

AGRAÏMENTS

Vull agrair a la Dolors Parés, directora del projecte, la possibilitat que em va oferir de realitzar aquest treball i la seva orientació, paciència, i les hores dedicades al laboratori i al despatx.

També donar les gràcies a la Mònica, la Carmen i l'Elena que sempre estaven disposades a ajudar-me, i sobretot a l'Anna Maria per el seu suport diari al laboratori.

A la Salomé i la Xisca, companyes de laboratori que també m'han ajudat molt quan ha fet falta, i a la Vanessa companya de projecte durant els primers dies.

I a tots aquells que han mostrat interès pel que feia i m'han donat suport durant els últims mesos: família, amics i companys de classe i de feina. Moltes gràcies!

ÍNDEX

PARAULES CLAU	1
RESUM	2
1. INTRODUCCIÓ	5
1.1. El sector porcí	5
1.1.1. La sang porcina en la indústria	5
1.2. La sang i les seves fraccions	6
1.2.1. Fracció cel·lular	7
1.2.2. Fracció plasmàtica	7
1.3. Aprofitament de la sang en la indústria agroalimentària	9
1.3.1. Propietats funcionals de les proteïnes plasmàtiques	10
1.3.1.1. Capacitat emulsionant	11
1.3.1.2. Capacitat gelificant	12
1.3.1.3. Capacitat escumant	13
1.4. Sistemes de fraccionament del plasma	14
1.4.1. Salting out	14
1.4.2. Separació per membranes, ultrafiltració i diafiltració	15
1.5. Productes de brioixeria	17
1.5.1. Magdalenes	18
2. OBJECTIUS	23
3. MATERIAL I MÈTODES	25
3.1. Disseny experimental	25
3.2. Obtenció de l'albumina deshidratada	27
3.2.1. Recollida de la sang	27
3.2.2. Obtenció del plasma	27
3.2.3. Precipitació del fibrinogen	28
3.2.4. Precipitació de les globulines	29
3.2.5. Concentració de l'albumina per ultrafiltració	29

3.2.5.1. Preparació de l'equip d'ultrafiltració	30
3.2.5.2. Procés de concentració	32
3.2.6. Dessalat de l'albumina per diafiltració	33
3.2.6.1. Protocol de neteja	33
3.2.7. Deshidratació per atomització	34
3.3. Determinacions fisico-químiques	35
3.3.1. Conductivitat	35
3.3.2. Humitat	35
3.3.3. Contingut en sals minerals (cendres)	36
3.3.4. Contingut de proteïna, mètode Kdeldahl (TKN)	36
3.4. Electroforesi (SDS-PAGE)	37
3.5. Propietats funcionals	39
3.5.1. Capacitat emulsionant	39
3.5.2. Capacitat gelificant	42
3.5.2.1. Anàlisi de la capacitat de retenció d'aigua	42
3.5.2.2. Anàlisi del perfil de textura dels gels (TPA)	42
3.5.3. Capacitat escumant	44
3.6. Aplicació de l'albumina en magdalenes	45
3.6.1. Contingut en greix	47
3.6.2. Anàlisi del perfil de textura de les magdalenes (TPA)	48
3.6.3. Tractament estadístic dels resultats	49
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	51
4.1. Obtenció de l'albumina concentrada	51
4.1.1. Concentració	51
4.1.2. Dessalat	53
4.1.3. Caracterització físico-química	55
4.2. Electroforesi (SDS-PAGE)	57
4.3. Propietats funcionals	58
4.3.1. Capacitat emulsionant	58
4.3.2. Capacitat gelificant	60
4.3.2.1. Anàlisi de la capacitat de retenció d'aigua	61
4.3.2.2. Anàlisi del perfil de textura dels gels (TPA)	61
4.3.3. Capacitat escumant	62

4.4. Aplicació de l'albúmina en magdalenes	63
4.4.1. Caracterització físico-química de les magdalenes	63
4.4.2. Anàlisi del perfil de textura de les magdalenes (TPA)	64
5. CONCLUSIONS	69
6. BIBLIOGRAFIA	71

PARAULES CLAU

Plasma de sang porcina

Salting out

Ultrafiltració

Diafiltració

Seroalbúmina

Ingredient funcional

Emulsió

RESUM

Els objectius d'aquest treball han estat l'obtenció de seroalbúmina porcina en pols per caracteritzar-la físico-químicament i funcional i utilitzar-la com a substituta de la clara d'ou en la producció de magdalenes.

L'obtenció de la seroalbúmina es va portar a terme fraccionant el plasma per *salting out* fins a una concentració del 60% de sulfat amònic, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El producte obtingut després d'aquesta operació era una solució de seroalbúmina amb una elevada concentració en sals. Per concentrar i dessalar el producte es va utilitzar la tecnologia de separació per membranes, ultrafiltració i diafiltració respectivament, amb una membrana de 30 kDa. Per tal de garantir-ne una bona conservació, el concentrat de seroalbúmina obtingut es deshidratava per atomització.

Es van guardar mostres de plasma, albúmina després del *salting out*, albúmina concentrada i albúmina en pols i se'n va fer l'anàlisi de conductivitat elèctrica, extracte sec, cendres, i contingut de proteïnes.

També es va determinar el perfil electroforètic del plasma i l'albúmina concentrada. Aquesta anàlisi va permetre comprovar la presència de fibrinogen, globulines i albúmina en el plasma, i la presència d'albúmina en la solució d'albúmina concentrada.

En la determinació de les propietats funcionals de l'albúmina en pols es va comprovar que aquesta proteïna té un índex d'activitat emulsionant igual que el del plasma i el caseïnat, i que a pH 5,5 és més elevat que a pH 7. L'estabilitat de l'emulsió, però, no varia en funció del pH, i la de l'albúmina és inferior a la del plasma i igual que la del caseïnat.

Per aconseguir un gel prou dur va ser necessària una concentració del 10% d'albúmina. El gel obtingut presentava una duresa i una capacitat de retenció d'aigua molt baixes en comparació al gels de globulines, sèrum o plasma a qualsevol pH.

L'última anàlisi de funcionalitat va ser la capacitat escumant. L'albúmina té una bona capacitat escumant, superior a la de les globulines i el plasma que podria facilitar la incorporació d'aire en les masses de brioixeria i donar-los-hi volum durant la cocció. Per tant, la seroalbúmina podria ser utilitzada com a substituta de la clara d'ou, ja que fa la mateixa funció.

L'albúmina com a ingredient no dóna prou duresa ni cohesivitat a les magdalenes ja que no gelifica bé. En aquest treball s'ha vist que funcionalment, la seroalbúmina porcina no és bona substituta de l'ou, i sensorialment també s'aprecien certes diferències.

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. El sector porcí

El sector porcí ocupa el primer lloc a nivell mundial en producció de carn. Espanya ocupa el quart lloc en el rànquing mundial de producció de carn de porcí, darrere de Xina (que té la major part de la producció), Estats Units i Alemanya (FAOSTAT, 2010).

Després de la producció d'olives, la carn de porc és el producte que genera més diners a Espanya, l'any 2010 va generar 4.056.121.000 € amb una producció de 3.498.040 tones (FAOSTAT, 2010). A Catalunya es van sacrificar 16.898.418 caps de porcí durant el mateix any. Segons estadístiques de la Generalitat de Catalunya (2009), la crisi financera afecta en el consum de carn (i el sacrifici és un indicador). L'any 2009 hi va haver una disminució del sacrifici de boví, aus i especialment oví en relació a l'any anterior, en canvi el sacrifici de porcí i conills va augmentar clarament.

Les exportacions tant al mercat europeu com a països tercers han anat augmentant de manera constant, i avui representen una part molt important de la producció espanyola. El nivell de producció supera amb molta diferència el consum intern (MARM, 2011).

Del sacrifici de bestiar se n'obtenen parts aptes per al consum i productes de rebuig que la indústria no aprofitarà.

1.1.1. La sang porcina en la indústria

La sang representa un dels principals efluents contaminants en els escorxadors degut a la seva càrrega orgànica i als elevats nivells de DQO i DBO, cosa que fa imprescindible comptar amb un procés costós de depuració dels efluents i de separació i tractament de la sang. Moltes vegades però, els escorxadors no disposen d'instal·lacions adequades pel tractament dels efluents. No obstant, la sang

es pot tractar com a subproducte, reduint així la contaminació que es genera en els escorxadors i fent factible la seva reutilització com a ingredient alimentari.

Les aplicacions industrials de les proteïnes de la sang en productes carnis han estat àmpliament estudiades. Tot i això, no hi ha massa interès en fer ús d'aquesta gran font de proteïnes, i sovint tota la sang és considerada residu. L'eliminació de la sang per complir amb la normativa vigent d'abocament d'aigües al sistema de clavegueram no només requereix tractaments de descontaminació cars, sinó també grans quantitats d'aigua.

Els tractaments de descontaminació es podrien evitar, i per tant es podria reduir el cost d'eliminació, si la sang es recuperés i es tractés adequadament per tal de ser utilitzada com a ingredient alimentari (Parés *et al.*, 2011).

1.2. La sang i les seves fraccions

La composició de la sang es descriu a la taula següent:

Taula 1.1. Constituents de la sang i les seves fraccions amb percentatge en pes (Ockerman *et al.*, 1988).

Constituent	Sang	Plasma (60%)	Fracció cel·lular (40%)
Aigua	80	90,8	60,8
Sals minerals	0,9	0,8	1,1
Greix	0,2	0,1	0,4
Proteïna	17	7,9	35,1
Albúmina	2,8	4,2	-
Globulines	2,2	3,3	-
Fibrinogen	0,3	0,4	-
Hemoglobina	10	-	30
Altres	1,1	0,4	2,6

La sang conté cèl·lules sanguínies, que corresponen al 40-45% del pes de la sang i estan suspeses en un líquid anomenat plasma sanguini, el qual representa més del 60% del total de la sang.

1.2.1. Fracció cel·lular

La majoria de les cèl·lules presents a la sang són els glòbuls vermells (eritròcits), i en menys quantitat els glòbuls blancs (leucòcits) i les plaquetes. Els eritròcits i el plasma tenen un pH lleugerament alcalí (7,3-7,5) i es poden separar fàcilment per centrifugació. La fracció dels leucòcits conté un 28-38% de proteïna, sent la hemoglobina la majoritària. La molècula d'hemoglobina és una agregació de quatre subunitats que són proteïnes globulars. Cada subunitat està formada per una cadena proteica amb un pes molecular d'uns 17 kDa estretament units amb un grup hemo no proteic (Parés *et al.*, 2011).

1.2.2. Fracció plasmàtica

El plasma és un líquid de color groc palla amb contingut en proteïnes del 6-8%. Conté una complexa mescla de proteïnes, que es poden classificar en tres grans grups: albúmina (més del 60%), globulines (40%) i fibrinogen (3%) (figura 1.1).

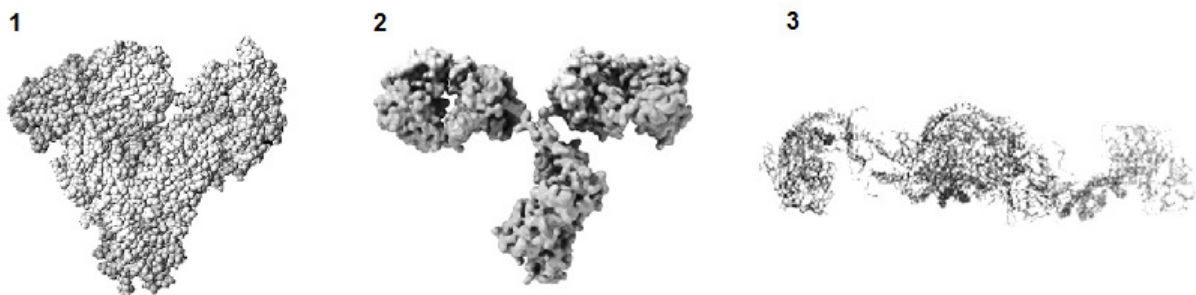


Figura 1.1. Representació molecular de les proteïnes majoritàries del plasma: **1.** Albúmina. **2.** Immunoglobulina G. **3.** Fibrinogen (Font: Universitat d'Arizona, 2006).

L'albúmina o seroalbúmina és una proteïna globular amb un pes molecular de 69 kDa i un punt isoelèctric (pI) de 4,8. L'estructura tridimensional de la seroalbúmina es forma amb estructures primària, secundària i terciària, predominantment alfa hèlix

reticulada per ponts disulfur. La seva estructura primària és la responsable de l'alta solubilitat d'aquesta proteïna, ja que li confereix una càrrega neta alta. L'albumina es compon d'uns 580 aminoàcids en una sola cadena i la seva seqüència conté 17 ponts disulfur i una cisteïna lliure en la posició 34 (Dàvila, 2006).

La seroalbumina és una de les proteïnes més estudiades i és la més abundant en el plasma, amb una concentració mitjana de 5 g/100 ml. En el sistema circulatori, l'albumina contribueix al 80% de la pressió sanguínia osmòtica col·loïdal. S'ha comprovat que la seroalbumina és la principal responsable de l'estabilitat del pH de la sang. En els mamífers, l'albumina se sintetitza inicialment com a prealbumina en el fetge. Un cop l'albumina està en circulació té una vida mitjana de 19 dies (Friedli, 1996).

L'albumina es caracteritza per tenir un baix contingut en aminoàcids triptòfan i metionina, i un alt contingut en cisteïna i aminoàcids amb càrrega, àcids aspàrtic i glutàmic, lisina i arginina (Friedli, 1996).

Les globulines són un grup heterogeni de proteïnes globulars, que es divideixen en α , β i γ globulines, amb un ampli rang de pesos moleculars, des de pocs a centenars de kDa, i un pI entre 5 i 7. En el cas de les immunoglobulines, l'estructura terciària típica té forma d'Y unida a dos parells de cadenes lleugeres i pesades estabilitzades per ponts disulfur a la vora dels quals es troba el lloc d'unió de l'antigen. La proteïna més abundant dins d'aquest grup és la immunoglobulina G (IgG), seguida de α_1 -antitripsina i transferrina (Dàvila, 2006).

El fibrinogen és el principal responsable de la coagulació. És una proteïna d'estructura fibrosa de 340 kDa feta de tres parells de cadenes de polipèptids no idèntiques que formen dues subunitats idèntiques. La seva funció principal és la formació de la xarxa tridimensional de fibres de fibrina durant la coagulació de la sang. Quan s'elimina fibrinogen del plasma, la fracció restant s'anomena sèrum (Dàvila, 2006).

1.3. Aprofitament de la sang en la indústria agroalimentària

La sang procedent d'animals sacrificats és un subproducte natural de la indústria càrnia que s'obté en grans volums i té potencial per produir una sèrie d'ingredients alimentaris.

La meitat del volum de la sang dels animals sacrificats es queda a les parts comestibles com ara la carn i els òrgans interns, i l'altra meitat es pot recuperar per dessagnat. Si de cada porc se'n recullen 3 litres de sang, la qual conté un volum mitjà de proteïna del 18%, en els escorxadors s'obtindrà una gran quantitat de proteïna animal que no ens podem permetre rebutjar. El processament d'aliments ofereix la possibilitat d'integrar la sang sencera o una fracció d'aquesta a la dieta humana.

La sang té un gran valor nutritiu gràcies no només al seu alt contingut en proteïnes, si no també al seu alt índex d'eficàcia, que és superior al de la caseïna. Tot i així, el perfil aminoacídic no es considera ben equilibrat a causa del dèficit d'aminoàcids essencials com la isoleucina i la metionina.

D'altra banda, la sang té un elevat contingut en ferro lligat a l'hemoglobina, la millor forma del ferro en termes de biodisponibilitat. El ferro hemínic s'absorbeix més de pressa que la forma inorgànica trobada en plantes o les sals ferroses sovint utilitzades en fortificació d'aliments. Les proteïnes de la sang també poden ser ingredients funcionals útils en la formulació de productes alimentaris ja que tenen propietats gelificants, emulsionants, escumants i/o de retenció d'aigua.

Divacaran (1980) defineix els usos de la sang en aliments com a agent emulsionant, estabilitzant, gelificant, colorant, component nutricional o com a substitut de la clara d'ou. La sang es pot utilitzar en altres sectors com el dels pinsos compostos, fertilitzants, laboratoris, medicina, farmàcia o en la indústria.

Segons Ockerman i Hansen (1988) els subproductes d'origen animal tenen diversos requeriments per poder ser utilitzats:

- Existència d'un procés comercial pràctic per poder convertir el subproducte animal en un article aprofitable per a la indústria.
- Obtenció del subproducte en quantitat suficient en un lloc determinat, de manera que el seu processament sigui econòmic.
- Existència d'un mercat potencial o real del producte final.
- Existència d'algun procediment tecnològic o de conservació adequat que permeti l'emmagatzematge del subproducte abans i després de processar-lo.
- Existència d'operaris especialitzats per treballar en aquest tipus d'indústria.

La sang té diverses aplicacions potencials. En la indústria alimentària és possible la incorporació de sang o derivats en productes alimentaris pel seu valor nutricional i les bones propietats funcionals, incloent-hi el paper potencial d'agent colorant (Parés *et al.*, 2011).

Encara que en alguns països d'Europa, com França, l'addició de fraccions de la sang a productes carnis està ben vista en les etiquetes, l'ús de sang animal com a additiu alimentari no és acceptat; en alguns casos a causa de consideracions religioses. Però tenint en compte que les proteïnes de la sang es troben a la carn de manera natural, el seu ús en productes carnis de fet no hauria de ser considerat res més que l'addició d'un ingredient natural. D'altra banda, val la pena assenyalar que les proteïnes de la sang no mostren potencial al·lèrgic; per tant podrien ser una alternativa als ingredients funcionals àmpliament utilitzats com blat, soja, ous o proteïnes làcties, responsables de la majoria d'al·lèrgies alimentàries (Parés *et al.*, 2011).

1.3.1. Propietats funcionals de les proteïnes plasmàtiques

Les proteïnes plasmàtiques mostren propietats funcionals interessants que inclouen bona solubilitat al llarg de tot el rang de pH, formació i estabilització d'escumes i emulsions gràcies a la seva capacitat de formar capes interfase, així com la formació de gels amb bona textura i alta capacitat de retenció d'aigua. La capacitat escumant és útil en l'aplicació a productes de pastisseria, les propietats emulsionants i

gelificants són les propietats funcionals més interessants del plasma quan s'utilitza en la formulació de productes carnis. A la taula 1.2 s'hi descriuen les propietats funcionals de les proteïnes plasmàtiques i la seva aplicació en diferents aliments.

