

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“EFECTO DE ULTRASONIDOS EN EL
PROCESO DE EXTRACCIÓN DE
PROTEÍNAS DE CO-PRODUCTOS
ANIMALES Y ESCALADO DEL
PROCESO”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

ANTÍA ACUÑA GONZÁLEZ

JULIO, 2017





Máster en Biotecnología Alimentaria

Universidad de Oviedo

C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Carlos Álvarez (Teagasc Research Centre)

CERTIFICA:

Que D. **Antía Acuña González** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 11^a promoción curso 2016-2017.

Dublín, 14 de Julio de 2017

D. (Tutor)

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Teagasc, la oportunidad de poder realizar estas prácticas en su centro, con unas instalaciones increíbles, que me permitieron disponer de todo el material necesario y por darme la oportunidad de conocer muchos equipos diferentes. En especial, gracias a la familia de Teagasc, ese grupo que siempre ameniza las comidas, y a Carlos, por su paciencia infinita, por su amabilidad, por darme la oportunidad de confundirme, de probar y de aprender, y, sobre todo, gracias por enseñarme todo lo que sé sobre proteínas. Además, agradecer a Sarah A. Lynch, en cuya investigación se ha basado esta, aunque no haya podido ser referenciada por no estar todavía publicada.

Gracias a Manuel, por ayudarme con la pesadilla burocrática que supone irte fuera: pedir becas o entregar el proyecto a distancia. Por su trato exquisito, y por involucrarse y ayudarnos durante todo el máster con cada dificultad que se presentaba.

Pero esta experiencia habría sido imposible sin el soporte económico de mi familia, que hace grandes esfuerzos porque me forme y viva experiencias vitales como estos tres meses en Dublín. En especial, a mis padres, por lanzarse conmigo a la piscina con cada proyecto que me propongo y por escuchar mis explicaciones infinitas. A mis hermanas, a las dos, a la humana y a la canina, por divertirme, ayudarme y escucharme siempre. A mi tía Noelia, que es mi Pepito Grillo laboral. Y sobre todo, a mi tía Beti, que es tan especial para mí, precisamente por llenarme de oportunidades, de cuidados y por darme siempre tantísimo.

Por último, me gustaría agradecer a mis amigos que me hagan llegar siempre todo su cariño a cualquier rincón en el que se me antoje vivir. A los que vinieron a verme, y a los que no pudieron, y también, como no, a los que he hecho aquí.

Muchas, muchísimas gracias a todos.

Listado de Tablas

Tabla 1. Usos potenciales y preparación de los co-productos aptos para consumo humano Esta tabla es una modificación de otra extraída de (Ockerman & Hansen, 2000).....	16
Tabla 2. Potenciales aplicaciones de las proteínas de la sangre. Extraída del artículo de (S. Lynch et al., 2017).....	24
Tabla 3. Condiciones de extracción más óptimas diseñadas por RSM. Extraída del trabajo de Sarah A. Lynch.....	27
Tabla 4. Composición de pulmón bovino, porcino y proteínas recuperadas (g kg^{-1}). Extraída de documentos de Sarah A. Lynch.....	32
Tabla 5. Condiciones de extracción en baño de ultrasonidos.....	33
Tabla 6. Condiciones de extracción con la sonda de ultrasonidos.....	34
Tabla 7. Orden de carga de geles SDS-PAGE del tratamiento con ultrasonidos.....	36
Tabla 8. Receta substitución de proteínas en hamburguesas.....	41
Tabla 9. Porcentaje de proteína solubilizada en el tratamiento del baño de ultrasonidos.....	47
Tabla 10. Porcentaje de extracción previsto y datos obtenidos reales para el tratamiento del baño de ultrasonidos.....	48
Tabla 11. Porcentaje de proteína solubilizada en el tratamiento de la sonda de ultrasonidos.....	49
Tabla 12. Porcentaje de extracción previsto y datos obtenidos reales para el tratamiento de la sonda de ultrasonidos.....	50
Tabla 13. Porcentaje de proteína solubilizada en el tratamiento de planta piloto.....	53
Tabla 14. Porcentaje de extracción previsto y datos obtenidos reales para el tratamiento de planta piloto.....	53
Tabla 15. Parámetros analizados de las proteínas extraídas.....	55
Tabla 16. Solubilidad de las proteínas extraídas.....	56
Tabla 17. Análisis de: cenizas, proteínas, humedad y grasa.....	59
Tabla 18. Pérdida por cocción.....	61
Tabla 19. Retención de agua por masa cruda.....	62
Tabla 20. Resultado pruebas de color.....	62
Tabla 21. Resistencia al corte de las hamburguesas.....	64

Tabla de figuras

Figura 1. Interacción de los dipolos de agua. Extraída de	20
Figura 2. Solubilidad de las proteínas en función del cambio de pH.	20
Figura 3. Método ISP.....	25
Figura 4. Efecto de los ultrasonidos y cavitación. Extraído de (Soria & Villamiel, 2010).	29
Figura 5. Aplicación de los ultrasonidos en Biotecnología alimentaria. Extraído de (Kadam et al., 2015).....	30
Figura 6. Equipos de ultrasonidos. Sonda de ultrasonidos (izquierda) y baño de ultrasonidos (derecha).	34
Figura 7. Equipo Stephan de la planta piloto.	37
Figura 8. Separación de la parte sólida. Planta piloto.....	38
Figura 9. Texturómetro.....	45
Figura 10. Significancia relativa de los factores en el rendimiento de la solubilidad de proteína. Para los factores: A (Tiempo): 65.0 minutos; B (Temperatura en°C): 12.00; C (pH): 9.50; D(SSR o ratio de solvente):6.25 a 1.....	47
Figura 11. Geles SDS-PAGE para los tratamientos de ultrasonidos. Gel 1 (izquierda) Gel 2 (derecha).	51
Figura 12. Geles SDS-PAGE para el tratamiento en planta piloto.....	54
Figura 13. Gráfica de la emulsión producida en función de la concentración de proteína.	56
Figura 14. Emulsión del 100% de las proteínas extraídas.....	56
Figura 15. Estabilidad de la espuma de las proteínas extraídas.....	57
Figura 16. Ensayos de capacidad espumante.....	58
Figura 17. Gráfica resistencia cortante (texturómetro).....	63

Resumen

Este trabajo busca dar solución a la generación de subproductos procedentes de la industria cárnica investigando la extracción de proteínas funcionales de pulmones bovinos y porcinos, sus propiedades tecnológicas y su aplicación como ingredientes alimentarios. Se ha querido comprobar el efecto de los ultrasonidos (aplicados como baño o como sonda) en el rendimiento de la extracción de proteínas mediante la técnica de solubilización y precipitación isoeléctrica y se han observado ligeros aumentos en el rendimiento de extracción. También se ha escalado el proceso optimizado de 2 L a 40L en planta piloto, manteniendo el rendimiento de extracción esperado. Por último, se ha estudiado las propiedades de las proteínas extraídas, que presentan una gran capacidad emulsionante. Finalmente, se ha realizado una sustitución de carne por proteínas extraídas de pulmón en hamburguesas, observando que este cambio no produce grandes diferencias en el producto final.

Abstract

This work tried to find a solution to the huge by-products generation in the Meat Industry, investigating the extraction of proteins from bovine and porcine lungs, their techno-functional properties and their application as food ingredients. The effect of the ultrasound assisted extraction on the extraction through isoelectric solubilisation/precipitation method has been tested (ultrasound bath and probe) and small effects have been shown. Moreover, the scale-up of the process from 2L to 40L have been also tested, and the extraction yield matches with the expected estimation. In addition, the properties of the extracted proteins have been tested and a strong emulsifying capability has been shown. Finally, the extracted proteins have been used for meat replacement in hamburgers, not big differences were found.

Índice

1.	INTRODUCCIÓN	8
1.1.	OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	12
2.	CONCEPTOS TEÓRICOS.....	13
2.1.	Subproductos de la industria cárnica y su repercusión medioambiental.....	13
2.2.	Estructura de las proteínas	16
2.3.	Propiedades tecno-funcionales de las proteínas	19
2.4.	Solubilización y precipitación a pH isoelectrico o ISP.	24
2.5.	Ultrasonidos	27
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	32
3.1.	Experimento de optimización con ultrasonidos.....	32
3.2.	Escalado del experimento	37
3.3.	Mediciones texturométricas	39
3.3.1.	Propiedades de las proteínas extraídas	39
3.3.2.	Elaboración de las hamburguesas.....	41
3.3.3.	Análisis de las hamburguesas y mediciones texturométricas.....	42
3.3.4.	Análisis estadístico de los resultados	45
4.	RESULTADOS	46
4.1.	Experimento de extracción	46
4.2.	Escalado del experimento de extracción	52
4.3.	Análisis de propiedades de proteínas y Texturometría	54
4.3.1.	Análisis de las propiedades tecnofuncionales de los extractos	55
4.3.2.	Análisis de las hamburguesas y Texturometría.....	59
5.	CONCLUSIONES	65
6.	SÍMBOLOS.....	66
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	67

1. INTRODUCCIÓN

La demanda a nivel mundial por el acceso a proteína de alta calidad nutritiva está en aumento, según varios informes de la FAO (FAO,2009). Este hecho, junto con una población mundial creciente, ha motivado la búsqueda tanto de nuevas fuentes de proteínas como el de un mejor aprovechamiento de las actualmente existentes. Este mismo organismo, la FAO, sostiene que la industria cárnica es uno de los pilares fundamentales para satisfacer esta creciente necesidad. Adicionalmente, el previsible aumento de la producción cárnica, supondría también un incremento en la demanda de productos para alimentar al ganado, ya que ambos están estrechamente relacionados (Pimentel & Pimentel, 2003; Trostle, 2008).

Un aumento en la producción cárnica, necesaria para abastecer la creciente demanda global, traería un aumento concomitante de la cantidad de subproductos, residuos y aguas de procesos generados; derivados éstos de la explotación cárnica. Se ha estimado que durante el proceso de producción de carne el 54-56% del peso en vivo de las reses y el 48% del peso vivo del ganado porcino (Marti, Johnson, & Mathews Jr, 2012), consiste en productos no cárnicos como sangre, vísceras, huesos o contenido gastrointestinal. De forma habitual, el conjunto de estos subproductos son encauzados en dos vías: bien desecharlos como residuos que necesitan un tratamiento posterior (tales como incineración o generación de biogás) con el consiguiente coste ambiental y económico para la empresa generadora, o bien son utilizados para aplicaciones finales de muy bajo valor añadido (que no aprovechan todo su potencial, como su uso en la fabricación de alimento de mascotas, compostaje o fertilizantes).

El gran potencial de los subproductos cárnicos proviene de su alto valor nutricional, ya que son ricos en diferentes nutrientes como vitaminas, proteínas, minerales, compuestos bioactivos y ácidos grasos.(López & Martos, 2004; Montero Castillo, Ligardo, Alejandro, González, & Cristina, 2015; A. Mullen & Álvarez, 2016). No obstante, de entre todos sus componentes, las proteínas son sin duda las que encierran un mayor potencial para su ulterior aplicación (A. M. Mullen et al.). Además las proteínas extraídas de estos co-productos son una fuente potencial de bio-peptidos (Di Bernardini et al., 2011; Lee et al., 2010), los cuales están

relacionados con propiedades beneficiosas para la salud (Sharma, Singh, & Rana, 2011) y colágeno, el cual tiene propiedades aplicadas a la biotecnología sanitaria (Dimitrios I Zeugolis, Paul, & Attenburrow, 2009; D. I. Zeugolis, Paul, & Attenburrow, 2008). A pesar de su valor nutricional, las vísceras se han visto cada vez más desplazadas de la dieta habitual en los países occidentales, siendo consideradas como desagradables o insalubres. No obstante, en ciertas zonas existe una larga tradición gastronómica en la que estos productos son considerados delicatesen (mollejas, asadura, criadillas, etc). Sin embargo, esta demanda, no absorbe la gran cantidad generada hoy en día. Actualmente, la mayoría de la población de estos países nunca ha probado platos cocinados con vísceras y por tanto no están familiarizados con su sabor, textura y características. Además, el desconocimiento y la existencia de algunos brotes de enfermedades derivadas de estos productos, como el de las vacas locas, hacen que la población tenga una percepción de estos como dañinos para la salud o como productos de desecho (Delgadino, Bonetto, J, & Lahey, 2002; Feng, Zhao, Zhu, & Mason, 2002).

Dado que se prevé una demanda creciente de proteínas, lo que conllevaría a un aumento en la producción animal, las autoridades públicas reclaman un mejor aprovechamiento de los recursos actuales mediante nuevas tecnologías sostenibles, de bajo impacto ambiental y que sean capaces de aprovechar todo el potencial presente en la industria cárnica (Penteado, Lajolo, & Santos, 1979). Precisamente, lo que propone el proyecto ReValue, en el que se encuadra esta investigación, es un aprovechamiento y una revalorización de todos esos subproductos de la industria cárnica, a los que designaremos como co-productos a lo largo de este trabajo. Optimizando el proceso de producción cárnica y proyectando cambios en las prácticas empresariales y en la investigación, se podrían lograr muchas metas interesantes como la mejora de la higiene y una producción más eficiente, que minimizaría el impacto medioambiental, ya que aprovechando los co-productos se generarían muchos menos productos de desecho a la par que se aumentaría la producción global de proteína (Waldron, 2007).

Ha sido recientemente publicado, que al extraer de estas vísceras los compuestos de interés, la aceptabilidad de estos aumenta, y con ello

aumenta también el potencial valor económico que éstos puedan tener. Es lo que se ha dado a conocer como “desanimalización”, y permite a los usuarios obviar algunos prejuicios negativos que tengan a cerca de las vísceras y aumentando la capacidad de estos de valorar sus beneficios de una manera más aislada. Lo cual es un aliciente para mejorar las técnicas de extracción y para poder optimizar la producción de carne y aprovechar al máximo los recursos actualmente disponibles. (Henchion, McCarthy, & O’Callaghan, 2016). Este tipo de aditivos alimentarios está altamente regulado, y la manipulación de estos determinará su clasificación final como subproducto (no apto para consumo humano) o como partes de carcasa dirigidas al consumo humano, reguladas en base a las leyes (EC)852/2004, Regulation (EC)853/2004 y Regulation (EC)854/2004.

Como ya se ha mencionado, la mayoría de estos co-productos están compuestos principalmente de proteína (Lemes et al., 2016). Los métodos de extracción tradicionales (altas temperaturas, procesos enzimáticos, uso de solventes, procesos de membranas, etc) son demasiado agresivos y deterioran tanto el valor nutricional de las proteínas como sus propiedades tecno-funcionales, incluso, en algunos tratamientos más agresivos usando pH’s extremos y altas temperaturas, se pueden degradar amino ácidos, lo que conlleva también una pérdida del valor nutricional. El principal motivo es una modificación de la estructura terciaria y secundaria de las proteínas, que, tras la extracción, no conservarán las propiedades tecno- funcionales que presentarían en su estado nativo (Korhonen, Pihlanto-Leppäla, Rantamäki, & Tupasela, 1998). Se propone, entonces, un método de extracción que obtenga altos rendimientos, tenga un bajo impacto en las propiedades de las proteínas y un bajo coste medioambiental. La técnica conocida como ISP, del inglés “Isoelectric solubilisation precipitation”, es una excelente candidata ya que cumple los requisitos anteriormente mencionados. Dicha técnica ha sido empleada con anterioridad para extraer proteínas de pescado, pollo e incluso algas (Tahergorabi, Beamer, Matak, & Jaczynski, 2011; Taskaya, Chen, Beamer, Tou, & Jaczynski, 2009; Tian, Wang, Zhu, Zeng, & Xin, 2014). Este método consiste en la solubilización y posterior precipitación de las proteínas presentes en las muestras por medio de cambios de pH aplicando soluciones ácidas y básicas. En trabajos

anteriores llevados a cabo en este laboratorio, el método ISP se optimizó mediante un método estadístico conocido como "metodología de respuesta en superficie" o RSM de sus siglas en inglés, es capaz de analizar el efecto de los principales factores que tienen un efecto en un proceso, permitiendo posteriormente optimizar dicho proceso. Como la aplicación de ácidos o bases muy fuertes puede resultar en el deterioro de la proteína de interés, se hace necesario un avance tecnológico y el estudio de otros métodos que puedan aumentar el rendimiento de la reacción, facilitando unas condiciones más suaves para las proteínas extraídas. Para ello, se estudia la posible combinación del método base anterior con tecnologías emergentes, siendo una de las más prometedoras el uso de ultrasonidos, los cuales se han empleado con éxito para incrementar la extracción de proteínas de diferentes matrices (Kadam, Tiwari, Álvarez, & O'Donnell, 2015). Se ha visto en la bibliografía, que los ultrasonidos aumentan el rendimiento de múltiples procesos de extracción, permitiendo reducir el consumo de los solventes empleados, generando por tanto menos residuos y reduciendo el coste del proceso. Los ultrasonidos han sido reportados en la bibliografía como una herramienta que podría ser eficiente para aumentar dicho rendimiento, ya que, es una tecnología "verde", por no producir residuos que contaminen el medio y porque reduce el volumen de reactivos a utilizar durante la extracción, convirtiendo el proceso en más sostenible. Además, con el uso de esta tecnología la proteína apenas se ve modificada durante el proceso de extracción, cuándo la temperatura es controlada y se emplean cortos periodos de exposición (Chandrapala, Zisu, Palmer, Kentish, & Ashokkumar, 2011; Garde-Cerdán, Arias-Gil, Marsellés-Fontanet, Ancín-Azpilicueta, & Martín-Belloso, 2007).

