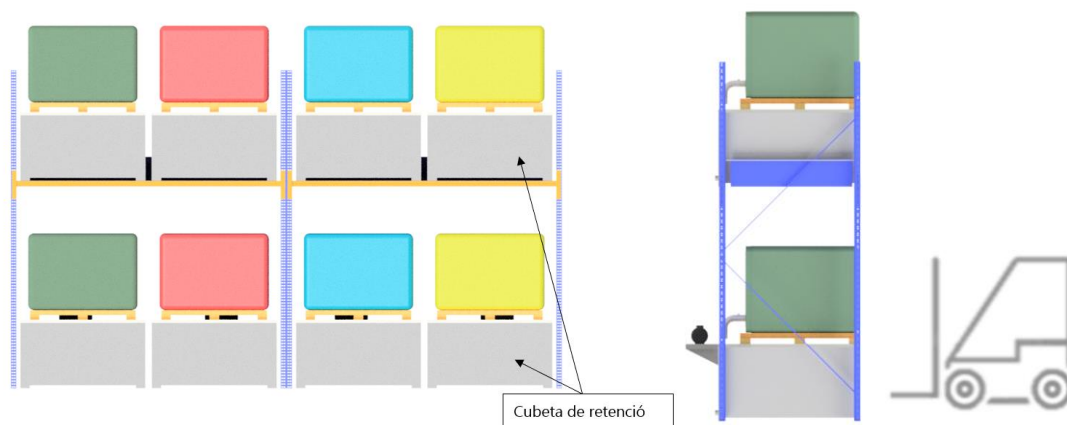


Figura 6.29. Disposició dels tancs de reactius sobre la prestatgeria amb les cubetes de retenció (esquerra) i càrrega/descàrrega dels reactius (dreta). Imatge extreta de Talleres Azuara S.L. (2018).

e. Sistema CIP

El sistema de neteja seleccionat pels equips principals de la planta pilot industrial és un sistema automatitzat *Cleaning In Place* (CIP). Aquest consisteix en fer circular per les línies i dispersar dins dels reactors una sèrie de dissolucions de neteja, a concentracions més o menys altes i a certa temperatura durant un temps determinat, per aconseguir la neteja i desinfecció dels diferents equips i conduccions d'una planta industrial sense haver de desmuntar-los. Es tracta d'un sistema comunament utilitzat en la indústria alimentària degut a la seva alta eficàcia per eliminar les restes orgàniques dels processos realitzats, evitant el creixement de microorganismes, la formació de biofilms, i/o processos de corrosió dels mateixos equips.

Els reactius utilitzats en aquest procés són l'àcid nítric (HNO_3) i l'hidròxid de sodi (NaOH), que són emmagatzemats en els tancs IBC corresponents. Aquests són dissolts per obtenir una solució a una concentració determinada que és escalfada i re-circularitzada per les línies de la planta que transporten producte líquid. A més, aquestes solucions netejadores són dosificades als diferents equips (tancs higiènics i tècnics, *triagi* i centrífuga) mitjançant les boles CIP de cada reactor.

Per dur a terme aquest procés es va dissenyar un reactor que permetés dosificar cada reactiu, dissoldre'l en aigua i escalfar-lo fins a la temperatura necessària. A la Figura 6.30 es mostra el disseny del reactor.

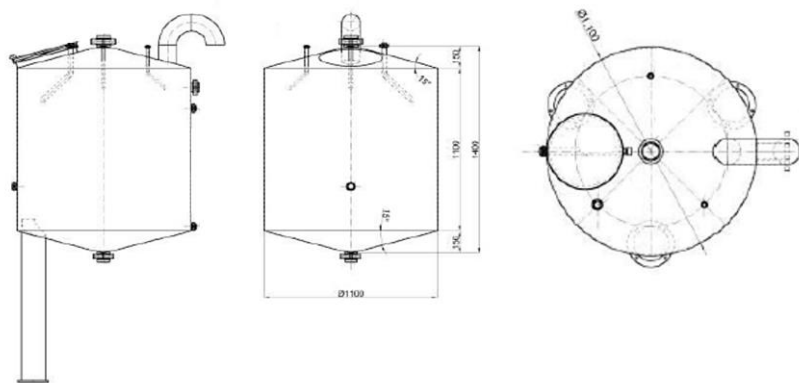


Figura 6.30. Disseny del reactor pel sistema de neteja CIP. Imatge modificada a partir de Talleres Azuara S. L. (2018).

Material

Degut a que el reactor CIP està en contacte directe amb reactius químics oxidants, és important escollir un material capaç d'aguantar tals condicions. En aquest cas, el reactiu més problemàtic és l'àcid nítric, pel que s'ha utilitzat un material de construcció d'acer inoxidable INOX 316-L amb un acabat superficial $R_a < 0,8 \mu\text{m}$.

Dimensionat

Es defineix un volum útil de 750 L, al que se li afegeix un 20 % de marge, resultant en un total de 900 L. Aquest volum s'arrodoneix a 1000 L per facilitar el disseny del tanc. Per optimitzar el procés de dissolució dels reactius, s'ha definit un diàmetre de 1100 mm i altura de 1100 mm. El disseny del dipòsit és en vertical i cilíndric, amb un fons cònic que permeti recuperar la solució des de la part inferior.

Accessoris

- Entrada d'aigua a temperatura ambient amb qualitat DN 25.
- Entrades dels reactius a partir de línies amb qualitat DN 15.
- Entrada lateral-inferior de vapor, de qualitat DN 80, a 400 kg/h per incrementar la temperatura fins a 85 °C.
- Retorn de solucions netejadores mitjançant línia DN 50 i DIN 11850.
- Sensors de nivell màxim i mínim DN80 DIN 11850.
- Conductímetre amb qualitat DN50 i DIN 11851: aquest permetrà calcular la concentració òptima per cada solució de neteja en cada etapa. A més, disposa d'un sensor de temperatura que permet controlar-la en tot moment.

Programa

Les fases del protocol de neteja CIP definides per dur a terme la neteja i desinfecció de la planta són:

- I. Esbandida dels tancs reactors amb aigua de xarxa, seguit de les línies de la planta pilot. L'aigua resultant és eliminada i enviada al tanc d'aigua descartada.
- II. Preparació de la dissolució de sosa: es dosifica NaOH en el tanc ple d'aigua fins a observar uns valors de conductivitat de 80-100 mS/cm (aproximadament un 2,5 % de sosa). La solució s'escalfa fins a 85 °C.
- III. Recirculació de la solució primer als tancs i després a les línies. Es descarta la solució de neteja.
- IV. S'emplena el tanc CIP amb aigua i es fa recircular pels equips i les línies fins a obtenir uns valors de conductivitat al retorn de la solució de <5 mS/cm.
- V. Es prepara la solució de neteja amb HNO₃ fins a obtenir uns valors de 40-50 mS/cm (aproximadament 1,5 %) i s'escalfa la solució fins a una temperatura de 45 °C.
- VI. Recirculació de la solució de nítric primer als tancs i després a les línies. Finalment es descarta la solució de neteja.
- VII. Finalment s'esbandeix primer els tancs i després les línies mitjançant aigua fins a obtenir una conductivitat a la tornada de l'aigua de <0,5 mS/cm.

Aquest procés de neteja pot arribar a tenir una durada aproximada de 2 h, pel que cal decidir quan es durà a terme, i la possibilitat de realitzar només una part del procés, per exemple descartant ocasionalment la neteja amb HNO₃.

f. Tanc d'aigua neta i aigua bruta

Per gestionar l'aigua utilitzada, tant en el processat de la sang com en la neteja dels equips, i les aigües descartades residuals, s'han dissenyat un total de quatre tancs pulmó de PVC (Figura 6.31): un tanc pulmó de 2000 L de capacitat, que permet la recollida immediata de l'aigua descartada per la centrífuga, i tres

tancs, dos per l'aigua bruta i un per aigua neta, de 21000 L de capacitat. Els volums d'aquests tancs s'han calculat en funció de l'aigua diària utilitzada i les aigües diàries descartades.



Figura 6.31. Disseny dels tancs pulmó d'aigua neta i aigües descartades. Imatge extreta de Talleres Azuara S.L. (2018).

g. Planta de tractament de l'aigua per osmosi inversa

S'ha inclòs una planta de tractament de l'aigua residual mitjançant osmosi inversa per poder reaprofitar l'aigua de procés obtinguda (Figura 6.32). Aquesta planta ha de permetre obtenir una bona qualitat de l'aigua després de ser processada, per així, poder-la reutilitzar en el processat de la sang.

S'ha seleccionat una planta de tractament amb una capacitat de tractament de fins a 4 m³ d'aigua diaris, que correspon a un cabal de 500 L/h. Els tractaments necessaris per depurar l'aigua s'han definit a partir de l'anàlisi de les aigües descartades (Taula A2.12, Annex 2).

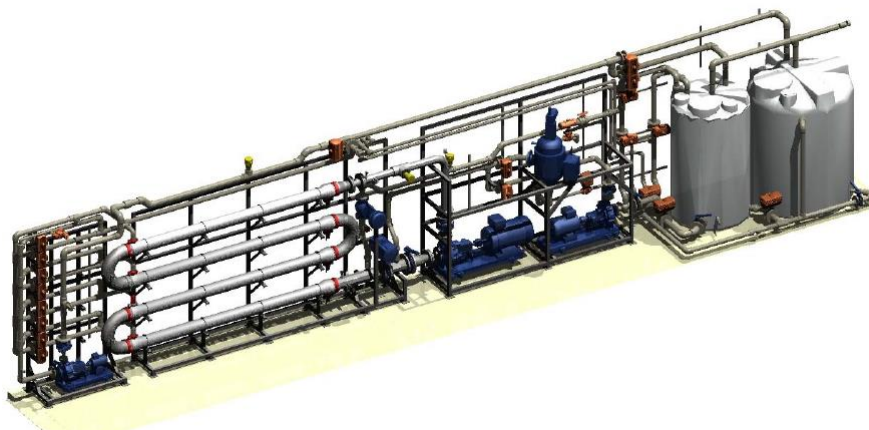


Figura 6.32. Planta de tractament de l'aigua residual del procés per osmosi inversa. Imatge extreta de Talleres Azuara S.L. (2018).

Equips

- Dipòsit 1000 L: en aquest s'hi acumula l'aigua procedent del tanc pulmó d'aigua bruta. Disposa d'un agitador per homogeneïtzar l'aigua abans de ser tractada.
- Cambra d'oxidació: presenta un volum útil de 10 m³. En aquesta s'introdueix oxigen a l'aigua mitjançant una sèrie de difusors (amb un caudal de 7 m³/h) amb l'objectiu d'eliminar la matèria orgànica per part dels microorganismes presents.
- Cambra de membranes: aquest equip consta d'un mòdul de filtració tangencial per membranes (amb un diàmetre de porus de 5 µm) amb una superfície total de 50 m², constituint el bioreactor de membranes, que permeten ultrafiltrar l'aigua, prèviament a l'osmosi inversa.
- Dipòsit 100 L: aquest permet recuperar l'aigua filtrada en el pas anterior.
- Dipòsit de 150 L: és en aquest on s'addiciona un reactiu antiincrustant (1 L/h a 4 bar) per evitar la precipitació de sals i compostos inorgànics insolubles variats abans de traspasar l'aigua al mòdul d'osmosi inversa.
- Mòdul d'osmosi inversa: en aquest l'aigua és dessalinitzada per osmosi inversa quan l'aigua travessa una membrana semipermeable. Aquest procés es realitza amb l'aplicació d'una sobrepressió (fins a 65 bar mitjançant una bomba de pistons a 1 m³/h).

6.5.3. Automatització del procés mitjançant software

Per dur a terme el control i la supervisió dels equips pel processament de la sang a la planta pilot es va triar utilitzar el *software* SCADA (*Supervisory Control and Data Acquisition*), un sistema típicament utilitzat en el control de l'automatització industrial. Aquest sistema implementa diferents elements de programació que permeten supervisar, recopilar i processar dades, interactuar i controlar la maquinària (bombes, vàlvules, motors, etc.) mitjançant el programari HMI (*Human Machine Interface*) o registrar successos d'interès.

La informació dels sensors o *inputs* manuals és enviada als PLC (*Programmable Logic Control*) o RTU (*Remote Terminal Units*), que a la vegada envien la informació al programari SCADA, que analitza i mostra les dades a l'operari, facilitant-li el control dels equips, a més d'optimitzar els processos, augmentar la productivitat i disminuir els possibles riscos operacionals associats.

A la Figura 6.33 s'observen les pantalles de control mitjançant SCADA per la línia tècnica i higiènica, respectivament.

A la part inferior-centre i dreta de la pantalla s'observen les diferents opcions o panells de control que permeten accedir a la pantalla de control del procés tècnic (TECHNICAL), procés higiènic (HYGIENIC), especificacions tècniques dels paràmetres de cada procés (SET POINTS), dades de treball dels diferents equips (EQUIPMENT), alarmes de procés (ALARMS) o control del procés de neteja mitjançant CIP (CIP

CLEANING). Les indicacions START/STOP permeten iniciar o aturar el procés en mode automàtic una vegada definits tots els paràmetres del procés optimitzat en la finestra SET POINTS. L'opció AUT/MANUAL possibilita passar al mode automàtic o manual segons conveniència. La funció RST ALL permet esborrar les alarmes del panell inferior-esquerra (PROCES ALARMS) una vegada gestionades.

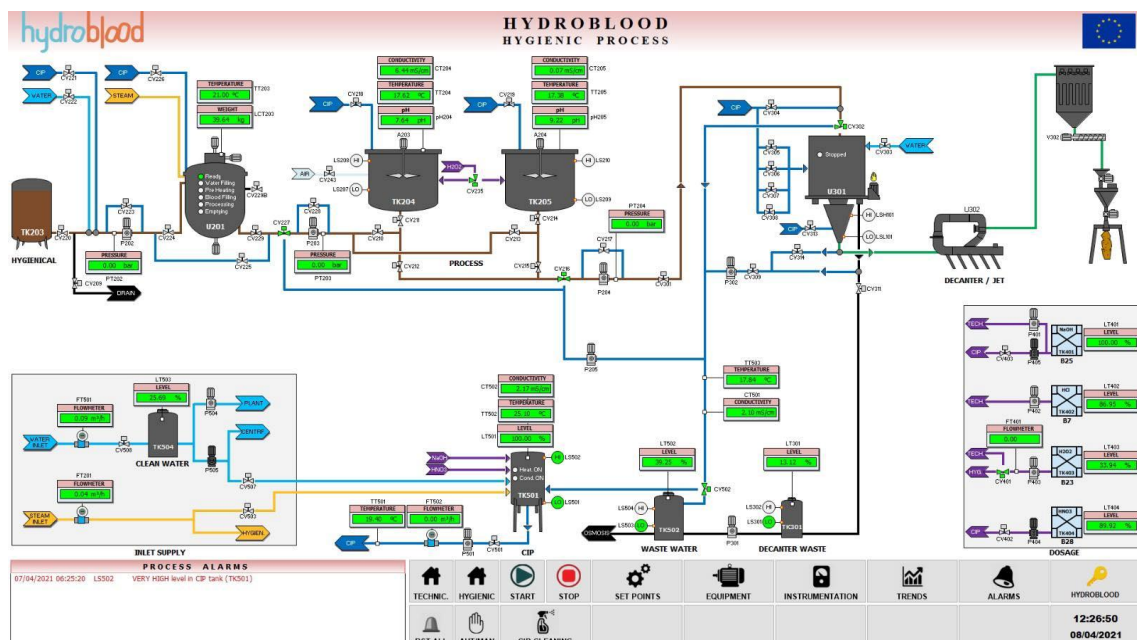
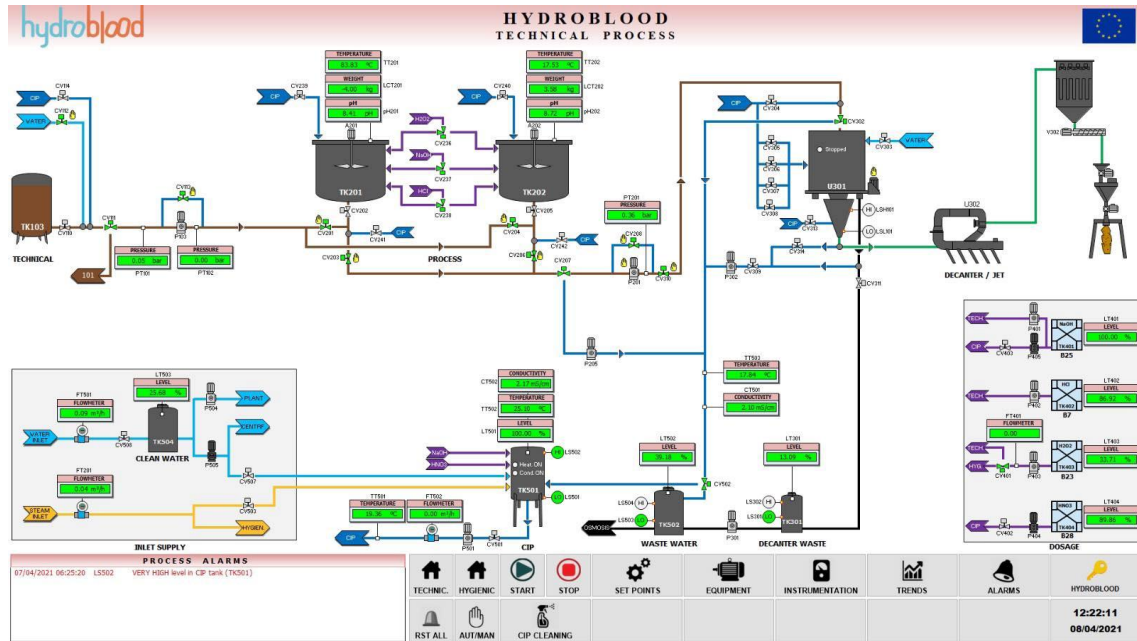


Figura 6.33. Pantalla de control del software Scada per la línia de processat de sang tècnica (imatge superior) i sang higiènica (imatge inferior) de la planta pilot industrial.

A la part superior de la pantalla, dins del panell de control pels processos, es mostren les línies de processament de la sang, mentre que a la part inferior s'observen les línies d'aigua, gas, neteja CIP i aigües residuals de procés. A la part dreta-inferior es mostren les quatre línies de reactius utilitzats.

En color marró es marca el circuit de producció per ambdós productes o aigua de producte fins a la centrífuga, a partir del qual es mostra la línia de producció en color verd. Les línies pels reactius es mostren en color lila; la línia d'aigua de xarxa es mostra en blau clar; en blau fosc s'observa la línia del CIP que permet aplicar les diferents solucions de neteja o aigua per esbandir; en color groc es mostra la línia de vapor que alimenta la camisa del tanc CIP o del *triagi* de la línia higiènica.

La instrumentació de la planta es mostra en forma de panells en color verd (o vermell en cas d'alarma per possibles errors o excés de *set point*) en el punt aproximat d'on estan ubicats. Es disposa de sondes de temperatura (°C), pH, conductivitat (mS/cm), pes (kg), pressió (bar), nivell (%) i cabal (m³/h).

El mode manual de l'SCADA permet manipular l'obertura i tancament de vàlvules i activació o desactivació i modificació de paràmetres de les bombes, a partir del qual es pot dur a terme el control de tot el procés.

6.6. PRODUCTE OBTINGUT EN LA PLANTA PILOT

6.6.1. Caracterització del producte obtingut en la planta pilot

A continuació s'exposen els resultats de la caracterització dels productes higiènic i tècnic, obtinguts en les diferents proves que es van realitzar en la planta pilot demostrativa.

Caracterització inicial

El producte obtingut en les proves inicials realitzades a la planta va ser caracteritzat pel laboratori Biotechveg (Alacant, Espanya). A la Taula 6.5 es mostren els resultats de la caracterització fisicoquímica d'una mostra tant del producte higiènic com del tècnic.

Taula 6.5. Caracterització fisicoquímica dels productes proteics obtinguts a la planta pilot industrial.

Valor	Mètode d'anàlisi emprat	Producte higiènic	Producte tècnic
Energia (kcal/100g)	Càlcul teòric	368,45	380,97
Energia (kJ/100g)	Càlcul teòric	1593,99	1633,39
Greixos (g/100g)	Fracció èter i mètode Soxhlet	1,38	2,73
Àcids grassos saturats (g/100g)	GC-FID	<0,10	<0,10
Hidrats de carboni (g/100g)	Càlcul	<0,50	<0,50
Sucres (g/100g)	Volumetria	<0,50	<0,50
Fibra total (g/100g)	Extracció àcida	0,20	0,22
Proteïna (g/100g)	Mètode Kjeldahl	94,40	89,00
Sal (NaCl) (g/100g)	Volumetria	0,75	<0,01
Humitat (g/100g)	Gravimetria	7,50	10,00
Cendres (g/100g)	Gravimetria	2,01	2,33

La humitat obtinguda mitjançant l'assecat en JET presenta bastanta fluctuació, amb una humitat de 7,5 % pel producte higiènic, mentre que arriba al 10,0 % pel producte tècnic. Aquesta fluctuació es dona a conseqüència de que no s'ha arribat a optimitzar completament el procés, doncs el valor objectiu per aquest paràmetre era del 10 %, paràmetre que sí s'aconsegueix en el producte tècnic.