Taula 1.2. Aplicacions de les proteïnes plasmàtiques en diferents aliments segons les propietats funcionals (Álvarez *et al.*, 2009).

Aliment	Proteïna Adequada	Propietat Funcional
Productes de fleca/forn	Plasma	Capacitat escumant Gelificació Solubilitat
Productes de pastisseria	Fibrinogen i plasma	Capacitat emulsionant Solubilitat
Productes carnis	Globulines	Capacitat emulsionant Solubilitat Gelificació
Productes lactis	Plasma i albúmina	Solubilitat Gelificació
Ovoproductes	Plasma	Capacitat escumant

1.3.1.1. Capacitat emulsionant

Les emulsions són dispersions de dos líquids immiscibles entre si: gotes disperses en una fase contínua. La major part d'emulsions alimentàries són del tipus O/W o W/O (oli en aigua o aigua en oli, respectivament), i el diàmetre de les gotes de la fase dispersa pot estar entre 0,1 i 50 µm (Cheftel *et al.*, 1989).

En el procés d'emulsió, la formació de les gotes disperses implica la creació d'una superfície interfasial entre els dos líquids immiscibles, la qual augmenta exponencialment a mesura que disminueix el diàmetre de les gotes (Cheftel *et al.*, 1989).

L'homogeneïtzador fa possible la formació d'una capa interfasial, exercint una alta pressió sobre el sistema, però el resultat pot ser una emulsió inestable. L'estabilitat

la donaran els agents emulsionants, que en aquest cas seran proteïnes amb una elevada hidrofobicitat superficial i solubilitat (Nakai *et al.*, 1980; Halling, 1981; Kato *et al.*, 1983; Voutsinas *et al.*, 1983).

Totes les proteïnes del plasma tenen bona activitat emulsionant, però l'albumina i les globulines aïllades per separat a pH 7,5, formen emulsions molt més estables que les altres proteïnes sèriques. Les millors condicions per a la formació d'emulsions són a pH àcid i sense fibrinogen (Parés *et al.*, 2011).

1.3.1.2. Capacitat gelificant

Una de les propietats més interessants de les proteïnes del plasma és la seva capacitat de formació de gels quan són tractades tèrmicament, i quan estan a la concentració adequada (Dàvila, 2007). En la figura 1.2 s'hi representen els canvis en l'estructura durant la formació de gels per calor.

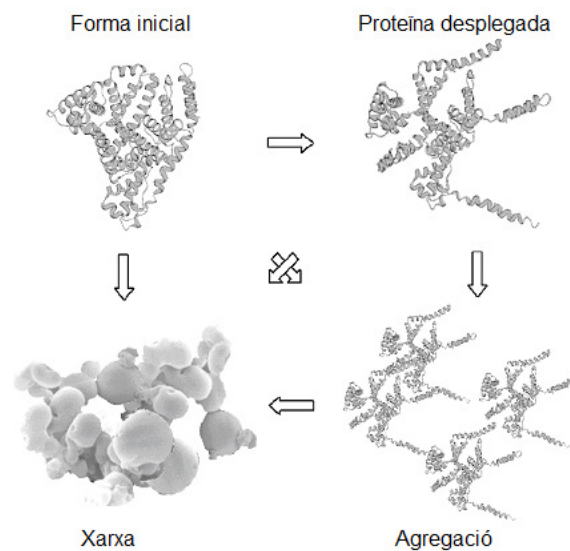


Figura 1.2. Transformació de les proteïnes de la seva forma inicial a la xarxa proteica en el procés de gelificació (Dàvila, 2007).

Durant el procés de gelificació les proteïnes del plasma es desnaturalitzen i provoquen reaccions hidrofòbiques, ponts disulfur i reaccions electrostàtiques que permeten la reorganització i agregació de les proteïnes en forma de xarxa tridimensional ordenada, formant gels consistents que retenen l'aigua dins la matriu proteica (Clark *et al.*, 1981; Damodaran, 1986; Shimada *et al.*, 1989).

La gelificació proteica implica la formació de gels sòlids viscoelàstics, contribueix a la millora de l'adsorció d'aigua i a l'estabilització d'emulsions i escumes (Torres *et al.*, 1997). Sol ser necessària l'aplicació d'un tractament tèrmic per aconseguir la gelificació, a més, a vegades convé disminuir el pH o afegir sals per augmentar la capacitat de gelificació de les proteïnes i la fermesa del gel (Cheftel *et al.*, 1989).

Aquesta és una de les propietats funcionals més importants del plasma, la seva aplicació és de gran utilitat en diversos aliments, com la seva substitució parcial de la clara d'ou en productes de pastisseria, doncs resulta un atractiu econòmic degut a que la clara d'ou costa el doble que les proteïnes plasmàtiques (Howell i Lawrie, 1984).

El fibrinogen i les globulines plasmàtiques gelifiquen a uns 57°C mentre que l'albumina gelifica a uns 70°C. Per això, la concentració de proteïna necessària per formar un gel és molt més baixa en les fraccions individuals de globulines i fibrinogen, que en l'albumina (Parés *et al.*, 2011).

La **capacitat de retenció d'aigua (CRA)** representa el percentatge d'aigua alliberada pel gel respecte el seu pes total. El plasma, en gelificar, forma un medi capaç de retenir aigua, nutrients i aromes.

1.3.1.3. Capacitat escumant

Les escumes són dispersions formades de dues fases: fase líquida contínua que envolta la fase dispersa, bombolles del gas incorporat. Les escumes tenen una àrea interfasial aire – aigua molt gran, on les proteïnes tendeixen a acumular-se (Dàvila, 2007) i on es despleguen parcialment i s'ajunten formant una capa intermolecular amb cert grau de flexibilitat (Friedli, 1996).

La distribució de les proteïnes al llarg de la capa entre les bombolles d'aire i la fase líquida determinen la quantitat d'aire que s'hi podrà incorporar, així com l'estabilitat de l'escuma. Això ve determinat principalment per tres factors: la tensió interfasial, la viscositat de la fase contínua i les propietats estructurals de la capa d'adsorció (flexibilitat). La viscositat de la fase líquida depèn de la proteïna que contingui, per

tant, tots els factors que incrementin la solubilitat de les proteïnes milloraran l'estabilitat de les escumes, evitant així els fenòmens de desestabilització (Friedli, 1996).

El plasma té una capacitat escumant tan bona com la de la clara d'ou. Però això passa sempre que l'albumina sigui la proteïna majoritària i estigui a un pH superior a 4,5, ja que les globulines tenen poca capacitat escumant. L'albumina té la capacitat d'estabilitzar l'escuma a pH 6,0 (Parés *et al.*, 2011).

1.4. Sistemes de fraccionament del plasma

El plasma és una mescla complexa de proteïnes globulars i fibroses amb un pes molecular que varia des de pocs kDa fins a centenars, poc o molt lligades, amb alta o baixa higroscopicitat. A causa de les diferents característiques fisicoquímiques i funcionals de les proteïnes del plasma, es pot desenvolupar una àmplia gamma d'ingredients funcionals a partir del fraccionament i reformulació del perfil proteic amb l'objectiu de potenciar les seves propietats específiques (Parés *et al.*, 2011).

Existeixen diversos mètodes per al fraccionament de les proteïnes del plasma: *salting out*, fraccionament amb alcohol, fraccionament aquós de dues fases, cromatografia per interacció hidrofòbica o cromatografia d'intercanvi de ions. L'obtenció d'efectes beneficiosos després de la separació de proteïnes no només depèn del mètode de fraccionament, sinó també de la procedència de la sang i el paràmetre mesurat (Parés *et al.*, 2011).

1.4.1. *Salting out*

Consisteix en l'addició de sulfat amònic, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, per provocar una precipitació selectiva de les proteïnes en funció de la seva solubilitat en medis amb diferent concentració de sal. Es basa en el principi de que a altes concentracions de sal les proteïnes són menys solubles. Aquest procés també s'utilitza per concentrar solucions diluïdes de proteïnes.

Les proteïnes estan formades per aminoàcids hidròfobs i hidròfils. Quan la proteïna està en solució, els aminoàcids hidròfobs solen formar àrees protegides hidròfobes, mentre que els aminoàcids hidròfils interactuen amb les molècules de solvatació formant ponts d'hidrogen entre les proteïnes i les molècules d'aigua del voltant. Una proteïna serà soluble amb aigua si prou quantitat de la seva superfície és hidròfila.

Quan la concentració de sal s'incrementa, algunes de les molècules d'aigua són atretes pels ions de sal, això fa disminuir el nombre de molècules d'aigua disponibles per interactuar amb la part hidròfila de la proteïna. Com a resultat de la creixent demanda de molècules de dissolvent, les interaccions proteïna - proteïna són més fortes que les interaccions aigua - proteïna, i les molècules de proteïna coagulen entre elles mitjançant la formació d'interaccions hidrofòbiques (Belitz *et al.*, 1997).

Degut a la diferent composició aminoacídica de les proteïnes, cada proteïna precipita a una concentració de sal diferent.

Per precipitar les proteïnes del plasma, Síria (2005) va determinar que calia un 20% de saturació de sulfat amònic per el fibrinogen, un 60% per les globulines i un 70% per l'albumina.

1.4.2. Separació per membranes, ultrafiltració i diafiltració

La separació per membranes és un procés de fraccionament selectiu on la mida dels porus de les membranes determina el pas de les proteïnes en funció del seu pes molecular.

Les aplicacions de tecnologies de separació per membranes dins les indústries agroalimentàries són nombroses i variades, i representen sovint la solució a problemes que altres tecnologies no poden resoldre mitjançant un tractament compatible amb el valor del producte final. Qualsevol líquid alimentari amb valor nutricional, degut als seus constituents macromoleculars, pot ser purificat o concentrat en una sola operació per aquestes tècniques de membrana (Maubois, 1974).

Una membrana és una barrera o pel·lícula permeoselectiva entre dos medis fluids, que permet la transferència de determinats components d'un medi a l'altre a través d'ella i evita el pas d'altres components. La permeabilitat selectiva està regida per la mida de la partícula, per l'afinitat química amb el material de la membrana i/o per la mobilitat dels components a través de la membrana (Raventós, 2003).

Les membranes per a ser efectives en els processos de separació i filtració, han de ser resistents químicament, tant a l'aliment com als productes de neteja, ser mecànicament i tèrmicament estables, tenir una permeabilitat elevada, alta selectivitat i resistència a les operacions.

En el procés de filtració ha d'existir una força impulsora que forci el pas dels components de la solució a través de la membrana. La força impulsora varia en funció del tipus d'operació amb membranes, podent tractar-se d'una diferència de concentració, de pressió o de potencial elèctric (Rodríguez *et al.*, 2002).

La solució a tractar es pot fer circular perpendicularment a la membrana filtrant o bé amb un flux creuat, de manera que flueixi tangencialment sobre la membrana. Amb el flux perpendicular és fàcil que es creï una capa concentrada de molècules retingudes a una banda de la membrana, les quals dificulten el pas d'altres components i acaben provocant la colmatació. En canvi, amb el flux tangencial es crea un efecte d'auto-neteja, ja que el propi flux circulat a alta velocitat redueix la deposició de les molècules o partícules que podrien colmatar la membrana.

Existeixen molts tipus de tecnologia de separació per membrana, però principalment són quatre els processos que utilitzen la pressió com a força impulsora per a realitzar la separació en fase líquida mitjançant membranes de permeabilitat selectiva. Aquests processos són la microfiltració, la ultrafiltració, la nanofiltració i la osmosi inversa. La grandària de les partícules i les seves propietats químiques són el que determinen les característiques estructurals, com la mida i la distribució dels porus de les membranes en cada procés. Aquests processos es poden aplicar a diversos sectors de la indústria, entre els quals s'inclouen el sector làctic, les fruites i les hortalisses, les begudes i el processament de llavors i sucres.

La **ultrafiltració** serveix per concentrar macromolècules de pes molecular entre 1 i 500 kDa, permetent la separació de les partícules en suspensió i macromolècules (com proteïnes i midó) de l'aigua i les sals. També s'utilitza com a pretractament per als sistemes de nanofiltració i osmosi inversa. La pressió de treball oscil·la entre 2 i 5 bars.

Existeixen altres aplicacions d'aquest procés en la indústria alimentària. S'utilitza en la recuperació de lactoalbúmina i lactoglobulina a partir de sèrum de formatge, com a mètode de preconcentració de llet durant la fabricació de formatge, en la clarificació de suc de fruites, clarificació de vins, concentració de gelatines, etc. (Rodríguez *et al.*, 2002).

La **diafiltració** és un procés que introdueix una modificació en el procés d'ultrafiltració. Consisteix en l'addició d'aigua al producte d'alimentació/retentat a mesura que es va separant el permeat, amb la finalitat de facilitar el pas d'alguns components, bàsicament sals, a través de la membrana. El volum del tanc d'alimentació es manté constant, perquè s'afegeix la mateixa quantitat d'aigua que la que surt. El procés de diafiltració es pot allargar fins que s'aconsegueixi una eliminació satisfactòria dels components a través del permeat (Winston i Sirkar, 1992).

1.5. Productes de brioixeria

Baixauli (2007) defineix els productes de brioixeria com aquells la massa dels quals està composta per una base de farina que incorpora greix i sucre com a elements principals i com a opcionals ous, llet i altres components. Un aspecte important dels productes de brioixeria a part de la seva dolçor, és la seva textura tova i la seva palatabilitat associada al cert contingut gras que afavoreix la facilitat de masticació, aspecte valorat positivament per els consumidors.

Els productes de brioixeria formen part dels hàbits d'alimentació. Des del punt de vista nutricional, la brioixeria generalment no està ben considerada, ja que està constituïda per productes d'alt contingut calòric.

1.5.1. Magdalenes

Les magdalenes són el producte de brioixeria líder per excel·lència, representant el 53% de les vendes totals de productes per a l'esmorzar (Baixauli, 2007).

Les magdalenes són un tipus de producte de brioixeria que es cou amb fornejat, té una estructura interna regular i es fa amb llevat químic.

La formulació d'una magdalena tradicional consta bàsicament de farina, sucre, ous, llet i oli. Tots els ingredients contribueixen en major o menor mesura a la qualitat sensorial a la qual el consumidor està habituat. Conèixer les interaccions que un nou ingredient pugui desenvolupar amb els constituents bàsics és fonamental per a predir els canvis que es detectaran en les característiques del producte final o per a replantejar el procés d'elaboració i cocció.

Cada ingredient contribueix en un aspecte particular a la qualitat del producte: estructura, humitat, sabor, etc. Qualsevol canvi en algun ingredient, la quantitat o la manera de fabricar el producte pot afectar al producte final. Molts ingredients interactuen entre si i poden afectar a la textura del producte.

Farina de blat

La farina de blat és la base en la formulació dels productes de brioixeria. És la que proporciona estructura, textura i sabor als productes. La farina té un determinat contingut en midó i proteïnes (glutenina, gliadina, globulina i albúmina) que li atorguen la seva funcionalitat.

El midó és un dels components de la farina que enforteixen el producte enforat mitjançant la gelatinització, i també és un dels responsables de la formació de la molla. La molla es crea durant l'enforat i depèn del nombre i grandària de cel·les de gas que es formen, del grau de gelatinització del midó i del grau de desnaturalització de proteïnes (Jacobson, 1997).

Quan es barregen amb aigua, les proteïnes de la farina formen una massa viscoelàstica que s'anomena gluten. La formació del gluten depèn de tres factors: la presència de proteïnes a la farina, la hidratació d'aquestes a causa de l'addició d'aigua i l'aportació d'energia durant el batut.

El midó també té un paper important en la formació de l'estructura del producte de brioixeria, ja que determina la viscositat de la massa durant l'escalfament, ajudant a retenir els gasos que s'expandeixen, el diòxid de carboni (de l'impulsor), l'aire (que s'atrapa durant el batut) i el vapor (de l'aigua afegida).

Sucre

El sucre és l'edulcorant més utilitzat en productes de pastisseria. A part de contribuir en la dolçor, el sucre té efecte sobre el volum, humitat, tendresa, color, aparença i naturalment sobre el contingut calòric dels productes de brioixeria.

L'aportació de dolçor és la principal funció que s'espera dels sucres que s'afegeixen a les masses batudes. El sucre, juntament amb altres ingredients ajuda al desenvolupament del producte al forn (Tejero, 1995), és a dir, en la retenció de les bombolles d'aire en el sistema i prolonga el període de la seva expansió, que contribueix a un augment de volum del producte. Durant el procés de fornejat el sucre augmenta la temperatura de gelatinització del midó, i també eleva la temperatura de desnaturalització de les proteïnes, donant al gluten més temps per desenvolupar-se; d'aquesta manera es produeix un major augment de volum del producte enforat (Conforti, 2006).

Un altre efecte que aporta el sucre és el daurat de la superfície per mitjà de la reacció de Maillard.

Greix

En els productes de brioixeria es poden utilitzar com a greix olis vegetals, greixos fluids (parcialment hidrogenats), llard o mantega. El greix ajuda a incorporar aire durant la barreja de la massa, les bombolles d'aire acumulen vapor d'aigua i el gas que aporta l'impulsor s'expandeix durant el fornejat. Això permet una distribució uniforme dels gasos de l'impulsor i del vapor d'aigua que es forma durant el fornejat,

que contribueix a un bon volum final. La incorporació de greixos a la fórmula proporciona una textura tendra, humida i suau i disminueix l'esmicolament de la molla, proporcionant també un sabor característic (Stauffer, 1998; Lai y Lin, 2006; Oreopoulou, 2006).

Impulsors

Els impulsors o llevats químics són els responsables directes de l'augment de volum que es produeix en el fornejat del producte. Els gasos que produeixen fan augmentar el volum amb la calor i s'expandeixen inflant el producte. Els impulsors estan formats per un àcid i per un donant de CO₂. El donant més utilitzat és el bicarbonat sòdic, aquest reacciona amb un àcid per a la correcta producció d'anhídrid carbònic (Gómez i Ronda, 2002).

Llet

La fase líquida és un component essencial en els productes de brioixeria. La quantitat d'aigua que s'aporta a la massa té influència sobre la seva qualitat, textura, gust, olor i volum. En l'elaboració artesanal o casolana, l'aigua no s'afegeix com a ingredient, sinó que hi està present a través d'altres ingredients com la llet (Chiech, 2006). La llet hidrata el midó de la farina, i els grànuls inflats quan s'escalfen, gelatinitzen. A més, dissol ingredients com ara el sucre durant el batut i el fornejat. També és important perquè allibera el diòxid de carboni de l'impulsor. La llet, a més de ser important per seva aportació d'aigua, confereix també un sabor característic i nutrients (calci i vitamina B) i conté una certa quantitat de components que ajuden a que es produeixi el daurat de la superfície, ja que la lactosa i les proteïnes de la llet participen en la reacció de Maillard.