Así pues, el principal objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de los ultrasonidos, combinado con el ya descrito proceso de extracción ISP, en el rendimiento del proceso de obtención de proteínas de un subproducto modelo como es el pulmón de cerdo. Además, con el objetivo de ser utilizadas como aditivos alimentarios (tanto para aumentar la cantidad de proteína como para mejorar las características tecnológicas del producto final), se valorará el impacto que puedan tener los ultrasonidos en las propiedades tecno-funcionales de los extractos. Asimismo, el uso de

ultrasonidos podría suponer una ventaja la hora de introducir las proteínas en el mercado, ya que, aunque la aceptabilidad aumenta con la extracción y transformación de estas proteínas de las vísceras a aditivos alimentarios, los métodos de extracción también influyen en la aceptabilidad del producto final, teniendo el mercado preferencia por aquellos métodos en los que la transformación sea mínima y se reduzca al máximo el uso de químicos. Los ultrasonidos no dejan una huella tan evidente en el alimento, como podría ser el caso de los químicos y de las altas temperaturas, que alteran de alguna manera la proteína.

Por último, y ya que estas proteínas se extraen con el objetivo de ser empleadas como ingrediente alimentario, se estudiara el efecto que su incorporación tiene en un producto modelo: hamburguesas de cerdo. Las propiedades tecnológicas más importantes (color, composición, textura, estabilidad de la emulsión y pérdidas por cocción) serán contrastadas con una receta control. Para ellos diferentes nivel de sustitución de carne de cerdo serán estudiados.

1.1. OBJETIVOS DEL PROYECTO

Habida cuenta de los factores aquí mencionados se han establecido los siguientes objetivos para este trabajo de investigación:

- Estudiar el efecto de los ultrasonidos en el rendimiento de la extracción de proteínas de pulmón y su efecto en las propiedades funcionales de los extractos.
- Estudiar el efecto del cambio de escala del proceso de extracción optimizado a nivel de laboratorio.
- Determinar el efecto en las propiedades tecnológicas de un producto modelo cuando las proteínas extraídas se emplean como sustituyente de carne de cerdo.

2. CONCEPTOS TEÓRICOS

El aprovechamiento de los co-productos de la industria cárnica tiene especial interés, dado que estos generan contaminación del medio ambiente, o se emplean para productos de bajo valor añadido. Incluso, en ocasiones son directamente procesados en incineradoras o plantas de compostaje. Lo cual conlleva un coste económico para la empresa que los haya generado.

2.1. Subproductos de la industria cárnica y su repercusión medioambiental

La industria alimentaria juega un papel muy importante en el cambio climático (Assessment, 2005; Krausmann, Erb, Gingrich, Lauk, & Haberl, 2008; Tilman et al., 2001; Weidema et al., 2008). El sector ganadero ocupa el 30% de la superficie (no recubierta por hielo) del planeta, y contribuye al 40% del producto agrícola global; generando ganancias económicas a más de 1.3 billones de personas. Además, aunque se destinan para su producción enormes áreas de pasto, un tercio del agua y de los cultivos son destinados también al ganado (M. Herrero et al., 2013). La producción ganadera es una actividad con doble filo, que puede suponer un aporte de nutrientes para los cultivos, pero a la vez contaminarlos y contribuir a la degradación del suelo. Estas dobles repercusiones de la ganadería ponen en relieve la necesidad de un cambio en la producción masiva de carne, que reconduzca al sector hacia una posición más amable con el medio ambiente, permitiéndole a la vez cubrir la demanda de proteína animal de un modo más sostenible (Pelletier & Tyedmers, 2010).

La alta demanda de proteína cárnica se debe a una población en incansable crecimiento (Alexandros, Bruinsma, Bodeker, Broca, & Ottaviani, 2012), y satisfacer dicha demanda supone exacerbar las presiones que ejerceremos sobre los sistemas ecológicos. El Panel Intergubernamental del Cambio Climático (Solomon, 2007) estima que la contribución directa de la agricultura al cambio climático es del 10-12%, sin contar las conversiones de territorios que se usarían para tal actividad. Si contásemos esto último, se estima que la contribución agrícola ascendería al 17-32% de las emisiones antropogénicas. Aunque no poseemos datos sobre la contribución global de la industria alimentaria al efecto invernadero (Garnett, 2008), la

Unión Europea estima que, dentro de esta, las emisiones del sistema alimentario contribuyen al 31% de las emisiones totales (Davila, Parés, Cuvelier, & Relkin, 2007), siendo gran parte de estas emisiones, atribuidas al sector ganadero (Steinfeld, Gerber, Wassenaar, Castel, & de Haan, 2006). Pero este sector no tiene solamente un impacto directo en la contaminación del planeta, sino que, de igual modo repercute directamente en la economía mundial, ya que la no utilización de los subproductos generados de una manera eficiente, o su infrautilización, no solo significa una pérdida de ganancias, si no que eleva el coste de producción (K. Jayathilakan, K. Sultana, K. Radhakrishna, & A. S. Bawa, 2012).

Los métodos actuales para la reutilización de los productos de desecho derivados de la industria alimentaria suelen seguir dos vías tradicionales con base agrícola: su uso para alimentación animal y su uso como fertilizantes. Este tipo de desperdicios se caracterizan por contar con un elevado porcentaje de materia orgánica, lo que dificulta la tarea de depositarlos en el medio como residuos. (K. Jayathilakan et al., 2012). En 2010 (FAO,2013) la producción global anual de carne alcanzó las 296 millones de toneladas, con la producción porcina en cabeza (109 millones de toneladas), seguida de la avícola (99 millones de toneladas), ternera y búfalo (68 millones de toneladas) y oveja y cabra (13 millones de toneladas). Esta producción ha ido en aumento durante los últimos años, generando cantidades significativas de subproductos. La mayoría de estos subproductos son producidos durante el sacrificio, siendo los más comunes: huesos, piel, sangre, vísceras, tejidos grasos, cráneos, pezuñas. La generación de estos subproductos es enorme debido a la cantidad de carne que se produce, ya que una gran parte del animal no es aprovechada. Por ejemplo, en cerdos, reses y corderos, la cantidad de subproductos que se deducen de la producción cárnica ya suponen el 52%, 66% y 68% respectivamente respecto al peso vivo de estos animales. De estos subproductos solo el 20% son no comestibles, lo que quiere decir que el resto si sería apto para el consumo (K. Jayathilakan, K. Sultana, K. Radhakrishna, & A. Bawa, 2012; Mirabella, Castellani, & Sala, 2014).

Continuos estudios tecnológicos y de las regulaciones vigentes sobre el procesado de la carne, animan a mejorar la higiene y a minimizar las

pérdidas de producto. En el matadero, que es dónde se da lugar a la mayoría de subproductos cárnicos, se llevan a cabo diversas operaciones como el despiece, el sacrificio, extracción de pelo, evisceración... Y todas ellas dan lugar a subproductos que se dividen según sus características en: comestibles (casquería), no comestibles (cuernos, lana, cuero...), subproductos de bajo valor (las usadas para alimentación animal), y productos de desecho (los que no tienen ningún tipo de aplicación y serán desechados) (Inkelaar & Fortuin, 1969). En general, los subproductos cárnicos son ricos en proteínas y también en vitaminas, hormonas, minerales, aminoácidos y ácidos grasos (K. Jayathilakan et al., 2012). Por ejemplo, el hígado es especialmente rico en vitamina A, y además tiene un proporción mayor de ácidos insaturados que de saturados (FAO, 2010a); la sangre es rica en proteína, zinc, hierro o vitamina B2 (Ockerman & Hansen, 2000; Toldra, Aristoy, Mora, & Reig, 2012); la cola, el hígado, las orejas y los pies de las reses poseen poca carne pero un gran contenido en colágeno (Ünsal & Aktaş, 2003); y el menor contenido en proteína se encuentra en el cerebro, las tripas y el tejido adiposo (K. Jayathilakan et al., 2012), en dónde mayor cantidad de lípidos puede ser detectada. Por tanto, a parte de su consumo directo, que no se produce debido a que no se elaboran tradicionalmente apenas platos con vísceras en nuestra gastronomía, se hace necesario el desarrollo de nuevas tecnologías que exploten estos subproductos para obtener el máximo beneficio. A continuación se describen los potenciales usos de estos en la Tabla 1. Aunque los elementos comercializados son los de más valor, también se podrían encontrar aplicaciones para los subproductos y por tanto revalorizarlos (K. Jayathilakan et al., 2012). Con un mejor aprovechamiento de estos podríamos cubrir los costes del sacrificio y los costes de contaminación y depósito de basuras.

A pesar de los riesgos medioambientales asociados que conlleva este tipo de productos, cada vez más se reconoce su potencial para ser reciclados o convertidos en productos de valor añadido, representando una gran oportunidad económica (Inkelaar & Fortuin, 1969).

Usos potenciales y preparación de los co-productos aptos para consumo humano		
Tipo de carne	Almacenamiento y preparación	Manera en qué se usa
Hígado	Congelado, fresco o refrigerado	A la brasa, asado, paté, salchicha
Riñones	Enteros, troceados, picados	Asados, a la brasa, en sopa y estofados
Corazón	Entero, troceado, congelado, fresco o refrigerado	A la brasa, fiambre, paté
Cerebro	Entero o troceado	En salchicha, asado, a la brasa, hervido
Lengua	Congelado, fresco o refrigerado. Entera.	Curada, en salchicha (ingrediente y revestimiento)
Estómago	Fresco, refrigerado, ahumado y en vinagre	Asado, en salchicha (ingrediente, revestimiento)
Bazo	Fresco, refrigerado, precocinado	Frito, en empanada, en morcilla
Cola	Congelada, fresca o refrigerada	Cocinada en agua con sal
Intestinos	Enteros, congelados, frescos, refrigerados, se limpian y salan	Revestimiento salchichas
Carrillera y cabeza	Congelados, frescos o refrigerados	En salchicha
Oreja	Congelada, fresca o refrigerada	Ahumada y salada, guisada con pezuñas
Piel	Fresca, refrigerada	Gelatina
Pezuñas	Congeladas, frescas o refrigeradas	Gelatina, en vinagre, hervidas, fritas
Grasa	Congelada, fresca o refrigerada	Manteca
Sangre	Congelada, refrigerada	Morcilla, salchicha, estofado de sangre y cebada
Hueso	Congelado, fresco o refrigerado	Gelatina, sopa, render
Pulmón	Congelado, refrigerado o fresco	Preparación de productos de sangre, comida de mascotas

Tabla 1. Usos potenciales y preparación de los co-productos aptos para consumo humano Esta tabla es una modificación de otra extraída de (Ockerman & Hansen, 2000).

2.2. Estructura de las proteínas

Uno de los principales intereses de extraer proteínas a partir de subproductos de la industria cárnica, es aprovechar sus propiedades tecnológicas para su empleo como ingredientes en el proceso de elaboración de productos alimentarios (como pueden ser salchichas o hamburguesas) con el objetivo de mejorar las características del producto final. Las proteínas pertenecen a los compuestos orgánicos llamados poliamidas y son en esencia, condensaciones de polímeros aminoacídicos. Consisten en carbón, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno; pudiendo incorporar a su estructura otros elementos como sulfuro, fósforo o hierro. Son macromoléculas formadas por aminoácidos que se unen mediante su parte

carboxil (-COOH) con la parte amino del siguiente aminoácido (-NH₂), estas uniones son denominadas "enlaces peptídicos". Un péptido no es más que la unión de dos aminoácidos por medio de dicho enlace. Los péptidos que contienen entre 50 y 80 aminoácidos son denominados polipéptidos y los que contienen más de 80 son ya considerados proteínas. Cada proteína posee un peso molecular, que se mide en relación con el átomo del carbono 12. Esta masa molecular se expresa en Daltons (Da) o KiloDaltons (kDa) y 1Da equivale a una doceava parte de la masa de un átomo de carbono 12 ($1.6 \cdot 10^{-24} \text{g}$) (BALDWIN & Sinthavalai, 1974).

En las proteínas, los grupos hidrofílicos miran hacia fuera mientras que los lipofílicos lo hacen hacia dentro. De esta manera se explican las 4 diferentes estructuras que puede poseer una proteína (BALDWIN & Sinthavalai, 1974):

- 1. Estructura primaria:** Consiste en una cadena de polipéptidos lineal y sin ramificaciones y no hay uniones o fuerzas implicadas en esta estructura.
- 2. Estructura Secundaria:** Consiste en un patrón plegable, bien en hélice alfa o en lámina beta, estabilizado mediante puentes de hidrógeno que unen los grupos amino de los enlaces peptídicos. La formación de una u otra estructura depende de la secuencia de aminoácidos de la estructura primaria.
- 3. Estructura Terciaria:** Esta estructura se estabiliza mediante diversas uniones: enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Típicamente, la estructura terciaria de las proteínas puede dividirse en estructura globular o fibrilar. El plegamiento de la proteína en esta estructura no es predecible, como ocurría en los dos casos anteriores.
- 4. Estructura Cuaternaria:** Se obtiene cuando dos o más cadenas polipeptídicas funcionan como una sola unidad, creando una estructura oligomérica estabilizada por enlaces no covalentes.

Cambios en las estructuras secundaria, terciaria o cuaternaria se denominan desnaturalización. Estos cambios pueden tener lugar por el impacto de temperatura, pH, altas concentraciones de sal o bajas concentraciones de actividad del agua. Por causa de estos cambios la

proteína pierde su forma nativa y su actividad biológica se pierde. La desnaturalización generalmente es irreversible y las estructuras terciaria y cuaternaria son las primeras afectadas. Normalmente la estructura primaria no se ve afectada por la desnaturalización (BALDWIN & Sinthavalai, 1974).

Cuándo extraemos proteínas las sometemos, habitualmente, a diferentes tratamientos que suponen su exposición a ácidos, bases, y temperaturas y presiones extremas. Tras estos tratamientos las proteínas pueden ver dañada alguna de sus estructuras y por tanto su función se verá alterada, llegando incluso a perderla por completo. Las proteínas cuentan con un amplio rango de propiedades tales como la absorción y retención de agua, dispersabilidad, solubilidad, viscosidad, gelificación, formación de estructuras diferentes (fibras y pastas proteicas por ejemplo), emulsificación y espumantes (BALDWIN & Sinthavalai, 1974). De estas propiedades, las que consideramos más importantes para los fines de la industria cárnica son las siguientes: emulsionantes, gelificantes, retención de agua y aceite y textura, así como también buscamos el mantenimiento del color en el producto final y su mejora de las propiedades organolépticas. De forma ideal, las proteínas además, deben presentar un buen perfil de aminoácidos, es decir, un alto contenido en aminoácidos esenciales que mantengan el alto valor nutritivo de las proteínas cárnica (Mokrzycki & Tatol, 2011). Sin embargo, de forma habitual, en las extracciones de proteínas se obtienen mezclas de proteínas, siendo complejo o económicamente inviable el hecho de obtener proteínas altamente purificadas. Por este motivo, el extracto final conseguido presenta una mezcla de las propiedades funcionales de todas las proteínas extraídas. En estas mezclas hay presentes, además, cantidades apreciables de glúcidos, polifenoles, lípidos o sales minerales; compuestos que puede afectar, de forma negativa o positiva, a las propiedades funcionales de las proteínas extraídas (Ockerman & Hansen, 2000; Omana, Xu, Moayed, & Betti, 2010). Precisamente por este motivo, es importante que los procesos de extracción maximicen las propiedades de las proteínas extraídas, y minimicen el impacto negativo que puedan sufrir.