Si es comparen els valors nutricionals obtinguts pel producte higiènic respecte als determinats en les proves del producte obtingut a escala de laboratori (Capítol 4) s'observen resultats molt similars, obtenint un percentatge proteic de 94,4 % envers a 94,9 %, respectivament, i un valor de cendres de 2,01 % envers a 2,34 %.

Per contra, s'obtenen valors lleugerament diferents als determinats a nivell de laboratori en el producte tècnic (Capítol 3), amb un percentatge de proteïna del 89,0 % enfront a un 84,66 % i valors de cendres del 2,33 % respecte a un 4,3 %. Aquestes diferències són degudes a l'obtenció d'un producte amb una major

quantitat d'aigua residual. Si es calcula el percentatge proteic respecte a l'EST, s'observen uns valors del 98 % de proteïna respecte al 94 % a nivell de laboratori.

Les determinacions d'aminoàcids (mitjançant HPLC-UV/PNT-FER-009) i les diferències del percentatge de cada un respecte a les determinacions realitzades a partir de producte obtingut al laboratori es mostren a la Taula 6.6. Aquests resultats s'han dut a terme a partir de la valoració d'una sola mostra de producte proteic degut a la complexitat d'aquest anàlisi i sols per observar-ne tendències.

Taula 6.6. Aminograma dels productes obtinguts en la planta pilot industrial i increment ($\Delta\%$: $\%_{\text{planta pilot}} - \%_{\text{laboratori}}$) respecte al percentatge determinat en els productes obtinguts a nivell de laboratori.

Aminoàcids (g/100g)	Producte higiènic	$\Delta\%$ higiènic	Producte tècnic	$\Delta\%$ tècnic
Àcid aspàrtic	12,41	-0,09	11,82	1,22
Àcid glutàmic	11,23	1,43	11,40	2,90
Alanina	0,95	-8,75	0,28	-7,82
Arginina	17,12	12,32	15,59	8,79
Cisteïna	0,40	-0,40	0,19	0,11
Fenilalanina	4,49	-0,41	5,37	-2,43
Glicina	6,37	1,07	5,16	0,86
Hidroxiprolina	2,65	ND	3,74	ND
Histidina	3,30	-2,50	3,68	-0,22
Isoleucina	2,66	1,76	3,70	2,60
Leucina	14,99	3,49	12,78	-1,92
Lisina	7,78	0,18	7,02	-2,88
Metionina	2,03	1,13	3,17	2,57
Prolina	0,61	-3,79	0,94	-3,06
Serina	0,55	-4,85	0,51	-3,69
Tirosina	1,49	0,29	0,68	-1,32
Treonina	0,25	-4,15	0,23	-3,37
Triptòfan	3,39	2,69	5,29	ND
Valina	5,63	3,77	5,52	-3,98
TOTAL	98,29		97,07	

Els resultats de les determinacions d'aminoàcids mostren lleus diferències en els percentatges obtinguts en els productes higiènic i tècnic de la planta pilot respecte als obtinguts a nivell de laboratori. En ambdós casos s'observa una disminució rellevant de l'Alanina, la Prolina, la Serina i la Treonina, el que indueix a l'augment per proporció dels altres aminoàcids com l'Àcid glutàmic, Isoleucina, Metionina o l'Arginina. Aquests resultats són indicatius d'unes condicions més severes en el procés d'obtenció del producte a nivell de planta pilot industrial respecte a les condicions de laboratori. Tot i això, per obtenir resultats concloents, caldria dur a terme un estudi més acurat que determinés, a partir d'un major nombre de mostres analitzades, si es dona un efecte significativament diferent del tractament emprat sobre el producte resultant obtingut en la planta pilot envers als resultats del de laboratori.

En la Taula 6.7 es mostren els resultats obtinguts en la caracterització microbiològica de cinc concentrats proteics tècnics. Es van observar resultats òptims en la determinació dels recomptes d'Enterobacteris, on es va determinar en totes cinc mostres valors inferiors a 10 ufc/g de producte. També es van obtenir resultats satisfactoris en la determinació d'absència de salmonel·la per 25 grams de producte. Per altra banda, si ens fixem en els resultats obtinguts pels recomptes d'aerobis mesòfils, es pot observar que totes les determinacions es troben dins de l'interval que es considera higiènicament acceptable, pel que es pot considerar que s'obté una qualitat higiènica general bona. Aquests resultats són molt similars als valors obtinguts en mostres produïdes a escala de laboratori, determinats en els estudis preliminars (Capítol 3), pels tres grups de microorganismes analitzats.

Taula 6.7. Recomptes de microorganismes en cinc mostres de producte proteic tècnic obtingut a la planta pilot a partir de sang porcina. Els valors s'expressen en ufc/g de mostra pels recomptes d'Enterobacteris, Aerobis mesòfils i la determinació de la presència/absència de Salmonella spp.

Mostra	Aerobis mesòfils (ufc/g)	Enterobacteris (ufc/g)	Salmonella spp. (en 25 g)
T1	< 10	< 10	Absència
T2	< 10	< 10	Absència
T3	< 10	< 10	Absència
T4	3,7 x 10 ³	< 10	Absència
T5	1,4 x 10 ²	<10	Absència

Caracterització del producte higiènic obtingut a la planta pilot

A continuació es mostren els resultats obtinguts en la caracterització fisicoquímica i microbiològica de 5 rèpliques de concentrat proteic procedent de sang higiènica obtinguts a la planta pilot en dies diferents (5 produccions diferents). Aquestes determinacions es van realitzar als laboratoris de la UdG en una segona fase de les proves de funcionament de la planta pilot. A la Taula 6.8 es mostra la composició, a_w i contingut en ferro i calci de les mostres de producte proteic obtingut a partir de sang higiènica a la planta pilot, després de les primeres proves de funcionament.

Els valors d'humitat presenten una mitjana de $8,16 \pm 2,07$ %, amb valors que van del 4,74 al 10,01 %. Yang i Lin (1998) determinen un percentatge d'humitat similar (del 7 %) en l'obtenció d'extracte proteic de globina descolorada amb peròxid, tot i que van aplicar un sistema de liofilització. Per altra banda, Low *et al.* (2014) també obtenen un percentatge d'humitat similar (5-8 %) després de liofilitzar farina de sang descolorada amb àcid peracètic per obtenir una matèria primera bioplàstica.

En aquest cas, els valors obtinguts, tot i trobar-se per sota el valor establert d'humitat desitjada (10 %), presenten una gran variabilitat, el que es veurà reflectit en la variació de la resta de components. Aquesta variabilitat és conseqüència de la dificultat en l'ajustament de les condicions d'assecat del producte en la planta pilot, que depèn, en primer lloc, d'un correcte funcionament de la centrífuga, on s'elimina una gran part de l'aigua del procés i, en segon lloc per l'assegador. Aquest últim, en funció de la humitat del producte entrant, pot augmentar l'alimentació i/o temperatura per assolir el grau d'assecat desitjat.

Si ens fixem en els valors d' a_w , es pot observar que aquests oscil·len seguint la mateixa tendència que la humitat de cada mostra, obtenint una mitjana de $0,38 \pm 0,10$, el que representa una gran variabilitat en aquest factor. Tot i això, el valor més elevat que s'obté és de 0,47, el que encara queda allunyat del valor lliandar de 0,6, a partir del qual poden créixer certs microorganismes patògens.

Taula 6.8. Resultats de la caracterització dels productes proteics higiènics obtinguts en la planta pilot a partir de sang porcina en 5 produccions diferents. Es mostra el percentatge d'humitat, cendres, greix i proteïna, activitat d'aigua (a_w) i el contingut en ferro (mitjanes \pm DE).

Paràmetre	M1	M2	M3	M4	M5	Mitjana \pm DE (n=5)
Humitat (%)	4,74 \pm 0,03	8,57 \pm 0,02	8,00 \pm 0,24	9,50 \pm 0,10	10,01 \pm 0,11	8,16 \pm 2,07
a_w (25°C)	0,21 \pm 0,00	0,42 \pm 0,00	0,35 \pm 0,00	0,43 \pm 0,00	0,47 \pm 0,00	0,38 \pm 0,10
Proteïna (%)	93,47 \pm 0,07	89,05 \pm 0,21	91,23 \pm 0,91	91,92 \pm 4,55	86,38 \pm 0,68	90,41 \pm 2,76
Greix (%)	1,03 \pm 0,02	2,31 \pm 0,01	0,76 \pm 0,04	0,53 \pm 0,30	1,50 \pm 0,14	1,23 \pm 0,71
Cendres (%)	2,56 \pm 0,01	2,31 \pm 0,01	2,49 \pm 0,01	2,04 \pm 0,03	2,98 \pm 0,02	2,48 \pm 0,35
Ferro (g/kg)	1,70 \pm 0,18	1,90 \pm 0,06	1,70 \pm 0,28	2,40 \pm 0,02	4,30 \pm 0,08	2,40 \pm 1,10
Calci (g/kg)	0,46 \pm 0,01	0,42 \pm 0,00	0,49 \pm 0,02	0,43 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01	0,45 \pm 0,03

El percentatge mitjà de proteïna és de $90,41 \pm 2,76$ %, valor inferior al determinat a nivell de laboratori, que és del 94,90 %. Aquesta diferència és deguda a la diferència d'humitat donada pel mètode utilitzat, pel que si es té en compte el valor sobre extracte sec s'obté un percentatge del 98,45 % de proteïna, respecte a l'obtingut a nivell de laboratori del 98,94 %, el que representa el mateix resultat. Aquest percentatge és molt superior al determinat per Yang i Lin (1998), amb un $86,2 \pm 0,5$ % de proteïna en extracte de sang porcina tractada amb peròxid d'hidrogen i dessecat mitjançant liofilització. Per altra banda, encara s'observa més diferència respecte al valor determinat per Gómez *et al.* (1999), amb un $75,87 \pm 0,21$ % de proteïna en un hidrolitzat de fracció cel·lular descolorat mitjançant NaOCl i dessecat per atomització.

El percentatge de greix és de $1,23 \pm 0,71$ %, percentatge molt similar al determinat en el producte tècnic en els estudis preliminars (capítol 3), amb una mitjana d' $1,35 \pm 0,10$ %, valors molt similars als determinats per Zheng *et al.* (2014) en hidrolitzat de fracció cel·lular de sang d'ànec, amb un valor d' $1,61 \pm 0,12$ %. Aquest valor també és molt similar al que presenten altres productes proteics substituïbles pel producte obtingut, com la proteïna de sèrum de la llet, proteïna de sèrum hidrolitzada o el caseïnat analitzat per Kerkaert *et al.* (2011), amb un contingut de l'1,5 %.

El valor mitjà determinat per les cendres és de $2,48 \pm 0,35$ %, el que concorda amb els resultats obtinguts al laboratori, amb un $2,52 \pm 0,72$ %. Aquest valor és semblant al reportat per Yang i Lin (1998) en extractes proteics de fracció cel·lular de sang porcina descolorada amb peròxid, amb un valor de $2,8 \pm 0,8$ %, però inferior al d'altres ingredients proteics com el caseïnat o proteïna de sèrum làctic, que presenten un contingut en cendres del 4 % (Kerkaert *et al.*, 2011).

Els valors de ferro obtinguts són de $2,4 \pm 1,10$ mg/kg de producte. En una de les mostres s'observa un contingut major, el que es relaciona directament amb el major contingut de cendres. Aquests resultats són molt similars als obtinguts en producte tècnic als estudis preliminars, on es va determinar un contingut de ferro de $2,20 \pm 0,11$ g/kg en producte tècnic obtingut a nivell de laboratori, i de $2,21 \pm 0,12$ g/kg en producte obtingut en planta pilot de menors dimensions.

Els valors de calci determinats són de $0,45 \pm 0,03$ g/kg. El contingut de calci de la sang sencera és de 0,08 g/kg (Valero *et al.*, 2018), el que equival a 0,42 g/kg d'extracte sec, que concorda amb els resultats obtinguts en l'extracte proteic. Tenint en compte que la ingesta diària recomanada per un adult és de 1 a 1,2 g (NIH, 2021b), la ingesta de 100 g de producte proteic comportaria l'aportació de 0,045 g, el que no representa una quantitat de calci significativa.

Per altra banda, els resultats de l'anàlisi del color instrumental es mostren a la Taula 6.9, on es presenten els paràmetres CIE $L^*a^*b^*$, el cromà, la tonalitat, l'escala RGB i la representació del color dels productes obtinguts.

En tots els paràmetres del color s'observa una variabilitat molt alta; la producció que presenta una major lluminositat i , per tant, un color més clar, és la mostra 2 amb un valor de 50,14, seguit de la 5, 4, 1 i, finalment, la 3, amb un valor de 25,37. Si ens fixem en el paràmetre a^* , s'observen valors que van del 17,92 en la mostra 4, fins el 8,15 en la mostra 5. Pel paràmetre b^* s'han determinat valors del 36,18 en la mostra 2 fins a 0,35 per la mostra 5. Aquesta variabilitat es reflecteix en el cromà, que representa la saturació del color, i en la tonalitat.

Taula 6.9. Paràmetres del color de les 5 produccions de concentrat proteic higiènic obtingudes a la planta pilot a partir de sang porcina. Es mostren els paràmetres CIE L^* a^* b^* del color, el cromà, la tonalitat, els paràmetres de l'escala RGB, la representació del color per cada mostra i la mitjana \pm DE.

Paràmetre	M1	M2	M3	M4	M5	Mitjana \pm DE (n=5)
L*	31,82 \pm 0,42	50,14 \pm 0,60	25,37 \pm 1,76	41,29 \pm 1,06	44,14 \pm 0,42	38,68 \pm 9,95
a*	9,92 \pm 0,53	17,39 \pm 0,44	10,92 \pm 1,16	17,92 \pm 0,01	8,15 \pm 0,27	12,86 \pm 4,49
b*	14,00 \pm 2,96	36,18 \pm 0,26	5,54 \pm 2,30	28,06 \pm 1,36	0,35 \pm 55,14	16,83 \pm 15,06
Cromà	17,16	40,14	12,24	33,29	8,16	22,20 \pm 13,84
Tonalitat	54,68	64,33	26,90	57,44	2,46	41,16 \pm 25,91
RGB	95 69 53	159 107 57	77 53 52	134 85 52	129 99 44	

Aquesta variabilitat segurament és conseqüència d'algunes irregularitats i desajustos en els paràmetres del procés aplicat. Per una banda, caldria fer un seguiment de les condicions que es donen en el procés de tractament tèrmic de la sang higiènica, per evitar un sobreescalfament, doncs s'ha observat una gran variabilitat en el temps d'escalfament degut a fluctuacions en el funcionament de l'equip (el *triagi*) o en el subministrament de vapor, on s'han detectat diferències de pressió i temperatura al llarg del temps. Per altra banda, un aspecte important a tenir en compte és l'eficàcia de l'homogeneïtzació del producte durant el procés de descoloració, que si no es realitza correctament, pot provocar que sols una part del producte es descolori correctament, obtenint una heterogeneïtat dins del reactor que repercuteix en la coloració final general.

Els resultats de la caracterització microbiològica de les mostres dessecades es mostren a la Taula 6.10, on es poden observar els recomptes d'enterobacteris, aerobis mesòfils, esporulats, clostridis sulfit reductors i *Staphylococcus coagulasa positius*, i la presència o absència en 25 g de producte de *Listeria monocytogenes* o *Salmonella spp.*

En les mostres 1 i 5 es van observar recomptes acceptables, amb valors < 10 ufc /g per Enterobacteris, Esporulats, i *Staphylococcus Coagulasa Positiu*, a més de l'absència de *Listeria monocytogenes* i salmonel·la en 25 g de producte. Els recomptes d'aerobis mesòfils totals en aquestes dues mostres, de l'ordre de 10^3 ufc/g, també són acceptables.

Per contra, la resta de mostres presenten un major recompte de bacteris; la mostra 3 presenta fins a 10^3 ufc/g d'Enterobacteris, la 2 i la 5 fins a 10^4 ufc/g d'aerobis mesòfils, i s'han recomptat 10^3 ufc/g d'esporulats per les mostres 3 i 4, i 10^4 ufc/g per la mostra 2. Aquests resultats es troben al límit o excedeixen els valors establerts pel Reglament (CE) nº 2073/2005, que especifica uns criteris higiènic general per productes derivats de la carn de 3,5 log per aerobis mesòfils i 1,5 log per Enterobacteris. Tanmateix, donada l'elevada variabilitat en aquestes 5 produccions, caldria un estudi més complet, analitzant més quantitat de mostres,

per poder comprovar si la qualitat higiènica del producte final és l'adequada. Aquests recomptes poden ser deguts a problemes durant el procés o a la qualitat higiènica de la matèria primera, per tant, un cop s'hagi aconseguit estandarditzar totes les etapes del procés seria necessari fer un seguiment de la contaminació del producte final, amb un nombre major de mostres, incloent també una anàlisi de la qualitat microbiològica de la matèria primera.

Taula 6.10. Recomptes de diferents microorganismes en cinc mostres de concentrat proteic higiènic obtingut a la planta pilot a partir de sang porcina. Els valors s'expressen en ufc/g de mostra pels recomptes d'Enterobacteris, Aerobis mesòfils, Esporulats, Clostridis Sulfit Reductors, Staphylococcus Coagulasa Positiuus, i la determinació de la presència/absència en *Listeria monocytogenes* i *Salmonella spp.*

	M1	M2	M3	M4	M5
Enterobacteris (ufc/g)	< 10	< 10	2,5 x 10	1,7 x 10 ³	< 10
Aerobis mesòfils (ufc/g)	6,4 x 10 ³	3,6 x 10 ⁴	2,3 x 10 ²	1,0 x 10 ⁴	5,6 x 10 ³
Esporulats (ufc/g)	< 10	3,9 x 10 ⁴	1,9 x 10 ³	2,7 x 10 ³	< 10
Clostridis Sulfit Reductors (ufc/g)	< 10	< 10	2 x 10	< 10	< 10
Staphylococcus Coagulasa Positiuus (ufc/g)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Listeria monocytogenes</i> (en 25 g)	Absència	Absència	Absència	Absència	Absència
<i>Salmonella</i> (en 25 g)	Absència	Absència	Absència	Absència	Absència

Si es comparen aquests resultats amb els obtinguts en l'anàlisi microbiològica del producte tècnic, es pot observar que la qualitat higiènica de la proteïna tècnica és millor que aquesta. Això podria ser degut a que les condicions del procés tècnic són més agressives, el que permetria higienitzar en major grau la sang de partida, tot i que per tractar-se de sang recollida sense condicions higièniques aquesta també hauria de presentar una major contaminació inicial que la higiènica. Per altra banda, la contaminació detectada en el producte higiènic podria ser deguda a unes condicions higièniques insuficients durant la recollida i el manteniment (de màxim 3 dies) de la sang, quan es van realitzar aquestes produccions, pel que, tal com s'ha comentat anteriorment, caldria aplicar un pla de control de la matèria primera per determinar els recomptes de la microbiota contaminant de la sang abans de ser utilitzada.

Per últim, caldria fer un control exhaustiu dels processos duts a terme en les neteges mitjançant CIP, a més a més d'un control de les superfícies i aplicar les mesures definides en un pla de neteges i desinfecció per validar aquests procediments i determinar l'estat higiènic dels equips i les línies de la planta pilot. Totes aquestes mesures es contemplaran en l'elaboració del pla APPCC.

6.7. PROCÉS D'AUTORITZACIÓ SANITARI

L'autorització sanitària de la planta pilot s'ha dut a terme pel procés de sang tècnica, ja que és la matèria primera de major disponibilitat de l'escorxador Mafrica i, per tant, el procés més viable a nivell productiu. Aquesta autorització es va dur a terme a través del DACC (Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural (DACC) de la Generalitat de Catalunya.

La resolució provisional d'inscripció en el Registre del sector de l'alimentació animal i de l'àmbit dels subproductes animals i productes derivats no destinats al consum humà (SANDACH) es du a terme en aplicació del Reglament (CE) 183/2005, Reglament (CE) 1069/2009 i del Decret 81/2012. Tal com es descriu en el Capítol 1, apartat 1.4.6, el mètode utilitzat de transformació de sang en un hemoderivat s'acull en el mètode 7 del capítol III de l'annex IV del Reglament (CE) 142/2011.