Ou

La incorporació d'ou en els productes de brioixeria no només augmenta el valor nutricional del producte sinó que aporta propietats funcionals interessants, a més de millor color i aparença al producte final. Entre les propietats que aporta l'ou hi ha: augmentar la humitat, facilitar la incorporació d'aire a causa de la capacitat de les seves proteïnes de formar escuma quan es bat, enriquir, ja que al rovell hi ha una alta proporció de greix, emulsionar, a causa de la presència de lecitina en el rovell, i

estructurar, a causa de la presència de les proteïnes que es troben tant en la clara com en el rovell i que coagulen durant l'escalfament (Conforti, 2006).

La clara d'ou consisteix en una barreja complexa de proteïnes tals com albúmina i globulines, aquestes proteïnes són les més importants per produir un augment de volum en els productes de brioixeria. Les proteïnes de la clara són capaces de millorar la dispersió de l'aire que es troba a la massa abans de ser fornejada, i estabilitza la mida de les cel·les d'aire durant el fornejat. La coagulació d'aquestes proteïnes estabilitza el volum del producte final (Çelik *et al.*, 2007). Quan es bat la clara d'ou, s'incorporen bombolles d'aire a la massa.

Altres ingredients

En els últims anys, els consumidors estan més ben informats sobre la relació existent entre dieta i salut, per tant ha augmentat la demanda d'aliments que ofereixen alta qualitat i seguretat, menys greix, colesterol, sucre i sodi, i menys calories que abans. La indústria alimentària intenta respondre a les demandes dels consumidors desenvolupant nous productes "saludables", baixant el nivell de greixos o sucre, afegint fibra, etc. Les formulacions de productes de brioixeria permeten la incorporació de nous ingredients intentant no modificar substancialment les propietats organolèptiques i de textura d'aquests productes.

2. OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

Aquest treball s'ha desenvolupat en el marc d'una línia de recerca del grup de Tecnologia Alimentària de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA) relacionada amb l'aprofitament de les proteïnes de la sang d'animals sacrificats en escorxadors.

En un treball previ (Casals, A. 2011) s'havia posat a punt una metodologia a escala de planta pilot per obtenir sèrum concentrat a partir de sang de porc, basada en el fraccionament del plasma per la tècnica *salting out*, i la concentració i dessalat del sèrum mitjançant sistemes d'ultrafiltració i diafiltració tangencial. Posteriorment s'han fet proves d'aplicació d'aquest ingredient com a substitut de caseïnat i polifosfat en la producció de salsitxes de frankfurt. D'altra banda, també es va estudiar la possibilitat d'introduir plasma deshidratat procedent de sang de porc, com a ingredient funcional en la fabricació de magdalenes substituint l'ou (Casals, F. 2011).

En aquest treball es vol fraccionar el plasma per *salting out* per obtenir seroalbúmina, i concentrar-la i dessalar-la seguint la mateixa metodologia. Aquesta es caracteritzarà físico-química i funcionalment i es valorarà la seva possibilitat de ser utilitzada com a ingredient funcional en magdalenes.

Els objectius concrets que es plantegen són:

- Obtenir seroalbúmina de sang de porc utilitzant la tècnica *salting out* i sotmetre-la posteriorment a processos d'ultra i diafiltració.
- Caracteritzar la seroalbúmina obtinguda des del punt de vista físico-químic i funcional per valorar la seva possible utilització com a ingredient alimentari amb funcionalitats específiques diferenciades.
- Utilitzar la seroalbúmina com a ingredient en magdalenes per valorar la possibilitat d'aprofitar la seva capacitat escumant utilitzant-la com a substituta de proteïna d'ou.

3. MATERIAL I MÈTODES

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Disseny experimental

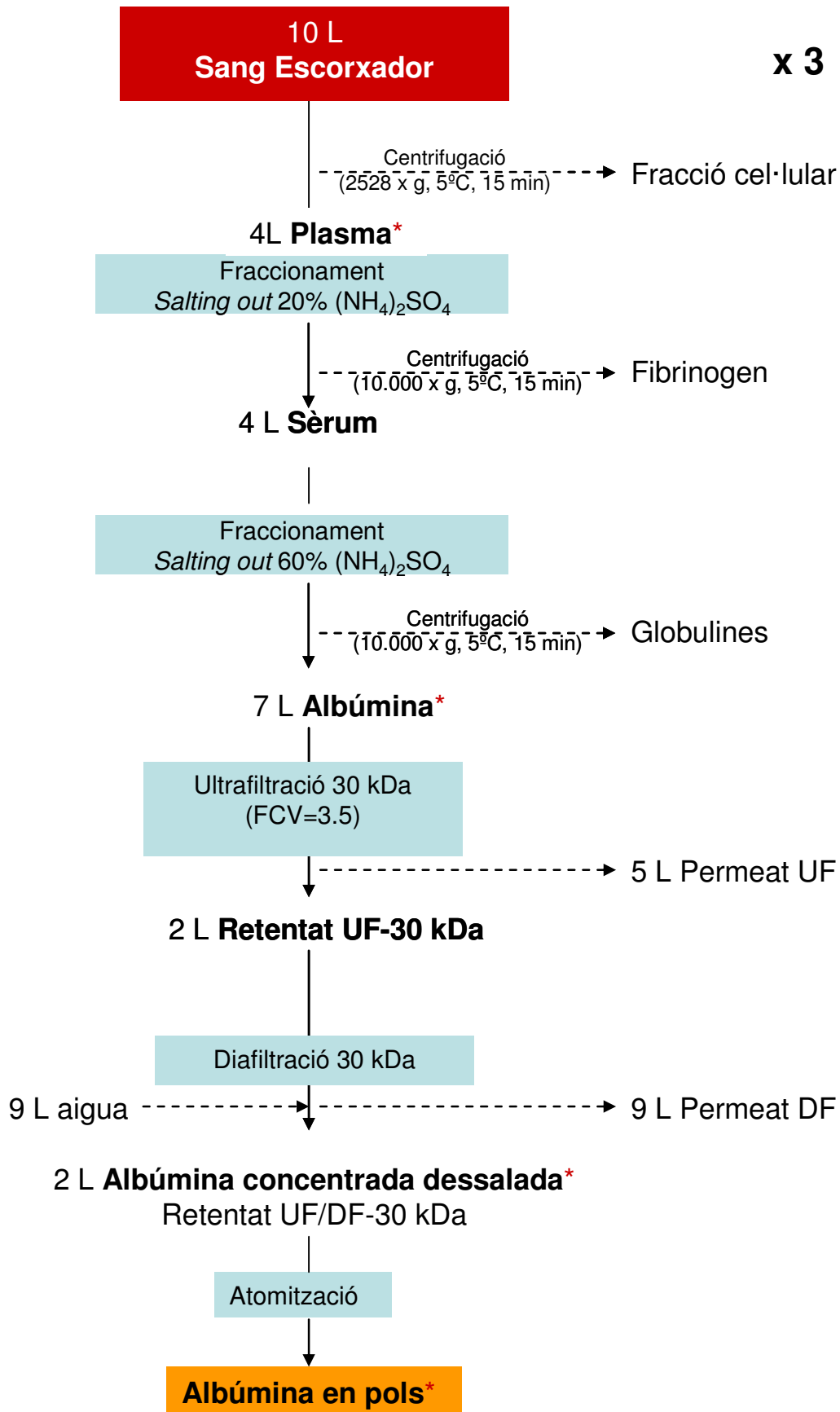
En la figura 3.1 es mostra el procediment seguit per a l'obtenció de l'albúmina en pols: en primer lloc se centrifugava la sang per tal de separar-ne la fracció cel·lular, la fracció restant era el plasma. Per la tècnica de *salting out* es precipitava el fibrinogen del plasma i després se separava per centrifugació. La fracció restant era el sèrum, el qual també se sotmetia a *salting out* i centrifugació per tal de separar-ne les globulines.

Després d'aquests tractaments el producte resultant era una solució d'albúmina molt diluïda amb una elevada quantitat d'amoni degut a l'addició de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durant el *salting out*. Per aquesta raó es procedia a concentrar el producte per ultrafiltració i a dessalar-lo mitjançant un procés de diafiltració.

Per tal de garantir-ne una bona conservació, el concentrat de seroalbúmina obtingut es deshidratava per atomització..

Aquest procés es va repetir tres vegades a partir de 10 litres de sang recollits en dies diferents però en les mateixes condicions. El processament de la sang s'iniciava el mateix dia de la recollida.

Es van guardar mostres de plasma, albúmina després del *salting out*, albúmina concentrada i albúmina en pols i se'n va fer l'anàlisi de conductivitat elèctrica, extracte sec, cendres, i contingut de proteïnes. També es va determinar el perfil electroforètic del plasma i l'albúmina concentrada.



*Caracterització físico-química: conductivitat, extracte sec, cendres i proteïna.

Figura 3.1. Diagrama de flux per l'obtenció d'albúmina deshidratada.

Es va determinar la capacitat escumant, emulsionant i gelificant de l'albúmina en solució. Es va procedir a fer una prova d'aplicació de l'albúmina deshidratada com a substituïda d'ou en la fabricació de magdalenes. En la figura 3.2 es mostra el disseny experimental de la prova d'aplicació.

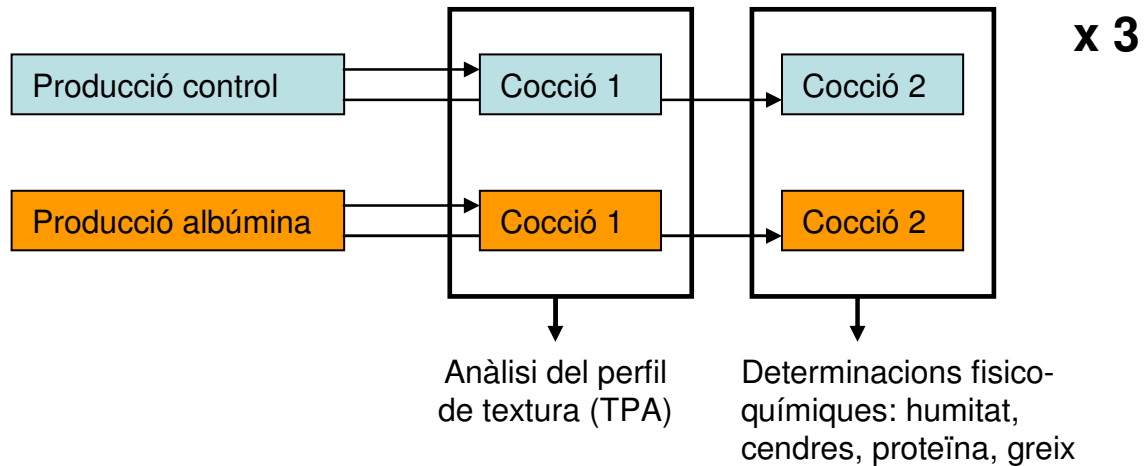


Figura 3.2. Disseny experimental de la producció de magdalenes. En cada cocció es feien 6 magdalenes.

3.2. Obtenció de l'albúmina deshidratada

3.2.1. Recollida de la sang

Per cada producció es recollien 10 litres de sang de porcí que contenien citrat sòdic com a anticoagulant en un escorxador industrial (Norfrisa S.A., Riudellots de la Selva, Girona) mitjançant garrafes estèrils de 5 litres i a partir del tanc refrigerat d'emmagatzematge de sang higiènica. Les mostres es van transportar i mantenir en refrigeració fins el moment de ser processades.

3.2.2. Obtenció del plasma

El primer pas en el processament de la sang consistia en centrifugar-la a 2.528 g, a 5°C durant 15 minuts en un equip Sorvall RC 5C Plus (DuPont Co., Newtown, Connecticut). D'aquesta manera se'n separava la fracció cel·lular i s'obtenia el plasma per decantació.

Es reservava una fracció del plasma obtingut per tal de fer les determinacions analítiques.

3.2.3. Precipitació del fibrinogen

Per tal d'extreure el fibrinogen contingut en el plasma, s'utilitzava la tècnica de fraccionament de proteïnes per *salting out* amb una solució saturada de sulfat amònic.

Es fraccionaven 4 litres de plasma mantinguts a baixa temperatura (0-3°C) i amb agitació lenta (60 rpm) (rotor Heldolph RZH 2021), per tal de minimitzar el risc de desnaturalització proteica. S'utilitzava un reactor encamisat per on s'hi feia circular aigua freda procedent d'un bany d'aigua amb gel i amb una resistència (P Selecta®) submergida que permetia mantenir la temperatura entre 0 i 1°C.

La solució precipitant consistia en una solució saturada de sulfat amònic preparada dissolent 767 g de sulfat amònic (Scharlau, Scharlab, S.L., Sentmenat) en 1 L de tampó TRIS/EDTA x mM pH 7,4, que contenia 1,223 g de TRIS (Panreac, Panreac Química S.A.U., Barcelona, Espanya) i 3,76 g d'EDTA (Panreac) per litre d'aigua destil·lada. Aquesta solució es mantenia en refrigeració.

Amb l'ajuda de 4 buretes s'afegia gota a gota 1 litre de la solució precipitant sobre els 4L de plasma. Un cop afegit el litre de sulfat es parava l'agitació, es deixava reposar durant 15 minuts i es donava un cop d'agitació per resuspendre el precipitat. Un 20% de saturació de sulfat amònic permetia la coagulació i precipitació del fibrinogen (Síria, 2005; Vilardell, 2010).

Tot seguit se centrifugava el plasma a 10.000 g, a 5°C durant 15 minuts i es decantava el sèrum. Una part del sèrum es reservava per fer les determinacions analítiques i la resta s'utilitzava per seguir el procés de fraccionament.

3.2.4. Precipitació de les globulines

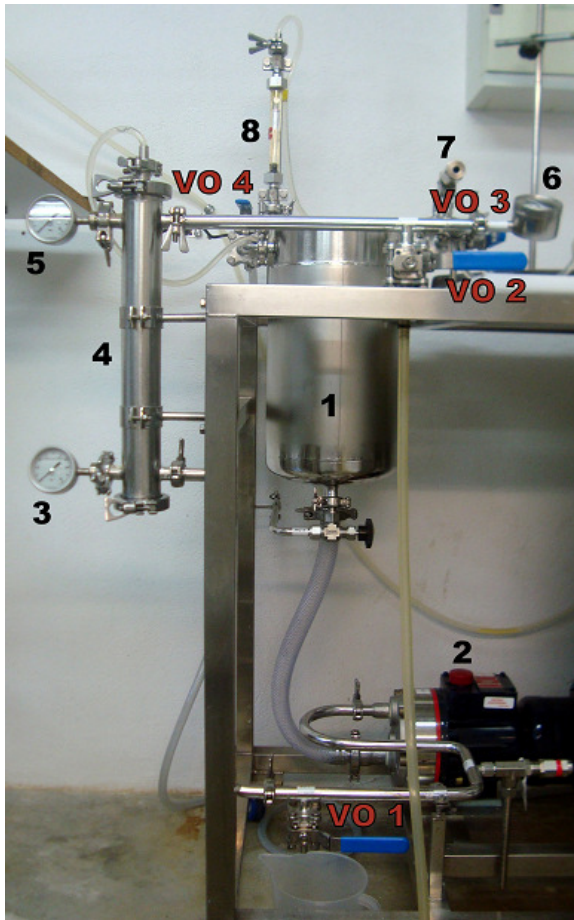
La separació de les globulines del sèrum també es feia per *salting out*. Es tractaven 4 litres de sèrum i es procedia igual que amb el fraccionament del plasma, amb la diferència que aquesta vegada s'hi afegien 4 litres de sulfat amònic, de manera que la concentració final d'aquest en el sèrum arribava al 60%. Aquesta concentració de sal provocava la precipitació de les globulines, que se separaven per centrifugació en les mateixes condicions que en el cas anterior, a 10.000 g, a 5°C durant 15 minuts. En aquesta operació s'obtenien uns 7 litres de seroalbúmina diluïda i amb un excés de sals, a causa de la quantitat de sulfat amònic saturat que s'hi havia afegit.

El fibrinogen i les globulines que s'obtenien en el *pellet* de la centrifugació de les dues etapes anteriors no s'utilitzaven en aquest estudi però es congelaven per a posteriors aplicacions.

Es reservava una fracció de l'albúmina obtinguda per tal de fer les determinacions analítiques de conductivitat, humitat, cendres i proteïna.

3.2.5. Concentració de l'albúmina per ultrafiltració

La concentració de l'albúmina es portava a terme amb un equip d'ultrafiltració MMS-SW 18 system (MMS AG, Zurich, Suïssa) a escala de planta pilot i un mòdul de membrana espiral de 0,32 m² de superfície filtrant de poliacrilonitril modificat amb un *cut-off* de 30 kDa (GE, MW1812C-34D) (figura 3.3).



1. Tanc d'alimentació
 2. Bomba
 3. Manòmetre d'entrada
 4. Mòdul d'ultrafiltració
 5. Manòmetre de sortida
 6. Termòmetre
 7. Vàlvula de purga RV-2
 8. Cabalímetre de sortida del permeat
- VO = vàlvules d'operació

Figura 3.3. Equip d'ultrafiltració MMS-SW 18 system (MMS AG, Zurich, Suïssa).

3.2.5.1. Preparació de l'equip d'ultrafiltració

Abans de començar el tractament de la mostra calia posar a punt l'aparell:

- **Muntatge de la membrana**

Col·locar el mòdul de membrana en el receptacle, posar la tapa de sota i fixar-la amb l'abraçadora i fer el mateix amb la tapa de sobre amb el tub de sortida de permeat. Calia verificar el bon estat de les juntes tòriques, lubricar amb una mica de vaselina el tub que s'introduïa dins el mòdul de filtració i comprovar que quedava ben encaixada per tal de suportar la pressió sense que es produïssin fuites.

- **Verificar la posició de les vàlvules de procés**

Perquè el contingut del tanc d'alimentació passés pel mòdul de filtració i tornés al tanc (recirculació del producte), calia que les 4 vàlvules d'operació i la vàlvula de purga estiguessin en la posició següent:

- VO 1: Tancada, de manera que feia entrar el producte al mòdul de filtració impulsat per la bomba.
- VO 2: Oberta. Feia recircular el retentat cap al tanc d'alimentació.
- VO 3: Tancada, per regular el circuit del retentat i incrementar la pressió transmembrana.
- VO 4: Tancada. Permetia l'entrada d'aigua al tanc d'alimentació quan volíem mesurar fluxos de permeació o netejar el sistema.
- Vàlvula de purga RV-2: Permetia incrementar la pressió transmembrana quan la VO 3 estava tancada. Si no volíem pressió dins el mòdul de filtració havia d'estar completament oberta.