2.3. Propiedades tecno-funcionales de las proteínas

En este trabajo como materia prima se ha empleado uno de los coproductos menos revalorizados y de más fácil recolección en la industria cárnica: el pulmón porcino y bovino. Actualmente, estos órganos son empleados como aporte de proteína para alimento de mascotas, lo cual reporta un bajo beneficio a la empresa. El contenido proteico del pulmón es de 170 g Kg^{-1} y se puede recuperar gran cantidad de la proteína durante la extracción, aunque posee un gran porcentaje de tejido conectivo, unos $150\text{-}205 \text{ g Kg}^{-1}$ de proteína total. Este tejido conectivo precipita por centrifugación tras el proceso de extracción y tiene aplicaciones biomédicas.

Solubilidad

Para entender el proceso de extracción de proteínas se deben entender las propiedades de estas y su interacción con el medio cuando se encuentran en disolución acuosa.

El agua, desde el punto de vista alimentario no contribuye al valor nutricional del alimento pero sin embargo es un elemento importante ya que el contenido de agua de dicho alimento influye tanto en el peso final de este, y por tanto en su valor, como también en las características sensoriales del producto final. Comúnmente se añade agua a los productos cárnicos, ya que aumenta el peso sin contribuir al contenido calórico del producto final y mejora el rendimiento económico. Las proteínas del músculo cárnico tienen gran capacidad de retención de agua, pero, normalmente, se requiere la adición de productos que eviten las pérdidas de agua en el producto final. Debido a la estructura que presenta la molécula de agua, donde se agrupan las cargas negativas del oxígeno y las positivas del hidrógeno formando un dipolo, las moléculas de agua establecen interacciones de puentes de hidrógeno entre los dipolos, pero también con otras moléculas cargadas positiva o negativamente, lo que la hace un medio perfecto para disolver o re suspender compuestos como proteínas, sales o azúcares. Estas aplicaciones son muy importantes en la Industria alimentaria, ya que cuando las proteínas tienen carga, pueden interactuar con los dipolos de agua, generando interacciones electrostáticas (Gogate, Mujumdar, Thampi, Wilhelm, & Pandit, 2004).

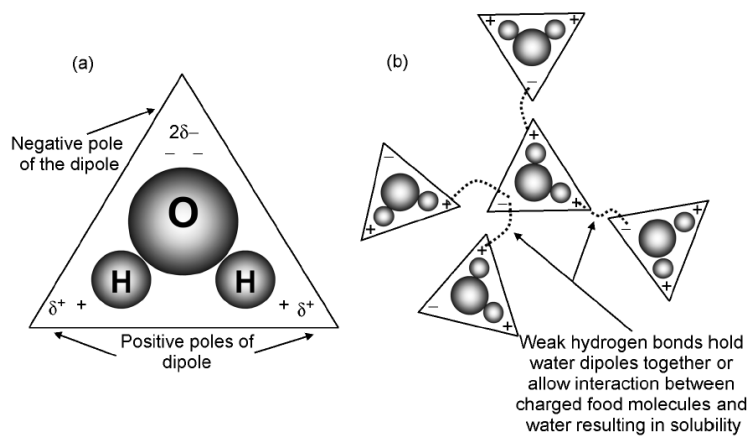


Figura 1. Interacción de los dipolos de agua.

La solubilidad de las proteínas depende de la suma de cargas eléctricas que presente el conjunto de su amino ácidos, la cual depende del pH del medio en que se encuentre. El valor del pH en el que la suma de todas las cargas de una proteína es igual a cero se le denomina pH isoeléctrico, para el cual la proteína presenta su mínima solubilidad y por tanto, tiende a precipitar.

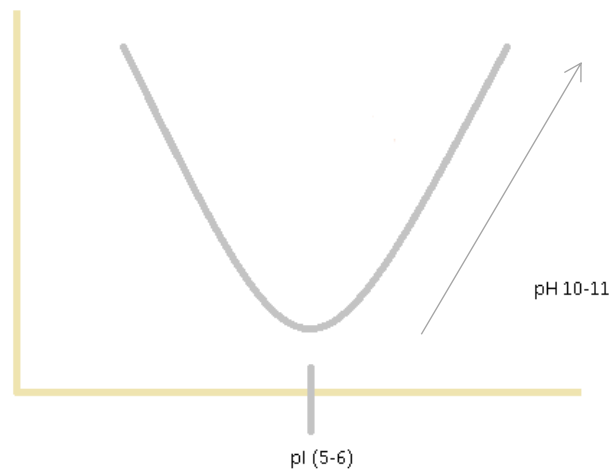


Figura 2. Solubilidad de las proteínas en función del cambio de pH.

Mediante la adición de ácidos, o en este caso bases, se consigue variar el pH y que la solubilidad de la proteína aumente. Esto ocurre dado que, dependiendo de la cadena que tenga unidad el carbón central del átomo de un aminoácido, las proteínas pueden quedar electrostáticamente cargadas

(positiva o negativamente). Cuando están cargadas, establecen interacciones múltiples de puentes de hidrógeno con las diferentes moléculas de agua, y, aunque estas interacciones son de carácter débil, al producirse tantas, consiguen estabilizar a la proteína en la disolución (Ünsal & Aktaş, 2003). Cuando añadimos un ácido a la solución, este se disocia formando un ion positivo de hidronio (H_3O^+), que neutraliza cargas negativas de la proteína y le confiere un estado de carga positiva. En la presencia de una base, por el contrario, la proteína se carga negativamente, ya que la base incrementará el número de cargas negativas en la superficie de la proteína. Tanto como aumenten las cargas positivas o negativas de la proteína, lo harán las interacciones electrostáticas de esta con los dipolos de agua, y por tanto, las interacciones hidrofóbicas entre proteínas (que provocan la agregación de estas) se reducirán, aumentando su solubilidad. Se podría decir entonces, que cuánto más aumentan las cargas de una proteína, más soluble será, y es por ello, que en el mencionado punto isoeléctrico o pI la solubilidad es la menor que puede presentar dicha proteína, ya que la suma de todas sus cargas en ese punto son cero (Ünsal & Aktaş, 2003).

En estas soluciones, podremos encontrar entre otras, tres grandes clases de proteínas (Ünsal & Aktaş, 2003):

1. **Proteínas miofibrilares:** Son proteínas compuestas por miofibrillas, solubles en soluciones salinas concentradas. Las miofibrillas están compuestas de miofilamentos ultramicroscópicos, uno grueso y otro fino, llamados miosina y actina respectivamente. Estos miofilamentos son responsables de las propiedades funcionales de la carne, también intervienen en los procesos de contracción del músculo, iniciadas por las proteínas reguladoras llamadas tropomiosina y troponina. El conjunto de estos miofilamentos forma sarcómeros, y el conjunto de estos, miofibrillas. Estos conjuntos se forman gracias a la unión que se establece de tejido conectivo o proteínas de estroma.

2. **Proteínas sarcoplasmáticas:** Son solubles en soluciones salinas diluidas y corresponden a mioalbuminas, globulinas y enzimas. Se localizan en el interior de las células musculares o miocitos.
3. **Tejido conectivo o estroma:** Son insolubles en soluciones salinas concentradas, pero se vuelven solubles cuando son tratadas con calor a 80°C. El ejemplo más claro de este tipo de proteínas es el colágeno y todas sus variedades.

Al solubilizar las proteínas, nos encontramos con hay proteína que no solubiliza, en su mayoría se trata del colágeno, una proteína que es prácticamente insoluble. Es una parte importante del tejido conectivo y se encuentra en ligamentos, tendones, piel, y otro tipo de tejidos con función mecánica y estructural. De la proteína presente en este tipo de muestras, el colágeno representa un tercio de esta, y está formado por diferentes tipos de proteínas (BALDWIN & Sinthavalai, 1974). Uno de los mayores componentes del colágeno es el aminoácido hidroxiprolina, que se encuentra presente al 12.5%. También los aminoácidos prolina y glicina están presentes en el colágeno en torno al 45-50%. Habitualmente, la secuencia de aminoácidos en el colágeno es Gly-Pro-X o Gly-X-Hyp, en dónde la X representa a cualquier otro de los residuos aminoácidos (Feiner, 2006). Las unidades que forman el colágeno son denominadas tropocolágeno, que es triple hélice dextrógira formada por tres proteínas entrelazadas. Las moléculas de tropocolágeno se alinean para formar el colágeno. Cada triple hélice de tropocolágeno está formada por tres hélices levógiras de procolágeno. El colágeno es insoluble en agua, aún con tratamientos que incluyan sales o fosfatos, sin embargo las hélices de procolágeno si lo son. Cuando se expone el colágeno a altas temperaturas durante un tiempo prolongado se produce una gelatina que al enfriar producirá un gel.

Propiedades emulsionantes e hidrofobicidad de superficie

Una emulsión es definida como un sistema de dos fases en la que participan dos fluidos inmiscibles, y en el que uno de ellos (fase dispersa) se encuentra distribuido en forma de gotas en el otro (fase continua). Las emulsiones son muy inestables termodinámicamente, y normalmente tienen

tendencia a separarse, lo que conduce a su desestabilización, y finalmente a la formación de dos fases bien diferenciadas. Sin embargo, las proteínas, moléculas anfifílicas, pueden estabilizar dichas emulsiones reduciendo la tensión superficial, debido a lo que se denomina como hidrofobicidad de superficie (O'Riordan, Kinsella, Mulvihill, & Morrissey, 1989). Se ha estudiado la hidrofobicidad de superficie en proteínas de diferentes procedencias (soja, huevo, bovinas...) y las procedentes de pulmón bovino han sido caracterizadas como las que daban lugar a mejores emulsiones, solo por detrás de las extraídas de la soja. Podríamos concluir entonces que las proteínas del pulmón son un buen agente emulsionante (Darine, Christophe, & Gholamreza, 2010). De acuerdo con (Dickinson, 1992), una buena emulsión debe poseer una buena hidrofobicidad de superficie, sin embargo, en lo tocante a las propiedades espumantes, se concluyó que estas no están fuertemente relacionadas con la hidrofobicidad. Quizás debido a que, por sus condiciones de moléculas hidrofóbicas, las proteínas penetran bien en las burbujas de aceite para dar lugar a emulsiones, pero cuando esas burbujas son de aire esa penetración es más reducida (Van, 2001). Esta alta hidrofobicidad se debe también a que conjuntamente con las proteínas encontramos lípidos, y esto podría deberse a la presencia de unas proteínas biosurfactantes que se encuentran en los pulmones. Estas, son unas lipoproteínas con alto contenido en fosfolípidos hidrofóbicos (Galdston, Shah, & Shinowara, 1969).

Propiedades espumantes

La espuma es un sistema de dos fases en el que una fase es gaseosa (aire) y la otra una fase líquida laminar de gran viscosidad y en la que se encuentran disueltas las proteínas. La capacidad espumante de una proteína es la cantidad de espuma formada por el volumen de la disolución, representa la interacción entre la solución de proteínas y el aire. La estabilidad de la espuma es un factor importante, y viene dado por el tiempo que la espuma es capaz de mantener su volumen. Las proteínas suelen mantener sus capacidades espumantes cuánto más cerca se encuentre el pH de la disolución al pI de la proteína. La espuma puede resultar deseable en algún tipo de alimentos de la industria alimentaria, pero excesivas capacidades espumantes pueden llegar a resultar

indeseables en otros procesos alimentarios (S. A. Lynch, Mullen, O'Neill, & García, 2017).

Propiedades gelificantes

Un gel de proteínas se podría definir como una estructura en la cual tienen lugar interacciones polímero-polímero y polímero-solvente, de una manera ordenada y dando lugar a grandes retenciones de líquido por pequeñas cantidades de proteínas. Las uniones entre los polipéptidos son esenciales para la formación de geles, como también lo será la fluidez del del solvente que van a inmovilizar. Esto confiere a los geles sus características de elasticidad y fuerza (S. Lynch, Mullen, O'Neill, & Álvarez, 2017).

Potenciales aplicaciones de las proteínas de sangre		
Comida	Propiedad funcional requerida	Proteína más óptima
Condimento ensaladas	Emulsión, viscosidad	Fibrinógeno, plasma, globulinas, hemoglobina, células rojas
Productos cárnicos	Absorción agua, gelificación, absorción de grasa, emulsificación	Plasma, globulinas, fibrinógeno, hemoglobina
Tartas y pasteles	Espumante, color, absorción de grasa	Globina roja, fibrinógeno, plasma, hemoglobina
Galletas	Solubilidad	Plasma, globulinas, albúmina, hemoglobina
Yogurt	Solubilidad, gelificante, emulsión	Plasma, globulinas, albúmina, hemoglobina
Bebidas	Solubilidad	Plasma, globulinas, albúmina, hemoglobina
Helado	Emulsión, espumante	Fibrinógeno, plasma, globulinas
Comidas simuladas	Formación fibras	Fibrinógeno
Batidos proteínicos	Espumante, solubilidad	Plasma, globulina amarilla
Gelatina, geles	Gelificación	Globulinas, fibrinógeno, albúmina
Sopas	Solubilidad, gelificante, viscosidad	Fibrinógeno, plasma, globulinas, hemoglobina, células rojas
Formulación de comidas	Solubilidad	Plasma, globulinas, albúmina, hemoglobina
Alimento animal	Nutritivas	Plasma, células rojas, albúmina, hemoglobina, globina
Comida de mascotas	Palatabilidad	Plasma, células rojas, hemoglobina, globina

Tabla 2. Potenciales aplicaciones de las proteínas de la sangre. Extraída del artículo de (S. Lynch et al., 2017).

2.4. Solubilización y precipitación a pH isoelectrico o ISP.

Este método de extracción es un proceso muy generalizado, bastante conocido y que ha sido ampliamente usado para extraer proteínas de diferentes procedencias, pero, concretamente en carnes animales su

aplicación ha consistido en extracciones en corazón (Dewitt, Gomez, & James, 2002), pulmón (Darine et al., 2010) y pollo (Omana et al., 2010). También en pescados como en la trucha (Chen, Tou, & Jaczynski, 2007) y la tilapia (Kristinsson & Ingadottir, 2006).

El método consiste en homogeneizar la muestra, en este caso de carne, en una disolución alcalina (empleando generalmente hidróxido sódico como reactivo) hasta obtener un pH tal que se pueda inducir la solubilización de las proteínas presentes en la carne en la solución acuosa. Esta disolución se centrifuga y se elimina los materiales no solubles, reservando un extracto rico en proteínas solubles. Seguidamente, el pH de este extracto se modifica hasta el pH original de la muestra mediante la adición de ácido clorhídrico, lo que provoca que las proteínas se vuelvan insolubles y se puedan recuperar fácilmente mediante centrifugación, filtración o secado.

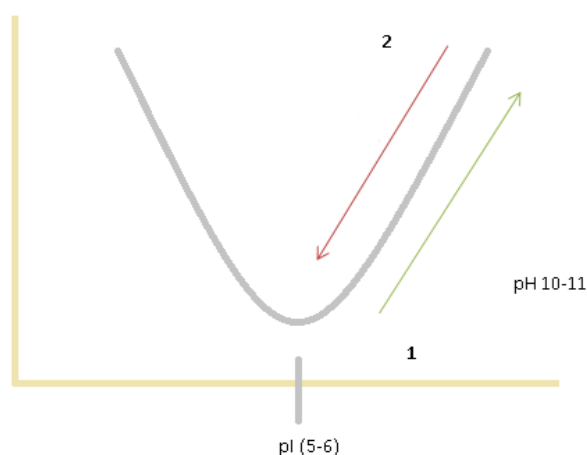


Figura 3. Método ISP.