En data 19 de gener del 2021, es va resoldre la inscripció provisional, condicionada pel compliment dels aspectes següents:

- Anàlisis microbiològiques, durant 30 dies consecutius, del producte proteic obtingut pel consum animal, determinant els recomptes de *Clostridium*, *Salmonella* i enterobacteris. Aquestes anàlisis les ha realitzat un laboratori acreditat (Biotechveg - Laboratorios de análisis agroalimentarios, Alacant, Espanya) que ha certificat l'absència de *Clostridium perfringens* i *Salmonella spp.*, i uns recomptes de <10 ufc/g en totes les mostres analitzades dins d'un total de 30, recollides en 30 dies consecutius a la planta pilot.
- Presentació dels resultats analítics anteriors conforme al Reglament (CE) 142/2011 al DACC.
- Document emès per un organisme o entitat científicament acreditat que indiqui que el mètode de transformació analitzat ha permès determinar tots els perills associats a la metodologia i que aquests s'han pogut reduir a un nivell insignificant per la salut pública o animal. Aquest document ha estat elaborat i presentat per part de la Dra. Carmen Carretero de la Universitat de Girona a dia 2 de febrer de 2021.

Una vegada presentada tota la documentació, en data 25 de març del 2021, l'òrgan administratiu va procedir a realitzar una presa de mostres oficials, a data 20 de abril, que es van analitzar per determinar uns resultats correctes a dia 6 de maig. Així, finalment es va resoldre positivament la inscripció i autorització a l'empresa sol·licitant a dia 10 de maig de 2021 per les activitats de fabricació de matèries primeres d'origen animal i processament o transformació de subproductes animals de categoria 3 de l'espècie porcina per l'obtenció d'hemoderivat mitjançant mètode 7.

6.7.1. Sistema APPCC

Per garantir una correcta detecció dels perills associats al procés i la planta de producció del concentrat proteic, a més a més del seu correcte funcionament, s'ha realitzat el pla APPCC.

La FAO (Food and Agriculture Organization, 2003) defineix un pla APPCC (Anàlisi de Perills i Punts Crítics de Control) com un document preparat de conformitat amb els principis del sistema APPCC, de tal manera que el seu compliment assegura un control dels perills que resulten significatius per la innocuïtat dels aliments en la cadena alimentària. A la vegada, considera un APPCC com un sistema que identifica, avalua i controla aquests perills.

En el pla APPCC es du a terme una anàlisi dels perills, on es recopila i avalua la informació sobre els perills i condicions que els originen, per determinar quins són importants en relació a la innocuïtat dels aliments pel consum humà, pels que s'aplica una sèrie de mesures correctores o mesures de control compreses en els diferents plans.

L'elaboració de l'APPCC per la planta pilot industrial pel processament de sang higiènica s'ha realitzat a través d'una empresa externa (Enginyeria i Consultoria Costa S. L., Barcelona, Espanya). Prèviament a l'APPCC, es van definir el conjunt de plans de prerequisits, els quals engloben les pràctiques i condicions de treball necessàries abans i al llarg de la implantació de l'APPCC, que s'han de dur a terme en l'espai físic on es desenvolupa l'activitat industrial alimentària. Aquests prerequisits són essencials per a la seguretat alimentària, d'acord amb el que es descriu en els principis generals d'higiene alimentària i que compleix amb el codi de pràctiques de la Comissió del *Codex Alimentarius*. Els plans de prerequisits establerts són els següents:

1. Pla de control de l'aigua.
2. Pla de neteja i desinfecció.
3. Pla de control de plagues i animals indesejables.
4. Pla de formació del personal.
5. Pla de control de proveïdors: control de recepció.
6. Pla de traçabilitat.
7. Pla de control de temperatures i processos.
8. Pla de manteniment i calibració/verificació.
9. Pla d'al·lèrgens.
10. Pla de control de residus i subproductes.
11. Pla de control d'incidències i no conformitats.
12. Pla d'analítiques de matèria primera, producte acabat o de superfícies.

Per realitzar l'anàlisi dels perills i punts crítics de control s'han definit quin tipus de perills es poden esperar i en quina gravetat es poden presentar. Així, es defineixen els perills següents:

- **Biològics:** poden transmetre malalties de transmissió alimentària o toxiinfeccions alimentàries, i poden ser de tipus microbiològics tals com insectes, rates, ocells, gats, etc., que poden comportar contaminació creuada i que es gestionen mitjançant el Pla de control de plagues; o microbiològics tals com bacteris, virus o fongs que se'n pot distingir la presència, contaminació o proliferació. Els que es consideren de gravetat més alta i, per tant, se n'ha de realitzar un control més acurat, són els aerobis totals i Enterobacteris, que s'utilitzen com a criteri higiènic del procés i del producte, i també *Salmonella spp.*, *E. coli*, *L. monocytogenes* i *S. aureus*, que s'utilitzen com a criteri indispensable de seguretat alimentària. Per prevenir uns recomptes massa elevats de microorganismes indicadors o la presència de microorganismes patògens s'ha desenvolupat el Pla de neteja i desinfecció, el Pla de formació de personal en bones pràctiques d'higiene i de manipulació d'aliments i el Pla de proveïdors. Per altra banda, com a mesures correctores s'aplicaria un control en el Pla de neteja i desinfecció, Pla de proveïdors i Pla d'analítiques, on s'analitzaria la matèria primera, el producte acabat i les superfícies de producció.

- **Físics:** es defineixen com a cossos estranys qualsevol partícula de material contaminant que s'incorpora accidentalment, i no relacionada amb els ingredients de l'aliment, que pot ocasionar un dany al consumidor o un defecte de qualitat, o també provocar danys en les estructures o la maquinària. Els objectes estranys són materials que poden aparèixer en el producte tals com peces metàl·liques despreses dels equips de producció o plàstics provinents del material auxiliar utilitzat. Aquests perills físics es minimitzen aplicant el Pla de manteniment i complint amb unes bones pràctiques d'higiene i manipulació. Per altra banda, també s'ha de controlar el possible sabotatge o frau mitjançant el Pla de *Food Defense* i el Control de Frau.

- **Químics:** referent a elements o compostos químics procedents de contaminació mediambiental (aire, aigua o sòl), substàncies addicionades intencionadament, substàncies presents naturalment en els aliments, migració per contacte (com en plàstics), contacte amb residus de productes utilitzats en la neteja i desinfecció o contaminació per al·lèrgens. Aquests representen un perill per contacte continuat, pel que s'estableixen uns límits admissibles o tolerables definits pel *Codex Alimentarius*. En el cas que aplica, el Pla de control de proveïdors estableix l'homologació per obtenir una sang de partida lliure de residus farmacològics; el Pla de neteja i desinfecció especifica la verificació d'una correcta neteja, desinfecció i esbandit dels equips; i el Pla de control de proveïdors exigeix el certificat de conformitat d'aptitud alimentària per tots els productes utilitzats.

- **Radiològics:** referents a radiacions ionitzants que, en aquest cas, només podrien provenir de l'aigua entrant. Aquest perill es contempla en el Pla de control d'aigua.

Cada perill s'ha avaluat en funció de la gravetat, probabilitat de succés i probabilitat de no detecció, el que defineix un risc insignificant, no significatiu o significatiu. Es defineix una gravetat baixa pels perills que no

poden afectar a la salut pública, mitjana quan poden afectar a la salut pública però no tenen conseqüències greus i no suposen una hospitalització i, finalment, gravetat alta pels que poden afectar d'una manera greu a la salut pública provocant hospitalització, mort, etc.

Punts de control crítics (PCC)

Per determinar els punts de control crítics (PCC) dels processos de la planta s'han analitzat les diferents activitats que es duen a terme en l'espai industrial, i així determinar quines són les mesures o accions a dur a terme en cada etapa del procés. Per determinar els PCC s'ha seguit un arbre de decisions que estableix si un punt no és un PCC, es contempla en els prerequisits, és un punt de control (PC) o és un PCC. A continuació es mostra l'anàlisi que s'ha realitzat per cada etapa del procés:

- RECEPCIÓ SANG HIGIÈNICA

Perill biològic per presència, contaminació o proliferació de microorganismes indicadors patògens. Es pot deure a sang contaminada per la mala manipulació per part del proveïdor, neteja incorrecta dels equips o per temperatura de refrigeració insuficient. Perill físic per presència de cossos estranys (metàl·lics o no metàl·lics) degut a desprendiments dels conductes. Perill químic de contaminació per restes de productes de neteja.

Els perills es preveuen dins del Pla de control de proveïdors, a partir de l'homologació de proveïdors i especificacions de compra, el control de recepció i el Pla de neteja i desinfecció i Pla de manteniment.

- RECEPCIÓ DE REACTIUS

Perill biològic per presència o contaminació per microorganismes indicadors i/o patògens per producte contaminat per part del proveïdor, per contaminació durant la recepció, o per presència de plagues provinents de males pràctiques del proveïdor. Perill físic per presència o contaminació per cossos estranys metàl·lics o no metàl·lics degut a males pràctiques del proveïdor o per manipulació incorrecta i producte mal tancat. Perill químic degut a que el producte no és apte per la indústria alimentària o error en l'additiu anticoagulant afegit.

Es preveuen tots els perills en el Pla de control de proveïdors (control de recepció) i Pla de formació.

- RECEPCIÓ D'AIGUA

Perill biològic per contaminació de l'aigua en origen per microorganismes, físic per contaminació per sòlids o químic per contaminació radiològica o per residus químics. Es defineixen les mesures de prevenció en el Pla de proveïdors, on s'estipula sol·licitar la documentació d'aptitud alimentària a més a més d'unes anàlisis periòdiques a l'empresa subministradora. A més, es determina l'anàlisi periòdica organolèptica i del clor lliure mitjançant un kit per part d'un operari.

- RECEPCIÓ MATERIAL AUXILIAR

Perill biològic per material auxiliar contaminat per males pràctiques del proveïdor o durant la recepció ja sigui per manipulació o per mal estat del moll de recepció; possibilitat de presència de plagues per males pràctiques del proveïdor. Perill físic per presència o contaminació per cossos estranys metàl·lics o no metàl·lics per males pràctiques de manipulació. Perill químic per contaminació química per migració de plàstic o altres materials no aptes per la indústria alimentària.

Tots els perills es preveuen al Pla de control de proveïdors i Pla de formació (recepció de matèries, neteja i desinfecció, bones pràctiques i sol·licitud de la documentació d'aptitud alimentària). S'ha determinat un control de recepció a l'entrada on es confirmarà el bon estat dels productes i la recepció de la documentació necessària (albarà, informació del proveïdor i producte, etc.). També s'ha definit un llistat de proveïdors que s'actualitzarà anualment o quan es doni un canvi puntual, on s'hi especificarà el registre sanitari, la fitxa tècnica dels productes, el qüestionari de proveïdors, estudis analítics, les fitxes de seguretat, contractes, etc.

- REFRIGERACIÓ DE LA SANG HIGIÈNICA

Perill biològic per contaminació de la sang degut a neteges deficientes o per proliferació de microorganismes degut a una temperatura de conservació insuficientment baixa, perill físic per contaminació amb cossos estranys metàl·lics o plàstics degut a desprendiments del tanc d'emmagatzematge de la sang i perill químic per contaminació amb restes de productes de neteja i desinfecció del CIP.

Aquests perills es preveuen en el Pla de neteja i desinfecció, Pla de manteniment i Pla de control de temperatura. Es determina el control de la temperatura del tanc de refrigeració en cada producció, establint-se una correcta temperatura de 0-3 °C, amb una situació límit de 3 h a 3-5 °C.

- EMMAGATZEMATGE DE REACTIUS

Perill biològic per contaminació per plagues o per microorganismes degut a l'incompliment de les bones pràctiques d'emmagatzematge, mala protecció o condicions higièniques deficientes. Perill físic per contaminació amb cossos estranys metàl·lics o plàstics procedents de les instal·lacions, per manteniment deficient o per males pràctiques de treball. Perill químic per contaminació amb restes de productes de neteja i desinfecció o per material mal protegit.

Tots els perills es preveuen en el Pla de neteja i desinfecció, Pla de manteniment, Pla de formació (bones pràctiques d'emmagatzematge i manteniment) i Pla de control de plagues.

- EMMAGATZEMATGE MATERIAL AUXILIAR

Perill biològic per contaminació del material per males pràctiques d'emmagatzematge o condicions deficientes d'higiene, perill físic per contaminació amb cossos estranys metàl·lics o plàstics provinents d'un

manteniment deficient, material mal protegit o mala manipulació i perill químic per contaminació amb restes de productes de neteja.

Aquests perills estan previstos en el Pla de manteniment, Pla de control de plagues (barreres físiques), Pla de formació (bones pràctiques d'emmagatzematge), Pla de neteja i desinfecció i Pla de formació (bones pràctiques d'emmagatzematge).

Es determina l'elaboració d'un Registre de traçabilitat de material auxiliar on s'anoten les dates d'inici i fi d'utilització dels lots de producte.

- LÍNIES DE PRODUCCIÓ

Perill biològic per contaminació per neteja insuficient, perill físic per contaminació amb cossos estranys metàl·lics i plàstics procedents del circuit per falta de manteniment i perill químic per contaminació amb restes de productes del CIP. Es preveuen tots els perills en el Pla de neteja i desinfecció, Pla de manteniment i Pla de formació.

Es determina una verificació anual del sistema CIP i una validació i verificació de la neteja mitjançant un pla d'anàlitiques i el registre de neteges i verificació de neteges. A la Taula 6.11 es mostren els paràmetres microbiològics que s'han d'anitzar en les superfícies en contacte amb els productes i els límits acceptables.

Taula 6.11. Límits acceptables i inacceptables de microorganismes en superfície dins del control de superfícies en contacte amb els productes alimentaris (Reglament 2073/2005).

Microorganisme	Valors acceptables	Valors inacceptables
Aerobis mesòfils	≤ 10 ufc/cm ²	> 10 ufc/cm ²
Enterobacteris	≤ 1 ufc/cm ²	> 1 ufc/cm ²
<i>Listeria monocytogenes</i>	Absència	Presència

A més, s'elabora un registre periòdic on s'hi anotarà l'estat dels equips revisats mitjançant una inspecció visual.

- PROCESSAT DE SANG EN EL TRIAGI

Perill biològic en l'etapa de processat en el *triagi* per un tractament tèrmic insuficient. Es preveu en el Pla de control de temperatures i processos: es defineix assolir una temperatura de 90 ± 5 °C durant 10 ± 2 min.

- DESCOLORACIÓ DEL PRODUCTE HIGIÈNIC

Perill químic per formació de components indesitjables procedents de l'oxidació de lípids pel peròxid d'hidrogen en l'etapa de descoloració. Es contempla en el Pla de control de temperatures i processos on es defineix un temps d'exposició màxim de la sang al peròxid d'hidrogen de 25 ± 5 min.

- ASSECAT DEL PRODUCTE

Perill químic per formació de compostos indesitjables a conseqüència del sobreescalfament del producte durant l'etapa d'assecat, i perill per creixement de microorganismes degut a un assecat insuficient. Es preveu dins del Pla de control de temperatures i processos i el Pla d'analítiques del producte acabat: es defineix una temperatura màxima d'assecat i un producte final amb una humitat del 10 ± 1 % i valors d' a_w inferiors a 0,6. A més, s'han determinat els límits de control microbiològic després de l'assecat, definits a la Taula 6.12, segons el Reglament 2073/2005.

Taula 6.12. Límits acceptables i inacceptables de recomptes de microorganismes en el concentrat proteic deshidratat.

Microorganisme	Valor satisfactori	Valor insatisfactori
Aerobis mesòfils	$\leq 5 \times 10^5$ ufc/g	$> 5 \times 10^5$ ufc/g
Enterobacteris	$\leq 1 \times 10^2$ ufc/g	$> 1 \times 10^2$ ufc/g
<i>Salmonella spp.</i>	Absència en 25 g	Presència en 25 g
<i>Clostridium perfringens</i>	$< 10^2$ ufc/g	$> 10^2$ ufc/g

- ENSACAT

Perill de contaminació conseqüent d'envasos contaminats, físic degut a la presència de cossos estranys metàl·lics o altres procedents d'envasos contaminats o del circuit per falta de manteniment, i químic per restes dels productes de neteja.

Es contemplen els perills i es preveuen en el Pla de control de proveïdors (documentació d'aptitud alimentària), Pla de manteniment i Pla de formació (formació en bones pràctiques d'emmagatzematge).

- EMMAGATZEMATGE DE PRODUCTE ACABAT I EXPEDICIÓ

Perill biològic per creixement de microorganismes en el producte per un mal tancament de l'envàs. Es contempla en el Pla de formació en bones pràctiques d'emmagatzematge.

A més, es determinarà la traçabilitat de tots els lots emmagatzemats, i posteriorment expedits, mitjançant el Pla de traçabilitat. Es realitzarà el control dels lots mitjançant un Registre de traçabilitat on s'anotará el dia de producció, el tipus de producte i el número de lot produït.

6.7.2. Etiquetatge

Tot i que el concentrat proteic no està pensat per ser venut directament al consumidor final, des de l'empresa Azuara S.L. es va plantejar l'elaboració d'una etiqueta segons la reglamentació vigent d'etiquetatge.

En els aliments envasats la informació alimentària ha d'anar a l'etiqueta. S'entén per etiqueta els rètols, marques comercials o de fàbrica, signes, dibuixos o altres descripcions, escrits, impresos, estergits, marcats, gravats o estampats en un embalatge o envàs alimentari, o que acompanyi el mateix. El Reglament (UE) nº 1169/2011 de 25 d'octubre de 2011 regula la informació alimentària facilitada al consumidor per assegurar que es compregui de forma senzilla i clara tota la informació relativa als aliments. Té com a finalitat protegir la salut dels consumidors i garantir el seu dret a la informació per així poder prendre decisions conseqüents i responsables (ACSA, 2019).

La informació alimentària que es mostra en l'etiqueta d'un producte de venda directa al consumidor ha de ser precisa, clara, fàcil d'entendre i que no indueixi a error o confusió. A més, ha de presentar-se en un lloc visible i de fàcil accés. En productes amb una superfície d'envàs major a 80 cm² s'ha d'utilitzar una font igual o superior a 1,2 mm per garantir-ne la llegibilitat.

Els requisits mínims d'obligat etiquetatge per productes derivats carnis, definits en el Reglament (UE) nº 1169/2011, són:

- ✓ Denominació de l'aliment: fa referència a la naturalesa de l'aliment comercialitzat. El producte obtingut es va definir com a *Concentrat proteic deshidratat*.
- ✓ Llista d'ingredients: aquesta no és d'obligat compliment en els productes que per la seva naturalesa no presentin més d'un ingredient, com és aquest cas.
- ✓ Pes net de l'aliment: pot presentar-se en g o kg.
- ✓ Declaració nutricional: ha d'incloure, per 100 g de producte, el valor energètic i les quantitats de greixos, àcids grassos saturats, hidrats de carboni, sucres, proteïna i sal. Degut al seu interès, es van afegir les quantitats d'aminoàcids presents en 100 g de proteïna (aminograma), tot i no ser un paràmetre obligatori.
- ✓ Data de caducitat o de consum preferent: aquesta haurà de ser determinada mitjançant anàlisis de vida útil dutes a terme per un laboratori certificat.
- ✓ Condicions especials de conservació en el cas que siguin necessaris: en aquest cas no aplica.
- ✓ Nom o raó social i direcció de l'empresa que comercialitza l'aliment: en aquest cas és l'empresa Talleres Azuara S.L.
- ✓ Lot: és definit per l'empresa productora i ha de permetre la traçabilitat dels lots produïts: dia, any, línia i número de producció.

- ✓ Registre sanitari (RSI): aquest ha de ser el de l'establiment on es produeix el producte alimentari, que en aquest cas és l'escorxador Mafrica.
- ✓ País d'origen dels animals sacrificats: en el cas que aplica, Espanya.

Es van dissenyar dues etiquetes diferenciades pels dos tipus de concentrats proteics obtinguts a la planta pilot industrial (Figura 6.34). El Pro 96 fa referència al producte obtingut a partir de sang higiènica i dirigida al consum humà (Figura 6.35), i el P 93 és el corresponent al producte obtingut a partir de sang tècnica i dirigit a l'alimentació animal. En aquestes s'hi han afegit tots els elements d'obligada declaració, a més d'altres dades d'interès nutricional.

LOT: XXXXX

Pro 96[®]

Concentrado proteico deshidratado

Declaración nutricional Por 100g

Valor energético	1633 kJ 369 kcal
Grasas	1,4 g
de las cuales saturadas	<0,1 g
Hidratos de carbono	<0,5 g
de los cuales azúcares	<0,5 g
Proteínas	94,4 g
Sal	0,75 g

*No contiene alérgenos.
Proceso de secado mediante turbo-secador.