A la figura 3.4 es representa el recorregut que segueix el producte durant el procés de filtració quan les vàlvules estan en aquesta posició.

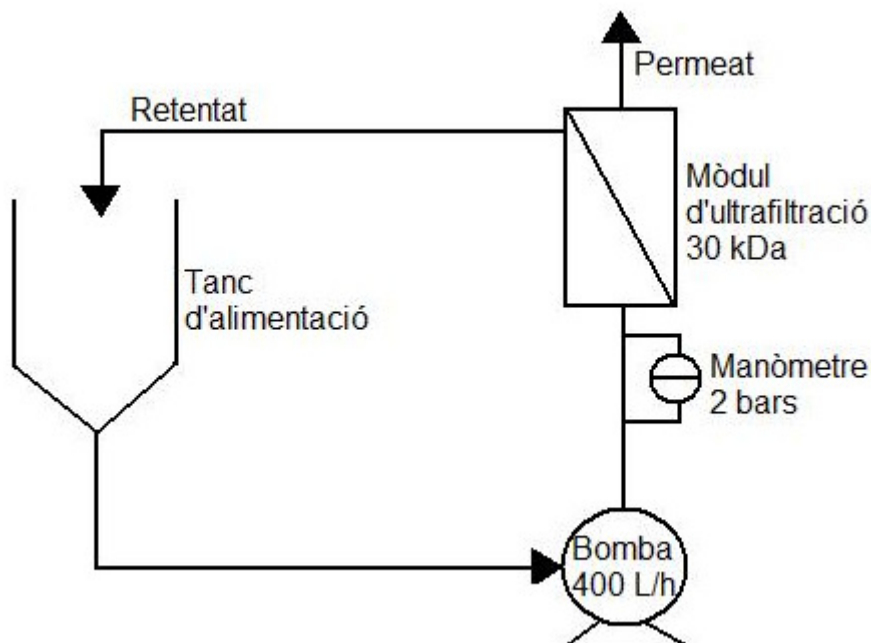


Figura 3.4. Esquema del procés de filtració.

- **Mesurar el flux de permeació inicial**

Anotar quin era el flux de permeació que s'obtenia amb aigua en unes determinades condicions de cabal, temperatura i pressió transmembrana. Si es recuperava el flux de permeació inicial al final del procés volia dir que la neteja havia sigut eficaç.

Per buidar el sistema primer es despressuritzava obrint la vàlvula RV-2, es baixava la freqüència de la bomba i s'obrien VO 2 i VO 3. Quan el dipòsit quedava buit es parava la bomba i s'obria VO 1 per acabar de buidar.

3.2.5.2. Procés de concentració

Un cop posat a punt l'equip i amb totes les vàlvules tancades i VO 3 oberta, es començava amb el procés de concentració de l'albúmina:

S'abocaven 7 litres d'albúmina al dipòsit d'alimentació. Es regulava el cabal de la bomba a una freqüència de 15 Hz (uns 400 L/h). Es tancava la vàlvula VO 3, s'engegava la bomba i es tancava RV-2 fins a tenir una pressió de treball de 2 bars. En aquest moment es començava a recollir el permeat en un recipient tarat damunt d'un granetari i cada 2,5 minuts s'anotava el pes obtingut per tal de calcular el flux de permeació. També s'anotava la temperatura del retentat.

Durant aquesta operació la solució d'albúmina passava a través d'una membrana amb pes molecular de tall de 30 kDa que permetia el pas d'aigua i sòlids de pes molecular petit, com les sals. La part que no travessava la membrana (albúmina) es recirculava al tanc d'alimentació de l'equip.

El procés de concentració continuava fins que s'havien recollit 5 litres de permeat. Es passava d'un volum inicial de 7 litres d'albúmina a 2 litres d'albúmina concentrada (retentat), per tant s'havia aplicat un factor de concentració volumètrica de 3,5.

3.2.6. Dessalat de l'albumina per diafiltració

Sense parar el procés es feia l'eliminació de les sals afegint aigua destil·lada dins el tanc d'alimentació. S'hi incorporaven alíquotes de 500 mL, i cada vegada que es treien 500 mL de permeat es mesurava la conductivitat de l'albumina per controlar el procés de dessalat, i s'afegia una nova alíquota d'aigua destil·lada, de manera que es mantenia el volum de solució a dins de l'equip. Al mateix temps, es continuava amb el seguiment del pes de permeat extret i de temperatura. El procés seguia fins que la conductivitat de l'albumina baixava fins a ser com la del plasma. En total s'hi afegien 9 litres d'aigua destil·lada i s'extreien 9 litres de permeat.

Per aturar la filtració es despressuritzava obrint la vàlvula RV-2 a poc a poc i es recollia l'albumina concentrada en un recipient obrint VO 2 i tancant VO 3. Les restes de mostra que no s'havien recollit s'obtenien obrint la vàlvula VO 1, tal com s'havia fet per buidar l'aigua. Es recollien en total uns 2 L d'albumina concentrada i dessalada.

3.2.6.1. Protocol de neteja

Acabada aquesta operació, calia fer una neteja del mòdul de filtració, seguint els següents passos:

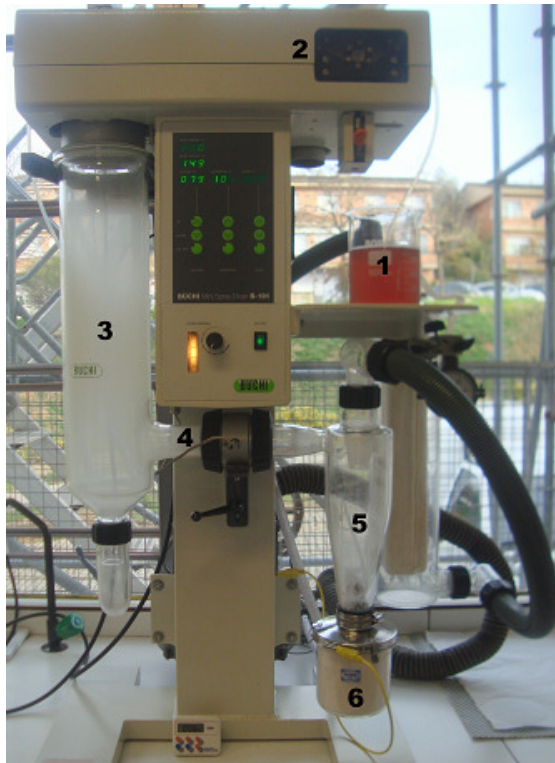
S'esbandia amb aigua i es buidava. S'omplia amb aigua calenta i es recirculaven retentat i permeat a 15 Hz, 10 minuts sense pressió, i 5 minuts més a 5 bars. Es buidava, s'esbandia i es buidava. S'omplia el dipòsit amb aigua calenta i 10 mL de sosa al 40%. Es recirculava a 15 Hz 10 minuts sense pressió i 5 minuts a 5 bars. Per últim es buidava i es tornava a esbandir amb aigua.

Calia tornar a abocar aigua al dipòsit i comprovar que s'havia recuperat el flux de permeació inicial. S'ultrafiltrava en les mateixes condicions de cabal, temperatura i pressió transmembrana que a l'inici.

Ja amb l'equip buit, es treia el mòdul de filtració i es guardava submergit en una solució conservant a l'1% d'àcid cítric i 0,3% de bisulfit sòdic.

3.2.7. Deshidratació per atomització

Per assegurar una conservació adequada del producte al llarg dels dies en que s'utilitzaria, es deshidratava amb un atomitzador Büchi Mini Spray Dryer B-191 (Büchi, Suïssa) (figura 3.5).



1. Albúmina a deshidratar
2. Bomba peristàltica
3. Cambra de deshidratació
4. Sonda de temperatura
5. Cicló separador
6. Col·lector de l'albúmina deshidratada

Figura 3.5. Atomitzador Büchi Mini Spray Dryer B-191 (Büchi, Suïssa) durant el procés de deshidratació d'una de les produccions d'albúmina.

Per l'eliminació de l'aigua del nostre producte l'atomitzador aspirava el líquid amb una bomba i el transportava fins a una tovera a pressió on es nebulitzava. D'aquesta manera es feia entrar el líquid en forma de gotes molt petites dins la cambra de deshidratació, on un corrent d'aire a 150°C (temperatura *inlet*) cedia la seva calor latent al líquid, provocant-ne l'evaporació. La deshidratació era immediata ja que com que el producte estava nebulitzat la superfície de contacte aire calent - líquid era molt gran. Una sonda mesurava la temperatura de l'aire a la sortida de la cambra de deshidratació (temperatura *outlet*), que era d'uns 80°C. Hauria disminuït respecte a la temperatura *inlet* perquè bona part de l'energia aportada s'absorbeix en el procés de canvi d'estat de l'aigua (calor latent de vaporització). En l'assecamment per atomització s'assumeix que la partícula deshidratada no està mai exposada a temperatures superiors a la de sortida de l'aire calent, ja que només la calor sensible

contribueix al seu escalfament. L'aire formava un corrent que transportava les partícules cap al cicló separador, on l'aire humit pujava i se separava de les partícules deshidratades que queien en el col·lector.

La deshidratació de 2 litres de solució d'albumina durava unes 3 hores, i se n'obtenien uns 60 grams de pols. El producte es guardava a la nevera en pots de plàstic fins el moment de la seva utilització (cada producció per separat).

3.3. Determinacions físico-químiques

Aquestes analítiques es feien a les mostres guardades de plasma, albumina, albumina concentrada dessalada i albumina deshidratada.

3.3.1. Conductivitat

La conductivitat elèctrica d'un líquid està relacionada amb la seva concentració de sals, que al dissoldre's generen ions que condueixen l'electricitat. La mesura de la conductivitat es feia amb un conductímetre Crison GLP 31, que indicava un valor referenciat a 25 °C. Per cada mostra es feien dues lectures.

Es va mesurar la conductivitat del plasma inicial, de la solució d'albumina obtinguda per salting out, de l'albumina després de la concentració i de vàries mostres de retentat durant la diafiltració, per tal de fer un seguiment del procés de dessalat.

3.3.2. Humitat / extracte sec

S'utilitzaven càpsules de vidre on s'hi afegien uns 2 mL o 2 grams de mostra. Les càpsules utilitzades s'havien de posar a l'estufa i refredar-les al dessecador abans de la seva utilització, d'aquesta manera s'assegurava que no contenien humitat. Es pesava amb una balança analítica (P>Selecta) amb precisió de 0,1 mg i s'anotava el pes de la càpsula i el pes de la càpsula amb mostra. Tot seguit es posava a l'estufa de dessecació a $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durant 24 hores per tal que les mostres perdessin tota la

humitat. Es treien les càpsules de l'estufa, es posaven al dessecador i quan estaven a temperatura ambient es pesaven. Primer es calculava la humitat per diferència de pes entre la mostra inicial i la mostra seca, el percentatge restant era l'extracte sec. Per cada mostra es feien dues repeticions de la humitat amb càpsules de vidre i tres repeticions amb gresols de porcellana amb els que es faria també l'anàlisi del contingut de cendres.

3.3.3. Contingut en sals minerals (cendres)

Els gresols de porcellana amb la mostra ja deshidratada es posaven a la mufla (Naber industrieofenbau, Bremen), 1 hora a 150°C i 4 hores més a 550°C. A aquesta temperatura es produïa una combustió de tots els compostos orgànics de la mostra, el residu d'incineració eren les sals minerals. Es treien els gresols de la mufla, es posaven al dessecador i quan estaven a temperatura ambient es pesaven. Per diferències de pes es calculava el percentatge de sals minerals que contenien les mostres. Es feien tres repeticions per cada mostra.

3.3.4. Contingut de proteïna, mètode Kjeldahl (TKN)

El mètode TKN determina la quantitat de proteïna d'una substància a través del seu contingut de nitrogen. En productes carnis es considera que el nitrogen no proteic és mínim i que tot el nitrogen es troba en els aminoàcids de les proteïnes.

Utilitzàvem aquest mètode per valorar la quantitat de proteïna en plasma, albúmina dessalada i albúmina deshidratada. Per l'albúmina no dessalada no es podia utilitzar ja que contenia l'amoni que se li havia afegit durant el *salting out*, nitrogen no proteic que interferiria en la determinació.

Es feien tres repeticions per l'anàlisi de cada mostra. Es pesava aproximadament 1 g de líquid en el cas del plasma i l'albúmina dessalada, i uns 0,1 g d'albúmina en pols. Es posaven dins un tub de digestió i s'hi afegia una pastilla de catalitzador de seleni i 10 mL d'àcid sulfúric. Es digerien les mostres en un digestor (Gerhart KB20, Alemanya) durant 1 hora a 150°C i 2 hores a 370°C fins que les mostres passessin

del color negre al transparent. Durant aquest procés el nitrogen proteic passava a nitrogen amoniacal.

A cada tub de mostra ja digerida se li afegia aigua destil·lada i, un cop freds, unes gotes d'indicador mixt blau de metilè/roig de metil, que en medi àcid dóna coloració lila. Es posava el tub en un destil·lador Kjeldahl (Buchi K314, Alemanya), s'afegia hidròxid sòdic fins que el contingut del tub virava a color verd (medi bàsic) i es bombollejava vapor calent per evaporar l'amoniac i condensar-lo mitjançant un serpentí refrigerant. Es recollien uns 150 mL de destil·lat en un erlenmeyer amb 25 mL d'àcid bòric al 4% i unes gotes d'indicador mixt (figura 3.6).

A continuació es valorava el contingut de l'erlenmeyer amb àcid clorhídric 0,1 N fins a viratge de la mostra de verd a incolor-lila i s'anotava el volum de clorhídric emprat. A partir de la quantitat de mostra utilitzada i l'àcid clorhídric gastat es feia el càlcul del nitrogen total (TKN). El percentatge de nitrogen es convertia en percentatge de proteïna multiplicant per un factor de 6,25.

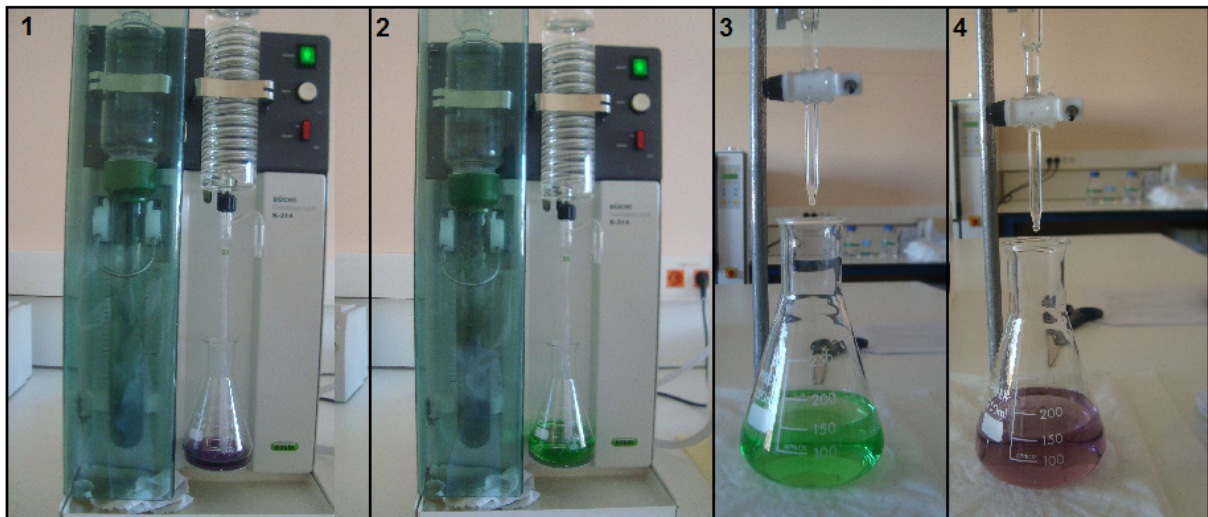


Figura 3.6. Processos de destil·lació i valoració. **1.** Destil·lador Kjeldahl (Buchi K314, Alemanya), abans de la destil·lació. **2.** Després de la destil·lació. **3.** Erlenmeyer abans de la valoració (medi bàsic). **4.** Erlenmeyer valorat amb HCl (medi àcid).

3.4. Electroforesi (SDS-PAGE)

L'electroforesi es va fer amb les mostres d'albúmina concentrada de les 3 produccions i amb una mostra de plasma, per comparar el perfil proteic i verificar l'eficàcia del procés de fraccionament. Es diluïa la solució de proteïnes en qüestió fins a una concentració aproximada de 10 mg/mL, i se n'afegia 1 mL en un tub d'assaig. En el tub també s'hi afegien 4 mL de tampó a pH 8, preparat amb 100 mL d'aigua destil·lada, 0,1223 g de TRIS i 0,0376 g d'EDTA., 50 µL de β-mercaptoetanol i 0,025 g de SDS. A continuació els tubs s'escalfaven a 100°C durant 5 minuts i s'hi afegien unes gotes de blau de bromofenol.

Per la separació electroforètica es van utilitzar gels homogenis de poliacrilamida de baixa densitat al 12,5% (Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia). Es va utilitzar un marcador de pes molecular entre 20 i 220 kDa (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen, Carlsbad, EUA). Als dos elèctrodes s'hi col·locaven gels tampó d'agarosa (Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia).

La separació electroforètica es va fer amb un Equip Phastsystem (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suècia, figura 3.7) i amb les següents condicions de treball:

- Preelectroforesi: 500 V – 10 mA – 3 W. A 15°C, 1 Vh.
- Aplicació: 500 V – 1 mA – 3 W. A 15°C, 1 Vh.
- Separació: 500 V – 10 mA – 3 W. A 15°C, 158 Vh.

Després de separar les proteïnes calia revelar els gels per poder observar com estaven col·locades:

- Colorant: rentatge de 8 minuts a 50°C. Solució de metanol (Scharlau, Scharlab, S.L., Sentmenat) 30%, àcid acètic (Scharlau, Scharlab, S.L., Sentmenat) 10%, aigua destil·lada 60% i blau de comassie 0,1% (una pastilla, GE Healthcare, Suïssa).