La solubilidad de una proteína depende en gran medida del pH del medio en el que se encuentre. Según la composición de amino ácidos y la estructura de la proteína, su carga se ve afectada por el pH del medio; cuando la carga neta es cero la solubilidad de la proteína es mínima debido a efecto de agregación y atracción entre las diferentes moléculas. A este pH se le conoce como pH isoelectrónico (pI). A medida que el valor de pH se aleja del pHi, las proteínas adquieren cargas negativas o positivas dependiendo de la alcalinidad o acidez del medio. Así, al cargarse con signo positivo o negativo, los efectos de repulsión entre moléculas se hacen patentes,

favoreciendo la solvatación y posterior solubilización. En el caso particular de las proteínas musculares, el pI se encuentra en un rango de valores entre 5 y 6, y a medida que el pH se hace más ácido o alcalino, la solubilidad de dichas proteínas se incrementa. Este cambio de la solubilidad es reversible, y este efecto es en el que se basa la extracción a pH isoelectrico (Figura 3). Aislar proteínas por el método de adición de ácidos o bases es un proceso que no necesariamente implica el uso de altas temperaturas, y en el que los rendimientos de los procesos de extracción se ven influenciados, en mayor o menor medida, por las condiciones en las que dicha extracción se produzca (temperatura, fuerza iónica, ratio del solvente de extracción y la naturaleza de la materia prima).

El método ISP ha sido usado por (Darine et al., 2010; Selmane, Christophe, & Gholamreza, 2008), que utilizó soluciones alcalinas para extraer proteína de pulmón bovino y determinó los factores claves para dicha extracción. Se concluyó entonces, que el pH era crítico para el proceso de extracción, y, en menor medida, también lo eran el tiempo y la temperatura. El trabajo posterior de Sarah Lynch determina que el SSR o ratio de solvente de extracción también resultaría clave en el proceso de extracción. Para estudiar esto se utilizó un método llamado RSM o Response Surface Methodology, que es un método estadístico que se usa para calcular las condiciones óptimas de operación e identificar las interacciones entre las diferentes condiciones del proceso (R. L. Mason, Gunst, & Hess, 2003). Este método ha sido ya usado para optimizar la recuperación de proteínas de otras fuentes como las de la membrana de huevo (Mohammadi et al., 2016), las de las semillas de sandía (Wani, Kaur, Ahmed, & Sogi, 2008) y las de los pimientos rojos (Firatligil-Durmus & Evranuz, 2010).

Una vez obtenido el modelo matemático que describe el efecto de cada uno de los parámetros en el rendimiento final, se seleccionaron cinco puntos de validación del proceso. De este modo, se pudo concluir que el modelo desarrollado era un buen descriptor de los rendimientos observados. En la Tabla 3 se muestran los 5 puntos de validación y los valores de cada uno de los parámetros estudiados. Así mismo se muestran los valores predichos por el modelo y los obtenidos experimentalmente. Estos puntos fueron diseñados bajo diferentes restricciones de interés industrial, tales como los

pH no muy extremos, el bajo consumo de solventes y el empleo de temperatura ambiente.

ID	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	pH	Ratio de solvente (SSR)	Deseabilidad	Rendimiento esperado	Rendimiento obtenido (g.kg-1)	
							Bovino	Porcino
MV-1	140	19	10,8	13,02	1	65,53	661 (24) ^a	686 (13) ^a
MV-2	120	20	8,6	10	0,714	55,59	598 (33) ^a	591 (58) ^a
MV-3	60	20	8,4	10	0,662	53,91	542 (19)	
MV-4	167	20	9,5	14,98	0,908	61,92	655 (10)	
MV-5	120	20	11	7,5	0,87	60,66	611 (41)	

Tabla 3. Condiciones de extracción más óptimas diseñadas por RSM. Extraída del trabajo de Sarah A. Lynch.

Con respecto al cambio de escala, los puntos de evaluación mencionados, ya han sido llevados a cabo en volúmenes de 2 litros. Se ha observado, en trabajos realizados en este departamento, que no ha habido cambios significativos en el rendimiento del proceso a pesar del aumento de volumen. Sin embargo, no ha sido probado todavía a escala de planta piloto (40L) y por tanto, aunque se prevé que los rendimientos también se mantengan, ya que se trata de un método muy optimizado, este punto será uno de los que ocupen a este trabajo.

2.5. Ultrasonidos

La industria alimentaria está en constante búsqueda de nuevas o emergentes tecnologías que faciliten el procesamiento de los alimentos para obtener a la vez un mayor beneficio de estos, permitiéndoles a la vez conservar sus características y propiedades intactas (Ashokkumar et al., 2008). Aunque muchas de estas tecnologías no son exactamente novedosas, no han sido suficientemente estudiadas para su aplicación en la

industria alimentaria. Los significativos avances tecnológicos de las últimas décadas, conjuntamente con el hecho de que muchos de ellos van reduciendo el valor del binomio coste-eficiencia (y que cada vez son más respetuosos con el medio ambiente) llevan de nuevo al estudio de dichas tecnologías para su aplicación en el ámbito alimentario. Ejemplos de estas tecnologías son el uso de altas presiones hidrostáticas, pulsos de campos eléctricos, microondas, condiciones sub-críticas, o como en el caso de este trabajo los ultrasonidos.

Los ultrasonidos son un conjunto de ondas mecánicas, cuya frecuencia es superior a la percibida por el oído humano ($<16\text{kHz}$). Esas ondas viajan por la superficie y del material a una velocidad determinada dependiendo de la naturaleza de este (Knorr, Zenker, Heinz, & Lee, 2004; T. Mason, 1998; Povey & McClements, 1988). Los ultrasonidos pueden dividirse en diferentes frecuencias, siendo las más habituales en tecnología de los alimentos las de alta frecuencia (100 kHz-1 MHz) y poca potencia ($<1\text{W cm}^{-2}$), ya que se requiere que la muestra no se deteriore o modifique demasiado (Demirdöven & Baysal, 2008) y estas bajas potencias son las más adecuadas, ya que generan poco calor y su efecto en la estructura de los compuestos de interés es mínima. Durante el tratamiento de muestras líquidas con ultrasonidos se producen efectos de rarefacción y compresión. A frecuencias adecuadas los ciclos de rarefacción exceden a las fuerzas de atracción de las moléculas del agua, formándose burbujas de cavitación a partir de un núcleo gaseoso presente en la muestra. Estas burbujas se distribuyen por todo el líquido y aumentan de tamaño hasta que finalmente colapsan (Barbosa-Cánovas & Rodríguez, 2002; T. Mason, 1998; Shukla, 1992). La implosión de estas burbujas produce acumulaciones de energía en determinados puntos, generando temperaturas y presiones extremas, que producen altas tensiones de ondas de energía y turbulencia en la zona de la cavitación, lo que origina unos esfuerzos cortantes muy elevados (Patist & Bates, 2008).

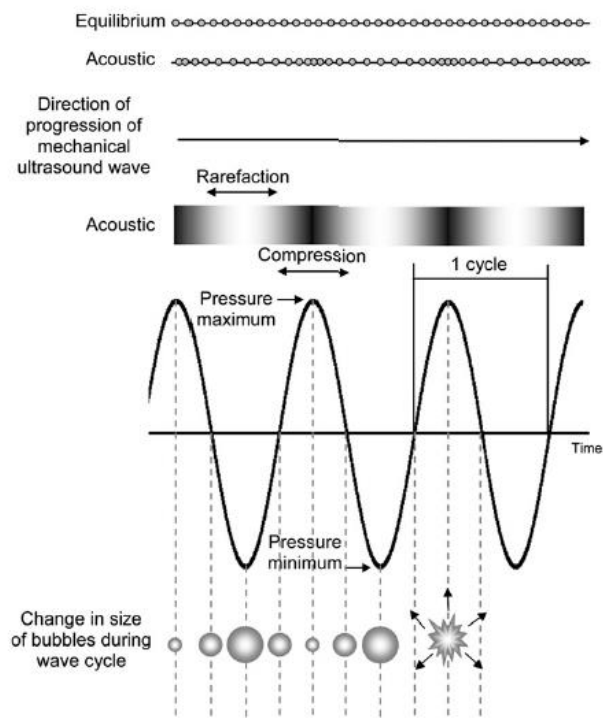


Fig. 1. Ultrasonic cavitation.

Figura 4. Efecto de los ultrasonidos y cavitación. Extraído de (Soria & Villamiel, 2010).

Como resultado de la variación de tamaño de las burbujas y de su colapso implícito, se forman fuertes micro-corrientes, asociadas a las altas velocidades y al estrés de corte producido por los ultrasonidos (Suslick, 1988). Además, cabe mencionar que parte de esa energía acústica puede ser absorbida como calor y que se pueden llegar a romper las moléculas de agua formando radicales libres que potencialmente pueden llegar modificar a otras moléculas mediante oxidación (Riesz & Kondo, 1992; Villamiel & de Jong, 2000). Todos los efectos mencionados anteriormente darán lugar a una mejor difusión de la materia, una degradación de la matriz y por tanto incrementando la transferencia (Ji, Lu, Cai, & Xu, 2006) ya que el solvente puede penetrar en mayor profundidad. Asimismo, al romperse las paredes de las células de la muestra, durante la cavitación, se facilita la liberación de los compuestos de interés al medio (Dolatowski, Stadnik, & Stasiak, 2007). El interés en el desarrollo de las extracciones asistidas con esta técnica recae en la posibilidad de reducir el tiempo de extracción a la par que se aumenta el rendimiento (Dolatowski et al., 2007) Mason, T., Riera, E., Vercet, A., & Lopez-Buesa, P. (2005). Application of ultrasound. In D. W.

Sun (Ed.), *Emerging technologies for food processing* (pp. 323e350). California: Elsevier Academic Press. Además, en algunos casos incluso podrían substituirse los solventes orgánicos, usados en ocasiones para las extracciones, por otros solventes reconocidos generalmente como seguros (denominados GRAS en EEUU), lo que reportaría beneficios económicos y medioambientales, pero también en términos de salud y seguridad alimentaria (Vilkhu, Mawson, Simons, & Bates, 2008). Se han estudiado las diferentes aplicaciones de estos en la industria alimentaria (Vilkhu et al., 2008) y el desarrollo de los ultrasonidos es tal que no resulta descabellado afirmar que pronto resultará rentable realizar extracciones asistidas por ultrasonidos a escala industrial, una vez que el proceso de escalado de los equipos se haya optimizado. (Hielscher (2006)(Vinatoru, 2001). Es este paso el que presenta un mayor desafío para la total implantación de los ultrasonidos a gran escala. Como se puede apreciar en la Figura 5, el uso de ultrasonidos se ha revelado ser útil no tan solo para extracciones, si no que se puede aplicar para análisis, mejorar los tiempos de congelación, modificar la fermentación de ciertos productos o incluso modificar las propiedades funcionales de las proteínas.



Figura 5. Aplicación de los ultrasonidos en Biotecnología alimentaria. Extraído de (Kadam et al., 2015).

Las extracciones de proteínas mediadas por ultrasonidos han sido llevadas a cabo para extraer dichos compuestos de diversas procedencias como la soja (Moulton & Wang, 1982), germen de trigo (Zhu, Sun, & Zhou, 2009), arroz (Chittapalo & Noomhorm, 2009), sorgo (Bean, Ioerger, Park, & Singh, 2006) o colza (Dong et al., 2011). En el trabajo de (Dong et al., 2011) los ultrasonidos contribuyeron a una mejora significativa en las extracciones alcalinas con precipitación ácida de proteínas de colza. Eso se debe a que los procedimientos de extracción suelen comprender una fase de calentamiento y/o agitación, lo que puede ser substituído con ultrasonidos, ya que la energía generada con el colapso de las burbujas de cavitación favorecería la penetración del solvente, a la vez que incrementa la temperatura de la muestra y provoca una constante agitación, y por tanto el intercambio de materia se ve favorecido (Knorr, 2003; Li, Pordesimo, & Weiss, 2004; Yang, 2003). Sin embargo, su aplicación como herramienta de extracción en productos de origen animal, incluyendo co-productos cárnicos, es una vía poco explorada y que merece ser estudiada. Por todo ello, los ultrasonidos de alta intensidad suponen una opción barata, reproducible, simple y eficiente para mejorar el rendimiento de los procesos industriales de extracción (Soria & Villamiel, 2010).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Experimento de optimización con ultrasonidos

3.1.1. Materia prima

La materia prima consistió en pulmones de cerdo que se recolectaron en el matadero emplazado en Teagasc Ashtown (Dublin) y se envasaron al vacío individualmente. Una vez envasados, se guardaron en un congelador industrial (-18 C) hasta su uso para la extracción. Previamente a la extracción, las partes visibles de grasa, tejido conectivo y grandes vías respiratorias fueron retirados con la ayuda de un bisturí. La composición de los pulmones fue determinada (ya en trabajos anteriores) y los valores de grasa, proteína cruda, humedad y cenizas se pueden ver en la tabla 4.

Tipo de muestra	Pulmón troceado		Proteína recuperada	
	Bovino	Porcino	Bovino	Porcino
Proteína total	184 (6) ^a	173 (7) ^b	116 (7) ^c	109 (13) ^c
Grasa	17 (5) ^a	28 (8) ^b	10 (3) ^c	16 (1) ^c
Humedad	779 (9) ^a	784 (7) ^b	863 (6) ^c	843 (10) ^d
Cenizas	11 (1) ^a	12 (2) ^a	5 (2) ^c	4 (1) ^c
Colágeno	46 (3) ^a	34 (5) ^b	ND	ND

Diferentes letras indicant diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

**Tabla 4. Composición de pulmón bovino, porcino y proteínas recuperadas (g kg⁻¹).
Extraída de documentos de Sarah A. Lynch.**

3.1.2. La extracción

La extracción se ha realizado por el método ISP basándonos en la publicación de Sarah A. Lynch y en los cinco puntos que en ella aparecen como los más óptimos para el proceso, para realizar una variante con ultrasonidos. Para ello, se han pesado 15g (pesados con una balanza de precisión de marca AND HR-200) de muestra inicial (de pulmones porcinos) a los que se les añade el volumen de agua destilada (procedente de un destilador Siemens) correspondiente a su ratio de solvente (SSR), tal y

como figura en las Tablas 5 y 6 (el agua destilada y la carne han sido homogenizadas con una batidora); el ajuste de pH se ha realizado con una disolución preparada en el laboratorio de 0.1Molar de NaOH, pero también es usada una de 0.01 molar de NaOH para acabar de ajustar cuando nos acercamos al límite y una 0.01molar de HCl en caso de rebasar el pH que necesitamos. Durante todo el proceso la muestra es agitada con un imán en una placa Heidolph MR 3001.El pH se ha medido con un pHímetro HANNA , para cada una de las tres condiciones que se analizan y que están reflejadas también en la Tabla 5 y 6.

Se estudian 3 condiciones para cada prueba de ultrasonidos durante tres tiempos que son iguales para cada condición extracción; para cada tiempo se elaboran dos réplicas. Dichas condiciones han sido seleccionadas en base a trabajos previos dónde se determinaron los valores óptimos de pH, temperatura y SSR de extracción (Condición 1). Adicionalmente, otros dos puntos de rendimiento inferior (Condiciones 2 y 3), empleados para validar el modelo matemático (RSM) asociado al proceso de extracción, fueron analizados también. Los resultados obtenidos en este trabajo, respecto al rendimiento de la proteína, serán contrastados con los resultados previos obtenidos sin el empleo de US.

1. CONDICIONES DE EXTRACCIÓN EN BAÑO DE ULTRASONIDOS				
CONDICIÓN	TEMPERATURA	pH	SSR	t EXTRACCIÓN
1	20	10.8	13.00	15'
2	20	8.4	10.00	30'
3	20	8	2.5	60'

Tabla 5. Condiciones de extracción en baño de ultrasonidos.