Aminograma
por 100g de proteínas

ESENCIALES		NO ESENCIALES	
Fenilalanina	4,9 g	Ác. Aspártico	12,5 g
Histidina	5,8 g	Ác. Glutámico	9,8 g
Isoleucina	0,9 g	Alanina	9,7 g
Leucina	11,5 g	Arginina	4,8 g
Lisina	7,6 g	Cisteína	0,8 g
Metionina	0,9 g	Glicina	5,3 g
Treonina	4,4 g	Prolina	4,4 g
Triptófano	0,7 g	Serina	5,4 g
Valina	9,4 g	Tirosina	1,2 g

Conservar en lugar fresco, seco y protegido de la luz solar.
Sin colorantes ni conservantes.
Nº RSI: 10.01182/B, País de origen: España
Talleres Azuara, S.L.
Cl. Licoristas 4 nave 13-15, 43800 Valls (Tarragona) España

XX g o kg

Consumir preferentemente
antes de: **X/X/2019**

LOT: XXXXX

P 93[®]

Concentrado proteico deshidratado

Declaración nutricional Por 100g

Valor energético	1594 kJ 381 Kcal
Grasas	2,7 g
de las cuales saturadas	<0,1 g
Hidratos de carbono	<0,5 g
de los cuales azúcares	<0,5 g
Proteínas	89 g
Sal	<0,01 g

*No contiene alérgenos.
Proceso de secado mediante turbo-secador.

Aminograma
por 100g de proteínas

ESENCIALES		NO ESENCIALES	
Fenilalanina	7,6 g	Ác. Aspártico	10,3 g
Histidina	3,8 g	Ác. Glutámico	8,3 g
Isoleucina	1,1 g	Alanina	7,9 g
Leucina	14,3 g	Arginina	6,6 g
Lisina	9,6 g	Cisteína	0,3 g
Metionina	0,6 g	Glicina	4,2 g
Treonina	3,5 g	Prolina	3,9 g
Triptófano	n.d.	Serina	4,1 g
Valina	9,2 g	Tirosina	1,9 g

Conservar en lugar fresco, seco y protegido de la luz solar.
Sin colorantes ni conservantes.
Nº RSI: 10.01182/B, País de origen: España
Talleres Azuara, S.L.
Cl. Licoristas 4 nave 13-15, 43800 Valls (Tarragona) España

XX g o kg

Consumir preferentemente
antes de: **X/X/2019**

Figura 6.34. Etiquetes dissenyades pels dos concentrats proteics obtinguts (Pro 96 i P 93) a la planta pilot industrial.

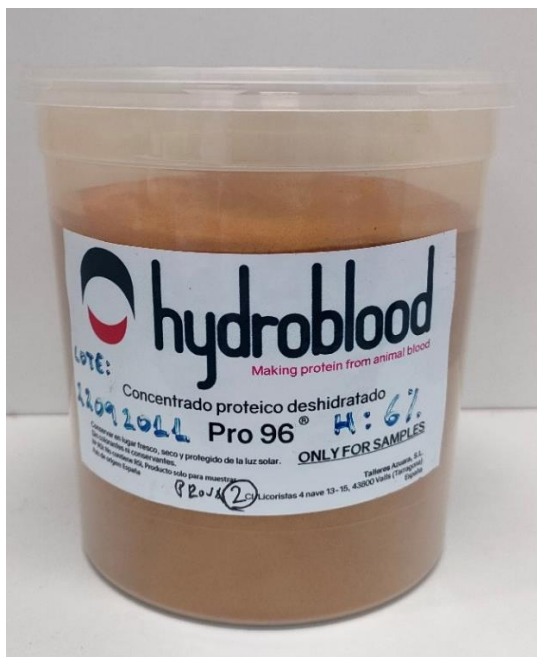


Figura 6.35. Mostra del concentrat proteic deshidratat destinat al consum humà (Pro 96) obtingut a la planta pilot.

6.8. CONCLUSIONS

1. El disseny i construcció de la planta pilot demostrativa ubicada en un escorxador ha permès aplicar, a nivell industrial, els dos mètodes d'obtenció d'un concentrat proteic a partir de sang porcina sencera descrits en els capítols 3 i 4.
2. Mitjançant els mètodes de precipitació àcida i tèrmica, previs a la descoloració de la sang amb peròxid, s'ha obtingut un producte apte pel consum animal i un altre apte pel consum humà, respectivament.
3. L'automatització d'aquests processos en la planta pilot mitjançant el software *Scada* permet controlar els paràmetres del processat de la sang per obtenir un producte homogeni.
4. Les anàlisis microbiològiques dels productes obtinguts ha mostrat un estat higiènic correcte en totes les mostres avaluades.
5. L'anàlisi del procés i les instal·lacions mitjançant el sistema APPCC ha mostrat l'absència de punts crítics de control. Això ha permès establir l'aplicació d'un sistema de pre-requisits com a mètode de control d'higiene i desinfecció que assegurí el bon funcionament de tota la producció.
6. Els resultats obtinguts han permès completar i justificar satisfactòriament el projecte europeu titulat "Planta de processament innovadora per la producció òptima de Proteïna Hidrolitzada i Descolorada (DHP)" dins del programa d'investigació i innovació SMI *Horizon 2020* de la Unió Europea amb nº 766747.

DISCUSSIÓ GENERAL I PERSPECTIVES DE FUTUR

DISCUSSIÓ GENERAL I PERSPECTIVES DE FUTUR

Tal com s'exposa en el Capítol 1, ens trobem dins d'un context de necessitat de trobar nous sistemes de producció i obtenció de proteïna per cobrir la demanda creixent d'aliments lligada al creixement de la població mundial. En conseqüència, s'estan desenvolupant diferents estratègies a nivell de la indústria alimentària centrades en la transició de la proteïna animal cap a altres alternatives més sostenibles, com és el cas de la proteïna vegetal, fúngica, o altres fonts de proteïna emergents que hauran de coexistir amb les fonts de proteïna animal convencionals. Per altra banda, es disposa de fonts de proteïna no utilitzades com són els subproductes d'origen animal de la indústria càrnia.

Aquest estudi es basa en la cerca d'un mètode per aprofitar al màxim la sang, subproducte de la indústria càrnia, per satisfer les necessitats del mercat i les previsions de futur per alimentar la població mundial de forma eficient i sostenible, o per destinar-ho al consum animal, tenint en compte els grans volums que se'n generen, el que permetria reduir la necessitat d'augmentar la producció animal. Així, es resoldrà la necessitat d'obtenir més proteïna animal o altres fonts de proteïna i disminuirà la problemàtica d'una major producció respecte a l'impacte ambiental que comporta.

En els capítols 3 i 4, s'ha estudiat i optimitzat el procés de precipitació àcida i descoloració de la sang sencera mitjançant peròxid d'hidrogen, obtenint un producte proteic en pols apte pel consum humà amb un 93,42 % de proteïna sobre extracte sec que presenta un alt percentatge d'aminoàcids essencials (com Leucina, lisina, Fenilalanina, Tirosina, Treonina i Valina), un alt contingut en ferro (2,2 g/kg) i uns paràmetres del color CIE L*a*b* de L*:47,32, a*: 5,22 i b*: 16,57, el que es tradueix en una coloració ocre-marronosa. Per altra banda, també s'ha estudiat i optimitzat un procés on s'aplica una precipitació tèrmica i descoloració amb peròxid d'hidrogen en sang sencera, assolint millors resultats fisicoquímics en el producte en pols obtingut, amb un 94,9 % de proteïna i uns paràmetres del color CIE L*: 50,18, a*: 6,18; i b*: 20,88, corresponent a una major lluminositat i un color més grogós. Tanmateix, la realització de proves de concepte per la incorporació d'aquest últim producte a formulacions alimentàries ha demostrat ser especialment interessant només en un dels tres models estudiats, obtenint resultats satisfactoris en l'elaboració de galetes, però no en productes carnis cuits com mortadella i paté, on s'ha determinat una baixa funcionalitat com a ingredient estabilitzant de les emulsions càrnies, a més a més d'afectar negativament en la coloració final dels productes obtinguts. Tot i això si que es podria utilitzar com a font de proteïna de càrrega enlloc d'ingredient tecno-funcional.

Amb la construcció de la planta pilot, descrita en el capítol 6, i la implementació d'ambdós processos, s'aconsegueix donar valor a la sang sencera procedent de l'escorxador Mafrica, obtenint dos productes diferenciats segons el procés realitzat, ja sigui la precipitació àcida per obtenir un producte proteic en pols destinat al consum animal, o la precipitació tèrmica, per aconseguir un producte apte pel consum humà. Tot i això, els concentrats proteics obtinguts encara presenten unes característiques fisicoquímiques que

en redueixen el valor enfront al valor potencial inicial de la sang sencera o les seves fraccions per separat, fonamentalment la fracció plasmàtica, que sí que es sol separar i s'utilitza com a ingredient funcional a la indústria càrnia, ja sigui en estat congelat o bé deshidratat.

Fins a dia d'avui, l'empresa Talleres Azuara S.L. ha aconseguit produir i distribuir 10.000 kg de producte proteic derivat de la sang porcina animal pel consum animal, que ha estat destinat a la producció de pinso per animals de producció. Tot i això, degut a la baixa productivitat de la planta demostrativa i, per tant, baixa rendibilitat, s'ha parat el procés productiu (dades actualitzades al desembre del 2022). Per donar-li rendibilitat caldria obtenir un volum més elevat de producte i, per tant, tractar més sang sencera o bé fracció cel·lular per cada lot produït. Per altra banda, l'empresa encara no ha aconseguit vendre la tecnologia i els processos desenvolupats, tot i haver trobat algunes empreses alimentàries interessades en aquests.

També s'ha estudiat l'aplicació d'un procés d'hidròlisi de la sang sencera o de la fracció cel·lular (capítols 4 i 5, respectivament). Els processos aplicats sobre sang sencera no han permès obtenir cap producte proteic amb les característiques fisicoquímiques desitjades, pel que s'ha descartat aquesta via d'estudi. Per altra banda, sí que s'han obtingut resultats d'interès en el processat de la fracció cel·lular de la sang mitjançant hidròlisi amb l'enzim *Flavourzyme*, que ha permès obtenir un concentrat proteic en forma de pols d'alta solubilitat i una coloració clara-beige. El producte obtingut està compost per un 85 % de proteïna i presenta un color CIE $L^*a^*b^*$ de $L^*:83,19$; $a^*: 2,58$; i $b^*:17,57$, essent el producte proteic obtingut amb un major grau de descoloració. Tanmateix, per aconseguir una millor valoració d'aquest producte, caldria dur a terme un estudi més exhaustiu de les seves característiques, com les possibles propietats bioactives dels pèptids presents (activitat antioxidant, antimicrobiana, etc.) o la seva aplicabilitat en productes alimentaris. Cal tenir en compte que el procés d'hidròlisi estudiat encara presenta un baix rendiment (només es recupera un 30-50 % de la proteïna total), resultant en un alt percentatge de producte residual al que no se li ha trobat una utilitat directa (fracció insoluble i amb una coloració marró fosca). Això dificultaria en gran mesura la viabilitat d'aquest procés a nivell industrial que, a més, no seria de fàcil aplicació en la planta pilot desenvolupada, doncs caldria dur a terme varies adaptacions en els equips existents, especialment en la fase de recuperació de les fraccions després del procés d'obtenció de l'hidrolitzat. Així, seria necessari dur a terme un estudi complet d'aquesta metodologia per determinar-ne la viabilitat o, per contra, buscar mètodes alternatius de processament.

En aquesta línia de la hidròlisi enzimàtica, la sang o les seves fraccions per separat poden ser un bon substrat per a la producció d'hidrolitzats proteics rics en ferro hèmic, per ser inclosos en preparats alimentaris com a suplement de ferro amb alta biodisponibilitat (Berraquero-García et al., 2022). També poden ser una bona font d'obtenció d'extractes rics en pèptids bioactius o compostos nutracèutics amb major valor afegit, amb diverses activitats biològiques com ara activitat antimicrobiana, antioxidant, antihipertensiva, etc. (Toldrá et al., 2021; Sanchez-Reinoso et al., 2022). En diversos estudis recents s'han identificat fraccions actives en hidrolitzats de l'hemoglobina o de proteïnes del plasma que tenen diferents

activitats biològiques. Entre aquestes bioactivitats, la presència de pèptids amb activitat antioxidant als hidrolitzats de proteïnes sanguínies pot ser un avantatge en la suplementació dietètica amb ferro hèmic. De fet, alguns estudis han mostrat que el ferro hèmic pot catalitzar la peroxidació lipídica en productes carnis i del peix. De manera que, a més dels pèptids hèmics, la incorporació d'hidrolitzats de proteïnes de la sang pot proporcionar compostos antioxidants, amb capacitat de segrestar el ferro o radicals lliures, que poden compensar l'efecte pro-oxidant del ferro del grup hemo (Nikhita i Sachindra, 2021; Berraquero-García et al., 2022), incrementant el valor afegit d'aquest hidrolitzats.

En general, l'aplicabilitat dels mètodes estudiats depèn en gran mesura de la facilitat d'implantar els processos d'obtenció dels concentrats proteics a nivell industrial, però també depèn de l'acceptació per part de la població de la incorporació d'aquest tipus d'ingredients nutricionals i/o tecno-funcionals obtinguts a partir de subproductes carnis en la seva alimentació. És de vital importància un canvi cultural que tingui com a base una consciència de l'aprofitament dels recursos alimentaris per crear valor i oportunitat en tota la cadena alimentària. A més, és important que qualsevol enfocament que s'utilitzi tingui com a objectiu la seguretat alimentària, la sostenibilitat mediambiental i l'economia global en general. Així, és necessari intentar valoritzar aquests subproductes al màxim, recuperant el major valor possible d'aquests recursos, alhora que se'n minimitzi l'impacte negatiu en el medi ambient (Soladoye et al., 2022).

Per tot això, és necessari continuar en l'estudi de noves tecnologies innovadores que permetin processar i aprofitar la sang, així com altres subproductes animals generats als escorxadors, per trobar solucions, no només encarades a l'alimentació humana i animal, diversificant els models de negoci d'aquesta indústria, sinó també a altres sectors industrials, per poder així aconseguir l'objectiu de residu zero, en un context de bio-economia circular i encarant el futur de la indústria càrnia cap a un desenvolupament més sostenible.

CONCLUSIONS GENERALS

CONCLUSIONS GENERALS

En aquesta tesi de Doctorat Industrial s'ha desenvolupat i optimitzat un procediment per l'obtenció d'un concentrat proteic ric en ferro i d'alt valor nutricional, a partir de sang de porc sencera d'escorxadors industrials. A més, s'ha portat a terme l'escalat del procés a escala industrial. Per altra banda, s'ha estudiat un procés alternatiu per obtenir un extracte proteic amb millors característiques fisicoquímiques.

A continuació, es mostren les conclusions extretes dels diferents capítols de la tesi.

Capítol 3. Estudis preliminars

1. S'ha aplicat la metodologia descrita en el projecte HYDROBLOOD, el que permet obtenir un producte proteic a partir d'una precipitació àcida de la sang i posterior descoloració amb peròxid d'hidrogen.
2. El producte obtingut consisteix en una pols seca homogènia i insoluble de color marró clar-daurat i presenta un extracte sec del 95,75 %, i conté un 93,42 % de proteïna, un 1,35 % de greixos, un 1,11 % de cendres, i un contingut en ferro de 2,20 g/kg.
3. El producte obtingut a escala de planta pilot presenta diferències en l'extracte sec final respecte al producte obtingut a escala de laboratori molt probablement degut al mètode de deshidratació utilitzat. A més, també s'han observat diferències en el contingut de cendres atribuïdes a variacions en les condicions de tractament d'acidificació durant el processat de la sang. La qualitat higiènica d'aquest producte és millor que la dels productes obtinguts al laboratori.
4. L'anàlisi electroforètica mitjançant SDS-PAGE del concentrat proteic ha evidenciat la presència de proteïnes de la sang senceres, el que indica que no s'ha produït hidròlisi durant el processat de la sang. El producte dessecat és ric en els aminoàcids essencials Leucina, Lisina, Fenilalanina, Tirosina, Treonina i Valina, però deficitari en Isoleucina i Metionina.
5. La utilització del metabisulfit de sodi a temperatura ambient, com a sistema de conservació de la sang, enlloc de l'addició d'un anticoagulant i la conservació en refrigeració, no disminueix el creixement de bacteris mesòfils, tot i que sí es mostra eficaç per evitar la proliferació d'enterobacteris durant 14 dies de conservació. Així, el tractament amb metabisulfit no evita el deteriorament de la sang, ni disminueix els recomptes totals als quatre dies de conservació, pel que es descarta la seva utilització com a sistema de conservació alternatiu al convencional degut al seu perill potencial per la salut humana.

Capítol 4. Obtenció d'un concentrat proteic descolorat a partir de sang sencera

1. Les condicions que permeten obtenir una major descoloració de l'extracte proteic de sang porcina són un tractament amb un 1,25% de peròxid i a una temperatura de 60 °C durant 30 min, o bé amb un 1,5% de peròxid a 50 °C durant 30 min. Tanmateix, aquestes condicions no són adequades per obtenir un producte apte per ser utilitzat en alimentació humana, perquè superen la dosi de peròxid (0,75 %) al temps de reacció autoritzats (30 min).
2. L'aplicació d'un tractament tèrmic previ sobre la sang, a 90 °C durant 10 min, i una posterior descoloració amb un 0,75 % de peròxid durant 30 min, permet obtenir un producte final amb grau de descoloració acceptable, essent unes condicions considerades com a segures pel consum humà.
3. L'ingredient proteic obtingut per aquest mètode és una pols insoluble, amb un alt contingut proteic (94,9 %). Tanmateix, no s'aconsegueix una descoloració prou intensa, fet que limita les seves possibilitats d'ús en la formulació de molts aliments.
4. Les proves de concepte d'incorporació de l'ingredient proteic en productes carnis tipus pastes fines emulsionades (mortadel·la i paté) no han presentat resultats favorables, mostrant una baixa funcionalitat com a ingredient estabilitzant de l'emulsió càrnia alhora que el producte final presenta una coloració massa fosca. Per altra banda, si que s'han obtingut resultats satisfactoris en la producció de galetes, mostrant que el producte en pols es podria utilitzar com a ingredient proteic i/o suplement de ferro hèmic en aquests tipus d'aliments.
5. El tractament d'hidròlisi enzimàtica aplicat sobre sang sencera, amb els enzims *Alcalasa* i *Flavourzyme*, combinat amb la descoloració amb peròxid d'hidrogen, no millora la descoloració de la proteïna de la sang. En tots els casos s'obté una major descoloració en el tractament control sense hidròlisi prèvia, pel que es descarta la utilització d'aquesta metodologia.

Capítol 5. Obtenció d'un concentrat proteic descolorat a partir de fracció cel·lular de sang mitjançant hidròlisi

1. El tractament d'hidròlisi enzimàtica aplicat sobre la fracció cel·lular que ha mostrat un major grau de descoloració ha estat el dut a terme utilitzant l'enzim *Flavourzyme*, a 50 °C i pH 7 durant 7,5 h, i l'aplicació d'un tractament de descoloració mitjançant peròxid d'hidrogen.
2. S'ha descartat l'aplicació combinada dels enzims *Neutrasa* i *Flavourzyme* degut a presentar pitjors resultats en quant al grau de descoloració.

3. El concentrat proteic obtingut mitjançant *Flavourzyme* es presenta en forma de pols seca d'alta solubilitat, amb una coloració marró clara-beix. Els paràmetres de color assolits mostren que aquest és el procediment que permet la màxima descoloració de tots els mètodes assajats en aquest treball. La composició química d'aquest producte és d'un mínim del 85 % de proteïna, un 8-9 % de cendres, i un extracte sec de més del 90 %.
4. El rendiment que s'obté en el processat de la sang mitjançant aquest mètode és molt baix, oscil·lant entre un 30 i un 50 % de proteïna recuperada, el que suposa una limitació important en l'aplicació d'aquesta metodologia a escala industrial. Així, només seria econòmicament viable donant valor a la fracció insoluble no descolorada.