- Destintatge: tres rentatges de 5, 10 i 8 minuts a 50°C. Solució de metanol 30%, àcid acètic 10% i aigua destil·lada al 60%.
- Conservant: rentatge de 5 minuts a 50°C. Solució de glicerol (Poch, S.A., Polònia) 10%, àcid acètic 10% i aigua destil·lada al 80%.



Figura 3.7. A l'esquerra equip de separació electroforètica, i a la dreta equip de revelat de gels PhastSystem (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suècia).

Un cop acabat el procés es podia interpretar quines proteïnes contenia cada mostra segons la distància que havien recorregut, tenint com a referència els marcadors de pes molecular.

3.5. Propietats funcionals

Una vegada obtinguda i caracteritzada físico-químicament l'albumina en pols, es passava a determinar-ne les propietats funcionals per valorar-ne la possibilitat de ser utilitzada com a ingredient alimentari.

3.5.1. Capacitat emulsionant

Consistia en la valoració de la capacitat de l'albumina per establir una emulsió d'oli en aigua (o/w). També es va determinar la capacitat emulsionant de plasma i de caseïnat per utilitzar-los com a referència.

Es va utilitzar un mètode turbidimètric basat en la tècnica de Pearce i Kinsella (1978) amb algunes modificacions de Parés i Ledward (2001). Es va determinar l'activitat emulsionant i l'estabilitat de les emulsions a pH 5,5 i pH 7.

Es preparaven solucions de 500 mL al 0,5% de proteïna (p/v) amb aigua destil·lada, una a pH 5,5 i una altra a pH 7 (s'ajustava el pH amb NaOH). Amb cadascuna de les solucions es preparaven 3 emulsions amb 50mL d'oli de blat de moro comercial (Koipe) i 150 mL de la solució proteica.

S'obtenia l'emulsió mitjançant un homogeneïtzador de vàlvula a alta pressió (MFC MicrofluidizerTM Series 5000, Microfluidics Corporation, Newton, MA, USA) (figura 3.8), fent passar la barreja a un cabal de 40 L/hora durant 1,5 minuts a 120 bars (que equivalia a 5 passades per la vàlvula d'homogeneïtzació).



Figura 3.8. Homogeneïtzador de vàlvula a alta pressió, MFC MicrofluidizerTM Series 5000, Microfluidics Corporation, Newton, MA, EUA.

Es rebutjaven les 10 primeres bombejades després de la incorporació d'una nova solució de la mateixa mostra. Es rentava l'homogeneïtzador amb aigua entre diferents emulsions de diferents mostres.

El producte homogeneïtzat es recollia en un vas de precipitats i immediatament s'afegien 20 µL de l'emulsió amb una micropipeta automàtica a dues ampolles (duplicats) amb 50 mL d' SDS 0,1% (temps 0). Es mantenia l'emulsió en repòs i al cap de 10 minuts es tornaven a afegir 20 µL de l'emulsió en dues ampolles amb SDS.

Les ampolles que contenien les emulsions diluïdes s'invertien 5 vegades i se'n determinava la terbolesa a 500 nm en un espectrofotòmetre Cecil CE 7400, aquarius 7000 (Cambridge, Anglaterra). S'utilitzava com a blanc la solució d' SDS 0,1%. A partir dels resultats d'absorbància donats per l'aparell es determinava l'índex d'activitat emulsionant (EAI) i l'índex d'estabilitat de l'emulsió (ESI) a cada pH i a cada temps.

L'**Índex d'Activitat Emulsionant (EAI)** s'expressava com unitats d'àrea interfasial estabilitzada per unitat de pes de proteïna (m²/g), a partir de la fórmula següent:

$$EAI = 2 \cdot T / \Phi \cdot C$$

on: T = terbolesa

Φ = fracció volumètrica de la fase dispersada

C = pes de proteïna per unitat de volum de fase aquosa abans d'emulsionar.

En el nostre cas es van utilitzar directament les mesures d'absorbància considerant que la densitat òptica de l'emulsió diluïda està directament relacionada amb l'àrea interfasial (Pearce i Kinsella, 1978).

També es feia el càlcul de l'**Índex d'Estabilitat de l'Emulsió (ESI)**, que correspon a l'estabilitat de l'àrea interfasial de l'emulsió en el temps (és adimensional):

$$ESI = T \cdot \Delta t / \Delta T$$

on: T = terbolesa

Δt = interval de temps

ΔT = variació de la terbolesa

3.5.2. Capacitat gelificant

Per formar el gel es preparaven 50 mL d'albumina reconstruïda al 10% de proteïna a pH 7,4. S'introduïa la solució dins d'un tros de tripa sintètica (Wieine-pak[®] 2350/84, Teepak LLC, Bèlgica) d'uns 25 cm de llargada, lligada per un extrem. Es lligava l'altre extrem de manera que no hi quedés aire a dins. Es submergia en un bany a 80°C durant 45 minuts i passat aquest temps es refredava amb aigua freda i es mantenia a la nevera fins l'endemà.

3.5.2.1. Anàlisi de la capacitat de retenció d'aigua (CRA)

S'utilitzava una tècnica que combinava filtració i centrifugació en la que s'analitzava la quantitat d'aigua despresada per el gel.

Es tallava un tros de gel de 14 mm d'alçada i amb un trepà s'extreïa una peça de la part central del gel de 8 mm de diàmetre. Es col·locava a l'interior d'un cilindre de PVC amb una malla de polièster amb porus de 100 µm, prèviament tarat, i s'anotava el pes de la mostra de gel. Els cilindres de PVC es col·locaven a dins de tubs de centrífuga de 50 mL, calia tenir anotat el pes dels tubs buits amb tap. Tot seguit s'introduïen els tubs dins la centrífuga (Sorvall RC Plus) amb adaptadors, i se centrifugava a 4.000 g, 10 minuts a 15°C. Posteriorment es pesava el tub de centrífuga amb tap amb l'aigua alliberada. A partir d'aquí es calculava el pes d'aigua alliberada per pes de gel. Per cada mostra es formaven dos gels, i per cada gel es realitzava la determinació per duplicat.

3.5.2.2. Anàlisi del perfil de textura dels gels (TPA)

En aquesta anàlisi es determinaven diversos paràmetres relacionats amb la textura a partir de la compressió d'un tros del gel.

Es tallaven cilindres del gel de 24 mm de diàmetre x 14 mm d'alçada. S'utilitzava un texturòmetre Texture Expert Model TA.XT2 (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, EUA) amb una sonda cilíndrica d'alumini de 50 mm de diàmetre (P50) (figura 3.9). En cada lectura es comprimia la mostra dues vegades fins que s'assolia una

deformació del 30% de l'altura. La taxa de compressió uniaxial va ser d'1 mm/segon. Les condicions de l'anàlisi van ser: 25 kg de cel·la de càrrega, una velocitat pre-assaig d'1 mm/segon, velocitat assaig d'1 mm/segon i una velocitat post-assaig de 10 mm/segon. El temps d'espera entre els 2 cicles de compressió-descompressió va ser de 2 segons. Per cada mostra es formaven dos gels, i per cada gel es realitzava la determinació de la textura per duplicat.

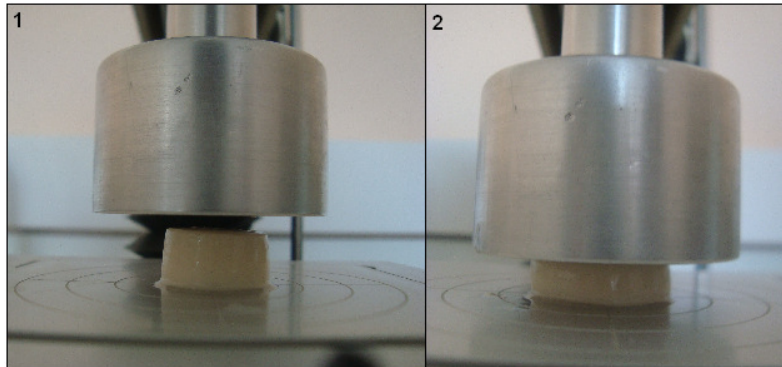


Figura 3.9. Fases de l'anàlisi de perfil de textura amb sonda P50. **1.** Gel d'albúmina abans de sotmetre's a la compressió. **2.** Tros de gel durant la compressió.

A partir de les corbes obtingudes en les anàlisis (figura 3.10) es van calcular els paràmetres de textura.

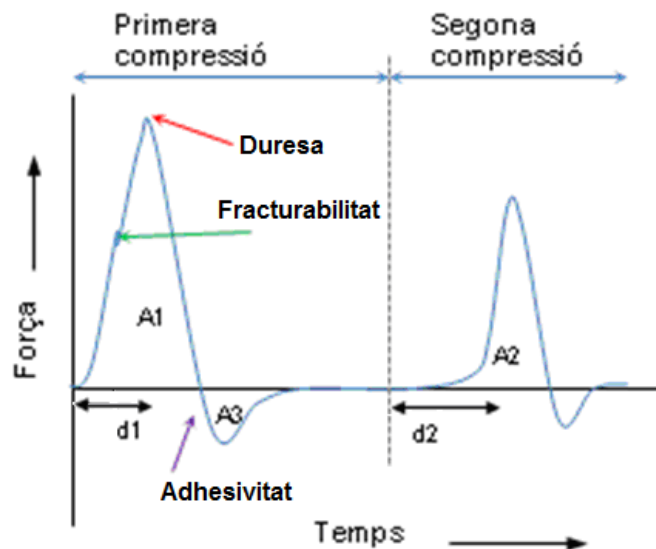


Figura 3.10. Gràfic força-temps d'una anàlisi de perfil de textura (TPA) obtingut amb el texturòmetre TA-XT2 (adaptat de Martínez *et al.*, 2004).

Els paràmetres mesurats d'acord amb la metodologia descrita per Bourne (1978) van ser:

- Duresa: Força màxima assolida durant el primer cicle de compressió. S'expressa en Newtons.
- Adhesivitat: Valor de l'àrea negativa (A3) que apareix després de la primera compressió; fa referència al treball necessari per retirar l'aliment de la superfície. És adimensional.
- Cohesivitat: Grau d'adhesió de les partícules de la mostra. Es calcula dividint l'àrea de treball en la segona compressió (A2) pel treball realitzat durant la primera compressió (A1). És adimensional.
- Elasticitat: Capacitat que té la mostra de tornar a la seva forma original després de la primera compressió. Es mesura dividint la distància des del començament de la segona compressió fins el seu pic de força màxima (d2) per la distància des del començament de la primera compressió fins el seu pic de força màxima (d1); S'expressa en mm.
- Masticabilitat: És el producte de l'elasticitat i la gomositat (duresa x cohesivitat). S'expressa en N x mm.

3.5.3. Capacitat escumant

En aquesta anàlisi es determinava la capacitat de la proteïna de formar escumes i la seva estabilitat.

L'escuma es formava a partir de 200 mL d'una solució d'albúmina al 0,5% ajustada a pH 7,4. S'abocava la solució en un vas de precipitats d'1 L i s'agitava durant 10 minuts amb una batedora Multimix M700 (Braun) a la velocitat màxima. Durant aquest temps el vas estava col·locat sobre un plat giratori per tal d'obtenir una escuma més homogènia. Per mesurar la quantitat d'escuma produïda, immediatament després de l'agitació es feia una marca de l'alçada d'escuma, i 2 minuts després s'anotava l'alçada del líquid que havia drenat. Sabent el volum d'escuma produïda es mesurava la capacitat escumant.

L'estabilitat de l'escuma es va determinar mesurant la seva cinètica de desaparició. Es dipositava una cullerada sopera d'escuma sobre un colador prèviament tarat, i

s'annotava el pes del colador i el de l'escuma cada 10 minuts durant una hora, procurant que no quedessin gotes en el colador. Aquesta determinació es feia per triplicat. S'expressava el percentatge en pes d'escuma que quedava després d'1 hora respecte el pes d'escuma inicial. També es representava gràficament la variació en el percentatge d'escuma al llarg del temps.

3.6. Aplicació de l'albúmina en magdalenes

Es van fer 3 produccions de magdalenes amb els ingredients convencionals (control), i 3 produccions substituint la clara d'ou deshidratada per albúmina. Per tal de minimitzar qualsevol factor de variació no relacionat amb el canvi d'ingredient, es procurava que totes les produccions es fessin en les mateixes condicions. Per aquesta raó es van fer les 6 produccions el mateix dia i alternant una fabricació de magdalenes control i una fabricació de magdalenes d'albúmina (taula 3.1).

Taula 3.1. Ingredients utilitzats en la fabricació de magdalenes control i albúmina (quantitats en grams).

Ingredient	Control	Albúmina
Sucre (Azucarera)	84,7	84,7
Llet desnatada pols (Induxtra)	8,5	8,5
Clara d'ou deshidratada (Induxtra)	12,7	0
Albúmina	0	11
Aigua	76,2	77,9
Margarina (Tulipán)	101,7	101,7
Sal (sal fina Costa)	1,3	1,3
Vainillina (aromatitzant artificial Vahiné)	0,8	0,8
Aroma de llimona (Vahiné)	1 mL	1 mL
Farina de blat (Nutrexpa)	84,7	84,7
Llevat químic (Royal)	4,2	4,2

A la taula 3.1 hi apareixen amb blau els ingredients que varien entre la producció control i l'albúmina. Com es pot observar la clara d'ou deshidratada se substitueix

per albúmina però en menys quantitat i una mica d'aigua. La quantitat dels dos ingredients s'ha calculat de manera que les dues produccions tinguessin la mateixa concentració en proteïnes.

La fabricació de les magdalenes es va fer amb un robot de cuina (Thermomix TM-31 (Vorwerk, Wuppertal, Alemanya). En primer lloc s'hi posava el sucre i es batia a velocitats 5, 7 i 9 durant 10 segons cada una. A continuació s'hi afegia l'estri proveït per pastar masses (papallona) i es posava l'aparell a 37°C. S'hi afegia la llet en pols, l'aigua i la clara d'ou deshidratada o l'albúmina, segons el cas, i es batia tot durant 3 minuts a velocitat 3. Tot seguit s'hi incorporava la margarina i es batia durant 40 segons a velocitat 2. Es parava el batut cada 10 segons per incorporar la margarina manualment. Per acabar s'hi addicionava sal, vainilla, aroma de llimona i la farina, que s'afegia de mica en mica i es barrejava manualment perquè quedés tot ben incorporat. Per últim s'hi afegia el llevat i amb la papallona es batia durant 10 segons a velocitat 2.

De cada producció en sortien 374 g de pasta per magdalenes. Amb una cullera s'emmotllaven uns 25 g de pasta en motlles de paper de 3,5 cm de diàmetre intern i 2 cm d'alçada i s'enfornaven per separat primer 6 magdalenes i després 6 més (figura 3.11). L'enfornat es feia amb una safata d'alumini centrada en el forn sobre una base de reixa a una altura mitjana. Es feia la cocció durant 17 minuts en un forn Moulinex B200 prèviament escalfat a 200°C.



Figura 3.11. Pasta de magdalena emmotllada abans de la cocció (esquerra) i magdalena cuïta (dreta).

Les magdalenes es guardaven en recipients tancats hermèticament. El dia següent es feia l'anàlisi del perfil de textura de les magdalenes de la primera fornada, i les magdalenes de la segona fornada es picaven i se'n feien les determinacions analítiques d'extracte sec, cendres i proteïnes, tal com es descriu en els apartats 3.3.2, 3.3.3 i 3.3.4, respectivament, i el contingut en greix.

3.6.1. Contingut en greix

Primerament s'hidrolitzaven les mostres amb àcid clorhídric diluït, es filtraven i, de la massa seca resultant, s'extreia el greix amb èter, s'evaporava el solvent i es determinava el contingut en greix de la mostra a partir del pes del residu.

Es pesaven uns 10 grams de mostra dins d'un erlenmeyer de 250 mL i s'hi afegien 100 mL d'HCl 3N. S'hi afegien unes perles de vidre i es feia bullir durant 1 hora tapat amb un vidre de rellotge. De tant en tant calia agitar. Un cop fred es filtrava el contingut de l'erlenmeyer amb paper de filtre prèviament humitejat. Es netejava el precipitat retingut en el filtre amb aigua destil·lada fins que el filtrat donés reacció neutra sobre paper indicador.

Es posava el filtre en un vas de precipitats i s'assecava a l'estufa durant 1 nit. Un cop el filtre sec, s'introduïa en un cartutx, que es col·locava dins d'un extractor Soxhlet i es cobria amb èter dietílic. L'extractor s'encaixava en un baló prèviament tarat i es posava en un bany a 40°C. L'extractor estava connectat per la part superior amb un serpentí refrigerant que condensava l'èter evaporat i en feia caure les gotes sobre el cartutx. Quan l'extractor estava prou ple sifonava i es buidava. L'èter i el greix dissolt anaven a parar al baló (figura 3.12).

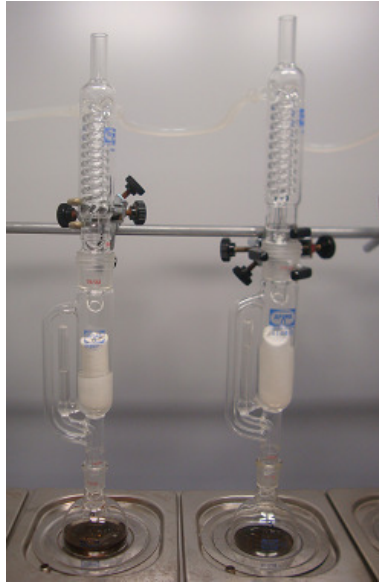


Figura 3.12. Procés d'extracció del greix amb extractors Soxhlet.

Després de 6 hores sifonant es deixava evaporar l'èter que quedés en el baló i s'assecava el residu a l'estufa. Finalment es pesava el baló i es determinava gravimètricament el contingut en greix de la mostra. Les anàlisis es van fer per duplicat.

3.6.2. Anàlisi del perfil de textura de les magdalenes (TPA)

En aquesta anàlisi es determinaven diversos paràmetres relacionats amb la textura a partir de la compressió d'un tros de magdalena.

Es tallaven cilindres de magdalena de 3,3 cm de diàmetre i 2,5 cm d'alçada, evitant la part exterior. Per cada producció s'utilitzaven 4 de les magdalenes obtingudes en la primera fornada.

S'utilitzava un texturòmetre Texture Expert Model TA.XT2 (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, EUA) amb una sonda cilíndrica d'alumini de 50 mm de diàmetre (P50). En cada lectura es comprimia la mostra dues vegades fins que s'assolia una deformació del 30% de l'altura. Les condicions de l'anàlisi van ser: 25 kg de cel·la de càrrega, una velocitat pre-assaig d'2 mm/segon, velocitat assaig d'1 mm/segon i una velocitat post-assaig de 2 mm/segon. El temps d'espera entre els 2 cicles de compressió-descompressió va ser de 4 segons.