2. CONDICIONES DE EXTRACCIÓN CON LA SONDA DE ULTRASONIDOS

CONDICIÓN	TEMPERATURA	pH	SSR	t EXTRACCIÓN
1	20	10.8	13.00	5'
2	20	8.4	13.00	15'
3	20	8	6.00	30'

Tabla 6. Condiciones de extracción con la sonda de ultrasonidos.

3.1.3. Extracción asistida por ultrasonidos

El efecto de los ultrasonidos en el rendimiento de la extracción de proteínas se estudiará en este apartado. Para ello dos sistemas de ultrasonidos serán comparados: una sonda de ultrasonidos sumergida en la mezcla de extracción y baño de ultrasonidos, en dónde el agua actuará como conductor de las ondas sónicas.



Figura 6. Equipos de ultrasonidos. Sonda de ultrasonidos (izquierda) y baño de ultrasonidos (derecha).

En el primer caso se utiliza un baño de ultrasonidos de marca Fisher Bioblock Scientific a 35 Khz con una potencia máxima del 100% y acoplado a un sistema de refrigeración LAUDA Ecoline Startedition RE 104 para mantener la temperatura entorno a los 20 grados centígrados. En el segundo, se utiliza una sonda Hielscher Ultrasound tech UIP 50 hd transductor a 20 Khz de ultrasonidos industrial conectada a un refrigerador Refriger Grant LTD20G que mantiene la temperatura entre 20-24 grados

centígrados. La amplitud de onda en este caso es del 20%, lo que equivale a 50 μm .

3.1.4. Centrifugación

Todas las muestras han sido centrifugadas con una centrifugadora Sorvall LYNX 6000 Centrifuge a 10.000g durante 10' justo después de terminar el tratamiento de extracción pertinente al que haya sido sometida. Tras la centrifugación se han separado la fase sólida (que está formada mayoritariamente por colágeno y ha sido pesada en la balanza de precisión usada anteriormente) y la líquida (en la que se encuentran las proteínas de interés solubilizadas y que ha sido medida con una probeta). Se han conservado estas dos fracciones separadas en el congelador Bosch hasta ser analizadas.

3.1.5. Determinación de la cantidad de proteína de las muestras

La cantidad de proteína ha sido determinada usando un LECO FP628 (LECO Corp., MI, USA), que es un analizador de proteína que se basa en el método Dumas acorde con el método AOAC 992.15 (1990). Un extracto de la muestra de 0.5 g fue usado para la determinación.

3.1.6. Determinación del tamaño de las proteínas extraídas mediante electroforesis en gel de acrilamida (SDS-page)

Con el objeto de determinar si los ultrasonidos han tenido un impacto en el tamaño de las proteínas extraídas, se procedió a analizar los sobrenadantes y los pellets obtenidos en el paso anterior mediante electroforesis. Se han corrido cuatro geles de SDS page Mini-PROTEAN TGX 4-20% con un aparato de electroforesis BIO-RAD Mini PROTEAN Tetra System y una fuente de alimentación BIO-RAD POWER PAC 1000. Los geles han sido cargados en el orden y con los volúmenes que figuran en la Tabla 7. La nomenclatura de la muestra se lee de la siguiente manera: Primero hace referencia a si es muestra de pellet (P) o sobrenadante (S), luego al tipo de tratamiento, baño de ultrasonidos (B) o sonda (P), seguido del tiempo, que en este caso es 60' en todos los del baño y 30' en todos los de la sonda, y del número de réplica I o II y del número del tratamiento 1/2/3. Por ejemplo: SB60'II1, es

una muestra de sobrenadante, de tratamiento de sesenta minutos con baño de ultrasonidos, réplica II y tratamiento 1.

Gel 1 duplicado				Gel 2 duplicado			
Número de carril	Muestra	Número del carril duplicado	Volumen cargado	Número de carril	Muestra	Número del carril duplicado	Volumen
1	SB60II 1	10	20µl	1	SP30'I1	10	25 µl
2	SB60' II 2	9		2	SP30'I2	9	
3	SB60'I3	8		3	SP30'I3	8	
				4	CN- Carne sin tratar	7	
5	PB60'I1	6	25 µl	5	PP30'I1	6	
6	PB60'II1	5		6	PP30'II1	5	
7	PB60'I2	4		7	PP30'I2	4	
8	PB60'II2	3		8	PP30'II2	3	
9	PB60'I3	2		9	PP30'I3	2	
10	PB60'II3	1		10	PP30'II3	1	

Tabla 7. Orden de carga de geles SDS-PAGE del tratamiento con ultrasonidos.

El gel ha sido corrido en un equipo BIOR-RAD Mini-PROTEAN Tetra System con un generador BIO-RAD POWER PAC 1000 A 2W durante 10 minutos y a 7W durante una hora y cuarto. A continuación, el exceso de SDS (Sodio Dodecil Sulfato) ha sido eliminado con tres lavados de 5 minutos bajo agitación con agua destilada, sumergiéndolos posteriormente en tinción Coomassie Brilliant Blue G (Staining solution) de BIO-RAD durante una hora. Al concluir han sido lavados 3 veces con agua destilada en periodos de cinco minutos hasta que se obtuvo un gel transparente.

3.1.7. Análisis estadístico de los resultados

Se ha hecho un análisis de la varianza (ANOVA), con el programa Minitab 15, de los resultados obtenidos en la determinación de proteína. El nivel de significación empleado es $p = 0.05$. Una vez determinada la diferencia entre muestras, un análisis de Duncan posterior fue realizado para establecer las diferencias entre los diferentes grupos analizados.

3.2. Escalado del experimento

Otro de los desafíos que se encuentran al trabajar con nuevos métodos de extracción es el aumento de escala para su aplicación industrial. En base al método de extracción optimizado por Sarah Lynch para la extracción de proteína de pulmón, se evaluará el impacto del aumento de escala en el rendimiento del proceso. El volumen de extracción será aumentado, de los 2 litros empleados a nivel de laboratorio hasta 40 litros a nivel de planta piloto. En este caso, la extracción se ha realizado por triplicado en una única condición de extracción, que es la que figura en los estudios de Sarah A. Lynch como la más óptima. En ella se han mantenido la temperatura ambiente y el pH a 10.8 y se ha variado el SSR y el tiempo, realizándose la extracción con un SSR de 10.00 y un tiempo de media hora. A pesar de no ser el SSR óptimo que se estudia en el trabajo de Lynch, se adopta este para reducir sensiblemente la cantidad de agua a utilizar, además, de acuerdo con el modelo matemático usado en su trabajo (RSM), este cambio tendrá un impacto mínimo en el rendimiento. Para ello, se han utilizado pulmones de vacuno troceados y agua de consumo.



Figura 7. Equipo Stephan de la planta piloto.

3.2.1. Extracción

Se han homogenizado 3,5 kg de pulmón con 32L de agua en un Stephan, que es un reactor encamisado con agitación de la planta piloto de Teagasc. Tras una homogenización a potencia 2 durante 3 minutos, se procede al ajuste de pH con un pHímetro que se introduce por la válvula de apertura con la que cuenta el reactor. Se adicionan aproximadamente 110 ml de

NaOH 5M para cada una de las réplicas, con el objetivo de alcanzar el pH 10,8 óptimo. Desde el momento en que se ajusta el pH se acciona un temporizador ajustado para 30 minutos y se acciona la potencia 2 del reactor.

3.2.2. Filtrado

Tras la extracción se procede al separado del sobrenadante y los restos sólidos (mayoritariamente compuesto por el colágeno que no ha sido solubilizado en el sobrenadante) de manera manual. Como material filtrante se han empleado cuatro capas de muselina adaptadas al cubo de recolección. Tras esto, de los residuos sólidos se extrae el pellet por centrifugación a 10.000g durante 10 minutos, y se separa del resto del sobrenadante. El peso final de la materia sólida y del sobrenadante han sido registrados para su posterior análisis.



Figura 8. Separación de la parte sólida. Planta piloto.

3.2.3. Análisis

Se miden los volúmenes, se pesan los pellet y se toman muestras (en cada una de las tres extracciones que se realizan) del sobrenadante de cada cubo, de los pellet, y del sobrenadante derivado de la centrifugación del

pellet para ser analizados en el LECO FP628, usado anteriormente, para obtener la concentración de proteína presente en cada una de las muestras recogidas, comprobando así la eficacia de la extracción.

3.2.4. Determinación del tamaño de las proteínas extraídas mediante electroforesis en gel de acrilamida (SDS-page)

Se corrió un gel SDS-PAGE de las mismas características que el anterior para determinar el tamaño de las proteínas, y por ende si están fragmentadas o dañadas tras el proceso.

3.2.5. Análisis estadístico

Todos los resultados han sido analizados exactamente de la misma manera que en el apartado anterior.

3.3. Mediciones texturométricas

3.3.1. Propiedades de las proteínas extraídas

Las proteínas extraídas tanto de las pruebas con ultrasonidos como de la planta piloto son liofilizadas en el liofilizador (Cryodos Testar F80) de la planta piloto. Con el polvo derivado de esto se realizan pruebas para determinar las propiedades funcionales de las proteínas extraídas.

Retención de aceite y agua

Se disponen 0.5g de muestra, medidos con la balanza utilizada anteriormente. A estos se les añaden 10g de agua o de aceite dependiendo de la prueba y se dejan reposar 30 minutos. A continuación, se procede a la centrifugación a 2700g durante treinta minutos, tras haberlo agitado dos veces. Midiendo la cantidad de agua o aceite adicionada antes y después de la centrifugación podremos deducir cuánto es retenido por la muestra, según la siguiente ecuación:

$$\%Retención = \left(1 - \frac{ml \text{ de agua o aceite recuperados}}{ml \text{ de agua o aceite iniciales}}\right) * 100$$

Test de solubilidad

Este análisis se basa en el procedimiento de (Penteado et al., 1979), por el cual se disponen 0.5g de muestra proteínica y se le adicionan 10 ml de agua destilada medida con una probeta. Se realiza para dos pH, 5 y 6, por duplicado. Se homogeniza durante 15 minutos en un homogenizador Heidolph Multi Reaxy, posteriormente se centrifuga a 2400g durante 30 minutos. El sobrenadante es analizado en el LECO para observar cuánta proteína se ha solubilizado.

Gelificación

Se busca la concentración mínima de proteína a la cual se produce la formación de un gel. Para ello preparamos una solución stock al 10%, diluyendo 3.0023g de proteína pesados con balanza de precisión en 30 ml de agua destilada y se ajusta su pH a 6 como en el método usado por (Davila et al., 2007). A partir de esta se preparan soluciones del 2%, 4%, 6%, 8% y 10% (por duplicado) y se llevan a volumen 5ml con agua destilada. Estos, son introducidos en un baño a 85°C durante 30 minutos y llevados posteriormente a la nevera por 24 horas. Al día siguiente se observa la formación de gel. Se considera un gel aquel que permanece estable en el fondo del tubo de ensayo después de invertirlo 180 grados.

Capacidad emulsionante

Se evalúa la emulsión por el método de (Inkelaar & Fortuin, 1969). Se prepara un solvente de NaCl 0.075%. Se preparará una solución stock diluyendo 1 g de proteína en 10 ml del solvente preparado. A partir de la solución stock se prepararán las concentraciones de 2, 4, 5, 6, 8, 10 mg/ml, llevando a volumen 10 ml con el solvente preparado al principio. A cada uno de estos, preparados por duplicado, se le añadirán 13 ml de aceite de colza.

Se homogenizan por 2 minutos para generar una emulsión y se miden los cm de emulsión generados. Posteriormente, se centrifugan a 1200g durante 10 minutos y se vuelven a realizar las medidas de la emulsión. Con esos datos y sabiendo que el diámetro de cada tubo son 2.7 cm se puede calcular que volumen de emulsión se mantiene utilizando la ecuación siguiente:

$$\%Emulsión = \left(\frac{\text{Volumen emulsión (Ve)}}{\text{Volumen aceite añadido (Va)}} \right) * 100$$

Dónde %E es el porcentaje de la emulsión, Ve el volumen emulsionado y Va el volumen de aceite añadido.

Capacidad espumante

Basándonos en el método de (BALDWIN & Sinthavalai, 1974), se mezcla 1 g de muestra de proteína con 100 ml de agua destilada, por duplicado, y se somete al ULTRA Turrax T25 Janke and F, IKA Labortechnik durante 5 minutos. Se realizan medidas de la altura de la capa de espuma en los dos duplicados durante una hora en periodos de 15 minutos, realizándose la primera a partir del primer minuto transcurrido de cada muestra. Sabiendo que el diámetro de cada tubo es de 7.1cm se puede calcular el volumen de espuma en cada caso. El volumen de espuma formado se compara con el volumen inicial de la muestra.

3.3.2. Elaboración de las hamburguesas

Con el objetivo de estudiar el efecto que estas proteínas extraídas de pulmón puedan tener en un producto real, se procedió a emplearlas como ingrediente en la fabricación de un producto tipo como las hamburguesas. La elaboración de las hamburguesas tuvo lugar en laboratorio de productos cárnicos de Teagasc. Allí se picó tanto la carne como la grasa y se elaboraron las hamburguesas siguiendo la receta indicada en la Tabla 8.

	500 gramos		
	Control	10%	20%
Carne de cerdo	75%	65%	55%
Proteína reemplazada (g)	0%	9	18
Agua reemplazada (g)	0%	35	70
Proteína de pulmón añadida	0%	15	30
Grasa de cerdo	25%	25%	25%
Sal contenida en la proteína añadida (g)	0%	6	12
Sal (g)	10	4	-2

Tabla 8. Receta sustitución de proteínas en hamburguesas.

Las proteínas se disolvieron en el agua a adicionar y se procesaron en una batidora para ser posteriormente añadidas a la mezcla de las hamburguesas.

Se prepararon 3 hamburguesas de cada tipo (control, proteína al 10% y proteína al 20%) y se envasaron individualmente al vacío para las posteriores pruebas. De la tercera réplica se extrajo la mitad de la hamburguesa para análisis texturométricos.

3.3.3. Análisis de las hamburguesas y mediciones texturométricas

Se han añadido las proteínas extraídas a la carne de hamburguesa, substituyendo parte de esta por proteína y se han realizado análisis tanto de la composición de estas, como de sus propiedades y de su texturometría.

Cenizas

Se ha medido el contenido de cenizas usando un método de secado de cenizas por el cual se ha registrado el peso de los diferentes vasos (previamente tarados) con la muestra y se han introducido en una estufa durante 6 horas a 105°C para eliminar la humedad. Posteriormente han sido introducidas en la estufa a 590°C durante 18 horas. Han enfriado en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se han vuelto a pesar. De la diferencia de los pesos se deduce el porcentaje de cenizas de cada muestra.

Grasa y humedad

Han sido medidas usando el sistema Smart System 5 Smart Trac 5 Model 907875, CEM Corporation, NC, USA) que consiste en un microondas secador y un NMR Smart Trac rapid Fat Analyzer (CEM Corporation, USA) usando los métodos oficiales de AOAC (1995) para humedad y (1995a) para grasa .

Pérdida de peso por cocción.

Se envasaron al vacío tres hamburguesas por cada tratamiento, individualmente, previo registro de su peso exacto antes de la cocción. Posteriormente se las introdujo envasadas en un baño a 75°C, y con el objetivo de que se alcanzasen 70°C en el centro de cada hamburguesa, se las mantuvo en el baño media hora. Tras dejarlas atemperar, se abrieron

las bolsas y se realizó una segunda pesada, secando cuidadosamente las hamburguesas antes para eliminar el exceso de agua en su superficie (Cofrades, Guerra, Carballo, Fernández-Martín, & Colmenero, 2000). La pérdida por cocción fue calculada aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Pérdida por cocción} = ((\text{Peso crudo} - \text{Peso cocinado}) / \text{Peso crudo}) \times 100$$

Color

Se analiza el color usando el equipo UltraScan Pro Hunterlab (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, VA) conjuntamente con el programa de ordenador Easy Match QC. Este equipo tiene una visión fr 25.54 mm y una luminosidad D65, 10°. El componente especular viene incluido con el equipo (RSEX) y se añade una trampa de luz con una apertura de 0.39”.