Capítol 6. Planta pilot

1. El disseny i construcció de la planta pilot demostrativa ubicada en un escorxador ha permès aplicar, a nivell industrial, els dos mètodes d'obtenció d'un concentrat proteic a partir de sang porcina sencera descrits en els capítols 3 i 4.
2. Mitjançant els mètodes de precipitació àcida i tèrmica, previs a la descoloració de la sang amb peròxid, s'ha obtingut un producte apte pel consum animal i un altre apte pel consum humà, respectivament.
3. Les anàlisis microbiològiques dels productes obtinguts ha mostrat un estat higiènic correcte en totes les mostres avaluades.
4. Els resultats obtinguts han permès completar i justificar satisfactòriament el projecte europeu titulat "Planta de processament innovadora per la producció òptima de Proteïna Hidrolitzada i Descolorada (DHP)" dins del programa d'investigació i innovació SMI Horizon 2020 de la Unió Europea amb nº 766747.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- A**dewale, P., Dumont, M. J., & Ngadi, M. (2016). Enzyme-catalyzed synthesis and kinetics of ultrasonic-assisted biodiesel production from waste tallow. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.032>.
- Aditivos alimentarios. E223- *Metabisulfito de Sodio*. Recuperat de <https://www.aditivos-alimentarios.com/2016/01/E223.html>. Data consulta: 4 octubre, 2019.
- ACSA (Agència Catalana de Seguretat Alimentària). (2004). L'autocontrol als establiments alimentaris: Guia per a l'aplicació de l'autocontrol basat en el Sistema d'APPCC. Recuperat de: https://acsa.gencat.cat/web/.content/Documents/eines_i_recursos/Guia-APPCC.pdf
- ACSA (Agència Catalana de Seguretat Alimentària). (2019). Informació alimentària facilitada al consumidor (Etiquetatge). Recuperat de: https://acsa.gencat.cat/ca/seguretat_alimentaria/seguretat_alimentaria_per_temes/etiquetatge_dels_aliments/que_es_etiquetatge/
- AESAN. (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al uso de la nanotecnología en la industria. *Revista Del Comité*. Recuperat de: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3438776>.
- AESAN. (2011). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al uso del peróxido de hidrógeno como coadyuvante tecnológico en el procesado de hemoderivados y cefalópodos. *Revista Del Comité Científico N° 15*, 11–32. Recuperat de: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3438776>.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Hydrolysates by Trinitrobenzensulfonic Acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27 (6): 1256-1262.
- Agrodigital (2018): La producción de carne en España en 2018 aumentó en un 5%. Recuperat de <https://www.agrodigital.com/2019/03/07/la-produccion-de-carne-en-espana-en-2018-aumento-en-un-5/>. Data consulta: 30 de març 2020.
- Alao, B. O., Falowo, A. B., Chulayo, A., & Muchenje, V. (2017). The potential of animal by-products in food systems: Production, prospects and challenges. *Sustainability (Switzerland)*, 9(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/su9071089>

- Allen, Aceros Inoxidables. Extret a partir de: <http://www.allen.cl/site/acero-inoxidables/bola-lavado/>. Data consulta: 19 de juny, 2021.
- Álvarez García, C. (2012). *Transformaciones de proteínas de sangre. Propiedades funcionales de materias primas y productos*. [Universidad de Oviedo]. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4053.7125>.
- Álvarez, C., Tiwari, B. K., Rendueles, M., & Díaz, M. (2016). Use of response surface methodology to describe the effect of time and temperature on the production of decoloured, antioxidant and functional peptides from porcine haemoglobin by sub-critical water hydrolysis. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 280–289. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2017.11.054>.
- Álvarez, S., Weng, S., Álvarez, C., Marcet, I., Rendueles, M., & Díaz, M. (2021). A new procedure to prepare transparent, colourless and low-water-soluble edible films using blood plasma from slaughterhouses. *Food Packaging and Shelf Life*, 28(January). <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100639>.
- ANAGRASA (Asociación Nacional de Industrias Transformadoras de Grasas y Subproductos Animales) (2018). La industria europea de subproductos animales aboga por la economía circular. Revista Alimentaria. Recuperat de: <https://revistaalimentaria.es/agricultura/opinion/la-industria-europea-de-subproductos-animales-aboga-por-la-economia-circular>. Data consulta: 8 de desembre, 2021.
- Anderson RC, Yu PL. (2003). Isolation and characterisation of proline/arginine-rich cathelicidin peptides from ovine neutrophils. *Biochem Biophys Res Comm* 312:1139–46.
- Andrades, J.A. (2008). Los vertidos de los mataderos e industrias cárnicas. Master Profesional en Ingeniería y Gestión Medioambiental (Sevilla, España). Escuela de Organización Industrial (EOI). Recuperat de: http://api.eoi.es/api_v1_dev.php/fedora/asset/eoi:48153/componente48151.pdf.
- Appiah Ofori, J., & Peggy Hsieh, Y.-H. (2012). The Use of Blood and Derived Products as Food Additives. In *Food additive* (pp. 230–256). http://cdn.intechopen.com/pdfs/28918/InTech-The_use_of_blood_and_derived_products_as_food_additives.pdf.
- Asgar M.A., Fazilah A., Nurul Huda, Rajeev Bhat I Karim A.A. (2010). Nonmeat protein Alternatives as Meat Extenders ans Meat Analogs. *Institute of Food Technologists*. Vol 9. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00124.x.
- Autio, K., Kiesvaara, M., Mälkki, Y., & Kanko, S. (1984). Chemical and Functional Properties of Blood Globin Prepared by a New Method. *Journal of Food Science*, 49 (3), 859–862. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb13228.x>.

Azuara, S. L. (2018). Report nº D1.2. Mechanical Desing and manufacturing of the whole demonstration plant. WP1. *Hydroblood: Innovative processing plant for optimal production of Decolourised hydrolysed protein (PHD)*.

Azuara, S. L. (2019). Report nº D4.2. Hydroblood feasibility assessment. WP4. *Innovative processing plant for optimal production of Decolourised hydrolysed protein (PHD)*.

Bah, C. S. F., Carne, A., McConnell, M. A., Mros, S., & Bekhit, A. E.-D. A. (2016). Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. *Food Chemistry*, *202*, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.020>.

Berraquero-García, C., Almécija, M. C., Guadix, E. M., & Pérez-Gálvez, R. (2022). Valorisation of blood protein from livestock to produce haem iron-fortified hydrolysates with antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Technology*, *57*(4), 2479–2486. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15616>.

Beaubier, S., Przybylski, R., Bodin, A., Nedjar, N., Dhulster, P., & Kapel, R. (2021). Ultrafiltration fractionation of bovine hemoglobin hydrolysates: Prediction of separation performances for optimal enrichment in antimicrobial peptide. *Membranes*, *11*(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/membranes11020073>

El Bahjaoui, C.. (2017). Caracterització d'un derivat de sang porcina, destinat a l'alimentació animal i humana. Treball final de Grau. Universitat de Girona.

Baladincz, P., & Hancsók, J. (2015). Fuel from waste animal fats. *Chemical Engineering Journal*, *282*, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.04.003>.

Bioinformàtica UPF. GPX HUMANAS. Extret de: <http://bioinformatica.upf.edu/2010/projectes10/Ey/GPXhumanas.html>. Data consulta: 15 de març, 2020.

Boisen, S., & Fernández, J. A. (1994). Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by in vitro analyses. *Animal Feed Science and Technology*, *51*(1–2), 29–43. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)00686-4](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)00686-4)

Boukid, F., & Gagaoua, M. (2022). Meat alternatives: A proofed commodity? In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 101). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2022.02.003>

Bover-Cid, S., Garriga, M., Fauquet, A., Grèbol, N., , Aymerich, T. (2015). Manual de seguridad alimentaria: Control del proceso de elaboración de productos cárnicos cocidos. Recuperat de:

https://www.3tres3.com/articulos/control-del-proceso-de-elaboracion-de-productos-carnicos-cocidos_43328/. Data consulta: 27 de febrer, 2021.

Bracho N., M., Márquez-Salas, E., & De Muñoz, B. A. (2001). Estudio comparativo del contenido de aminoácidos esenciales en sangre de bovino y cerdo. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 11(2), 133–138.

Brown, B. S. B., Hatzikonstantinou, H., & Herries, D. G. (1978). *The Role of Peroxide in Haem Degradation*. *Biochemical Journal*, 174 (3): 901–907. <https://doi.org/10.1042/bj1740901>.

Btech. Colector de polvo tipo filtro de mangas. Recuperat de: <https://www.btech.com.co/filtro-de-mangas/>. Data consulta: 19 de juny, 2021.

BUCHI. Mini Spray Dryer B-290. Technical data sheet. Recuperat de: <https://www.buchi.com/en/content/spray-drying-encapsulation-solutions>. Data consulta: 19 de juny, 2021.

Carretero, C., Parés, D. (1997) "La sangre de matadero: subproducto de la industria cárnica.." *Cárnica 2000*: 49-54.

Carvalho, I. M. C. M. M., Melo Cavalcante, A. A. C., Dantas, A. F., Pereira, D. L. A., Costa Rocha, F. C., Andrade, T. J. A. S., & Da Silva, J. (2011). Genotoxicity of sodium metabisulfite in mouse tissues evaluated by the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 720(1–2), 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.12.007>

Casals, A. (2011). *Obtenció i caracterització físico-química de sèrum de sang porcina*. Treball Final de Grau. Universitat de Girona.

Chang, C. Y., Wu, K. C., & Chiang, S. H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, 100(4), 1537–1543. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.019>.

Comissió Europea (2020). *Modificar nuestras pautas de producción y consumo: El nuevo Plan de acción para la economía circular muestra el camino hacia una economía competitiva y climáticamente neutra de consumidores empoderados*. Extret a partir de: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/es/ip_20_420. Data consulta: 2 de febrer, 2022.

Condalab. 2020 Análisis microbiológico en la industria alimentaria; Detección y recuento de Estafilococos Coagulasa-Positivo. <https://www.condalab.com/>. Data consulta: 2021.

Cross, M. L., & Gill, H. S. (2000). Immunomodulatory properties of milk. *British Journal of Nutrition*, 84, S81–S89.

Cui, J., Chong, B., Rutherfurd, S. M., Wilkinson, B., Singh, H., & Moughan, P. J. (2013). Gross and true ileal digestible amino acid contents of several animal body proteins and their hydrolysates. *Meat Science*, 94(3), 349–354. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.03.002>.

Dailoux, S., Djelveh, G., Peyron, A., Oulion, C. (2002). Rheological behaviour of blood plasmas concentrated by ultrafiltration and by evaporation in relation to liquid-gel transition temperature. *J Food Eng.*, 55 (1): 35-39.

DARP – Departament d’Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació. (2017). Guia per a la implantació d’un sistema d’autocontrol de la qualitat a les petites i mitjanes empreses agroalimentàries.

Dàvila, E. (2006). *Advances in animal blood processing development of a biopreservation system and insights on the functional properties of plasma*. Tesi Doctoral. [Universitat de Girona]. <http://www.tdx.cat/handle/10803/7929>.

Dàvila, E.; Parés, D.; Howell, N.K. (2007a) "Studies on plasma protein interactions in heat-induced gels by differential scanning calorimetry and FT-Ramam spectroscopy." *Food Hydrocolloids* 21 : 1144 -1152.

Dàvila, E.; Saguer, E.; Toldrà, M.; Carretero, C.; Parés, D. (2007b) "Surface functional properties of blood plasma protein fractions." *European Food Research and Technology* 226 : 207-214.

Dàvila, E.; Toldrà, M.; Saguer, E.; Carretero, C.; Parés, D. (2007c) "Characterization of plasma protein gels by means of image analysis." *LWT- Food Science and Technology* 40 : 1321-1329.

Decret 81/2012 de 10 de juliol pel qual es crea i regula el Registre del sector de l’alimentació animal i de l’àmbit dels subproductes animals i productes derivats no destinats al consum humà. Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya Núm 6169- 12.7.2012. Departament d’Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi natural.

Del Hoyo, P., Moure, F., Rendueles, M., & Díaz, M. (2007). Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration. *Meat Science*, 76(3), 402–410. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.06.014>.

Del Hoyo, P., Rendueles, M., & Díaz, M. (2008). Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science*, 78(4), 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.024>.

Derossi A., Severini C. and Cassi D. (2011). Mass Transfer Mechanisms during Dehydration of Vegetable Food: Traditional and Innovative Approaches, Advanced Topics in Mass Transfer, Prof. Mohamed El-Amin (Ed.), ISBN: 978-953-307-333-0, InTech.

Dietrick, W. C., Lindquist, F. E., Bohart, G. S., Morris, H. J., & Nutting, M. -D. (1955). Effect of Degree of Enzyme Inactivation and Storage Temperature on Quality Retention in Frozen Peas. *Journal of Food Science*, 20(5), 480–491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1955.tb16858.x>.

Directiva Europea nº 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas; manual de interpretación y elaboración de informes. DOCE num. 135, del 30 de maig de 1991, pàgines 40 a 52. Departament de Comunitats Europees. Ref: DOUE-L-1991-80646.

Directiva Europea nº 98/15/CE de la Comisión de 27 de febrero de 1998 por la que se modifica la Directiva 91/271/CEE del Consejo en relación con determinados requisitos establecidos en su anexo I. DOCE num. 67, del 7 de març de 1998, pàgines 29 a 30. DOUE-L-1998-80424.

Dobbealere, D. (2017). *Statistical overview of the animal by-products industry in the EU in 2016*. European fat processors and renderers association Congress, Hamburg, Alemania.

EN/ISO 16649-2 (2001). *Microbiology of food and animal stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli – Part 2: Colonycount technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-Dglucuronide*.

EN/ISO 6579 (2002). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2003). *Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas*. Capítulo 2: Sinopsis del sistema de análisis de peligros y de puntos Críticos de control (APPCC). Elaboración de un plan de APPCC.

FAO, (2007). *Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition*. Report of a Joint WHO/FAO/UNU, Expert Consultation Technical Report Series, No 935, WHO, Geneva.

FAO (2013): *FAO Statistical yearbook*. (2013). In *The Lancet* (Issue 7102). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(59\)91820-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(59)91820-3).

FAO, (2019). *Food Outlook, Biannual report on global food markets*.

FAO (2020a): Livestock production. Recuperat de: <http://www.fao.org/3/y4252e/y4252e07.htm>. Data consulta: 31 de març, 2020.

FAO (2020b): *Estructura y funcionamiento de mataderos medianos en países en desarrollo. 5. Desgüello y desangrado*. Extret a partir de: <http://www.fao.org/3/T0566S/T0566S05.htm>. Data consulta: 28 de març, 2020.

FAO (2020c): The contribution of insects to food security, livelihoods and the environment. Extret a partir de: <https://www.fao.org/edible-insects/en/>.

FAO, (2022). ¿Por qué deberíamos interesarnos en los insectos comestibles?. Extret a partir de: <https://www.fao.org/fao-stories/article/es/c/1603348/>. Data consulta: 16 de setembre, 2022.

FEDNA: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal; Ingredientes para piensos (Tablas DEFNA 2010). Recuperat de: <http://www.fundacionfedna.org/ingredientes-para-piensos>. Data consulta: 27 de desembre, 2020.

Ferraro, V., Anton, M., Santé-Lhoutellier, V. (2016). *The “sisters” α -helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: functionality, bioactivity and trends of application*. Trends in Food Science and Technology 51, 65-75.

Ferrer, C. (2016). Obtenció de concentrat proteic a partir de sang porcina. Treball Final de Màster. Universitat de Girona.

Finn Jacobsen, Jens Asler-Nissen, H. S. O. (1983). *Research in Food Science and Nutrition Volume 2*. (B. M. M. J.V. McLoughlin, Ed.). Dublin: Boole Press.

Florido Rodríguez, J. L. (2008). 2 289 937 Procedimiento para la recogida y transformación de la sangre en una proteína hidrolizada a partir 54 de sangre de animales de abasto obteniéndose Proteína Hidrilizada de la Sangre (PHS).

FMI (2019): How the rise of flexitarians is powering plant-based sales. Recuperat de: <https://www.fmi.org/blog/view/fmi-blog/2019/10/22/how-the-rise-of-flexitarians-is-powering-plant-based-sales>. Data consulta: 16 de setembre, 2022.

Fons Europeu de Desenvolupament Rural, 2019. Curs taller d'etiquetatge per a petits elaboradors alimentaris.

Font i Furnols, M. (2002). La Androstenona: Hormona responsable del mal olor de la carne. Recuperat de: https://www.3tres3.com/articulos/la-androstenona-hormona-responsable-del-mal-olor-de-la-carne_212/. Data consulta: 15 de novembre, 2020.

Fontes, P.R., Gomide, L.A.M., Costa, N.M.B., Peternelli, L.A., Fontes, E.A.F., Ramos, E.M. (2015). Chemical composition and protein quality of mortadella formulated with carbon monoxide-treated porcine blood. *LWT - Food Science and Technology*, 64 (2): 2015, 926-931. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.004>.

Fu, Y., Liu, J., Hansen, E. T., Bredie, W. L. P., & Lametsch, R. (2019). Structural characteristics of low bitter and high umami protein hydrolysates prepared from bovine muscle and porcine plasma. *Food Chemistry*, 257(December 2017), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.159>

Gatnau, R., Polo, J., & Robert, E. (2001). Plasma protein antimicrobial substitution at negligible risk. *Feed Manufacturing in the Mediterranean Region. Improving Safety: From Feed to Food*, 54, 141–150. <http://om.ciheam.org/om/pdf/c54/01600021.pdf>.

Gómez-Juárez, C., Castellanos, R., Ponce-Noyola, T., Calderón, V., & Figueroa, J. (1999). Protein recovery from slaughterhouse wastes. *Bioresource Technology*, 70(2), 129–133. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00030-9).

González, J. (2017). Aplicació d'un colorant alimentari a partir d'hemoglobina en mortadella. (Treball final de grau). Escola Politècnica Superior, Universitat de Girona.

Gorbatov VM. (1988). Collection and utilization of blood and blood proteins for edible purposes in the USSR. In: Pearson AM, Dutson TR, editors. Edible meat by-products advances in meat research. London and New York, N.Y.: Elsevier Applied Science. p 167–96.

Guardia M. D. L., Garrigues S. (2015). Handbook of mineral elements in food. John Wiley & Sons, Ltd.; West Sussex, UK.

Guzmán, J. C., Mc Millin, K. W., Bidner, T. D., Dugas-Sims, S., & Godber, J. S. (1995). Texture, Color and Sensory Characteristics of Ground Beef Patties Containing Bovine Blood Proteins. *Journal of Food Science*, 60(4), 657–660. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb06200.x>

Hald-Christensen; Jens L. Adler-Nissen; Hans S. Olsen. (1981). *Method for preparing a food material from blood. n° 4262022. Degree of hydrolysis (DH) and temperature measured during the enzymatic hydrolysis.*

Hemeda, H. M., & Klein, B. P. (1990). Effects of Naturally Occurring Antioxidants on Peroxidase Activity of Vegetable Extracts - HEMEDA - 2006 - Journal of Food Science - Wiley Online Library, 55(1), 184–186.

Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A. M., Fenelon, M., & Tiwari, B. (2017). Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods*, 6(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>.

Hicks, T. M., Verbeek, C. J. R., Lay, M. C., & Manley-Harris, M. (2013). The role of peracetic acid in bloodmeal decoloring. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(10), 1577–1587. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2304-2>.

Houlier, B. (1986). A process of discolouration of slaughter house blood: some technical and economical results. Proceedings of 32nd European Meeting of Meat Research Workers, Ghent, Belgium. Pp. 91–94.

Howell, N. K., & Lawrie, R. A. (1983). Functional aspects of blood plasma proteins. I. Separation and characterization. *Journal of Food Technology*, 18, 747–762.

Hurtado, S.; Saguer, E.; Espigulé, E.; Parés, D.; Toldrà, M.; Carretero, C. (2010). Use of porcine blood plasma and stabilized haemoglobin as functional ingredients in “pork liver pâté”. *International Conference on Food Innovation (FOODINNOVA 2010)*. València, Espanya.

Hurtado, S.; Saguer, E.; Toldrà, M.; Parés, D.; Carretero, C. (2012). Porcine plasma as polyphosphate and caseinate replacer in frankfurters. *Meat Science*, 90: 624-628.

Idescat (2019): Producció de carn. Per espècies. Recuperat de: <https://www.idescat.cat/pub/?id=aec&n=457>. Data consulta: 30 de març, 2020.

Ikasari, D., Hastarini, E., & Suryaningrum, T. D. (2020). Characteristics of Cookies Formulated with Fish Protein Concentrate Powder Produced from Snakehead Fish (*Channa striata*) Extraction By-Product. *E3S Web of Conferences*, 147, 1–8. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014703028>

In, M.-J., Chae, H. J., & Oh, N.-S. (2001). Process development for heme-enriched peptide by enzymatic hydrolysis of hemoglobin. *Bioresource Technology*, 84, 63–68.