Es va mesurar la duresa, l'elasticitat, la cohesivitat i la masticabilitat de les magdalenes, paràmetres ja definits en l'apartat 3.5.2.2.

3.6.3. Tractament estadístic dels resultats

Els resultats obtinguts en les anàlisis de les magdalenes es van tractar estadísticament amb el programa SPSS versió 17.0. Es comprovava la homogeneïtat de les variàncies amb el test de Levene, i es determinava l'efecte de cada tractament (control o albúmina) amb el test de t de Student. Es van considerar significatius els valors de probabilitat inferiors a 0,05.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Obtenció de l'albumina concentrada

Després de la separació del fibrinogen i les globulines del plasma per *salting out*, el producte resultant era seroalbumina diluïda i amb un elevat contingut en sals a causa de l'addició de sulfat amònic. Per això, a continuació es concentrava i es dessalava el producte per ultrafiltració i diafiltració.

Durant els processos de separació per membranes es duia a terme un control del volum de permeat recuperat i de la taxa de permeació de la membrana.

4.1.1. Concentració

En la figura 4.1 s'hi representa el volum de permeat recuperat durant la concentració de l'albumina. Es van requerir entre 85 i 105 minuts per extreure 5 L de permeat a partir dels 7 L d'albumina inicials (factor de concentració volumètric, FCV = 3,5). Es va partir de mostres refrigerades amb una temperatura inicial d'entre 8 i 10°C, que durant l'etapa de concentració van experimentar un increment d'uns 10°C.

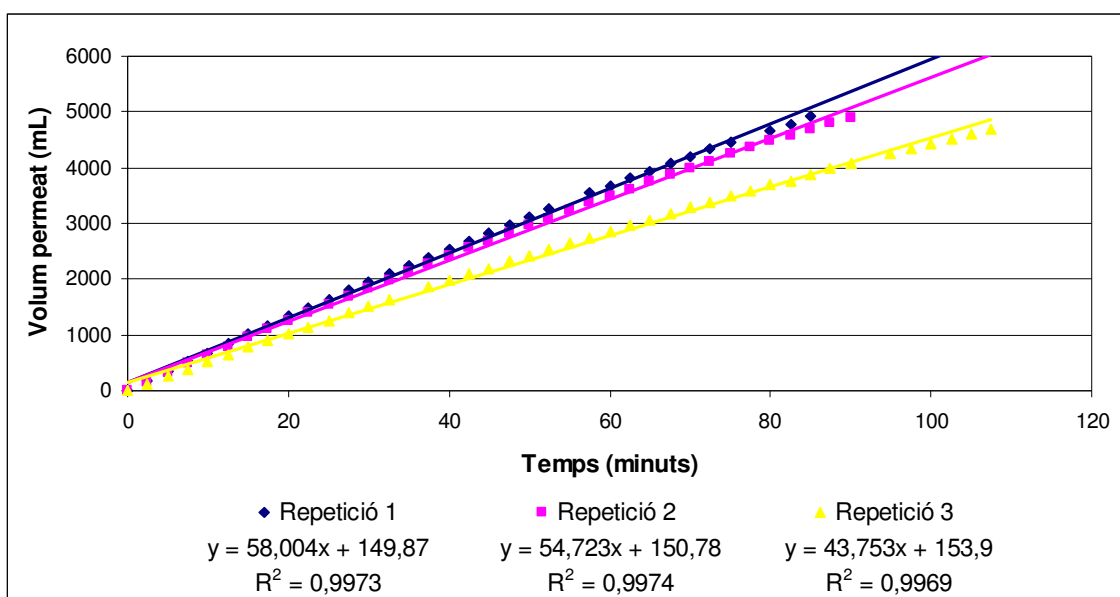


Figura 4.1. Volum de permeat obtingut en les tres repeticions dels processos de concentració de l'albumina. Volum inicial de mostra = 7 L, FCV = 3,5.

En el gràfic i les equacions obtingudes a partir dels ajustaments per regressió lineal, s'observa que en les tres repeticions les dades s'ajusten prou bé a un comportament lineal. El flux de permeació mitjà varia entre 43,7 i 58,0 mL/min. El flux de permeació anava disminuint lleugerament en cada repetició, això feia que cada vegada es necessités més temps per obtenir els 5 L de permeat. Això és degut a que la membrana no s'havia utilitzat mai, i les característiques de permeabilitat s'estabilitzen al cap d'un temps d'utilització. Per tant, quan la membrana és nova es pot observar una variabilitat més alta en el seu flux de permeació.

A partir del volum de permeat recollit i tenint en compte que la superfície filtrant de la membrana era de $0,32 \text{ m}^2$, es calculava la taxa de permeació cada 2,5 minuts (figura 4.2).

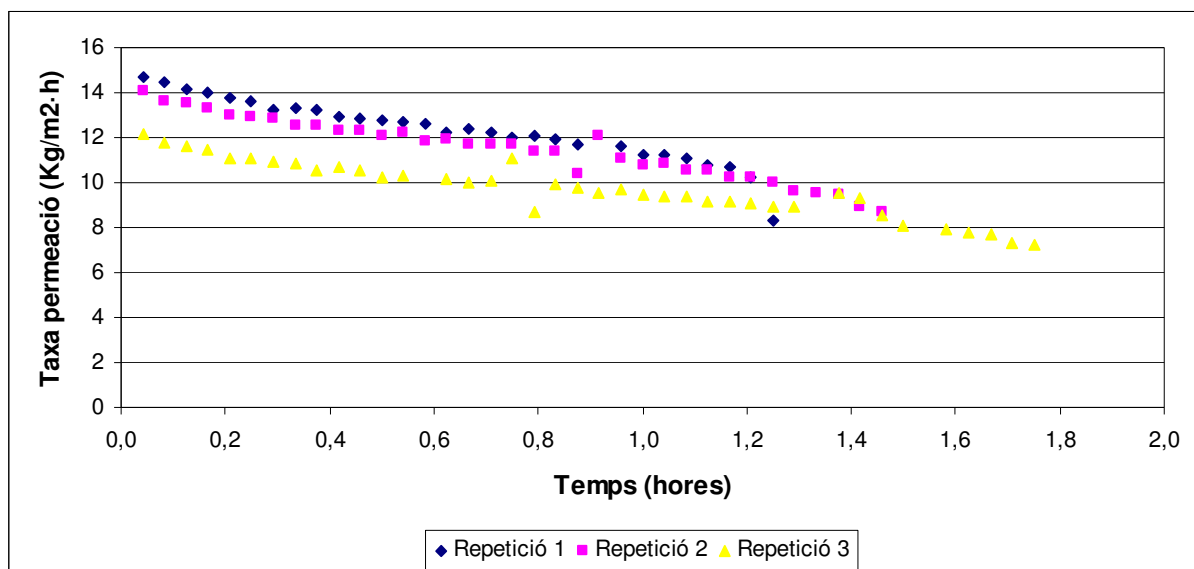


Figura 4.2. Taxa de permeació dels tres processos de concentració de l'albumina. Volum inicial de mostra = 7 L, FCV = 3,5.

Es pot apreciar que es produeix una reducció gradual del flux de permeació al llarg del procés de concentració de l'albumina. El flux inicial està entre 12,1 i 14,7 Kg/m²·h, i disminueix fins a arribar a valors entre 7,3 i 8,7 Kg/m²·h.

Aquesta desviació és deguda a l'increment de la concentració de macromolècules en el retentat a mesura que es va retirant el permeat, això suposa un embrutiment progressiu de la membrana, ja que les molècules que no poden passar a través

d'ella hi queden retingudes i s'acumulen a la seva superfície, dificultant el pas del permeat a través seu.

4.1.2. Dessalat

En la figura 4.3 es mostra el volum de permeat recollit durant la diafiltració de l'albumina. Es va requerir un temps aproximat d'entre 52 i 60 minuts per completar el dessalat. En començar la diafiltració la temperatura de les mostres era d'uns 20°C, i en les tres repeticions va experimentar una baixada d'entre 2 i 5°C degut a l'addició d'aigua destil·lada, que estava més freda.

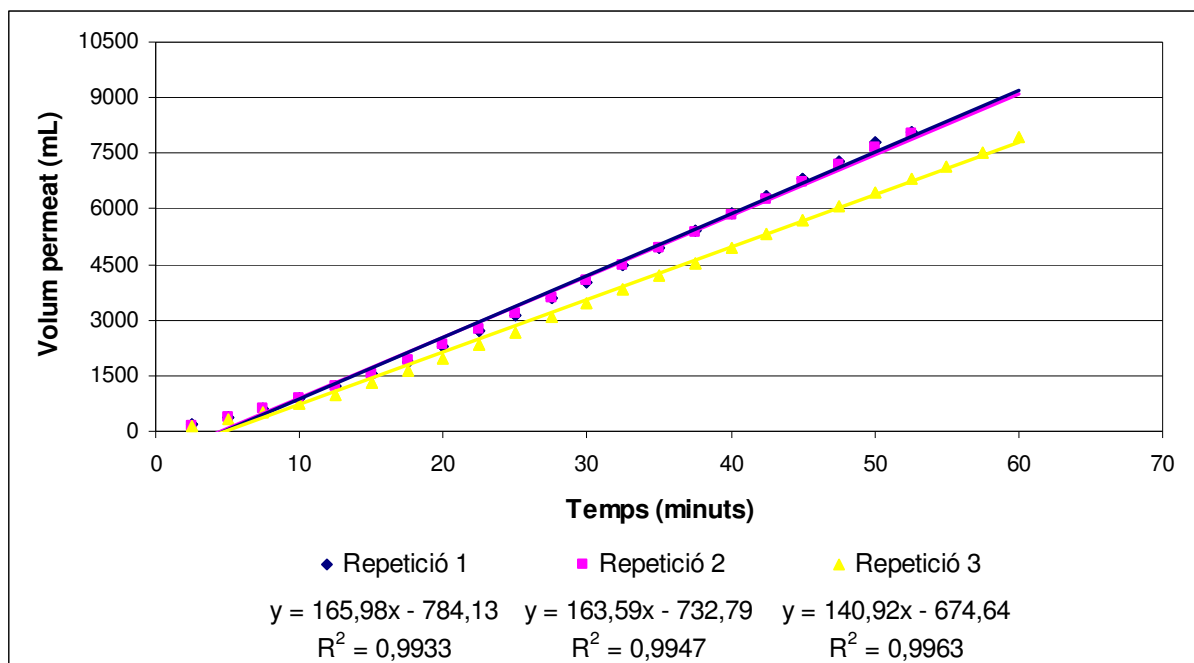


Figura 4.3. Volum de permeat obtingut en les tres repeticions dels processos de dessalat de l'albumina. Volum de mostra= 2L, volum d'aigua de diafiltració = 9 L.

Tal com es pot veure en la figura 4.3 el volum de permeat obtingut en la primera i la segona repetició són molt semblants, mentre que en la tercera repetició és inferior. Com s'ha dit abans, això és degut a la modificació de les característiques de permeabilitat de la membrana quan s'utilitza per primera vegada. El flux de permeació mitjà varia entre 140,9 i 165,9 mL/min.

La taxa de permeació de la membrana es representa a la figura 4.4.

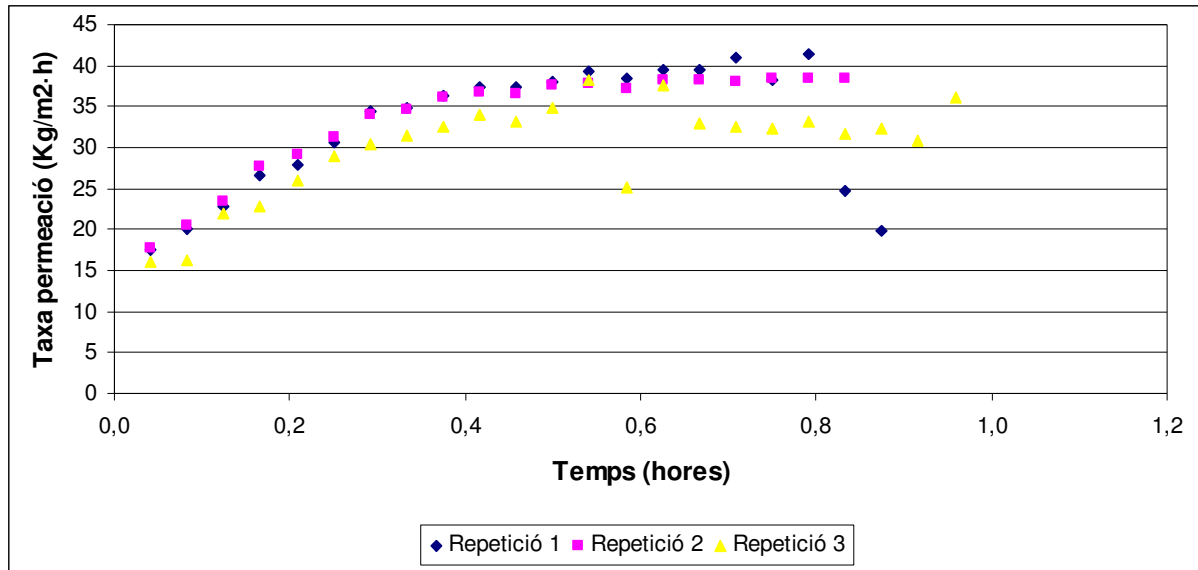


Figura 4.4. Taxa de permeació dels tres processos de dessalats de l'albumina. Volum de mostra = 2 L, volum d'aigua de diafiltració = 9 L.

En la figura 4.4 podem observar que la taxa de permeació durant la diafiltració s'incrementa des de 16 fins a uns 36 o 41 Kg/m²·h, segons la repetició. La taxa de permeació al final del procés va ser superior a la de l'inici ja que cada vegada que s'afegia una alíquota d'aigua destil·lada al dipòsit d'alimentació, disminuïa la concentració en sals del producte. A més, l'aigua afegida probablement ajudava a reduir la capa de macromolècules acumulades a la membrana que s'havia format durant l'etapa de concentració.

Abans de l'addició de cada alíquota d'aigua es feia la lectura de la conductivitat del retentat (figura 4.5).

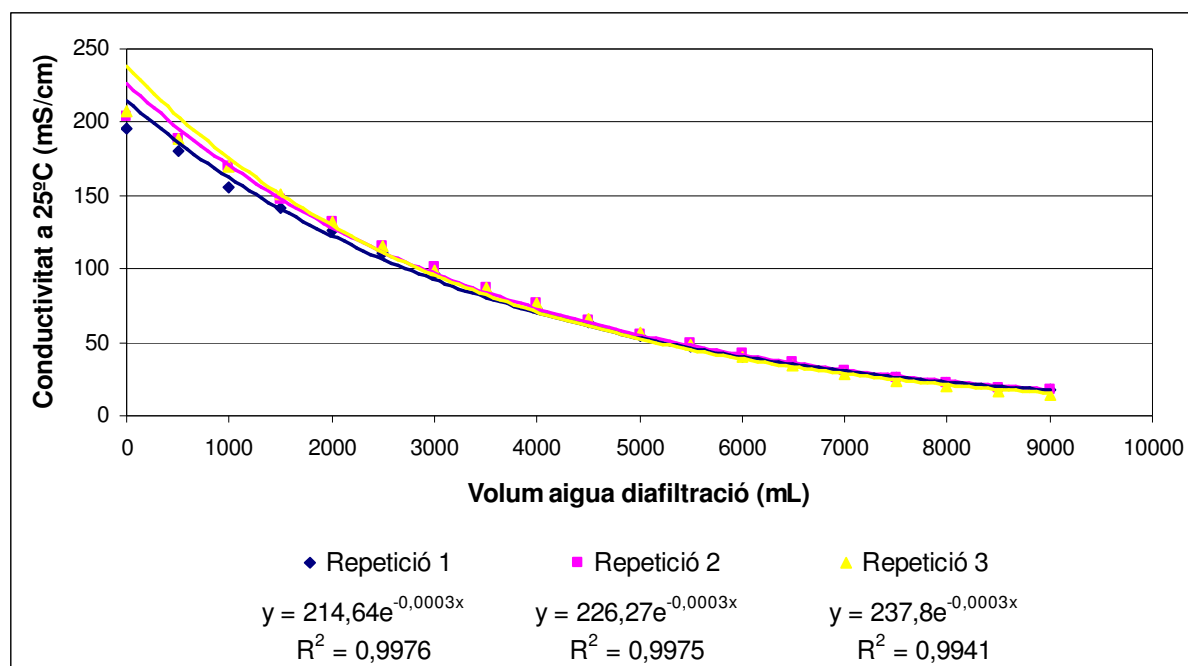


Figura 4.5. Reducció de la conductivitat de la mostra en funció del volum d'aigua afegida al tanc d'alimentació en tres repeticions del procés de diafiltració de l'albumina. Volum de mostra = 2 L, volum d'aigua diafiltració = 9 L.

A l'inici de la concentració (just després del *salting out*) es partia de mostres amb una conductivitat de $239,50 \pm 0,40$ mS/cm. Al final del procés, és a dir, després de concentrar i dessalar afegint 9 L d'aigua destil·lada i retirar el mateix volum de permeat, la conductivitat de l'albumina va ser de $16,39 \pm 1,79$ mS/cm. Com veiem en la figura 4.5 la reducció de sals en les mostres durant el procés de diafiltració segueix una cinètica exponencial, de manera que la reducció de conductivitat assolida amb cada fracció d'aigua afegida és menor que l'anterior.

4.1.3. Caracterització físico-química

Es van determinar les característiques físico-químiques dels productes que s'obtenien al llarg del procés (taula 4.1).

Taula 4.1. Conductivitat dels productes intermitjos de l'obtenció de l'albumina deshidratada (mitjana \pm desviació estandard).

	Conductivitat (mS/cm)
Plasma	$14,80 \pm 0,16$
Albumina (<i>salting out</i>)	$239,50 \pm 0,40$
Albumina concentrada	$16,39 \pm 1,79$

Les dades de conductivitat permeten comprovar que l'addició de sulfat amònic al producte durant el *salting out* comporta un augment important en la concentració de sal. D'altra banda, l'aigua afegida durant la diafiltració va arrossegar les sals que hi havia a la mostra, provocant la disminució de la conductivitat en un 93%. Tot i que el valor de conductivitat en el producte final és lleugerament superior al del plasma inicial, es va considerar que s'havia assolit l'objectiu del procés de diafiltració.