Para obtener una superficie plana de medición, las muestras se envuelven en celofán transparente y se moldean manualmente contra una superficie plana. El blanco (L=100) durante el calibrado del equipo fue envuelto en el mismo material para eliminar el ruido de fondo que esto pueda generar. El negro del calibrado corresponde a L=0. Cada muestra se midió cinco veces, siendo cada medida la media de tres mediciones individuales. Los datos se obtuvieron en el sistema Lab: L* (luminosidad), a* (rojez) and b* (amarillez). La diferencia total de color ha sido calculada utilizando esta ecuación (Salgado, Fernández, Drago, & Mauri, 2011):

$$\Delta E = \sqrt{(L_s - L_c)^2 + (a_s - a_c)^2 + (b_s - b_c)^2}$$

Dónde “s” es el valor obtenido por la muestra y “c” es el valor medido en el control.

Dependiendo de los resultados obtenidos concluiremos si las diferencias de color son perceptibles al ojo humano o no de una manera objetiva, teniendo en cuenta que (Mokrzycki & Tatol, 2011):

- Los valores <1 indican que los cambios de color son perceptibles al ojo humano
- Los valores 1<x<3 indican que la diferencia de color es perceptible bajo la mirada entrenada de un experto.

- Los valores >3 indican que las diferencias de color son perceptibles a simple vista.

Retención de agua

Se disponen en un tubo de centrífuga 5g cada una de las de muestra cruda de masa de hamburguesa pesados con balanza de precisión (de las de control, al 10% de proteína y al 20% de proteína) y se le adicionan 10 ml de agua destilada con una pipeta fija de 5 mL. Las muestras se centrifugan 30 minutos a 3000g. El peso del agua no retenida se pesa y se calcula la cantidad de agua retenida por la masa siguiendo el protocolo descrito en la publicación de (Jin et al., 2007), en la que figura la siguiente fórmula:

$$\%Retención\ de\ agua = ((Peso\ inicial - Peso\ final)/Peso\ inicial) \times 100$$

Texturómetro

Podríamos entender la ternura de un alimento como la medida del esfuerzo requerido para dar un mordisco a dicho alimento. La medida de esta propiedad varía según esta se mida en crudo o tras la cocción (Tatake & Pandit, 2002). En estas mediciones mediremos la ternura de las hamburguesas cocinadas con un texturómetro, que evalúa la resistencia al corte de las hamburguesas cocinadas acorde con el método descrito por (A. Herrero et al., 2007), utilizando para ello un texturómetro INSTRON 5543 y el programa Bluehill2 de ordenador. Utilizaremos una celda de $\pm 500N$ combinada con el método WSFP del programa, que hará que la cuchilla baje con una velocidad de corte de 50 mm/ min. Fijamos que la cuchilla baje hasta 24 mm para qué corte la muestra en dos. Cilindros de cada una de las muestras ensayadas se obtienen mediante n sacabocados de 8mm de diámetro. Las muestras empleadas son las hamburguesas previamente cocinadas en el baño de agua. Las muestras se obtienen agujereando con un sacabocas del número 8 cuatro partes de cada uno de los triplicados de las tres condiciones (control, proteína al 10% y proteína al 20%). Se registraron los pesos de cada corte para relacionarlos posteriormente con los resultados obtenidos en la prueba.



Figura 9. Texturómetro.

3.3.4. Análisis estadístico de los resultados

Todas las muestras han sido analizadas estadísticamente con el mismo programa y el mismo nivel de significancia ($p < 0.05$) que en los resultados obtenidos en los otros dos experimentos.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento de extracción

Los experimentos de extracción han sido llevados a cabo siguiendo el modelo matemático RSM, que permite predecir las condiciones óptimas de extracción, ya que evalúa el impacto de cada uno de los parámetros y su interacción. La respuesta en superficie (Figura 10), indica que el pH y el SSR tienen un efecto significativo en el proceso de extracción, puesto que la pendiente de estos dos valores es elevada, tal y como se muestra en el gráfico de perturbación. El proceso de optimización basado en RSM, resultó de la ecuación exponencial que se muestra a continuación, la cual es capaz de predecir el resultado de un proceso de extracción basado en el valor de los factores implicados. Asignando a cada constante un valor específico se puede predecir el rendimiento, y por tanto determinar qué tipo de impacto tienen los ultrasonidos en este proceso; ya que es posible comparar el resultado del modelo con el resultado real.

$$Y = 50.66 + (0.87 * A) + (2.31 * B) + (6.28 * C) + (6.92 * D) + (0.63 * A * B) + (0.18 * A * B) + (0.22 * A * D) - (1.06 * B * C) + (0.041 * B * D) - (0.33 * C * D) - (0.54 * A^2) - (0.90 * B^2) + (0.13 * C^2) - (1.52 * D^2)$$

Dónde:

A = tiempo en minutos

B = temperatura °C

C = pH

D = SSR "solvent sample ratio" o ratio de solvente

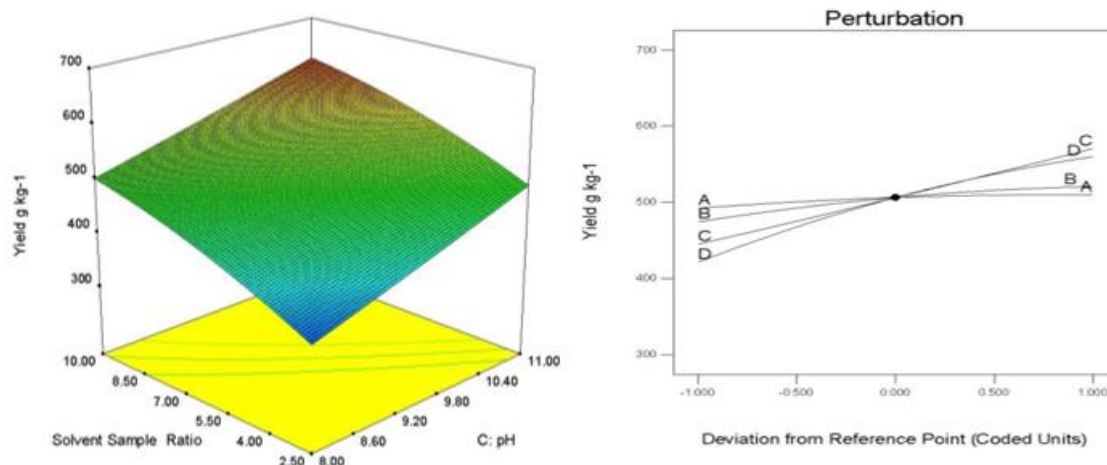


Figura 10. Significancia relativa de los factores en el rendimiento de la solubilidad de proteína. Para los factores: A (Tiempo): 65.0 minutos; B (Temperatura en °C): 12.00; C (pH): 9.50; D(SSR o ratio de solvente):6.25 a 1.

Baño de ultrasonidos

El primer experimento diseñado para comprobar el efecto de los ultrasonidos fue empleando un baño de agua acoplado a un transductor, tal como se especificó en la sección de materiales y métodos. Los resultados obtenidos, en referencia a la proteína extraída, para cada uno de los experimentos, se muestra en la Tabla 9.

		%Proteína solubilizada	%Proteína en pellet
1	B10015'I	83.18	41.58
	B10030'I	80.57	44.46
	B10060'I	86.49	53.62
2	B10015'I	68.94	51.00
	B10030'I	65.48	48.25
	B10060'I	66.39	52.73
3	B10015'I	39.06	44.32
	B10030'I	35.93	43.00
	B10060'I	39.21	46.27

Tabla 9. Porcentaje de proteína solubilizada en el tratamiento del baño de ultrasonidos.

Los resultados obtenidos para la condición I ensayada (pH =10.8; SSR 13), no fueron concluyentes, ya que el balance de materia excede sobradamente los valores de error usuales para este tipo de experimentos. Es probable, que la cantidad de proteína en disolución sea muy baja, menor del 1%, y el error acumulado por el sistema de análisis de proteína (LECO) haya sobreestimado el valor real. Por dichos motivos, a la hora de realizar la discusión de los resultados, este primer experimento no será tomado en consideración. Para la segunda y tercera condición los resultados son razonables, además, se han predicho los rendimientos esperados para cada condición empleando el modelo matemático previamente descrito, para posteriormente compararlos tras haber sido analizados estadísticamente (Tabla 10). Para la segunda condición observamos un aumento de rendimiento con significancia estadística ($p < 0.05$) para todos los tiempos, sin embargo, para la tercera condición en la que el SSR es 2,5 no se observa ninguna mejora del rendimiento, quizás por tratarse de un volumen demasiado pequeño para que los ultrasonidos tengan un efecto apreciable, ya que el volumen de agua disponible es rápidamente saturado.

		Rendimiento de proteína extraída según el modelo matemático (%)			Datos reales obtenidos (%)		
		t=15	t=30	t=60	t=15	t=30	t=60
Baño	I	62.53	63.4	64.41	83.18	80.57	86.49
	II	52.19 ^a	52.91 ^a	53.71 ^a	68.94 ^b	65.48 ^b	66.39 ^b
	III	36.37 ^a	36.94 ^a	37.55 ^a	39.06 ^a	35.93 ^a	39.21 ^a
		t=5	t=15	t=30	t=15	t=30	t=60

Superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 10. Porcentaje de extracción previsto y datos obtenidos reales para el tratamiento del baño de ultrasonidos.

Sonda de ultrasonidos

A la vista de los resultados obtenidos mediante baño de ultrasonidos son estadísticamente mejores, se espera que mediante la aplicación de ultrasonidos por medio de la sonda, los resultados se puedan mejorar notablemente. Cuando una sonda se emplea, la energía se aplica

directamente en el interior de la muestra, por lo que la disipación de la energía es menor y el efecto sobre la matriz, en términos de degradación, agitación e interacción solvente/extracto son mayores. Para ello se empleó una sonda con las condiciones previamente descritas.

Se han ensayado 3 condiciones, la primera idéntica a la ensayada en la primera condición del baño de ultrasonidos, y la segunda y la tercera son variaciones de las condiciones diseñadas por RSM para los trabajos de Lynch. Dichas variaciones aplican restricciones que pueden ser interesantes a nivel industrial, como un menor consumo de agua o pH menos extremos. Solamente han sido ensayadas para el 20% de amplitud, aunque el objetivo inicial era ensayarlas para otras amplitudes como 60% y 100%. La razón principal es que a medida que aumenta la amplitud, la cantidad de energía aplicada a la muestra aumenta en proporción, y como consecuencia, la temperatura final es muy elevada. A dichas temperaturas la estabilidad y estructura de las proteínas a extraer se compromete y por tanto su funcionalidad se vería deteriorada. Aún usando refrigeración resultó imposible contrarrestar el calor generado por la sonda en la muestra a amplitudes superiores al 20%. Los resultados obtenidos se pueden observar en la siguiente tabla (Tabla 11).

	Muestra	%Proteína sobrenadante	%Proteína en pellet
1	P205'I	69.53	33.16
	P2015'I	70.11	41.20
	P2030'I	70.02	42.34
2	P205'I	60.33	43.15
	P2015'I	61.33	39.69
	P2030'I	59.88	39.11
3	P205'I	54.79	43.59
	P2015'I	45.95	31.32
	P2030'I	51.62	45.75

Tabla 11. Porcentaje de proteína solubilizada en el tratamiento de la sonda de ultrasonidos.

Al analizar estadísticamente los resultados obtenidos (Tabla 12) y compararlos con los esperados según el RSM, podemos apreciar que en las tres condiciones se aprecia un aumento de rendimiento bastante uniforme, de entre el 3 y el 7%, al usar esta tecnología. Los mayores rendimientos son los presentados por la primera condición, que fue realizada con SRR de 13 y a pH 10.8, y que coincidía con la óptima diseñada por el modelo matemático. En este caso vemos como el rendimiento aumenta un 7% sobre el esperado y que a partir de la primera media hora no se produce más aumento. Para la segunda condición observamos un efecto similar y en la tercera los datos obtenidos, aunque superan los previstos, tienen demasiada variabilidad, probablemente derivada del tipo de muestra biológica con el que trabajamos, y no nos permiten compararlos entre ellos durante el transcurso del tiempo.

		Rendimiento de proteína extraída según el modelo matemático (%)			Datos reales obtenidos(%)		
		t=5	t=15	t=30	t=5	t=15	t=30
Sonda	I	62.53 ^a	63.4 ^a	64.41 ^a	69.53 ^b	70.11 ^b	70.02 ^b
	II	55.03 ^a	55.81 ^a	56.74 ^a	60.33 ^b	61.33 ^b	59.88 ^b
	III	44.59 ^a	45.22 ^a	45.91 ^a	54.79 ^b	45.95 ^a	51.62 ^b

Superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 12. Porcentaje de extracción previsto y datos obtenidos reales para el tratamiento de la sonda de ultrasonidos.

Los aumentos de rendimiento de extracción son significativos estadísticamente ($p < 0.05$), pero habría que realizar un estudio económico que valorara el gasto extra en refrigeración (para evitar el calentamiento), la inversión en maquinaria y los costes añadidos inherentes a este nuevo proceso. En la bibliografía se reportan posibles soluciones para la mejor distribución de la energía, como por ejemplo la combinación de frecuencias durante el tratamiento de ultrasonidos (Delgadino et al., 2002; Feng et al., 2002; Moholkar, Rekveld, & Warmoeskerken, 2000; Swamy & Narayana, 2001; Tataka & Pandit, 2002). Esto, combinado con el uso de recipientes o reactores con una geometría asimétrica o poligonal con número de caras

impares, según (Gogate et al., 2004), parecen haber resultado en un proceso más efectivo. Aunque, la aplicabilidad industrial de los ultrasonidos se ve dificultada por el escaso uso que se hace de estos a escala industrial, lo que implica que se encuentren en la actualidad pocos equipos de ultrasonidos a gran escala, y que los que hay disponibles cuenten con un precio muy elevado. No se puede concluir dónde resulta más beneficioso el efecto de los ultrasonidos, usando un baño o un sistema de sonda, pues tienen un impacto diferente en el proceso de extracción dependiendo de la condición estudiada. Además, teniendo en cuenta el alto nivel de colágeno del material empleado, su alta resistencia a ser alterado por los ultrasonidos y su baja solubilidad a cualquiera de los pH empleados para la extracción de proteínas, el margen de mejora esperado en la extracción era muy limitado. Los datos obtenidos en estos experimentos demuestran que un aumento de hasta el 7% de la proteína extraída puede ser obtenido, siendo el resto de proteína no solubilizada, como colágeno y proteínas fuertemente adheridas a él.

Geles SDS-PAGE

Se han corrido geles SDS-PAGE en su modalidad desnaturizante y que dejan a la proteína en su estructura primaria, para evaluar posibles alteraciones en el tamaño de las proteínas debido al efecto de los ultrasonidos combinado con pH's extremos. Los perfiles de tamaños obtenidos para las diferentes muestras se pueden ver en la (Figura 11).

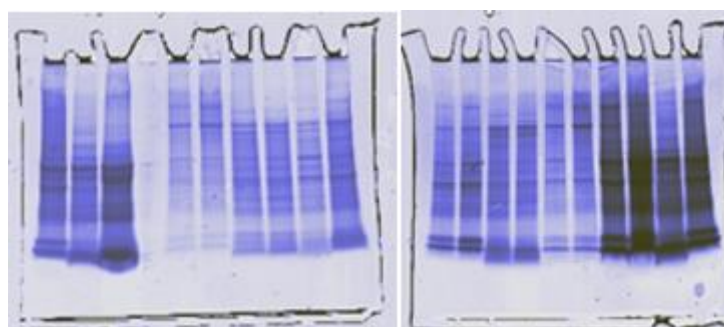


Figura 11. Geles SDS-PAGE para los tratamientos de ultrasonidos. Gel 1 (izquierda) Gel 2 (derecha).