INNOVACC (Associació Catalana d'Innovació del Sector Carni Porcí). (2014). Manual de seguretat alimentària del sector carni porcí: com gestionar els principals perills. Recuperat de: https://acsa.gencat.cat/web/.content/_Publicacions/Guies_i_documents_de_bones_practiques/Manual-porci/manual_porci_sencer.pdf

- Irshad, A. i Sharma B. (2015). Abattoir by-Product Utilization for Sustainable Meat Industry: A Review. *Journal of Animal Production Advances*, 5(6), 681. <https://doi.org/10.5455/japa.20150626043918>
- ISO 11290-1, (2017). Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and *Listeria spp* - Part 1: Detection Method.
- ISO 11290-2, (2017). Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and *Listeria spp* - Part 2: Enumeration Method.
- ISO 1443 (1973). Meat and meat products – Determinaqtion of fat.
- ISO 16649-2 (2001). Microbiology of food and animal stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.
- ISO 4833-1 (2013). Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique.
- ISO 6888-1, (1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.
- ISO 6888-2, (1999/2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium.
- ISO 6888-3, (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 3: Detection and MPN technique for low numbers.
- ISO 7402, (1993). Microbiology- General guidance for the enumeration of Enterobacteriaceae without resuscitation – MPN technique and colony-count technique.
- ISO 7932, (2014). Microbiology of the food chain – Horizontal method for enumeration of presumptive *Bacillus cereus*. Colony Count technique at 30 °C.
- ISO 7937, (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* – Colony-count technique.
- ISO 937 (1978). Meat and meat products- Determination of nitrogen content. (Reference method).

- Jamroz, D., Wiliczekiewicz, A., Orda, J., Kuryszko, J., Stefaniak, T. (2011a). Use of spray-dried porcine blood by-products in diets for young chickens. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01149.x>.
- Jamroz, D., Wiliczekiewicz, A., Orda, J., Skorupińska, J., Słupczyńska, M., & Kuryszko, J. (2011b). Chemical composition and biological value of spray dried porcine blood by-products and bone protein hydrolysate for young chickens. *British Poultry Science*, 52(5), 589–605. <https://doi.org/10.1080/00071668.2011.610298>.
- Janitha, P. K., Wanasundara, P. D., Ross, A. R. S., Amarowicz, R., Ambrose, S. J., Pegg, R. B., & Shand, P. J. (2002). Peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 6981–6988. <https://doi.org/10.1021/jf025592e>.
- Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, & K., & Bawa, A. S. (2012). *Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review*. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0290-7>.
- Kaykici, Y., Ozbiltekin, M., & Kazancoglu, Y. (2020). Minimizing losses at red meat supply chain with circular and central slaughterhouse model. *Journal of Enterprise Information Management*, 33(4), 791–816. <https://doi.org/10.1108/JEIM-01-2019-0025>
- Kehrer, J. P., Robertson, J. D., & Smith, C. V. (2010). Free Radicals and Reactive Oxygen Species. *Comprehensive Toxicology*, 277–307. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7>.
- Kerkaert, B., Mestdagh, F., Cucu, T., Aedo, P. R., Ling, S. Y., & De Meulenaer, B. (2011). Hypochlorous and peracetic acid induced oxidation of dairy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(3), 907–914. <https://doi.org/10.1021/jf1037807>
- Kim, H.-O. & Li-Chan, E.C.Y. (2006). Quantitative structure-activity relationship study of bitter peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 10102–10111.
- Kocher, P.N. i Foegeding, E.A. 1993. Microcentrifuge-based Method for Measuring Water-holding of Protein Gels. *J. Food Sci.*, 58: 1040-1046.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived Bioactive Peptides - Opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297–1308. <https://doi.org/10.2174/1381612033454892>.

Kowalski, Z., & Krupa-luczek, K. (2007). A model of the meat waste management. *Polish Journal of Chemical Technology*, 9(4), 91–97. <https://doi.org/10.2478/v10026-007-0098-4>.

LabMedica: Noticias de lab clínico del día. Extret a partir de: <https://www.labmedica.es>. Data consulta: 23 de març, 2020.

Labuza, T. P., Tsuyuki, H., Karel, M. (1969). Kinetics of linoleate oxidation in model systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 409-416. <https://doi.org/10.1007/BF02545625>.

Lansdowne, L. R., Beamer, S., Jaczynski, J., & Matak, K. E. (2009a). Survival of *Escherichia coli* after isoelectric solubilization and precipitation of fish protein. *Journal of Food Protection*, 72(7), 1398–1403. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.7.1398>.

Lansdowne, L. R., Beamer, S., Jaczynski, J., & Matak, K. E. (2009b). Survival of *Listeria innocua* after isoelectric solubilization and precipitation of fish protein. *Journal of Food Science*, 74(4), 201–205. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01144.x>.

Lantz, I., Glämsta, E. L., Talbäck, L., & Nyberg, F. (1991). Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity. *FEBS Letters*, 287(1–2), 39–41. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80011-Q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80011-Q).

LEE, Y. -Z, WANG, R. M., & NAKAI, S. (1990). Preparation of Colorless Globin from Bovine Hemoglobin using Sodium Alginate. *Journal of Food Science*, 55(2), 577–578. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb06821.x>

Lee John, Hahn Joseph i Musser Robert C (2000). WO/2000/053195: decolorized animal blood products and method of making same.

Leoci, R. (2014). *Animal by-products (ABPs): origins, uses and European regulations*.

Liu, Y. De, Wu, H. L., Zhang, J., Wan, D. J., & Zhao, J. H. (2012). Study of Porcine Blood Decoloration Technique. *Advanced Materials Research*, 518–523, 3980–3983. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.518-523.3980>.

Llei 7/2022, del 8 d'abril, de residus i sòls contaminats per una economia circular.

Low, A., Verbeek, C. J. R., & Lay, M. C. (2014). Treating bloodmeal with peracetic acid to produce a bioplastic feedstock. *Macromolecular Materials and Engineering*, 299(1), 75–84. <https://doi.org/10.1002/mame.201200447>

- Lun, L. J. Y. (2012). *Preparation method for decolorized blood globulin powder*. 2, 6–8.
- Luna, E. J., & Hitt, A. L. (1992). Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science*, 258, 955–964.
- Lundblad, R. (2003). Considerations for the Use of Blood Plasma and Serum for Proteomic Analysis. *The Internet Journal of Genomics and Proteomics*, 1(2), 1–8. <https://doi.org/10.5580/26e>.
- Lynch, S. A., Mullen, A. M., O'Neill, E. E., & García, C. Á. (2017). Harnessing the Potential of Blood Proteins as Functional Ingredients: A Review of the State of the Art in Blood Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 330–344. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12254>.
- Lynch, S. A., Mullen, A. M., O'Neill, E., Drummond, L., & Álvarez, C. (2018). Opportunities and perspectives for utilisation of co-products in the meat industry. *Meat Science*, 144, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.019>.
- M**APA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), (deseembre 2019): Indicadores trimestrales de porcino.
- Marc J & Vancikova O (1978), Changing the sensory properties of blood for food purposes. *Prumysl Potravin*, 29, 369.
- Marco Barrero M i Riera Masgrau J. (2001). Utilización del laboratorio. El proteinograma en medicina clínica. *Medicina Integral*, Vol. 38, Núm. 9.
- Márquez, E., Bracho, M., Archile, A., Rangel, L., and Benítez, B. (2005) Proteins, isoleucine lysine and methionine content of bovine, porcine and poultry blood and their fractions. *Food Chem.* 93, 503-505.
- Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomozuka, N., & Suzuki, H. (1985). Isolation and characterization of angiotension I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 1405–1409.
- Mekonnen, M. M., & Hoekstra, A. Y. (2011). The green, blue and grey water footprint of crops and derived crop products. *Hydrology and Earth System Sciences*, 15(5), 1577–1600. <https://doi.org/10.5194/hess-15-1577-2011>.
- Mekonnen, M. M., & Hoekstra, A. Y. (2012). A Global Assessment of the Water Footprint of Farm Animal Products. *Ecosystems*, 15(3), 401–415. <https://doi.org/10.1007/s10021-011-9517-8>.

Mora, L., Reig, M., Toldrà, F.. (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International* 65, 344-349.

Moure Fernández F. (2000). Separación de proteínas de sangre. Análisis de alternativas. Available from <http://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/17164>.

Moure, F., Rendueles, M., & Díaz, M. (2003). Coupling process for plasma protein fractionation using ethanol precipitation and ion exchange chromatography. *Meat Science*, 64(4), 391–398. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00205-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00205-X).

Mulet, J. M. (2021). *Ecologismo real: todo lo que la ciencia dice que puedes hacer para conservar el planeta y los ecologistas no te dirán nunca* (Ediciones destino). Volum 316.

Naciones unides (2022). Recuperat des de: <https://www.un.org/es/desa-es/la-poblaci%C3%B3n-mundial-llegar%C3%A1-8000-millones-en-2022>.

Naciones Unidas (2023). Climate Risk in the Agriculture Sector.

Narasimmalu, A., & Ramasamy, R. (2022). Food Processing Industry Waste and Circular Economy. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 955(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/955/1/012089>. Data consulta: 11/12/2022.

National Institutes of Health (NIH), National Center for Biotechnology Information: Arginine. (2021a). U.S. Department of Health and Human Services. Recuperat des de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Arginine>. Data consulta: 17 de gener 2021.

National Institutes of Health (NIH), National Center for Biotechnology Information: Calcium. (2021b). Recuperat des de: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Calcium-DatosEnEspanol/> Actualitzat: desembre 2019. Data consulta: 20 de juny, 2021.

National Institutes of Health (NIH): *Iron*. (2016). U.S. Department of Health and Human Services. Recuperat des de: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Iron-HealthProfessional/>. Data consulta: 25 d'agost 2016.

Nilsson, R. (1975). The utilization and processing of blood. Symposium on the prospects for industrial meat processing in developing countries. United Nations Industrial Development Organization. Viena, 13-17 octubre.

Nikhita, R. & Sachindra, N.M. (2021). Optimization of chemical and enzymatic hydrolysis for production of chicken blood protein hydrolysate rich in angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity. *Poultry Science*, 100, 101047.

Nollet, L. M. L., Toldrà, F. (2011). *Introduction- offal meat: definitions, regions, cultures and generalities*. In: Nollet, L. M. L., Toldrà, F. (Eds.), *Handbook of Analysis of Edible Animal By-products*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pàg. 3-11.

Novo Nordisk. (1990). *Decoloration of Slaughterhouse Blood by Application of Alcalase 2.4 L.pdf*. Enzyme Process Division.

Novozymes (2022). Recuperat des de: <https://www.novozymes.com/es>. Data consulta: 5/06/2022.

Ochoa, U. S. H. (2001). *Procesos Industriales de Separación*. Universidad Autónoma Metropolitana, 1–13.

Ockerman, H. W., & Hansen, C. L. (1988). *Animal by-product processing*. Ellis Horwood Ltd., Chichester (England). [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(89\)90039-9](https://doi.org/10.1016/0309-1740(89)90039-9).

Ockerman, H. W., Basu, L. B. (2004). *Hides and skins*. In: Jensen, W., Devine, C., Dikeman, M. (Eds.), *Encyclopedia of Meat Science*. Elsevier Science Ltd., Londres, Regne Unit. Pàgines 125-138.

Olsen, H. S. (1991). *Enzymatic Processing of slaughterhouse blood*. Zalahus, Zalaegerszeg: Novo Nordisk A/S.

Otto, R. A., Beamer, S., Jaczynski, J., & Matak, K. E. (2011). The Effect of Using Citric or Acetic Acid on Survival of *Listeria monocytogenes* during Fish Protein Recovery by Isoelectric Solubilization and Precipitation Process. *Journal of Food Science*, 76(8), 0–4. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02340.x>.

O'Flynn, C. C., Cruz-Romero, M. C., Troy, D., Mullen, A. M., & Kerry, J. P. (2014). The application of high-pressure treatment in the reduction of salt levels in reduced-phosphate breakfast sausages. *Meat Science*, 96(3), 1266–1274. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.11.010>.

Pan, D., Luo, Y. K., & Tanokura, M. (2005). Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004. *Food Chemistry*, 91, 123–129.

Parés, D. (2001). *Caracterització i revaloració de la fracció plasmàtica de la sang de porc procedent d'escorxadors industrials*. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). Universitat de Girona.

- Parés, D.; Ledward, D.A. (2001) "Emulsifying and gelling properties of porcine blood plasma as influenced by high pressure processing." *Food Chemistry* 74 : 139-145.
- Parés, D., Saguer, E. i Carretero, C. (1998). Functional Properties of Heat Induced Gels from Liquid and Spray Dried Porcine Blood Plasma as Influenced by pH. *J. Food Sci.*, 63 (6): 958-961.
- Parés, D.; Saguer, E.; Carretero, C. (1999) "Aplicación de la alta presión hidrostática sobre el plasma de sangre porcina de mataderos." *Ibérica: actualidad tecnológica* 417 : 156-159.
- Parés, D., Saguer, E., i Carretero, C. (2011). Blood by-products as ingredients in processed meat. In *Processed Meats: Improving Safety, Nutrition and Quality*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857092946.2.218>.
- Parés, D.; Saguer, E.; Pap, N.; Toldrà, M.; Carretero, C. (2012) "Low-salt porcine serum concentrate as functional ingredient in frankfurters." *Meat Science* 92 : 151-156.
- Parés, D., Toldrà, M., Camps, E., Geli, J., Saguer, E., & Carretero, C. (2020). Rsm optimization for the recovery of technofunctional protein extracts from porcine hearts. *Foods*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/foods9121733>.
- Parés, D., Toldrà, M., Saguer, E., & Carretero, C. (2014). Scale-up of the process to obtain functional ingredients based in plasma protein concentrates from porcine blood. *Meat Science*, 96(1), 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.07.022>.
- Parés i Oliva, D. (2001). Caracterització i revaloració de la fracció plasmàtica de la sang de porc procedent d'escorxadors industrials. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). Universitat de Girona. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/7773>.
- Park, K.J. and HYUN, C.K. 2002. Antigenotoxic effects of the peptides derived from bovine blood plasma proteins. *Enzyme. Microb. Technol.* 30, 633–638.
- Pearl, G. G.. (2004). Inedible. In: Jensen, W., Devine, C., Dikeman, M.. Eds) *Encyclopedia of Meat Science*. Elsevier Science Ltd, Londres, Regne Unit. Pag. 112-125.
- Piot JM, Guillochon D, Thomas D. (1986). Preparation of decolorized peptides from slaughter-house blood. *MIRCEN J App Micro Biotech* 2:359–64.
- Ramos-Clamont, *et al.* 2003. Functional Properties of Protein Fractions Isolated from Porcine Blood. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*—Vol. 68, 4.

Ranken M.D. (1980). Applications of blood proteins. A: Grant R.A. Applied Protein Chemistry. Springer Netherlands, pp: 169-180.

Real Decret 474/2014, de 13 de juny, pel que s'aprova la norma de qualitat dels derivats carnis. «BOE» núm. 147, de 18 de junio de 2014, pàgines 46058 a 46078 . Secció I. Disposicions generals. Ministeri de la Presidència. Ref. BOE-A-2014-6435.

Reglament (CE) nº 1069/2009 del parlamento europeo y del consejo de 21 de octubre de 2009 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano y por el que se deroga el Reglamento (CE) no 1774/2002 (Reglamento sobre subproductos animales). DOUE num. 300, del 14 de novembre del 2009, pàgines 1 a 33. Departament de la Unió Europea. DOUE-L-2009-82155.

Reglament (CE) nº 142/2011 de la comisión de 25 de febrero de 2011 por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano, y la directiva 97/78/CE del consejo en cuanto a determinadas muestras y unidades exentas de los controles veterinarios en la frontera en virtud de la misma. (2011). Diario Oficial de La Unión Europea, DOUE num. 54, del 26 de febrer de 2011, pàgines 1 a 254. Departament de la Unió Europea. DOUE-L-2011-80346.

Reglament (CE) nº 1774/2002 del parlamento europeo y del consejo de 3 de octubre de 2002 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano. DOCE num. 273, del 10 d'octubre del 2002, pàgines 1 a 95. Departament de Comunitats Europees. DOUE-L-2002-81776.

Reglament (CE) nº 178/2002 del parlamento europeo y del consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. DOCE num. 31, de l'1 de febrer de 2002, pàgines 1 a 24. Departament de Comunitats Europees. DOUE-L-2002-80201.

Reglament (CE) nº 183/2005 del parlamento europeo y del consejo de 12 de enero de 2005 por el que se fijan requisitos en materia de higiene de los piensos. DOUE num 35, del 8 de febrer de 2005, pàgines 1 a 22. Departament de la Unió Europea. DOUE-L-2005-80251.

Reglament (CE) nº 2073/2005 de la comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (texto pertinente a efectos del EEE). DOUE num 338, del 22 de desembre de 2005, pàgines 1 a 26. Departament de la Unió Europea. DOUE-L-2005-82539.

Reglamento (CE) nº 853/2004 del parlamento europeo y del consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. DOUE num 139, del 30 d'abril del 2004, pàgines 55 a 205. Departament de la Unió Europea. DOUE-L-2004-81036.

Reglament (UE) nº 1129/2011 de la comisió de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del reglamento (CE) nº 1333/2008 del parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. DOUE num 290, del 4 d'octubre del 2014, pàgines 11 a 11. Departament de la Unió Europea. DOUE-L-2014-83015.

Reglament (UE) nº 1169/2011 del parlamento europeo y del consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) nº 1924/2006 y (CE) nº 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) nº 608/2004 de la Comisión. DOUE num 304, del 22 de noviembre de 2011, pàgines 18 a 63. Departament de la Unió Europea. DOUE-L-2011-82311.

Reglament (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de noviembre de 2015, relativo a los nuevos alimentos, por el que se modifica el Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo y se derogan el Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1852/2001 de la Comisión.

Reglament d'execució (UE) 2021/1975 de la Comisió de 12 de noviembre de 2021 por el que se autoriza la comercialización de las formas congelada, desecada y en polvo de Locusta migratoria como nuevo alimento con arreglo al Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) 2017/2470 de la Comisión.

Reglament d'execució (UE) 2021/882 de la Comisió de 1 de junio de 2021 por el que se autoriza la comercialización de larvas de Tenebrio molitor desecadas como nuevo alimento con arreglo al Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) 2017/2470 de la Comisión.

Reglament d'execució (UE) 2022/169 de la Comisió de 8 de febrero de 2022 por el que se autoriza la comercialización de las formas congelada, desecada y en polvo del gusano de la harina (larva de Tenebrio molitor) como nuevo alimento con arreglo al Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) 2017/2470 de la Comisión.

Reglament d'execució (UE) 2022/188 de la Comisió de 10 de febrero de 2022 por el que se autoriza la comercialización de las formas congelada, desecada y en polvo de Acheta domesticus como nuevo

alimento con arreglo al Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) 2017/2470 de la Comisión.

Rina Flash Dryer: Assecadors instantanis i contínues per energia fluida, Equipaments de petita i gran capacitat, versàtils. Recuperat des de: <https://www.rieranadeu.com/ca/rina-flash-dryer/> Data de consulta: 4 de juliol, 2021.

Rivera, C., Alexander, J., Duarte, B., Estrella, L., Cuenca, N., & Eduardo, C. (2006). Catalasa, Peroxidasa y Polifenoloxidasa de pitaya AMARILLA (*Acanthocereus pitajaya*). *Revista Colombiana de Química*, 35, 91–101.

Rodríguez, F. (2008). 2 289 937 Procedimiento para la recogida y transformación de la sangre en una proteína hidrolizada a partir 54 de sangre de animales de abasto obteniéndose Proteína Hidrilizada de la Sangre (PHS).

Ronaghi, M., Beamer, S., Jaczynski, J., & Matak, K. E. (2016). A comparison of the bactericidal effectiveness of hydrochloric and acetic acid on *Staphylococcus aureus* in silver carp during a pH-shift protein recovery process. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.043>.

Saguer, E.; Altarriba, S.; Lorca, C.; Parés, D.; Toldrà, M.; Carretero, C. (2003) "Colour stabilization of spray-dried porcine red blood cells using nicotinic acid and nicotinamide." *Food Science and Technology International* 9 : 301-307.

Saguer, E.; Dàvila, E.; Toldrà, M.; Fort, N.; Baixas-Nogueras, S.; Carretero, C.; Parés, D. (2007a) "Effectiveness of high pressure processing on the hygienic and technological quality of porcine plasma from biopreserved blood." *Meat Science* 76 : 189-193.

Saguer, E.; Fort, N.; Parés, D.; Toldrà, M.; Carretero, C. (2007b) "Improvement of gelling properties of porcine blood plasma using microbial transglutaminase." *Food Chemistry* 101: 49-56.

Salvador, P.; Toldrà, M.; Saguer, E.; Carretero, C.; Parés, D. (2009) "Microstructure-function relationships of heat-induced gels of porcine haemoglobin ." *Food Hydrocolloids* 23 : 1654-1659.

Sanchez-Reinoso Z, Todeschini S, Thibodeau J, Ben Said L, Fliss I, Bazinet L, Mikhaylin S. (2022). Impact of Pulsed Electric Fields and pH on Enzyme Inactivation and Bioactivities of Peptic Hydrolysates Produced from Bovine and Porcine Hemoglobin. *Foods*. doi: 10.3390/foods11213313. PMID: 36359927; PMCID: PMC9655097.