També es va fer un seguiment dels canvis en la composició del producte al llarg del seu tractament (taula 4.2).

Taula 4.2. Composició dels productes intermitjos de l'obtenció de l'albumina deshidratada (mitjana \pm desviació estàndard).

	Plasma	Albumina (<i>salting out</i>)	Albumina concentrada	Albumina en pols
Humitat (%)	91,13 \pm 0,15	70,23 \pm 0,98	94,83 \pm 0,91	8,18 \pm 1,67
Cendres (%)	1,41 \pm 0,28	0,62 \pm 0,13	0,06 \pm 0,05	0,44 \pm 0,15
Proteïna (%)	7,17 \pm 0,26		5,02 \pm 0,21	93,52 \pm 2,28

A partir d'aquestes dades es poden deduir els canvis que es produïen a la mostra durant els diferents tractaments als que se sotmetia.

Els valors d'humitat del plasma disminueixen després del *salting out*, ja que l'addició de sulfat amònic incorpora sals a la mostra.

A la vegada l'addició de sulfat amònic durant el *salting out* dilueix considerablement la mostra, ja que s'afegeixen 5 L de sulfat amònic a 4 L de mostra. El sulfat amònic afegit es volatiliza durant la calcinació de la mostra, per aquesta raó el percentatge de cendres disminueix.

Després de la concentració i dessalat, tot i l'extracció de 5 L d'aigua, la humitat del producte augmenta degut a la reducció important del contingut en sals. Per la mateixa raó, el percentatge en cendres del producte disminueix, ja que a més del sulfat amònic, que no queda com a cendra, la resta de sals minerals també han travessat els porus de la membrana i ja no es troben en el producte.

L'albumina deshidratada té un percentatge humitat notablement més baix, ja que ha perdut la major part de l'aigua durant la deshidratació. El percentatge de cendres augmenta per la mateixa raó.

En comparar el percentatge de proteïna de les mostres veiem que l'albumina concentrada conté un 5,02% de proteïna mentre que el plasma en té un 7,17%, ja que el plasma conté albumina, globulines i fibrinogen. Després de la deshidratació del producte la concentració de proteïna es veu incrementada notablement.

4.2. Electroforesi (SDS-PAGE)

Es va fer l'anàlisi electroforètica per identificar quines proteïnes estaven presents en el plasma i l'albumina concentrada. En la figura 4.6 es poden veure les bandes que es van obtenir en la separació electroforètica de les tres mostres d'albumina, el plasma i el marcador.

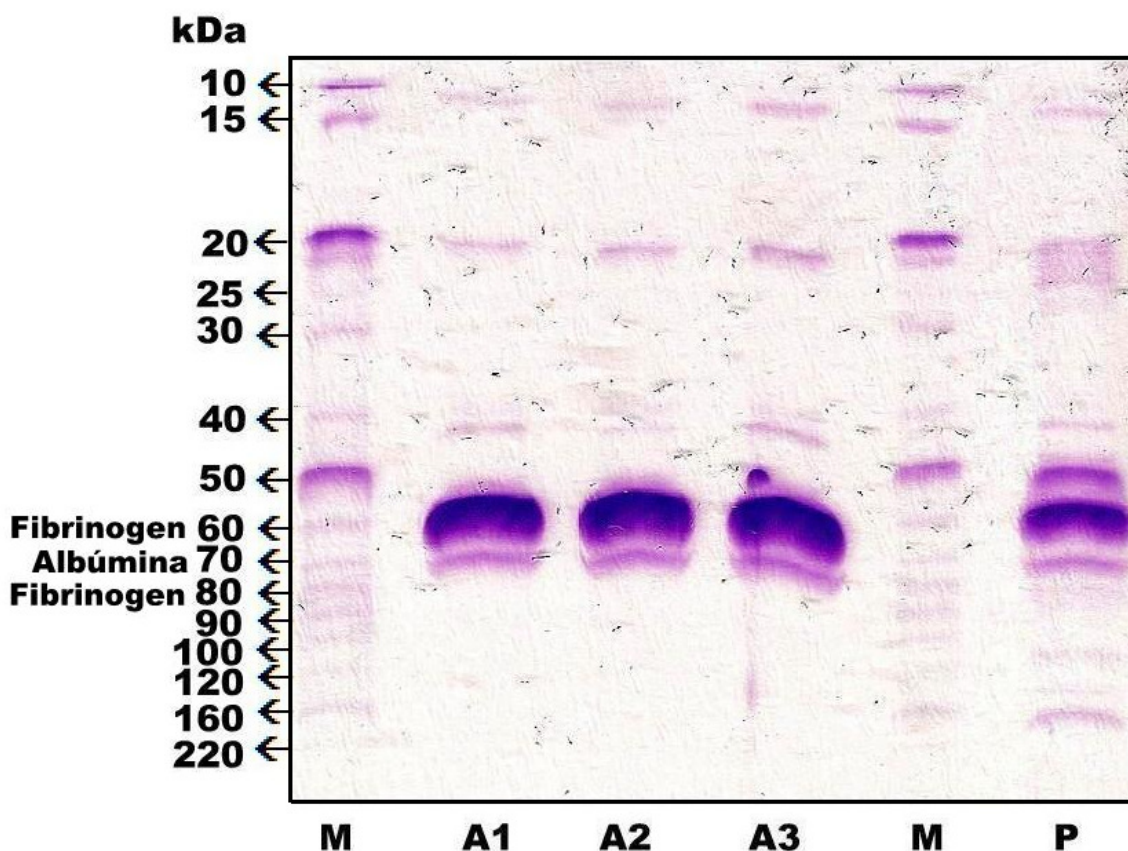


Figura 4.6. Perfils SDS-PAGE de les tres mostres d'albumina concentrada (A1, A2 i A3), plasma (P) i marcador de pes molecular (M).

Tant en l'albumina com en el plasma s'obté una banda molt intensa de pes molecular entre 60 i 70 kDa, corresponent a la seroalbumina, proteïna majoritària del plasma. Es pot veure clarament que l'albumina concentrada té més quantitat d'albumina que el plasma, que conté altres proteïnes.

Les bandes adjacents a la de la seroalbumina que s'observen en el carril del plasma podrien correspondre al fibrinogen. Les 6 cadenes polipeptídiques que formen el fibrinogen se separen ja que la proteïna perd l'estructura quaternària. Amb aquesta tècnica podem veure les diferents cadenes polipeptídiques que constitueixen la seva estructura nativa, de pes molecular entre 50 i 80 kDa.

S'obtenen també una sèrie de bandes de pesos moleculars superiors i inferiors que correspondrien a la resta de proteïnes plasmàtiques, entre elles les del grup de les globulines, que inclouen proteïnes de pesos moleculars molt diversos, des de 5 fins a centenars de kDa, algunes de pes molecular pròxim també al de la seroalbumina. Segons s'observa en la figura 4.8, les globulines de pes molecular elevat no es troben en la mostra d'albumina concentrada, però el procés de fraccionament no ha permès eliminar totes les globulines de pesos moleculars més baixos ja que encara s'hi poden observar algunes bandes.

4.3. Propietats funcionals

4.3.1. Capacitat emulsionant

En la figura 4.7 s'hi representen els índexs d'activitat emulsionant (EAI) de l'albumina en pols comparats amb els EAI de plasma i caseïnat obtinguts per Nievas (2012).

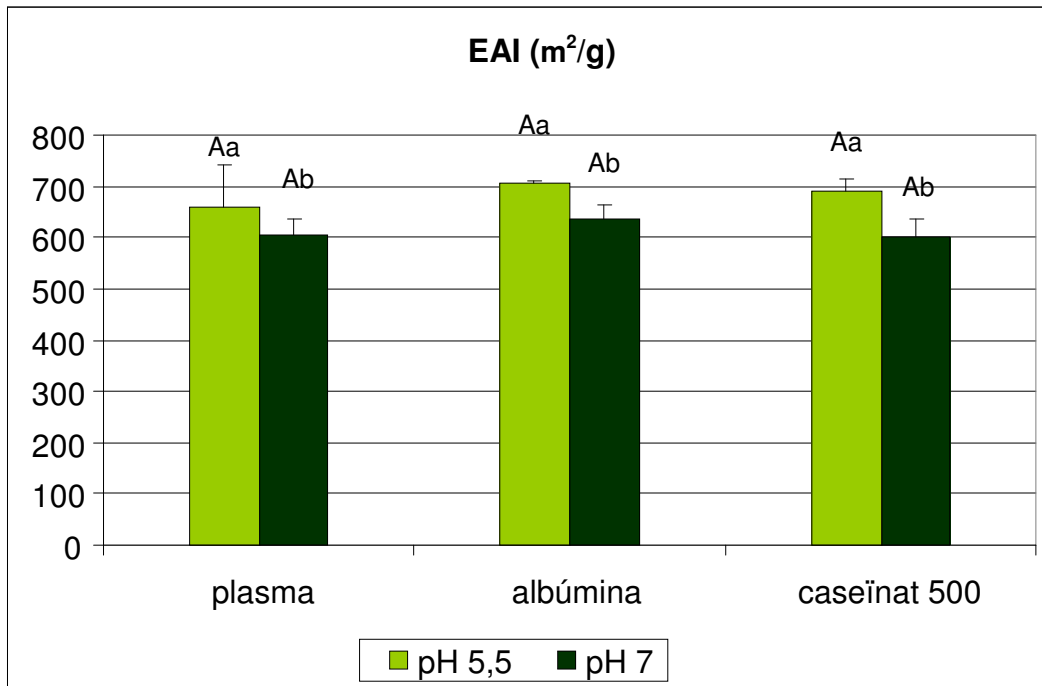


Figura 4.7. Índex d'activitat emulsionant del plasma, albúmina i caseïnat al 0,5% de proteïna a pH 5,5 i 7. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre productes (majúscules) i entre pH (minúscules) segons el test de Tukey ($P < 0,05$).

No hi ha diferències significatives en l'EAI dels tres productes, però sí que n'hi ha respecte als pH. A pH 5,5 l'albúmina presenta la seva màxima activitat emulsionant, que és $70 \text{ m}^2/\text{g}$ superior que a pH 7. Aquests resultats concorden amb els obtinguts per Dávila *et al.* (2007), on l'albúmina a pH 4,5 presentava una activitat emulsionant d'uns $550 \text{ m}^2/\text{g}$, a pH 6 pujava fins a $620 \text{ m}^2/\text{g}$, i a pH 7,5 tornava a baixar fins a uns $530 \text{ m}^2/\text{g}$.

La figura 4.8 representa els índexs d'estabilitat de l'emulsió (ESI) obtinguts amb l'albúmina i es comparen amb els del plasma i caseïnat obtinguts per Nievas (2012).

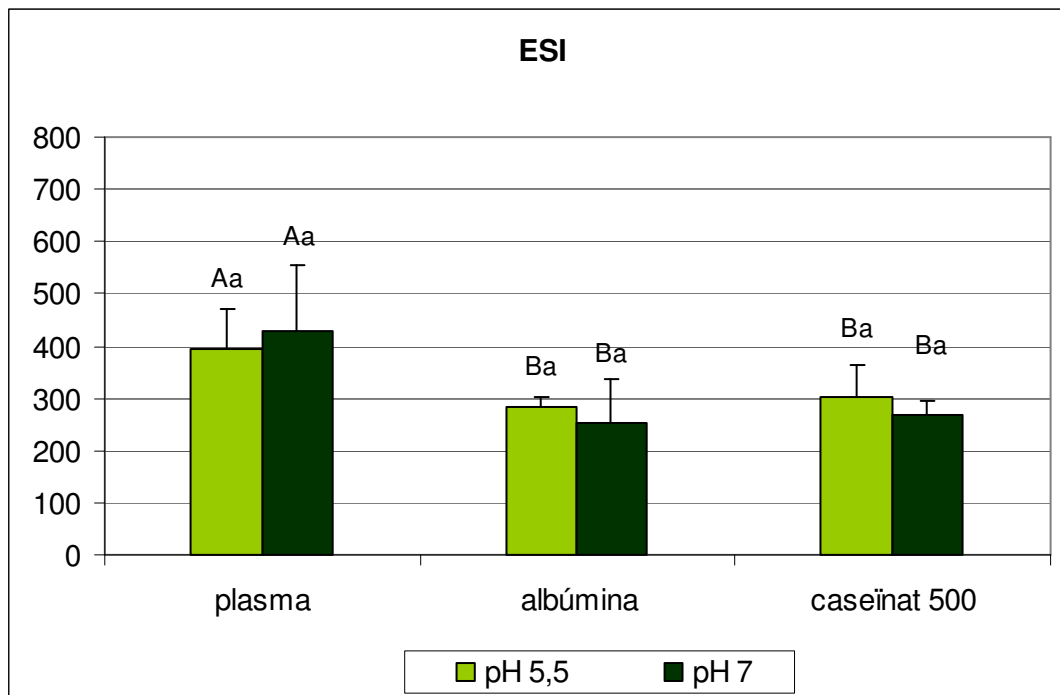


Figura 4.8. Índex d'estabilitat de l'emulsió del plasma, albúmina i caseïnat al 0,5% de proteïna a pH 5,5 i 7. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre productes (majúscules) i entre pH (minúscules) segons el test de Tukey ($P < 0,05$).

Segons els resultats obtinguts, l'estabilitat de l'emulsió de plasma és clarament superior a l'estabilitat de l'albúmina i el caseïnat, que són iguals entre elles. Pel que fa al pH, aquesta vegada no s'han observat diferències. Els valors d'estabilitat obtinguts no coincideixen amb els publicats en l'estudi de Dàvila et al. (2007). Tanmateix, en aquest treball s'avaluava la capacitat emulsionant de solucions de proteïnes plasmàtiques dialitzades i a pH diferents.

4.3.2. Capacitat gelificant

En l'anàlisi de la capacitat gelificant es van elaborar gels al 7% d'albúmina a pH 7,4 que no van resultar prou consistents per poder-ne analitzar la capacitat de retenció d'aigua ni el perfil de textures. Va ser necessària una concentració del 10% de proteïna per aconseguir un gel dur.

4.3.2.1. Anàlisi de la capacitat de retenció d'aigua (CRA)

El resultat obtingut en l'anàlisi de la capacitat de retenció d'aigua dels gels d'albumina al 10% a pH 7,4 va ser de $55,80 \pm 5,58$ % d'aigua alliberada; valor molt superior al del plasma, que allibera un 24,24% d'aigua (Dàvila *et al.*, 2007). Aquesta quantitat suposa una pèrdua de la major part de l'aigua continguda en el gel ja que la capacitat de retenció d'aigua baixa. Segons Dàvila *et al.* (2007) l'albumina és la proteïna del sèrum amb menor capacitat de retenció d'aigua.

4.3.2.2. Anàlisi del perfil de textura dels gels (TPA)

La taula 4.3 mostra els resultats obtinguts en l'anàlisi del perfil de textura dels gels.

Taula 4.3. Paràmetres de textura de gels d'albumina al 10% a pH 7,4 (mitjana \pm desviació estàndard).

Duresa (N)	0,68 \pm 0,11
Adhesivitat	-0,05 \pm 0,01
Cohesivitat	0,52 \pm 0,01
Elasticitat (mm)	5,61 \pm 0,48
Masticabilitat (N·mm)	2,02 \pm 0,48

Aquest gel presenta una duresa molt baixa. Segons Dàvila *et al.* (2007) la duresa dels gels presenta un comportament molt variable depenent de la proteïna utilitzada. Els gels d'albumina són més tous que els gels de globulines, sèrum o plasma a qualsevol pH. Un gel de plasma a la mateixa concentració i pH té una duresa de 2,24 N (Dàvila *et al.*, 2007), mentre que en el d'albumina és de tan sols 0,68 N.

En la utilització d'albumina com a substituta de l'ou en productes de brioixeria, la seva baixa capacitat gelificant podria fer que durant la cocció el producte no agafés una estructura prou dura.

Els valors de cohesivitat i elasticitat són semblants als obtinguts per Dàvila *et al.* (2007), segons el qual aquests dos paràmetres tenen valors força similars en totes les fraccions del plasma.

4.3.3. Capacitat escumant

La capacitat escumant de l'albumina és de $3,55 \pm 0,03$ L escuma/L mostra d'albumina al 0,5% a pH 7,4.

Al cap d'una hora de la formació de l'escuma hi queda el $20,13 \pm 2,29$ % del seu pes inicial en forma d'escuma. L'evolució del pes al llarg de l'hora es representa a la figura 4.9.

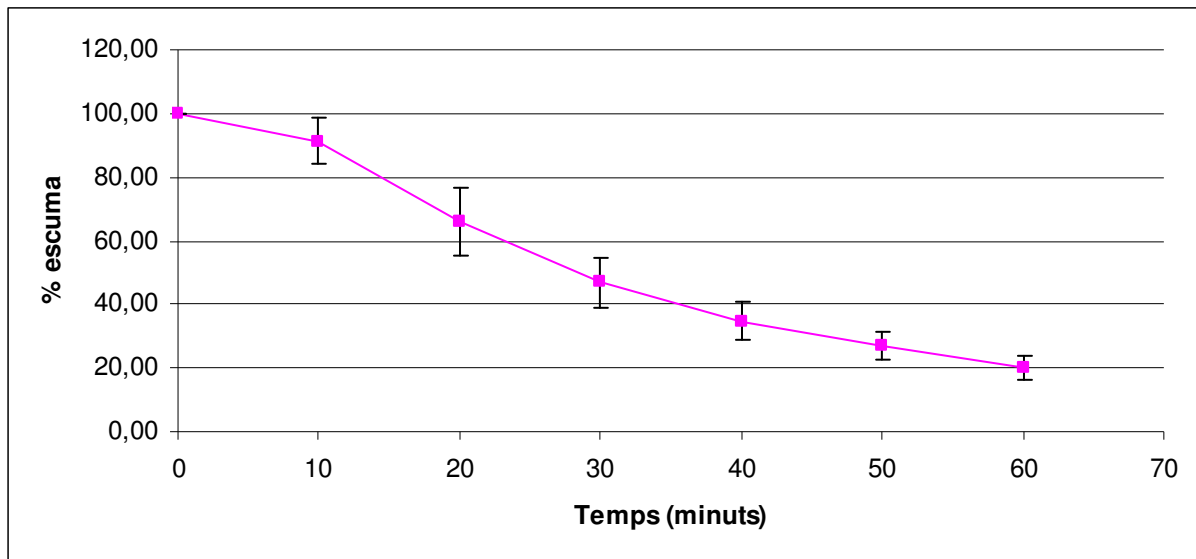


Figura 4.9. Evolució del percentatge d'escuma a pH 7,4. Les barres d'error representen la desviació estàndard.