Al comparar los duplicados del gel 1, que corresponden al tratamiento del baño, se puede apreciar que el perfil que presentan las proteínas es idéntico en ambos y si comparamos el sobrenadante (a la izquierda) con el pellet, a la derecha, podemos comprobar que las diferencias entre ellos también es mínima. Lo mismo ocurre al comparar los duplicados del gel 2, que pertenecen al tratamiento con sonda de ultrasonidos, y al comparar los geles 1 y 2. Todos los geles presentan un perfil muy similar (el tamaño de las proteínas es igual tras las extracciones asistidas con sonda y baño, pero también son idénticas a la muestra de carne sin tratar de la calle 4 del gel 2), lo que quiere decir que el tamaño de las proteínas se mantiene en ambos tratamientos y que, por tanto, aunque podría haber cambios a nivel aminoacídico, el hecho de que el tamaño sea similar en todos ellos, es un indicativo de que las proteínas no se han visto modificadas por el uso de ultrasonidos. Al tratarse de un gel desnaturizante el daño en las estructuras de las proteínas no puede ser apreciado por electroforesis. Precisamente por este motivo, un estudio de las propiedades funcionales, para asegurar el impacto de los ultrasonidos en estas proteínas se ha llevado a cabo, cuyos resultados se discutirán más adelante. Para ello, todos los sobrenadantes derivados de este proceso han sido liofilizados para estudiar las propiedades de las proteínas extraídas y su aplicación a un producto cárnico.

4.2. Escalado del experimento de extracción

Uno de los problemas a los que la industria se enfrenta habitualmente es al escalado de procesos. En este caso, la extracción de proteínas mediante ISP, es un buen candidato para ser aplicado a nivel industrial dado la sencillez del proceso y los buenos rendimientos que se pueden obtener (sin tener en cuenta el alto contenido en colágeno de las muestras). Con el fin de determinar el efecto del cambio de escala sobre el rendimiento, fue realizada una extracción a nivel de planta piloto, empleando las condiciones óptimas. Los resultados pueden verse en la Tabla 13 siguiente.

Lote	Extracción de proteínas (%)	Media	SD
1	56.03	60.45	3.86
2	65.44		
3	59.89		

Tabla 13. Porcentaje de proteína solubilizada en el tratamiento de planta piloto.

Durante escalado, que se hizo por triplicado, se obtuvo un rendimiento muy similar al obtenido a nivel de laboratorio y en consonancia con los valores dados por el modelo matemático. En el escalado, con el objetivo de minimizar el gasto de agua se empleó un SSR 10.00 en vez de 13.00, que ha sido tenido en cuenta para la predicción del resultado, pudiendo así compararlos estadísticamente con los obtenidos experimentalmente (Tabla 14). Al compararlos, no se aprecian diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el modelo y los resultados reales, lo que quiere decir que hemos conseguido escalar el proceso de manera exitosa, a pesar de que el proceso podría ser optimizado, mejorando el sistema de filtración de la materia sólida, o adicionando antiespumantes (como Breviol D 102 K).

	Rendimiento de proteína extraída según el modelo matemático (%)	Datos reales obtenidos (%)
Planta piloto	61.06 ^a	60.45 ^a

Superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 14. Porcentaje de extracción previsto y datos obtenidos reales para el tratamiento de planta piloto.

Además, las proteínas extraídas se han analizado mediante SDS-PAGE (Figura 12), usando las mismas condiciones descritas para las proteínas extraídas con ultrasonidos. En este caso tampoco se observaron cambios en el perfil de las proteínas extraídas de los sobrenadantes y de los pellet de cada una de las extracciones en planta piloto.

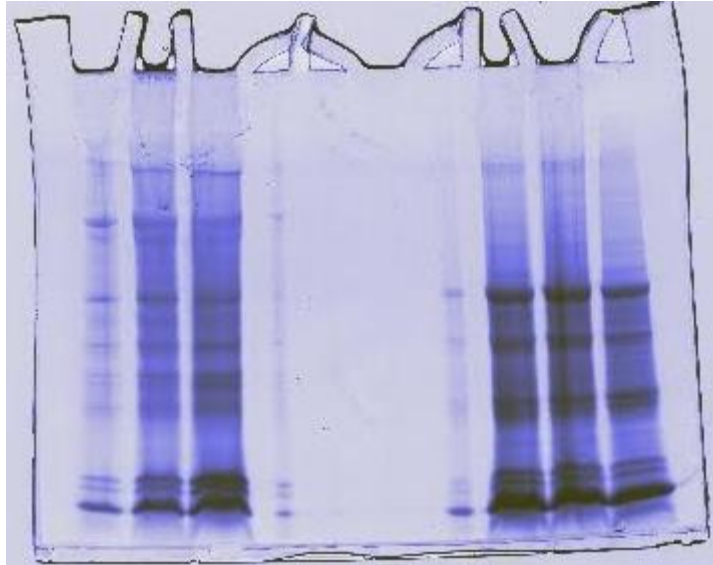


Figura 12. Geles SDS-PAGE para el tratamiento en planta piloto.

Los resultados de este experimento evidencian que la optimización del método de extracción hace posible escalar el proceso de 2 a 40L sin perjuicio del rendimiento esperado. Estos datos sugieren que extracciones llevadas a una escala aun mayor, no deberían afectar el rendimiento del proceso; lo que es indicativo de la robustez del método empleado.

4.3. [Análisis de propiedades de proteínas y Texturometría](#)

El objetivo de estos análisis fue analizar y valorar las propiedades tecnofuncionales de las proteínas obtenidas en las extracciones realizadas con ultrasonidos y en la planta piloto. De este modo se puede realizar una valoración previa de en qué productos alimentarios estas proteínas tienen un mayor potencial de uso. Para ello se midieron solubilidad, capacidad espumante, propiedades gelificantes y retención de agua y aceite. Todas ellas de relevancia para la industria cárnica, dónde estas proteínas tienen un mayor potencial de aplicación.

4.3.1. Análisis de las propiedades tecnofuncionales de los extractos

La solubilidad de las proteínas se estudia para determinar las condiciones óptimas de extracción por solubilización y de precipitación de las proteínas cárnicas, pero también es relevante para las aplicaciones de estas en la industria alimentaria. Por ello, cuando se trata de preparar, transformar o usar proteínas en la industria alimentaria, este suele ser uno de los parámetros a medir en primer lugar (Moholkar et al., 2000).

	Solubilidad	Emulsionante	Espumante	LGC (w/v) (%)	WHC (g/g) (%)	OHC (g/g) (%)
Proteínas extraídas	Baja a pH5 y pH6	100%	Alta, estable	10% Gelificación	5.95±2.00	41.63±1.8

Tabla 15. Parámetros analizados de las proteínas extraídas.

En el caso analizado se ha medido la solubilidad (Tabla 15) a pH 5 y 6 y la diferencia de solubilidad resulta significativa entre los diferentes pH. A pH 5 la solubilidad es menor debido a que el valor del pH se encuentra más cerca del punto isoeléctrico (pI) de la proteína. En el segundo caso (pH6) se observa mayor solubilidad dado que nos alejamos de su pI y por tanto las proteínas comienzan a estar cargadas, lo que promueve la repulsión entre las diferentes moléculas, y la interacción con el agua de la disolución, solubilizándose. Al aumentar el pH a 6 la solubilidad aumenta de un 36,57% a un 38,26%, y esto, según los análisis estadísticos realizados, evidencia una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la solubilidad. Estos resultados son similares a los estudiados en proteínas extraídas de pulmón bovino en (Darine et al., 2010) pero menor que la de las proteínas extraídas de sangre en (S. Lynch et al., 2017), que presentan solubilidades de hasta el 90% a pH 6, debido a su naturaleza de proteínas sanguíneas que están constantemente en disolución. Para pH 5 presentan una solubilidad reducida, acorde con la esperada, confirmando entonces que supone un buen pH para realiza la precipitación de las proteínas tras la solubilización alcalina.

	Media	SD
pH 5	36.57 ¹	0.02
pH 6	38.26 ²	0.02

Superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 16. Solubilidad de las proteínas extraídas.

Las proteínas extraídas muestran una gran capacidad para formar emulsiones incluso a concentraciones tan bajas como 2 mg/mL, que se mantienen tras la centrifugación en porcentajes comprendidos entre 90-100% para todas las concentraciones estudiadas (Figura 13).

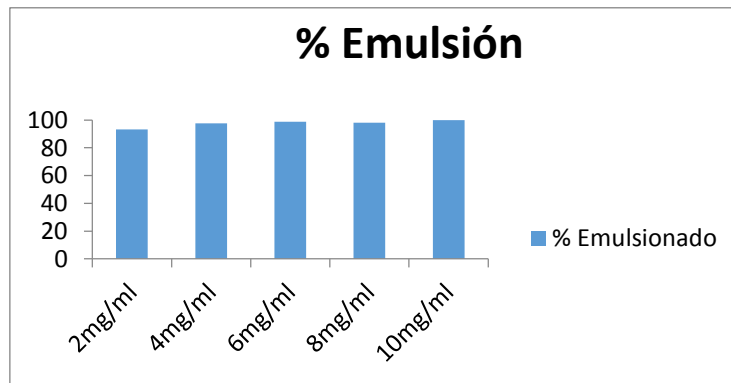


Figura 13. Gráfica de la emulsión producida en función de la concentración de proteína.



Figura 14. Emulsión del 100% de las proteínas extraídas.

Podríamos concluir que las propiedades emulsionantes de las proteínas extraídas de pulmón son excelentes. Esto, posiblemente, se deba a que las proteínas de pulmón presentan una alta hidrofobicidad (Darine et al., 2010), lo que según (Dickinson, 1992), supone una característica elemental para un buen agente emulsionante. Seguramente esta hidrofobicidad sea debida a la presencia de lipoproteínas (Galdston et al., 1969). La calidad de estas emulsiones puede compararse con proteínas que actualmente ya se usan en alimentación, como por ejemplo el fibrinógeno, que presenta también una capacidad de emulsión casi del 100 % (Álvarez, Bances, Rendueles, & Díaz, 2009).

La capacidad para formar espuma de las muestras también fue estudiada. Las proteínas de pulmón dieron lugar a una espuma estable en el tiempo ya que, aunque se produce un descenso brusco de 2.4 unidades (volumen espuma/volumen líquido) entre el primer valor medido a los 15' y el último valor medido a los 60' (Figura 15), este es más bien progresivo a lo largo del tiempo y responde sobre todo a un primer cambio que se produce en los 15' primeros minutos. Con el tiempo la espuma alcanza una estabilidad y las reducciones producidas en el tiempo son mucho menores. Estos resultados eran esperables, ya que en (Darine et al., 2010), se comparan las proteínas extraídas de pulmón de ternera con caseinatos, proteínas de clara de huevo, y proteínas de soja, resultando la proteína de pulmón la mejor espumante solo después de la proteína de clara de huevo, que produce unas espumas más estables.

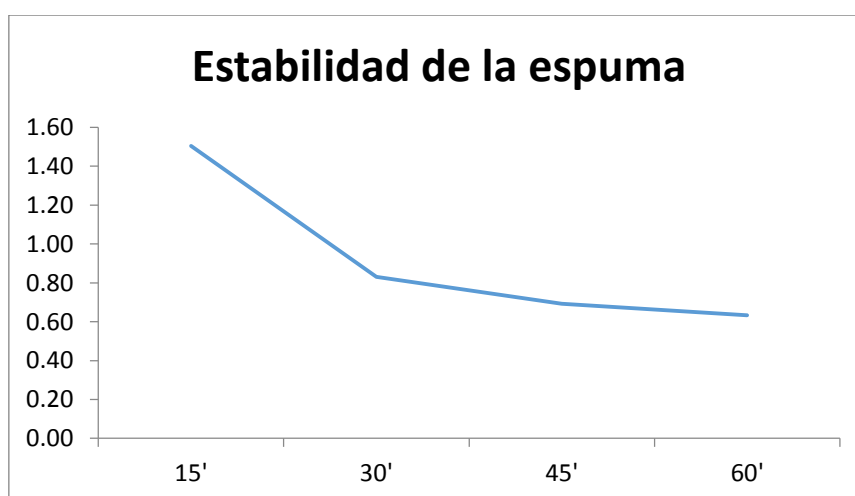


Figura 15. Estabilidad de la espuma de las proteínas extraídas.



Figura 16. Ensayos de capacidad espumante.

A pesar de que esta propiedad es apreciada en la industria alimentaria (por ejemplo en la industria láctea), resulta ambigua en nuestras muestras, pues su aplicabilidad en productos que buscan propiedades espumantes no sería aceptada, por su condición de proteínas cárnicas. Por otra parte, en la industria cárnica esta propiedad tiende a obstaculizar los diferentes procesos, y por tanto, se tiende a evitarla (Darine et al., 2010). Pero esto no tendría por qué suponer un problema ya que existen diferentes antiespumantes de uso alimentario que pueden ser utilizados, como el usado durante los experimentos en la planta piloto.

Con respecto a las propiedades gelificantes (LGC) de las proteínas extraídas, a pesar de que tienen la capacidad de formar de geles, solo se aprecian estos a elevadas concentraciones, ya que se necesita un mínimo de un 10% (p/v) para obtener un gel estable. A menores concentraciones no se observó ningún indicio de formación de gel. Esto contrasta con las características de las proteínas de la sangre que suelen tener más potencial gelificante (alrededor del 6%) (Álvarez et al., 2009).

La diferencia entre los valores obtenidos para las capacidades de retención de agua (5.95 ± 2.00) y de aceite (41.63 ± 1.8) podría estar vinculada a la parcial disolución de las proteínas en el agua, por tanto no quedaría retenida. La capacidad de retención de aceite es elevada, como cabía esperar tras analizar la capacidad de estas proteínas para formar emulsiones. Sabiendo que estas presentan afinidad por los lípidos, no resulta extraño el resultado obtenido.

4.3.2. Análisis de las hamburguesas y Texturometría

Las proteínas son añadidas con frecuencia a productos cárnicos debido a sus propiedades (emulsionantes, gelificantes...). También se unen al agua a nivel molecular, debido los puentes de hidrógeno, contribuyendo a la firmeza final del producto, firmeza que se ve incrementada si la proteína presenta además buenas propiedades gelificantes. Incluso, pueden ser añadidas para contribuir a mejorar el sabor o para alcanzar los mínimos legales de proteína requeridos en el producto cárnico (Feiner, 2006). Por lo tanto, podrían constituir un buen aporte de proteína extra para diferentes productos, contribuyendo a mejorar las características de este, o incluso, como ocurre en el caso estudiado, podrían reemplazar parte de la proteína que existe en el producto en forma de carne, ayudando a reducir el precio final de este y la cantidad de carne necesaria para elaborarlo. Por lo que aportaría una mayor sostenibilidad y mejor rendimiento a la industria cárnica en general. Para llevar a cabo esto, se reemplazó el 10% y el 20% de la proteína proveniente de la carne de la hamburguesa por proteína extraída de pulmones (porcino -del experimento con ultrasonidos- y bovino-del escalado del proceso-) y analizamos las características y la composición (Tabla 17) del producto final. Las recetas empleadas para la elaboración de dichas hamburguesas se pueden encontrar en la sección correspondiente de material y métodos. Se realizó el análisis de composición de los productos (ceniza, proteína, grasa y humedad) tanto en crudo como después de cocinados.

		Cenizas		Proteína		Grasa		Humedad	
		<i>Media</i>	<i>SD</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>
Crudo	<i>Control</i>	2.54 ³	0.02	14.70 ¹	0.29	31.19 ¹	0.38	56.45 ²	0.06
	<i>T10</i>	1.69 ²	0.01	14.25 ¹	0.24	34.26 ³	0.29	54.85 ¹	0.32
	<i>T20</i>	1.06 ¹	0.01	14.98 ¹	0.39	32.62 ²	0.52	56.23 ²	0.36
Cocinado	<i>Control</i>	2.79 ³	0.04	19.47 ¹	0.76	31.53 ²	0.75	53.02 ¹	0.31
	<i>T10</i>	1.78 ²	0.04	18.22 ²	0.67	27.37 ¹	0.34	56.16 ²	0.2
	<i>T20</i>	1.02 ¹	0.03	17.2 ²	0.85	34.22 ³	1.33	52.74 ¹	0.23

Superíndices indican diferencias significativas (p<0.05)

Tabla 17. Análisis de: cenizas, proteínas, humedad y grasa.