- Santagata, R., Ripa, M., & Ulgiati, S. (2017). An environmental assessment of electricity production from slaughterhouse residues. Linking urban, industrial and waste management systems. *Applied Energy*, *186*, 175–188. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.07.073>.
- SASBDB, Small Angle Scattering Biological Data Bank. *SASDA92 – Catalase in PBS*. Extret de: <https://www.sasbdb.org/data/SASDA92/>. Data consulta: 15 de març, 2020.
- Sato, Y., Hayakawa, S., & Hayakawa, M. (1981). Preparation of blood globin through carboxymethyl cellulose chromatography. *International Journal of Food Science & Technology*, *16*(1), 81–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb00999.x>.
- Sheu, S. C., & Chen, A. O. (1991). Lipoxygenase as Blanching Index for Frozen Vegetable Soybeans. *Journal of Food Science*, *56*(2), 448–451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb05300.x>.
- Shi, J., de Roos, A., Schouten, O., Zheng, C., Vink, C., Vonk, B., Edens, L. (2015). Properties of Hemoglobin Decolorized with a Histidine-Specific Protease. *Journal of Food Science*, *80*(6), E1202–E1208. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12809>.
- Silva, V. D. M., & Silvestre, M. P. C. (2003). Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *LWT - Food Science and Technology*, *36*(7), 709–718. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00092-6](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00092-6).
- Soladoye, P. O., Juárez, M., Estévez, M., Fu, Y., & Álvarez, C. (2022). Exploring the prospects of the fifth quarter in the 21st century. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *21*(2), 1439–1461. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12879>.
- Sorapukdee, S., & Narunatsopanon, S. (2017). Comparative Study on Compositions and Functional Properties of Porcine, Chicken and Duck Blood. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *37*(2), 228–241. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.2.228>.
- Sun, Q., Shen, H., & Luo, Y. (2010). *Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin*. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0115-0>
- Swingler, G. R., & Lawrie, R. A. (1979a). Improved protein recovery from some meat industry by-products. *Meat Science*, *3*(1), 63–73. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(79\)90025-1](https://doi.org/10.1016/0309-1740(79)90025-1).
- Swingler, G. R., Naylor, P. E. L., & Lawrie, R. A. (1979b). *ASPECTS OF PROTEIN RECOVERY MEAT INDUSTRY BY-PRODUCTS FROM A major problem in improving the usage of meat by-products is the high level of micro-organisms associated with the raw materials , particularly those originating from the gastro-intestinal tract. 3.*

Synowiecki, J., Jagiełka, R., & Shahidi, F. (1996). Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction. *Food Chemistry*, 57(3), 435–439. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00005-2).

Toldrà, F., Mora, L., Reig, M. (2016). New insights into meat by-products utilization. *Meat science* 120, 54-59.

Toldrà, F., Reig, M., & Mora, L. (2021). Management of meat by- and co-products for an improved meat processing sustainability. *Meat Science*, 181(June). <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108608>.

Toldrà, M. (2002). Revaloració de la fracció cel·lular de la sang de porc procedent d'escorxadors industrials. Universitat de Girona. Retrieved from <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/7783/tmta.pdf?sequence=12&isAllowed=y>.

Toldrà, M.; Carbó, N.; Parés, D. (2005a) "Concentración por ultrafiltración de un hidrolizado proteico de la fracción celular de sangre de cerdo.." *Avances de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos en los inicios del siglo XXI.* : 761-764.

Toldrà, M.; Carbó, N.; Parés, D. (2005b) "Valorisation of an hemic residue obtained from the enzymatic hydrolysis of the porcine red blood cells fraction.." *Innovations in traditional foods (INTRAFOOD 2005)* 2 : 1007-1010.

Toldrà, M.; Dàvila, E.; Sagner, E.; Fort, N.; Salvador, P.; Parés, D.; Carretero, C. (2008) "Functional and quality characteristics of red blood cell fraction from biopreserved porcine blood as influenced by high pressure processing." *Meat Science* 80: 380-388.

Toldrà, M., Elias, A., Parés, D., Sagner, E., & Carretero, C. (2004). Functional properties of a spray-dried porcine red blood cell fraction treated by high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*, 88(3), 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.060>.

Toldrà, M.; Lynch S.A.; Couture R.; Álvarez, C. (2019a). "Blood Proteins as Functional Ingredients." Sustainable Meat Production and Processing. Edited by Charis M. Galanakis.. London (ENG): Elsevier.

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

Toldrà, M.; Parés, D.; Saguer, E.; Carretero, C. (2019b) "Recovery and Extraction of Technofunctional Proteins from Porcine Spleen Using Response Surface Methodology." *Food and Bioprocess Technology* 12 (2019): 298-312.

Toldrà, M., Parés, D., Saguer, E., Carretero, C. (2019c). Utilisation of protein fractions from porcine spleen as technofunctional ingredients in emulsified cooked meat sausages. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(2), 871–877. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14298>.

Toldrà, M., Parés, D., Saguer, E., & Carretero, C. (2020). Utilisation of protein fractions from porcine spleen as technofunctional ingredients in emulsified cooked meat sausages. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(2), 871–877. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14298>.

Troller, J.A. (1989). Water Activity and Food Quality. A: Hardman, T.M. (ed.). *Water and Food Quality*. Ed. Elsevier Science Publishers Ltd., London-New York. pp. 1-31.

Tybor, P. T., Dill, C. W. and Landmann, W. A. (1973). Effect of decolorisation and lactose incorporation on the emulsification capacity of spray-dried blood protein concentrates. *Journal of Food Science* 38: 4.

Tybor, P. T., Dill, C. W., & Landmann, W. A. (1975). Functional Properties of Proteins Isolated From Bovine Blood By a Continuous Pilot Process. *Journal of Food Science*, 40(1), 155–159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb03759.x>.

UEC, Unió d'Empresaris de la Construcció (2019). Prevenció de riscos laborals (mòdul bàsic, segons normativa), Recurs preventiu.

UNAM Universidad Nacional Autónoma de México. (2013). Proteínas-3-Propiedades funcionales. Recuperat re: <http://depa.fquim.unam.mx/amyd/>. Data consulta: 3 de juny, 2020.

Valero, T., Rodríguez, P., Ruiz, E., Ávila, J., & Varela, G. (2018). La alimentación española: características nutricionales de los principales alimentos de nuestra dieta. In *Ministerio de agricultura, pesca y alimentación*.

Van den Oord, A.H.A. & Wesdorp, J.J. (1979). Decolouration of slaughter blood by treatment with hydrogen peroxide. Proceedings of 25th European Meeting of Meat Research Workers, Budapest, Hungary. Pp. 827–830.

Verma, A. K., Chatli, M. K., Kumar, P., & Mehta, N. (2018a). Antioxidant and Antimicrobial Efficacy of Peptidic Hydrolysate Obtained from Porcine Blood. *Agricultural Research*. <https://doi.org/10.1007/s40003-018-0350-6>.

Verma, A. K., Chatli, M. K., Kumar, P., & Mehta, N. (2018b). Effects of inclusion of porcine blood hydrolysate on physico-chemical quality, oxidative and microbial stability of pork batter stored at (4 ± 1 °C). *Journal of Food Science and Technology*, 55(12), 4758–4769. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3409-2>.

Viana, F. R., Silva, V. D. M., Delvivo, F. M., Bizzotto, C. S., & Silvestre, M. P. C. (2005). Quality of ham pâté containing bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat Science*, 70(1), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.12.013>

Vidal, G. i Bornhardt, C. (1991). La Actividad del Agua en los Alimentos. *Alimentación: equipos y tecnología*, setembre 1991: 159-163.

Wanasundara, P. K. J. P. D., Amarowicz, R., Pegg, R. B., & Shand, P. J. (2002). Preparation and characterization of hydrolyzed proteins from defibrinated bovine plasma. *Journal of Food Science*, 67(2), 623–630. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10649.x>

Wismer-Pedersen, J. (1988). Use of haemoglobin in foods-A review. *Meat Science*, 24(1), 31–45. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(89\)90005-3](https://doi.org/10.1016/0309-1740(89)90005-3).

Wei, J.-T., & Chiang, B.-H. (2009). Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(3), 372–378. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3451>.

X-Rite, Incorporated (2002). Guia para Entender la Comunicación del Color.

Yang, J. H., & Lin, C. W. (1998). Functional properties of porcine blood globin decolourized by different methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 33(4), 419–427. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1998.00223.x>.

Yang, J. H., & Lin, C. W. (2000). Decolorization of Porcine Red Blood Cell Globin with Ion Exchanger Method and Modification of Its Protein Functionalities. In *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* (Vol. 13, Issue 12, pp. 1770–1774). <https://doi.org/10.5713/ajas.2000.1770>.

- Zamora R, L. M., Carretero, C., & Parés, D. (2006). Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. *Food Science and Technology International*, 12(1), 77–84. <https://doi.org/10.1177/1082013206062443>.
- Zamora Rodríguez, L. M., Carretero Romay, C., Parés i Oliva, D., & Universitat de Girona. Departament d'Enginyeria Química, A. i T. A. (2005). Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. Universitat de Girona. <http://www.tdx.cat/handle/10803/7925>.
- Zheng, Z., Si, D., Ahmad, B., Li, Z., & Zhang, R. (2018a). A novel antioxidative peptide derived from chicken blood corpuscle hydrolysate. *Food Research International*, 106(2), 410–419. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.078>.
- Zheng, Z., Huang, Y., Wu, R., Zhao, L., Wang, C., & Zhang, R. (2014). Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of duck blood corpuscle using commercial proteases. *Poultry Science*, 93(10), 2641–2650. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-03898>
- Zheng, Z., Wei, X., Shang, T., Huang, Y., Hu, C., & Zhang, R. (2018b). Bioconversion of duck blood cell: process optimization of hydrolytic conditions and peptide hydrolysate characterization. *BMC Biotechnology*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0475-5>.
- Zhou, C., Wang, J., Wang, H., Zhang, L., & Cai, K. (2012). Effect of carboxy-hemoglobin on color stability of cooked pork sausage. *Food Science and Biotechnology*, 21(1), 267–272. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0035-z>.

ANNEXOS

ANNEXOS

ANNEX 1: Resultats de l'anàlisi estadística dels capítols 3, 4 i 5.

Resultats de l'anàlisi de la variància (ANOVA) per l'efecte de la utilització de metabisulfit de sodi o anticoagulant sobre la proliferació de microorganismes aerobis mesòfils o enterobactèries:

Taula A1.1. ANOVA: Efecte del tractament (metabisulfit de sodi o anticoagulant) en el creixement de microorganismes enterobactèries en la sang a dia 7 de conservació.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: Enterobacteris a Dia 7)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	106,092	1	106,092	695,914	,001
	Error	,305	2	,152		
Tractament	Hipòtesi	58,344	1	58,344	629,272	,002
	Error	,185	2	,093		
Mostra	Hipòtesi	,305	2	,152	1,644	,378
	Error	,185	2	,093		

Taula A1.2. ANOVA: Efecte del tractament (metabisulfit de sodi o anticoagulant) en el creixement de microorganismes aerobis mesòfils en la sang a dia 7 de conservació.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: aerobis mesòfils a Dia 7)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	303,597	1	303,597	398,570	,002
	Error	1,523	2	,762		
Tractament	Hipòtesi	2,561	1	2,561	15,492	,059
	Error	,331	2	,165		
Mostra	Hipòtesi	1,523	2	,762	4,608	,178
	Error	,331	2	,165		

Resultats de l'anàlisi de la variància (ANOVA) pels efectes de la dosi de peròxid sobre els paràmetres del color:

Taula A1.3. ANOVA: Efecte de la concentració de peròxid d'hidrogen i de la temperatura en el paràmetre L* del color.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: L)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	157885,103	1	157885,103	665,962	,001
	Error	474,156	2	237,078		
Temperatura	Hipòtesi	210,829	1	210,829	12,322	,002
	Error	444,856	26	17,110		
ConcentracióH2O2	Hipòtesi	3797,337	6	632,889	36,990	,000
	Error	444,856	26	17,110		
Mostra	Hipòtesi	474,156	2	237,078	13,856	,080
	Error	444,856	26	17,110		
Temperatura*ConcentracióH2O2	Hipòtesi	207,913	6	34,652	2,025	,098
	Error	444,856	26	17,110		
Subconjunts homogenis						
HSD Tukey ^{ab}						
ConcentracióH2O2	N	Subconjunt				
		1	2	3	4	5
,75	6	42,4061				
1,25	6		54,9728			
1,50	6		59,5128	59,5128		
1,75	6			63,9872	63,9872	
2,00	6			65,4850	65,4850	65,4850
2,25	6				70,0850	70,0850
3,00	6					72,7356
Sig.		1,000	,497	,200	,182	,070

Es visualitzen les mitjanes pels grups en els subconjunts homogenis. Es basa en les mitjanes observades.

El terme d'error és la mitjana quadràtica (Error) = 17,110.

- a. Mida de la mostra de la mitjana: 6.
- b. Alfa: 0,05.

Taula A1.4. ANOVA: Efecte de la concentració de peròxid d'hidrogen i de la temperatura en el paràmetre a^* del color de l'escala CIE $L^*a^*b^*$.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: a)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	1851,055	1	1851,055	163,652	,006
	Error	22,622	2	11,311		
Temperatura	Hipòtesi	,236	1	,236	,136	,715
	Error	45,047	26	1,733		
ConcentracióH2O2	Hipòtesi	7,432	6	1,239	,715	,641
	Error	45,47	26	1,733		
Mostra	Hipòtesi	22,622	2	11,311	6,528	,025
	Error	45,047	26	1,733		
Temperatura*ConcentracióH2O2	Hipòtesi	10,924	6	1,821	1,051	,416
	Error	45,047	26	1,733		
Subconjunts homogenis						
HSD Tukey ^{ab}						
ConcentracióH2O2	N	Subconjunt				
		1				
,75	6	5,7956				
1,25	6	6,3294				
1,50	6	6,5733				
1,75	6	6,7711				
2,00	6	6,9100				
2,25	6	6,9950				
3,00	6	7,0967				
Sig.		,614				

Es visualitzen les mitjanes pels grups en els subconjunts homogenis. Es basa en les mitjanes observades.

El terme d'error és la mitjana quadràtica (Error) = 1,733.

- Mida de la mostra de la mitjana: 6.
- Alfa: 0,05.

A1.5. ANOVA: Efecte de la concentració de peròxid d'hidrogen i de la temperatura en el paràmetre b^* del color de l'escala CIE $L^*a^*b^*$.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: b)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	31904,558	1	31904,558	8200,650	,000
	Error	7,781	2	3,890		
Temperatura	Hipòtesi	106,753	1	106,753	14,875	,001
	Error	186,600	26	7,177		
ConcentracióH2O2	Hipòtesi	1715,111	6	285,852	39,829	,000
	Error	186,600	26	7,177		
Mostra	Hipòtesi	7,781	2	3,890	,542	,588
	Error	186,600	26	7,177		
Temperatura*ConcentracióH2O2	Hipòtesi	53,812	6	8,969	1,250	,314
	Error	186,600	26	7,177		

Continuació Taula A1.3. a la següent pàgina.

Continuació taula A1.3.

Subconjunts homogenis						
HSD Tukey ^{ab}						
ConcentracióH2O2	N	Subconjunt				
		1	2	3	4	5
,75	6	15,6617				
1,25	6		23,3239			
1,50	6		26,5600	26,5600		
1,75	6			29,8850	29,8850	
2,00	6			30,2128	30,2128	30,2128
2,25	6				33,3017	33,3017
3,00	6					34,9850
Sig.		1,000	,386	,254	,325	,063

Es visualitzen les mitjanes pels grups en els subconjunts homogenis. Es basa en les mitjanes observades.

El terme d'error és la mitjana quadràtica (Error) = 7,177.

- Mida de la mostra de la mitjana: 6.
- Alfa: 0,05.

Resultats de l'anàlisi de la variància (ANOVA) pels efectes de la temperatura del tractament tèrmic previ a la descoloració amb peròxid sobre els paràmetres del color:

Taula A1.6. ANOVA: Efecte de la temperatura en el paràmetre L* del color de l'escala CIE L*a*b*.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: L)						
Origen		Típus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	25239,677	1	25239,677	1223,609	,001
	Error	41,254	2	20,627		
Temperatura	Hipòtesi	313,189	2	156,595	9,898	,028
	Error	63,281	4	15,820		
Mostra	Hipòtesi	41,254	2	20,627	1,304	,366
	Error	63,281	4	15,820		
Subconjunts homogenis						
HSD Tukey ^{ab}						
Temperatura	N	Subconjunt				
		1	2			
90	3	48,5178				
80	3	49,0589				
70	3		61,2933			
Sig.		,985	1,000			

Es visualitzen les mitjanes pels grups en els subconjunts homogenis. Es basa en les mitjanes observades.

El terme d'error és la mitjana quadràtica (Error) = 15,820.

- Mida de la mostra de la mitjana: 3.
- Alfa: 0,05.

Taula A1.7. ANOVA: Efecte de la temperatura en el paràmetre a^* del color de l'escala CIE $L^*a^*b^*$.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: a)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	314,314	1	314,314	1240,705	,001
	Error	,507	2	,253		
Temperatura	Hipòtesi	1,263	2	,632	1,191	,393
	Error	2,121	4	,530		
Mostra	Hipòtesi	,507	2	,253	,478	,652
	Error	2,121	4	,530		
Subconjunts homogenis						
HSD Tukey ^{ab}						
Temperatura	N	Subconjunt				
		1				
90	3	5,4744				
80	3	5,8656				
70	3	6,3889				
Sig.		,368				

Es visualitzen les mitjanes pels grups en els subconjunts homogenis. Es basa en les mitjanes observades.

El terme d'error és la mitjana quadràtica (Error) = ,530.

- Mida de la mostra de la mitjana: 3.
- Alfa: 0,05.

Taula A1.8. ANOVA: Efecte de la temperatura en el paràmetre b^* del color de l'escala CIE $L^*a^*b^*$.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: b)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	4060,238	1	4060,238	550,700	,002
	Error	14,746	2	7,373		
Temperatura	Hipòtesi	73,730	2	36,856	3,975	,112
	Error	37,093	4	9,273		
Mostra	Hipòtesi	14,746	2	7,373	,795	,512
	Error	37,093	4	9,273		
Subconjunts homogenis						
HSD Tukey ^{ab}						
Temperatura	N	Subconjunt				
		1		2		
90	3	19,2156				
80	3			23,2878		
70	3			23,3675		
Sig.		1,000		,942		

Es visualitzen les mitjanes pels grups en els subconjunts homogenis. Es basa en les mitjanes observades.

El terme d'error és la mitjana quadràtica (Error) = 9,273.

- Mida de la mostra de la mitjana: 3.
- Alfa: 0,05.

Resultats de l'anàlisi de la variància (ANOVA) pels efectes de la temperatura del tractament tèrmic previ a la descoloració amb peròxid sobre els paràmetres fisicoquímics:

Taula A1.9: ANOVA: Efecte de la temperatura en la concentració de cendres del concentrat proteic de sang sencera.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: cendres)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	37,560	1	37,560	718,913	,001
	Error	,104	2	,052		
Temperatura	Hipòtesi	,101	2	,095	4,136	,106
	Error	,092	4	,023		
Mostra	Hipòtesi	,104	2	,052	2,266	,220
	Error	,092	4	,023		
Subconjunts homogenis						
HSD Tukey ^{ab}						
Temperatura	N	Subconjunt				
		1				
90	3	1,8905				
80	3	1,9992				
70	3	2,2389				
Sig.		,100				

Es visualitzen les mitjanes pels grups en els subconjunts homogenis. Es basa en les mitjanes observades.

El terme d'error és la mitjana quadràtica (Error) = ,023.

- Mida de la mostra de la mitjana: 3.
- Alfa: 0,05.

Taula A1.10: ANOVA: Efecte de la temperatura en la concentració de proteïna en el concentrat proteic de sang sencera.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: proteïna)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	82191,148	1	82191,148	713419,130	,000
	Error	,230	2	,115		
Temperatura	Hipòtesi	7,084	2	3,542	2,656	,184
	Error	5,334	4	1,333		
Mostra	Hipòtesi	,230	2	,115	,086	,919
	Error	5,334	4	1,333		
Subconjunts homogenis						
HSD Tukey ^{ab}						
Temperatura	N	Subconjunt				
		1				
90	3	96,2602				
80	3	94,3113				
70	3	96,1186				
Sig.		,212				

Es visualitzen les mitjanes pels grups en els subconjunts homogenis. Es basa en les mitjanes observades.

El terme d'error és la mitjana quadràtica (Error) = 1,333.

- Mida de la mostra de la mitjana: 3.
- Alfa: 0,05.