El gràfic presenta una forma similar a l'obtinguda per Dávila *et al.* (2007) en les mateixes condicions. Durant els primers 10 minuts és quan hi ha més quantitat d'escuma i la pèrdua de pes és inferior, en els minuts següents augmenta la inestabilitat de l'escuma, que es va convertint en aigua a més velocitat, i a partir del minut 40 queda menys escuma i la seva velocitat de desaparició disminueix.

L'albumina té una capacitat escumant elevada. Penteado *et al.* (1979) constaten que l'albumina té una capacitat escumant superior a la de les globulines i el plasma. Aquesta bona capacitat escumant pot facilitar la incorporació d'aire en les masses de brioixeria i per tant donar-los-hi volum durant la cocció. Per tant, la seroalbumina podria ser utilitzada com a substituta de la clara d'ou, ja que fa la mateixa funció.

4.4. Aplicació de l'albúmina en magdalenes

Es va fer la caracterització físico-química i l'anàlisi de la textura de les magdalenes control i albúmina i es van tractar estadísticament els resultats per determinar si per cada paràmetre existien diferències significatives entre els dos tractaments.

4.4.1. Caracterització físico-química de les magdalenes

A la taula 4.4 s'hi representa la composició de les magdalenes obtingudes en els dos tractaments.

Taula 4.4. Composició de les magdalenes control i albúmina. Mitjana \pm desviació estàndard. Superíndexs diferents indiquen diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$).

	Control	Albúmina
Humitat (%)	23,24 ^a \pm 0,59	24,33 ^a \pm 0,64
Cendres (%)	1,61 ^a \pm 0,02	1,52 ^b \pm 0,04
Proteïna (%)	7,04 ^a \pm 0,19	6,91 ^a \pm 0,24
Greix (%)	19,46 ^a \pm 0,10	18,77 ^b \pm 0,52

Estadísticament no hi ha diferències en el contingut d'humitat ni el de proteïnes entre les magdalenes control i albúmina. Això indica que els càlculs que es van fer per tal de normalitzar la formulació dels lots de producció (control i albúmina) en funció de la quantitat de proteïna de cada ingredient van ser correctes. Es va determinar també l'activitat d'aigua dels dos productes i es van obtenir valors $0,830 \pm 0,009$ en les magdalenes control, i de $0,822 \pm 0,005$, en les que contenien seroalbúmina, sense que les diferències siguin estadísticament significatives.

Les magdalenes control tenen una quantitat de cendres significativament superior a la de les magdalenes d'albúmina. L'explicació d'aquesta diferència podria trobar-se en el fet que l'ingredient elaborat per nosaltres contenia un percentatge de cendres molt baix en comparació amb el de l'albúmina d'ou comercial, degut a la reducció de sals durant el procés de diafiltració.

Segons els resultats de l'anàlisi estadística, les magdalenes control contenen més greix que les d'albúmina i presenten una variabilitat més elevada pel que fa a aquest paràmetre. Això podria estar relacionat amb una menor capacitat emulsionant de la seroalbúmina, que dificultaria la retenció de el greix dins de la massa i facilitaria la pèrdua de greix durant la cocció del producte.

4.4.2. Anàlisi del perfil de textura de les magdalenes (TPA)

En l'anàlisi del perfil de textura es van determinar els paràmetres que apareixen a la taula 4.5.

Taula 4.5. Paràmetres calculats en l'anàlisi de perfil de textura de les magdalenes control i albúmina. Mitjana \pm desviació estàndard. Superíndexs diferents indiquen diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$).

	Control	Albúmina
Duresa (N)	7,84 ^a \pm 1,15	3,07 ^b \pm 0,34
Adhesivitat	-0,01 ^a \pm 0,01	-0,01 ^a \pm 0,00
Cohesivitat	0,62 ^a \pm 0,01	0,59 ^b \pm 0,01
Elasticitat (mm)	12,05 ^a \pm 0,51	11,36 ^a \pm 0,49
Masticabilitat (N·mm)	58,52 ^a \pm 11,23	20,57 ^b \pm 3,18

Els resultats mostren clarament les diferències entre les dues produccions. Pel que fa a la duresa, les magdalenes fetes amb clara d'ou doblen el valor de les magdalenes d'albúmina. La duresa de les magdalenes control concorda amb els resultats obtinguts per Casals, F (2011), segons el qual les magdalenes control tenien una duresa de $7,20 \pm 0,63$ N, i les magdalenes comercials de $6,62 \pm 0,57$ N. En el seu estudi la duresa de magdalenes fetes amb plasma era de $4,58 \pm 0,39$ N, valor superior al de les magdalenes d'albúmina ja que el plasma conté globulines i fibrinogen que gelifiquen millor.

Aquest valor tan baix en la duresa de les magdalenes que contenen l'hemoderivat pot estar relacionada amb la pobre capacitat de gelificació de la seroalbúmina, tal com demostren els resultats de l'apartat 4.3.2.2.

Tot i que el valor d'adhesivitat és el mateix en les dues produccions, les magdalenes control tenen una cohesivitat significativament superior a la de les magdalenes d'albúmina. Aquest fet també pot tenir relació amb la capacitat de gelificació de les proteïnes de les magdalenes, ja que una xarxa proteica més estructurada està relacionada amb partícules més cohesionades.

Un altre paràmetre mesurat va ser l'elasticitat, que va resultar ser estadísticament igual en les dues produccions. Tot i tenir dureses notablement diferents, les magdalenes control i albúmina tenen la mateixa capacitat de tornar a la seva forma original després de la compressió.

L'últim paràmetre mesurat va ser la masticabilitat. Com que la duresa de les magdalenes control és superior a la de les magdalenes d'albúmina, la seva masticabilitat també és superior, ja que aquest paràmetre depèn de la duresa i l'elasticitat de la mostra.

L'aspecte de les dues produccions de magdalenes era clarament diferent a simple vista (figura 4.15). D'una banda les magdalenes amb seroalbúmina eren menys voluminoses i donaven formes finals més planes que les magdalenes control. Es va observar el comportament de la massa de magdalenes durant el procés de cocció i es va poder comprovar que les que contenien albúmina experimentaven un procés d'inflament important, que coincidia amb l'esperat segons els resultats de capacitat escumant. Tanmateix, un cop produït l'inflament, la massa no es mantenia l'estructura i vessava cap als costats, a vegades fins i tot fora del motllo. Una hipòtesi que explicaria aquest comportament seria que no es produïa la coagulació proteica necessària ni en el moment adequat, és a dir simultàniament a l'inflament de la massa, de manera que no es podien fixar o retenir les cel·les d'aire en el seu interior i es col·lapsava l'estructura.

Deixant de banda la seva forma, les magdalenes control presentaven un color molt més clar que les magdalenes d'albúmina, que sortien més torrades tot i haver estat enforades en les mateixes condicions i durant el mateix temps (figura 4.10). Això es va atribuir a que es produïa un enfosquiment no enzimàtic (reacció de Maillard) més intens en les mostres amb seroalbúmina. La reacció de Maillard o glucosilació no

enzimàtica de proteïnes, és un conjunt complex de reaccions químiques que es donen entre proteïnes i sucres reductors en escalfar els aliments. Donat que la quantitat de sucre en la formulació dels dos productes era la mateixa, caldria comprovar en futurs experiments si la seroalbúmina té més capacitat de reaccionar amb els sucres reductors que l'ovoderivat utilitzat en la producció dels lots control.



Figura 4.10. Magdalena control (esquerra) i albúmina (dreta). Diferent color i forma.

En un estudi de Myhara i Kruger (1998) es va determinar que quan se substituïa ou per plasma porcí des del punt de vista sensorial existia una preferència pels pastissos fets amb ou. Casals F. (2011) també va concloure que el plasma porcí era un bon substitut de l'ou pel que fa a la seva funcionalitat en magdalenes, però la presència de plasma era massa evident sensorialment.

En les magdalenes produïdes amb albúmina, tot i contenir aromes de vainilla i llimona, també es podien apreciar certes diferències en el gust i l'olor respecte a les magdalenes control, malgrat que de força menys intensitat que en les elaborades amb plasma. Probablement l'etapa de diafiltració del procés d'obtenció de l'ingredient, a més d'eliminar eficaçment les sals del concentrat proteic, ha contribuït a reduir la concentració de molècules de baix pes molecular responsables d'aquests atributs sensorials.

En aquest treball s'ha vist que funcionalment, la seroalbúmina porcina no és bona substituta de l'ou degut a la textura, forma i color que presenta el producte final, tanmateix s'han millorat aspectes relacionats amb l'aroma i el gust de les magdalenes amb proteïnes de sang. Les perspectives futures d'aquesta línia

s'haurien de centrar en (1) trobar la formulació adequada de l'ingredient funcional, pel què fa a la concentració relativa de cada grup de proteïnes plasmàtiques necessària per aconseguir millorar la capacitat de gelificació sense reduir la capacitat escumant; i en (2) establir les condicions de procés per obtenir l'ingredient sense els atributs sensorials no desitjables en productes de brioxeria.

5. CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

Les principals conclusions derivades d'aquest treball són:

1. S'ha obtingut un concentrat de seroalbúmina porcina a partir de plasma de sang recollida higiènicament en un escorxador industrial. El procés ha consistit en un fraccionament per *salting out* combinat amb una etapa de concentració i dessalat mitjançant la tecnologia de membranes i la posterior deshidratació per atomització. L'albúmina en pols obtinguda té una humitat del $8,18 \pm 1,67$ % i conté un $93,52 \pm 2,28$ % de proteïna i un $0,44 \pm 0,15$ % de cendres.
2. Pel que fa a les propietats funcionals de superfície, la seroalbúmina en pols obtinguda ha presentat una bona capacitat de formar i estabilitzar escuma i una activitat emulsionant comparable a la del caseïnat i a la del plasma sencer, tant a pH 5,5 com a pH 7. Tanmateix, les emulsions obtingudes amb plasma sencer són més estables que les d'albúmina o caseïnat.
3. La concentració mínima de proteïna necessària per a què es produeixi la termogelificació (45 min, 80°C) de la seroalbúmina en pols (pH 7,4) ha estat del 10%. Tanmateix, el gel obtingut presenta unes característiques pobres tant de textura com de capacitat de retenció d'aigua.
4. Les magdalenes elaborades amb seroalbúmina en pols en substitució de clara d'ou deshidratada tenien un color més torrat i no presentaven les característiques de forma i textura desitjades. L'albúmina com a ingredient no dóna prou duresa ni cohesivitat a les magdalenes i aquestes són menys voluminoses i més planes que les de les produccions control.
5. Amb els resultats obtinguts en aquest estudi podem afirmar que la seroalbúmina porcina en pols, a diferència del plasma sencer, no és un ingredient funcional adequat per a l'elaboració de magdalenes sense ou.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

Baixauli, R. 2007. Influencia de la adición de un ingrediente funcional en la calidad de un producto de bollería. Aspectos reológicos y texturales y su relación con la aceptación sensorial. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.

Belitz, H., Grosch, W. 1997. Química de los alimentos. Ed. Acribia, S. A., Saragossa.

Casals, A. 2011. Obtenció i caracterització físico-química de sèrum de sang porcina. Treball final de carrera de la titulació d'Enginyeria Tècnica Agrícola especialitat Indústries Agràries i Alimentàries, Escola Politècnica Superior, Universitat de Girona.

Casals, F. 2011. Revalorització de la sang de porc dels escorxadors en la fabricació de magdalenes. Treball final de carrera de la titulació d'Enginyeria Tècnica Agrícola especialitat Indústries Agràries i Alimentàries, Escola Politècnica Superior, Universitat de Girona.

Cheftel, J.C., Cuq, J.L. i Lorient, D. 1989. Proteines alimentaires. Biochimie, propriétés fonctionelles valeur nutritionelle, modifications chimiques. Lavoisier, París.

Chiech, C. 2006. Water. A: Bakery products: Science and Technology (1ª edició). Ed: Hui. Y.H. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, EUA. Ciacco, C.F., Queiroz.

Clark, A.H., Saunderson, D.H. i Suggett, A. 1981. Infrared and laser-Raman spectroscopic studies of thermally-induced globular protein gels. International Journal of Peptide and Protein Research, 17(3): 353-364.

Conforti, F.D. 2006. Cake Manufacture. A: Bakery products: Science and Technology (1ª edició). Ed: Hui. Y.H. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, EUA.

Çelik, I., Yilmaz, Y., Isik, F. i Üstün, Ö. 2007. Effect of soapwort extract on physical and sensory properties of sponge cakes and rheological properties of sponge cakes batters. Food Chemistry, 101, 907-911.

Damodaran, S. 1986. Kinetics of Formation of Hydrophobic Regions During Refolding of Bovine Serum-Albumin. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 27(6): 589-596.

Dàvila, E. 2007. Advances in animal blood processing: development of a biopreservation system and insights in the functional properties of plasma. Tesi Doctoral, Universitat de Girona.

Dàvila, E.; Saguer, E.; Toldrà, M.; Carretero, C.; Parés, D. 2007. Surface functional properties of blood plasma protein fractions. *European Food Research and Technology*, 226: 207-214.

Divakaran, S. 1980. Animal blood. National Information Center for Leather and Allied Industries. Mandras, Índia.

FAOSTAT (2010). *Food and Agricultural commodities production* [en línia]. Accessible a: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> [consulta 5/04/12].

Friedli, G.L. 1996. Interaction of deamidated soluble wheat protein (SWP) with other food proteins and metals. Interaction of SWP with bovine serum albumin (BSA).

Generalitat de Catalunya (2009). *Enquesta de sacrifici d'escorxadors* [en línia]. Accessible a: <http://www20.gencat.cat/portal/site/DAR/menuitem> [consulta 17/05/2012].

Gómez, M. i Ronda, F. 2002. Impulsores. Utilización en bollería y galletería. *Molinería y Panadería*, 1108, 72-77.

Halling, P.J. 1981. Protein-stabilized foams and emulsions. *Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15(2): 155-203.

Jacobson, K. A. 1997. Whey protein concentrates as functional ingredients in baked goods. *Cereal Foods World*, 42(3), 138-141.

Kato, A., Osako, Y., Matsudomi, N. i Kobayashi, K. 1983. Changes in the emulsifying and foaming properties of the proteins during heat denaturation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(1): 370-37.

Lai, H.M. i Lin, T.C. 2006. *Bakery products: science and technology. A: Bakery products: Science and Technology*, (1^a edició). Ed: Hui. Y.H. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.

MARM (2011). *Comercio exterior ganadero* [en línia]. Accessible a: <http://www.marm.es/es/ganaderia/temas/comercio-exterior-ganadero/default.aspx> [consulta 5/04/2012].

Maubois, J.L. (1974). *Aplication of Membrane Ultrafiltration to Preparation of Various Types of Cheese* [en línia]. Accessible a: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030275846728> [consulta 04/5/2012].

Myhara, R.M.; Kruger, G. 1998. The performance of decolorized bovine plasma protein as a replacement for egg white in high ratio white cakes. *Food Quality and Preference*, 9, 135-138.

Nakai, S., Ho, L., Helbig, N., Kato, A. i Tung, M.A. 1980. Relationship Between Hydrophobicity and Emulsifying Properties of Some Plant-Proteins. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal-Journal de Institut Canadien de Science et Technologie Alimentaires*, 13(1): 23-27.

Nievas, S. 2012. Propietats emulsionants de les proteïnes de sang de porc. *Pràcticum de la titulació de Ciència i Tecnologia dels Aliments*, Escola Politècnica Superior, Universitat de Girona.

Ockerman, H.W. i Hansen, C.L. 1988. *Animal by-product processing*. Ellis Horwood Ltd., Chinchester, England.

Oreopoulou, V. 2006. Fat replacers. A: Bakery products: Science and Technology.(1^a edició). Ed: Hui. Y.H. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, EUA.

Martínez O, Salmerón J, Guillén MD, Casas C. 2004. Texture profile analysis of meat products treated with commercial liquid smoke flavourings. Food Control, 15, 457-461.

Parés, D.; Sagner, E. i Carretero, C. 2011. Blood by-products as ingredients in processed meat. A: Kerry, J. P.; Kerry, J. F. (Eds). Processed meats. Woodhead Publishing, Cambridge. 218-242.

Penteado, M.D.V.C.; Lajolo, F.M. i Pereiradossantos, N. 1979. Functional and Nutritional Properties of Isolated Bovine Blood Proteins. Journal of the Science of Food and Agriculture, 30(8): 809-815.

Raventós, M. 2003. Indústria alimentària. Tecnologies emergents. Edicions UPC. Barcelona.

Rodríguez, F.; Aguado, J.; Antonio, J.; Cañizares, P.; López, B.; Santos, A. i Serrano, D. 2002. Ingeniería de la industria alimentaria (vol. II). Ed. Síntesis DL, Madrid.

Shimada, K. i Cheftel, J.C. 1989. Sulfhydryl group disulfide bond interchange reactions during heat induced gelation of whey protein isolate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37(1): 161-168.

Síria, C. 2005. Fraccionament de les proteïnes del plasma de sang de porc i determinació de les seves propietats funcionals. Treball final de carrera de la titulació d'Enginyeria Tècnica Agrícola especialitat Indústries Agràries i Alimentàries, Escola Politècnica Superior, Universitat de Girona.

Stauffer C.E. 1998. Fats and oils in bakery products. Cereal Foods World, 43(3), 120-126.

Tejero, F. 1995. Los azúcares en las masas fermentadas. *Molinería y panadería*, 90 (1024): 54-59

Torres, M.R., Ramos, A.J. i Soriano, E. 1997. Aspectos funcionales y nutricionales de las proteínas sanguíneas: Empleo en la industria cárnica. *Alimentaria*, maig 1997: 63-68.

Universitat d'Arizona, 2006. The biology project [en línia]. Accessible a: <http://www.biology.arizona.edu/> [consulta 17/05/2012].

Vilardell, N. 2010. Desenvolupament d'una nova metodologia per a l'obtenció de concentrats de proteïnes plasmàtiques procedents de sang de porc. Treball final de carrera de la titulació d'Enginyeria Tècnica Agrícola especialitat Indústries Agràries i Alimentàries, Escola Politècnica Superior, Universitat de Girona.

Voutsinas, L.P., Cheung, E. i Nakai, S. 1983. Relationships of Hydrophobicity to Emulsifying Properties of Heat Denatured Proteins. *Journal of Food Science*,48(1): 26-32.

Winston, H.O. i Sirkar, K.K. 1992. *Membrane Handbook*, Van Nostrand Reinhold, New York.