Resultats de l'anàlisi de la variància (ANOVA) pels efectes de la temperatura del tractament tèrmic previ a la descoloració amb peròxid sobre els paràmetres microbiològics:

Taula A1.11: ANOVA: Efecte de la temperatura en els recomptes d'enterobactèries del concentrat proteic de sang sencera.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: enterobacteris)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	84,038	1	84,038	906,659	,001
	Error	,185	2	,093		
Temperatura	Hipòtesi	1,161	2	,581	2,616	,188
	Error	,888	4	,222		
Mostra	Hipòtesi	,185	2	,093	,418	,684
	Error	,888	4	,222		
Subconjunts homogenis						
HSD Tukey ^{ab}						
Temperatura	N	Subconjunt				
		1				
90	3	2,6911				
80	3	3,5443				
70	3	2,9319				
Sig.		,181				

Es visualitzen les mitjanes pels grups en els subconjunts homogenis. Es basa en les mitjanes observades. El terme d'error és la mitjana quadràtica (Error) = ,222.

- a. Mida de la mostra de la mitjana: 3. b. Alfa: 0,05.

Taula A1.12: ANOVA: Efecte de la temperatura en els recomptes d'aerobis mesòfils del concentrat proteic de sang sencera.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: aerobis mesòfils)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	177,993	1	177,993	198,954	,005
	Error	1,789	2	,895		
Temperatura	Hipòtesi	,587	2	,293	,873	,485
	Error	1,344	4	,336		
Mostra	Hipòtesi	1,789	2	,895	2,662	,184
	Error	1,344	4	,336		
Subconjunts homogenis						
HSD Tukey ^{ab}						
Temperatura	N	Subconjunt				
		1				
90	3	4,5600				
80	3	4,6877				
70	3	4,0937				
Sig.		,487				

Es visualitzen les mitjanes pels grups en els subconjunts homogenis. Es basa en les mitjanes observades. El terme d'error és la mitjana quadràtica (Error) = ,336. a. Mida de la mostra de la mitjana: 3. b. Alfa: 0,05.

Resultats de l'anàlisi de la variància (ANOVA) per l'efecte de la descoloració amb peròxid en la fracció sobrenedant d'extractes proteics a partir d'hidrolitzats de sang mitjançant l'enzim *Flavourzyme*:

Taula A1.13. ANOVA: Efecte de la descoloració de la fracció sobrenedant d'hidrolitzat sobre l'extracte sec.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: extracte sec)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	49515,067	1	49515,067	9876,708	<,001
	Error	10,027	2	5,013		
Tractament	Hipòtesi	,516	1	,516	1,033	,416
	Error	,999	2	,500		
Mostra	Hipòtesi	10,027	2	5,013	10,034	,091
	Error	,999	2	,500		

Taula A1.14. ANOVA: Efecte de la descoloració de la fracció sobrenedant d'hidrolitzat sobre l'activitat d'aigua.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: activitat d'aigua)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	,500	1	,500	99,539	,010
	Error	,010	2	,005		
Tractament	Hipòtesi	,001	1	,001	3,204	,215
	Error	,000	2	,000		
Mostra	Hipòtesi	,010	2	,005	24,786	,039
	Error	,000	2	,000		

Taula A1.15. ANOVA: Efecte de la descoloració de la fracció sobrenedant d'hidrolitzat sobre el contingut en cendres.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: cendres)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	420,341	1	420,341	3826,503	<,001
	Error	,220	2	,110	,110	
Tractament	Hipòtesi	,024	1	,024	,024	,340
	Error	,031	2	,016	,016	
Mostra	Hipòtesi	,220	2	,110	,110	,124
	Error	,031	2	,016	,016	

Taula A1.16. ANOVA: Efecte de la descoloració de la fracció sobrenedant d'hidrolitzat sobre el contingut proteic.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: proteïna)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	45224,538	1	45224,538	13670,781	<,001
	Error	6,616	2	3,308		
Tractament	Hipòtesi	,313	1	,313	3,849	,159
	Error	,129	2	,065		
Mostra	Hipòtesi	6,616	2	3,308	51,275	,019
	Error	,129	2	,065		

Taula A1.17. ANOVA: Efecte de la descoloració de la fracció sobrenedant d'hidrolitzat sobre el paràmetre L^* del color de l'escala CIEL $*a^*b^*$.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: L^*)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	33946,786	1	33946,786	1021,622	<,001
	Error	66,457	2	33,228		
Tractament	Hipòtesi	381,285	1	381,285	197,249	,005
	Error	3,866	2	1,933		
Mostra	Hipòtesi	66,457	2	33,228	17,190	,055
	Error	3,866	2	1,933		

Taula A1.18. ANOVA: Efecte de la descoloració de la fracció sobrenedant d'hidrolitzat sobre el paràmetre a^* del color de l'escala CIEL $*a^*b^*$.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: a^*)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	505,818	1	505,818	64,856	,015
	Error	15,598	2	7,799		
Tractament	Hipòtesi	261,756	1	261,756	63,817	,015
	Error	8,203	2	4,102		
Mostra	Hipòtesi	15,598	2	7,799	1,901	,345
	Error	8,203	2	4,102		

Taula A1.19. ANOVA: Efecte de la descoloració de la fracció sobrenedant d'hidrolitzat sobre el paràmetre b^* del color de l'escala CIEL $*a^*b^*$.

Proves d'efecte inter-subjecte (variable dependent: b^*)						
Origen		Tipus III de suma de quadrats	Graus de llibertat	Mesura quadràtica	F	Sig.
Intersecció	Hipòtesi	2169,041	1	2169,041	516,055	,002
	Error	8,406	2	4,203		
Tractament	Hipòtesi	12,557	1	12,557	53,408	,018
	Error	,470	2	,235		
Mostra	Hipòtesi	8,406	2	4,203	17,877	,053
	Error	,470	2	,235		

ANNEX 2: Planta pilot

Taula A2.1. Resultats de l'anàlisi de les aigües de xarxa de l'escorxador Mafrica. Dades extretes de les anàlisis realitzades pels laboratoris Aigües de Manresa S.A. i Calitec Lab S.L. en mostres d'aigua del 2017.

Paràmetres indicadors	Mètode analític	Aigua Llobregat	Aigua Cardener
Alumini (µg/L)	Espectrofotomètric	40	28
Amoni (mg NH ₄ /L)	Comparador visual Nessler	<0,075	<0,03
Clor combinat	Valoració (Colorimetria DPD)	0,1 mg/L	0,3 ppm
Clor lliure	Valoració (Colorimetria DPD)	0,7 mg/L	0,3 ppm
Clorurs (mg/L)	Mètode de Mohr	42	221
Color (unit Pt-Co)	Comparador visual	<5	<2
Conductivitat a 20 °C /(µS/cm)	Electromètric	434	1382
Ferro (µg/L)	Absorció atòmica- forn grafit	<5	32
Gust (Ídex dil.)	Llindars de gust i olor	1	<3
Manganès (µg/L)	Absorció atòmica- forn grafit	<2	<0,01
Olor (Ídex dil.)	Llindars de gust i olor	1	<3
Oxidabilitat KMnO ₄ (mg O ₂ /L)	Volumètric	1,8	2,27
pH	Electromètric	7,8	8,5
Sodi (mg/L)	Emissió atòmica de flama	23	81
Sulfats (mg/L)	Turbidimetria	96	61
Terbolesa (NTU)	Nefelomètric	0,3	<1

Taula A2.2. Informació tècnica de la centrífuga RINA 300F (Riera Nadeu) i imatge de la pantalla del quadre elèctric de control del procés de centrifugació, disgregació, i assecat (Figura A2.1).

ESPECIFICACIONS TÈCNIQUES CENTRÍFUGA RINA 300F	
Mida cistella	1250 mm
Pes cistella	625 mm
Espessor màxima	150 mm
Actual volum de retenció de sòlid	250 dm ³
Càrrega nominal (amb densitat màxima 1,25 kg/cm ³)	125 kg
Superfície de filtració	2,4 m ²
Màxima velocitat de cistella	1000 rpm
Factor màxim de centrifugació	690 xG
Acceleració de segellat a DIN 24400	400 mBar
Pes net amb accessoris	7400 kg
Fonaments	No necessaris
Nivell de soroll	Limitat a 80 dB(A) a 1,0 m, acord a EN 180 4871 EN1247
Placa d'inèrcia	Acer St. 52.3 + pintura poliuretana
Tapa de centrifuga	Acer inoxidable AISI-316L DIN 1.4404
Cistella	Acer inoxidable AISI-316L DIN 1.4404
Rascador	Acer inoxidable AISI-316L DIN 1.4404

Continuació Taula A2.2. a la següent pàgina.

Continuació Taula A2.2.

Tub alimentador	Acer inoxidable AISI-316L DIN 1.4404
Tub netejador	Acer inoxidable AISI-316L DIN 1.4404
Coberta carcassa	Acer inoxidable AISI-316L DIN 1.4404
Anell de fricció	Acer inoxidable AISI-316L DIN 1.4404
Coixinet i carcassa	Acer carboni
Juntes tòriques	VITON

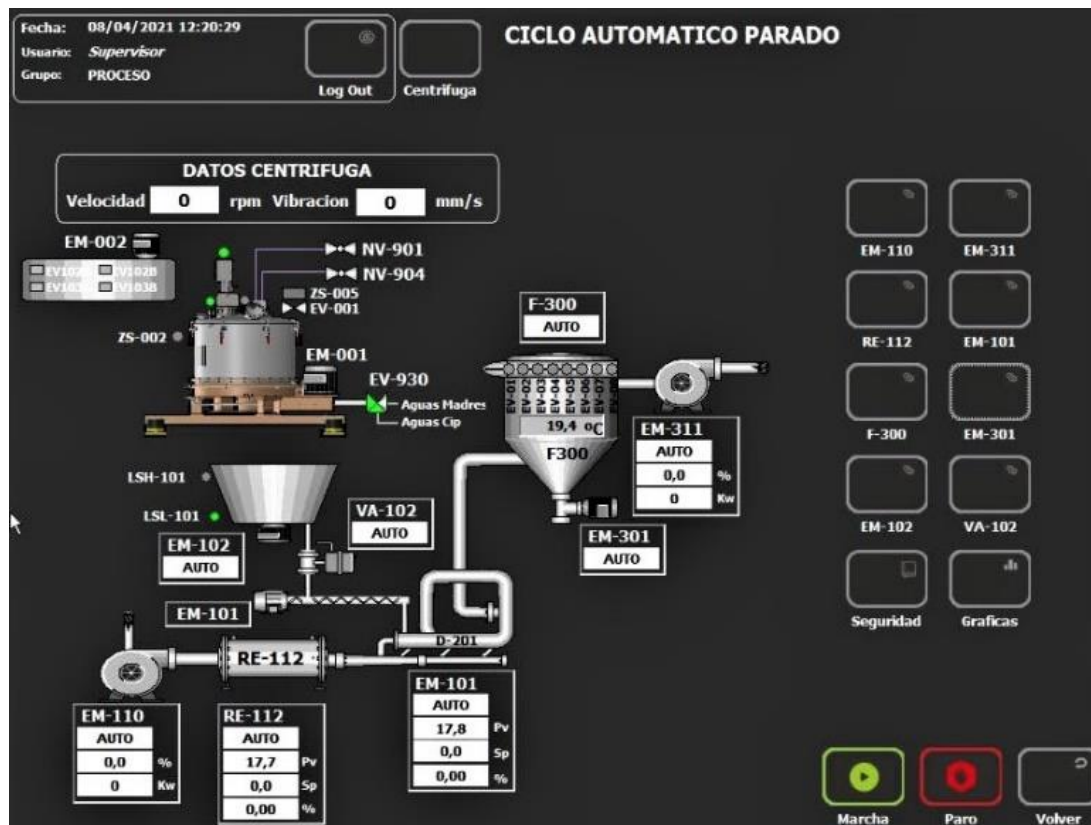


Figura A2.1. Pantalla del quadre elèctric que controla el procés i paràmetres de la centrifuga, disgregador, assecador i filtre de mànegues.

Taula A2.3. Especificacions tècniques del disgregador.

ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DEL DISGREGADOR	
Obertura d'entrada	DN-300 connexió de brida
Obertura de sortida	DIN NW-150
Diàmetre tub	DN-200
Velocitat	Variable de 30 a 120 rpm
Potència	4 KW / 5.5 CV
Revolucions màximes	1500 rpm
Voltatge	3 fases 380 V/ 50 Hz
Protecció	IP-65

Taula A2.4. Especificacions tècniques de l'assegador RINA-Jet turbo S-806 (Riera Nadeu S.A., Granollers, Espanya).

ESPECIFICACIONS TÈCNIQUES ASSECADOR RINA-JET TURBO S-806	
Model	RINA_Jet S806 FA
Règim de treball	Continu
Producte	Extracte proteic de sang
Capacitat nominal	160 kg/h
Evaporació	100 kg/h
Subministrament energia	Cargol de cuc volumètric
Tipus d'escalfament	Intercanviador de corrent + resistència elèctrica
Combustible	Vapor + electricitat
Capacitat d'escalfament	320000 kcal/h
T1, temperatura calenta nominal (t ³ de treball)	240 °C
T2, temperatura màxima a la sortida	90 °C
Descàrrega de producte sec	80 kg/h
Temperatura del producte sec	65 °C
Humitat final	10-8 %
Mida de partícula	Igual que al producte original

Taula A2.5. Especificacions tècniques del filtre de mànigues.

ESPECIFICACIONS TÈCNIQUES DEL FILETRE DE MÀNIGUES	
Superfície de filtració de la bossa	Aprox. 75 m ²
Aire comprimit	0,75 Nm ³ /h a 20 °C
Cabal del ventilador del cap	3100 m ³ /h a 20 °C
Pressió del ventilador del cap	150 mbar
Cabal de ventilador de cua	4900 m ³ /h a 100 °C
Pressió de ventilador de cua	50 mbar
Potència instal·lada	30 kW
Àrea necessària d'instal·lació	750 m ² (9m d'alçada per cada bossa)
Nivell de soroll	Limitat a 75 dB(A) a 1 m, seguint EN1804871 i EN12547

Taula A2.6. Especificacions tècniques del molí IMF-60 i l'ensacadora DEP 5/100 (ATPP Lleal, Barberà del Vallès, Espanya).

ESPECIFICACIONS TÈCNIQUES DEL MOLÍ IMF-60 I L'ENSACADORA DEP 5/100	
CARACTERÍSTIQUES GENERALS	
Capacitat de fresat	Fins a 250 kg/h
Tremuja de pre-càrrega	5 L
Duresa del producte a fresar	Fins a 3,5 Mohs
Tipus de material	Suau, semi-dur, fràgil o cristal·lí
Potència	5,5 kW/7,5 CV
Velocitat del motor	3000 rpm
Voltatge	3-FASE 380 V/50 Hz
Proteccions	IP-65
MATERIALS DE CONSTRUCCIÓ	
Bosses antiestàtiques filtradores	Polièster teflonades

Continuació Taula A2.6. a la següent pàgina.

Continuació Taula A2.6.

Gàbia	Acer inoxidable AISI 304
Juntes	PTFE
Filtre de descàrrega per vis sens fi	Acer inoxidable AISI 304
Vàlvula rotatòria	Acer inoxidable AISI 304
Caixa insonoritzada de ventilació	Acer galvanitzat
INFORMACIÓ DELS MOTORS	
Vàlvula rotatòria del motor	Potència nominal 0,5 kW
Protecció	IP-55
CARACTERÍSTIQUES GENERALS	
Capacitat de dosificació	2500 kg/h
Rang de càrrega	5-100 kg
Precisió de dosificació	± 20 g
Voltatge	Una fase 220 CV – 50 Hz
Potència	3 CV
Protecció	IP-65
FAM -14/600 (EBC)	
Material de contacte amb el producte	AISI-316-L
Material sense contacte amb el producte	AISI-304-L
Bosses de filtre	Superior a 12 pcs des de 600 mm ²
Material dels filtres	SS-316/polièster/tefló
Neteja automàtica	Per pressió inversa
Pressió	Fins a 6 kg/cm ²
Cambra anterior	Sí
Protecció	IP-55
Segellat de tapa	Pols fins
Aixeta	Frontissa especial de colis
Tancaments	6 knobs
Junta	Junta quadrada (aprovada per FDA)
Acabat en contacte amb el producte	Polit brillant RA≥0,4 μ
Acabament exterior	Textura mate
MOTOR VDR-05 2CV	
Material en contacte amb el producte	AISI-316-L
Material sense contacte amb el producte	AISI-304-L
Potència del motor	1,5 Kw/2 CV
Velocitat nominal	35 rpm
Protecció	IP-65 T135º
Segellat de l'eix	Tancament mecànic
Tipus	PS CARTRITGE (aprovat per FDA)
Segellat de la tapa	Metall/metall
Entrada	5" CLAMP
Sortida	5" CLAMP
Acabament en contacte amb el producte	Polit ultra brillant RA≥0,4μ
Acabament extern	Polit ultra brillant

Taula A2.7. Especificacions tècniques del tanc de conservació de sang higiènica.

ESPECIFICACIONS TÈCNiques DEL TANC DE CONSERVACIÓ DE SANG HIGIÈNICA	
Capacitat nominal	1560 L
Capacitat màxima	1620 L
Potència del compressor	4 CV
Diàmetre	1900 mm
Pes	430 kg
Agitació	30 rpm
Material	AISI 304

Taula A2.8. Especificacions tècniques de les bombes lobulars.

ESPECIFICACIONS TÈCNiques DE LES BOMBES LOBULARS		
Nº bomba	Tipus	Rotatòria
P103, P201, P203 i P204	Control	VF
	Fluid a transportar	Sang, aigua, dilucions sistema CIP
	Material	AISI 316-L
	Pressió de bombeig	1,5 Bar
	Connexió	DIN 11851
	Connexió elèctrica	400 V, 3 ph, 50 Hz

Taula A2.9. Especificacions tècniques de les bombes centrífugues.

ESPECIFICACIONS TÈCNiques DE LES BOMBES CENTRÍFUGUES		
Nº bomba	Tipus	Bomba centrífuga auto-encebadora amb tanc separador
P205 i P302	Control	VF
	Fluid a transportar	Aigua de procés
	Material	AISI 316-L
	Pressió de bombeig	0,5 Bar
	Connexió	DIN 11851
	Connexió elèctrica	400 V, 3 ph, 50 Hz

Taula A2.10. Especificacions tècniques de les bombes centrífugues monobloc horitzontals.

ESPECIFICACIONS TÈCNiques DE LES BOMBES CENTRÍFUGUES MONOBLOC HORITZONTALS		
Nº bomba	Tipus	Bomba centrífuga monobloc horitzontal
P301, P501, P504 i P505	Control	VF
	Fluid a transportar	Producte proteic en suspensió i dilucions del sistema CIP
	Material	AISI 316-L
	Pressió de bombeig	0,5 Bar
	Connexió	GAS/BSP
	Connexió elèctrica	400 V, 3 ph, 50 Hz

Taula A2.11. Especificacions tècniques de les bombes dosificadores.

ESPECIFICACIONS TÈCNiques BOMBES DOSIFICADORES		
Nº bomba	P401, P402 i P403	P404 i P405
Tipus	Bomba dosificadora de diafragma motoritzada amb vàlvules de contrapressió i sobrepressió	Bomba pneumàtica dosificadora
Control	VF	
Fluid a transportar	NaOH 25 %, HCl 33 % i H ₂ O ₂ 50 %	NaOH 25 %, HNO ₃ 33 %
Material	PVC/EPDM, PVC/FPM, SS/PTFE	
Velocitat de flux	2 Bar	2 Bar
Pressió de bombeig	0,5 Bar	3 Bar
Connexió	GAS/BSP	Connexió per tub
Connexió elèctrica	400 V, 3ph, 50 Hz	

Taula A2.12. Anàlisi de les aigües residuals obtingudes en la planta pilot.

Paràmetres físics	
Conductivitat	9,34 $\mu\text{S}/\text{cm}$
pH	6,57
Terbolesa	0,08 NTU
Sòlids en suspensió	114 mg/L
TDS	5,97 mg/L
Paràmetres biològics	
Paràmetre	Valor
D.Q.O.	4,47 mg O_2/L
Fosfats	71,3 mg $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$
Paràmetres químics	
Paràmetre	Valor
Cations	
Amoni	21,4 mg NH_4^+/L
Calci	34,4 mg Ca^{2+}/L
Magnesi	9,47 mg Mg^{2+}/L
Potassi	244 mg K^+/L
Sodi	1,95 mg Na^+/L
Anions	
Bicarbonats	307 mg HCO_3^-/L
Clorurs	2,61 mg Cl^-/L
Fluorurs	<0,2 mg F^-/L
Nitrats	<10 mg NO_3^-/L
Sulfats	993 mg $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$
Metalls pesants	
Paràmetre	Valor
Alumini total	<50 $\mu\text{g Al}/\text{L}$
Ferro total	<50 $\mu\text{g Fe}/\text{L}$
Magnesi total	5,05 $\mu\text{g Mn}/\text{L}$
Altres paràmetres	
Paràmetre	Valor
Síllice	3,97 mg SiO_2/L
Bor	<0,05 mg B/L