Con respecto a la cantidad de cenizas, esta se mantiene tanto en crudo como en cocinado, para cada una de las muestras, y entre ellas estadísticamente se aprecia una diferencia significativa, teniendo menos cenizas la que más proteína tiene añadida (T20) y teniendo ambas menos que la hamburguesa de referencia o control. Esto podría responder a una incorrecta compensación de la sal a la hora de elaborar la receta. La cantidad de proteína en crudo no presenta diferencias significativas entre las diferentes recetas, lo que refleja que la adición de proteína ha sido correcta y que hemos conseguido reemplazar la cantidad adecuada. Por lo tanto, las diferentes propiedades observadas en las recetas analizadas responden únicamente a las propiedades de las proteínas analizadas y no a su concentración. Se puede observar como después de la cocción se produce un aumento de la concentración de proteína, debido a que al cocinar se pierde agua y la proteína se concentra en la muestra. Entre el control y la muestra T10 no se aprecian diferencias significativas ($p < 0.05$), sin embargo sí que se observa una concentración de proteína más baja en las muestras T20, cuando se compara al control. Finalmente, entre T10 y T20, tampoco se aprecian diferencias relevantes. Lo que lleva a indicar que de manera muy gradual, y a medida que se reemplaza más proteína, una menor concentración de proteína tiene lugar después de la cocción. La cantidad de grasa antes de cocinar es mayor en T10, sin embargo, tras la cocción, T10 es la que muestra menos cantidad de grasa de las tres, lo que podría indicar que T10 es, de las dos muestras ensayadas, la que peor retiene la grasa. T20 parece retener la grasa mejor que el control. La pérdida de agua tras la cocción ha repercutido a la mayor concentración de las proteínas tras esta, en la pérdida de grasa, e incluso a una mínima reducción en la cantidad de cenizas. Pero, obviamente el mayor efecto de la pérdida de agua lo podemos observar en la pérdida de humedad de las hamburguesas, en los casos analizados. T10 resulta ser la muestra que menos cantidad de agua tiene antes de la cocción -habiendo una diferencia significativa entre esta y T20 y el control (que son estadísticamente iguales)- pero la que más cantidad de agua tiene tras la cocción, lo que indica que ha sido la muestra que mejor retiene el agua durante el proceso de cocinado. Este podría ser debido a una gran pérdida de grasa, debido a la baja estabilidad de la emulsión generada; por lo que sufriría un efecto de

concentración de agua, daña una humedad aparente mayor después de la cocción. Todos los resultados muestran similitud con ensayos anteriores reportados en la bibliografía (Cofrades et al., 2000; Hughes, Cofrades, & Troy, 1997; O'Flynn, Cruz-Romero, Troy, Mullen, & Kerry, 2014). A pesar de que estadísticamente los resultados son diferentes, en términos prácticos las diferencias observadas en cantidad de proteína y humedad en el producto cocinado no son relevantes.

Pérdida por cocción y retención de agua

Para la industria cárnica uno de los parámetros más relevantes es la pérdida por cocción, la cual está directamente relacionada con los parámetros de retención de agua y estabilidad de la emulsión. Se entiende que una masa de hamburguesa con una matriz estable dará lugar a menos pérdidas de peso, ya que gracias a las propiedades de cohesión que se produce durante la emulsión, se producirían menos pérdidas de agua y grasa (O'Flynn et al., 2014). Durante los ensayos de la pérdida por cocción (Tabla 18), la retención de agua de la masa cruda (Tabla 19) y el color (Tabla 20) de las hamburguesas han sido analizados. Con respecto a la pérdida por cocción, T20 presenta una menor pérdida por cocción, siendo mayor y estadísticamente idéntica la presentada tanto por el control como por T10. En los resultados anteriores T10 la que mantenía más humedad tras la cocción, pero la que experimentaba una mayor pérdida de grasa (un 7%); lo que puede compensar el aumento de humedad observado tras cocinar. Al comparar los resultados de la pérdida por cocción con los de la retención de agua por la masa cruda de hamburguesa estos parecen encajar, puesto que T10 es el que menor cantidad de agua retiene y ha sido el que más pérdida por cocción ha experimentado, confirmando que la mayor pérdida de materia en T10 es debido a la baja estabilidad de la emulsión.

Pérdida por cocción	Media	SD
Control	25.85 ²	2.87
T10	25.84 ²	2.45
T20	18.18 ¹	0.74

Superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 18. Pérdida por cocción.

Retención de agua por masa cruda	Media	SD
Control	5.45 ³	0.17
T10	3.49 ¹	0.10
T20	4.08 ²	0.08

Superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 19. Retención de agua por masa cruda.

Color

Con el objetivo de medir el impacto que el reemplazo de proteína pueda tener en el color final de las hamburguesas procesadas, se procedió a medir este parámetro. Se midieron los colores del control, T10, T20, tanto en crudo como 24h después de la cocción, y acorde con la ecuación que figura en el apartado de material y métodos se valoraron las diferencias de color obtenidas. De acuerdo con la clasificación de (Mokrzycki & Tatol, 2011), podríamos decir que todos los cambios de color que existen entre las muestras son claramente apreciables al ojo humano, ya que todos sus valores son superiores a 3. Esto quiere decir que el consumidor podría distinguir entre la receta modificada y la original. Pero si observamos los valores de la *a* (que indica rojez) podemos ver que estos son más elevados en las hamburguesas tratadas que en las no tratadas, y en la industria se busca que el color de la carne tienda a rojo, puesto que es asociado positivamente por los consumidores. Por tanto, añadir estas proteínas a estos productos podría mejorar su aceptación final. Con respecto a los otros dos factores estudiados (*L* y *a*); las diferencias observadas, aunque significativas, no tienen un impacto tan reseñable en la diferencia total de color.

		<i>L</i>*	<i>a</i>*	<i>b</i>*	ΔE
Crudo	<i>Control</i>	67.31 ± 0.76	5.07 ± 0.40	15.79 ± 0.70	
	<i>T10</i>	61.74 ± 1.32	8.44 ± 0.87	17.34 ± 0.72	6,69
	<i>T20</i>	56.18 ± 1.50	8.85 ± 0.87	16.11 ± 0.52	11,75
Cocinado	<i>Control</i>	69.38 ± 0.40	1.77 ± 0.05	13.68 ± 0.61	
	<i>T10</i>	61.94 ± 0.38	3.91 ± 0.21	14.01 ± 1.56	7,75
	<i>T20</i>	59.43 ± 0.69	5.39 ± 0.69	14.35 ± 1.14	10,62

Tabla 20. Resultado pruebas de color.

Texturómetro

Uno de los aspectos organolépticos más importantes para el consumidor de carne y sus derivados es la textura. Por tanto, cualquier modificación de este parámetro, introducida por el cambio de ingredientes, debe ser valorada. De forma general, los productos más aceptados por el consumidor son aquellos que presentan una ternera alta. El tratamiento térmico al que se somete la carne, hace que de crudo a cocinado se produzcan una serie de cambios (como por ejemplo la solubilización del colágeno) que afectan a la ternera (Tatake & Pandit, 2002), o la formación de geles que aportan cierta resistencia al corte. Con ayuda del texturómetro medimos la ternera de las hamburguesas cocinadas, evaluando su resistencia al corte. Del texturómetro se obtiene una gráfica de cada corte (Figura 17), producto de la medida de la fuerza necesaria en N para cortar la muestra de hamburguesa. El resultado son un pico elevado (corresponde al primer esfuerzo cortante) y picos menos acentuados, que son producto de la fuerza aplicada por el texturómetro hasta que lo parte en dos.

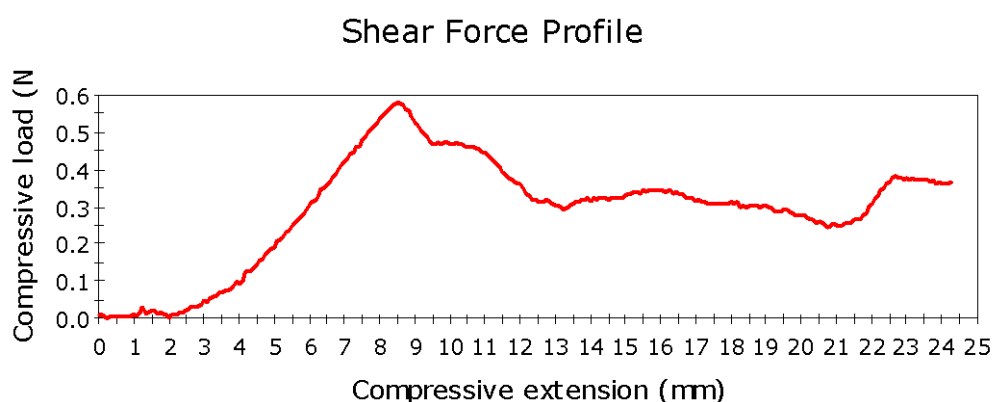


Figura 17. Gráfica resistencia cortante (texturómetro).

También nos da los valores de cada fuerza empleada para cada réplica analizada, de los cuales hemos calculado la media y la desviación típica y aplicando el mismo análisis estadístico que en todas las muestras anteriores. Para estos valores, el que menor esfuerzo cortante ofrece es T20, y la diferencia es significativa con T10 y el control, que estadísticamente no presentan diferencias entre ellos. Es decir, la adición de proteína en T20 resulta en una pérdida de consistencia del producto,

debido en parte a la menor presencia de colágeno por la sustitución de carne y a la poca habilidad gelificante de las proteínas añadidas.

Resistencia al corte	Media	SD
Control	1.10 ²	0.30
T10	1.44 ²	0.30
T20	0.87 ¹	0.23

Superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 21. Resistencia al corte de las hamburguesas.

5. CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos, se ha llegado a las siguientes conclusiones, que dan respuestas a los tres objetivos planteados en este proyecto:

- Después de los tratamientos con ultrasonidos estudiados podríamos afirmar que la optimización con ultrasonidos supone un ligero aumento en el rendimiento de la extracción. Debido a ello, un estudio económico sería necesario para valorar si la implantación de ultrasonidos sería económicamente ventajoso en este proceso en particular.
- Con respecto al escalado del proceso de extracción en planta piloto, demostró mantener el rendimiento esperado según el modelo matemático RSM, pero con una reducción del SSR, lo cual es muy interesante para la industria.
- Por último, al substituir las proteínas extraídas de los dos procesos (porcinas y bovinas) en hamburguesas no se han encontrados cambios significativos en la cantidad de proteína del producto, de grasa, de cenizas o de color. Sin embargo, las hamburguesas ensayadas con las proteínas extraídas si muestran una mayor retención de agua que el control. Sin embargo, si se observó un cambio en la consistencia de las hamburguesas con proteína substituida, sobre todo en la de mayor concentración (T20).
- Se concluye pues, que este proceso tiene el potencial de ser escalada planta piloto sin pérdida de rendimiento. Que las proteínas así extraídas son adecuadas para su uso en formulación de productos cárnicos. Estos factores en combinación sostienen la premisa de que una industria cárnica más sostenible es viable mediante nuevas técnicas de proceso sin perder por ello rendimiento económico.

6. SÍMBOLOS

IPS. *Isoelectric Precipitation Solubilization* o método precipitación/
solubilización isoeléctrica.

RSM. *Response Surface Method* o método de respuesta en superficie

SSR. *Ratio de solvente*

T10/T20. *Substitución de carne en las hamburguesas ensayadas por
proteína del 10% y del 20%.*

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alexandros, N., Bruinsma, J., Bodeker, G., Broca, S., & Ottaviani, M. (2012). World agriculture towards 2030/2050. *Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy*.
- Álvarez, C., Bances, M., Rendueles, M., & Díaz, M. (2009). Functional properties of isolated porcine blood proteins. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(4), 807-814. doi: 10.1111/j.1365-2621.2009.01908.x
- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K., & Versteeg, C. K. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 155-160.
- Assessment, M. E. (2005). Millennium ecosystem assessment. *Ecosystems and Human Well-Being: Biodiversity Synthesis, Published by World Resources Institute, Washington, DC*.
- BALDWIN, R. E., & Sinthavilai, S. (1974). Fish protein concentrate foam. *Journal of Food Science*, 39(5), 880-882.
- Barbosa-Cánovas, G., & Rodriguez, J. (2002). Update on nonthermal food processing technologies: Pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. *Food Australia*, 54(11), 513-520.
- Bean, S., Ioeberger, B., Park, S., & Singh, H. (2006). Interaction Between Sorghum Protein Extraction and Precipitation Conditions on Yield, Purity, and Composition of Purified Protein Fractions. *Cereal chemistry*, 83(1), 99-107.
- Cofrades, S., Guerra, M., Carballo, J., Fernández-Martín, F., & Colmenero, F. J. (2000). Plasma protein and soy fiber content effect on bologna sausage properties as influenced by fat level. *Journal of Food Science*, 65(2), 281-287.
- Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5), 951-957.
- Chen, Y. C., Tou, J. C., & Jaczynski, J. (2007). Amino acid, fatty acid, and mineral profiles of materials recovered from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing by-products using isoelectric solubilization/precipitation. *J Food Sci*, 72(9), C527-535. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00522.x
- Chittapalo, T., & Noomhorm, A. (2009). Ultrasonic assisted alkali extraction of protein from defatted rice bran and properties of the protein concentrates. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(9), 1843-1849.
- Darine, S., Christophe, V., & Gholamreza, D. (2010). Production and functional properties of beef lung protein concentrates. *Meat Science*, 84(3), 315-322.
- Davila, E., Parés, D., Cuvelier, G., & Relkin, P. (2007). Heat-induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. *Meat Science*, 76(2), 216-225.
- Delgadino, G., Bonetto, F., J, n., & Lahey, R. (2002). The relationship between the method of acoustic excitation and the stability of single bubble sonoluminescence for various noble gases. *Chemical Engineering Communications*, 189(6), 786-802.
- Demirdöven, A., & Baysal, T. (2008). The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. *Food Reviews International*, 25(1), 1-11.
- Dewitt, C., Gomez, G., & James, J. (2002). Protein extraction from beef heart using acid solubilization. *Journal of Food Science*, 67(9), 3335-3341.
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., & Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296-1307.
- Dickinson, E. (1992). *Introduction to food colloids*: Oxford University Press.
- Dolatowski, Z. J., Stadnik, J., & Stasiak, D. (2007). Applications of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6(3), 88-99.

- Dong, X. Y., Guo, L. L., Wei, F., Li, J. F., Jiang, M. L., Li, G. M., . . . Chen, H. (2011). Some characteristics and functional properties of rapeseed protein prepared by ultrasonication, ultrafiltration and isoelectric precipitation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(8), 1488-1498.
- Feiner, G. (2006). *Meat products handbook: Practical science and technology*: Elsevier.
- Feng, R., Zhao, Y., Zhu, C., & Mason, T. (2002). Enhancement of ultrasonic cavitation yield by multi-frequency sonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, *9*(5), 231-236.
- Firatligil-Durmus, E., & Evranuz, O. (2010). Response surface methodology for protein extraction optimization of red pepper seed (*Capsicum frutescens*). *LWT-Food Science and Technology*, *43*(2), 226-231.
- Galdston, M., Shah, D. O., & Shinowara, G. Y. (1969). Isolation and characterization of a lung lipoprotein surfactant. *Journal of colloid and interface science*, *29*(2), 319-334.
- Garde-Cerdán, T., Arias-Gil, M., Marsellés-Fontanet, A. R., Ancín-Azpilicueta, C., & Martín-Belloso, O. (2007). Effects of thermal and non-thermal processing treatments on fatty acids and free amino acids of grape juice. *Food Control*, *18*(5), 473-479.
- Garnett, T. (2008). *Cooking up a storm: Food, greenhouse gas emissions and our changing climate*: Food Climate Research Network, Centre for Environmental Strategy, University of Surrey.
- Gogate, P. R., Mujumdar, S., Thampi, J., Wilhelm, A. M., & Pandit, A. B. (2004). Destruction of phenol using sonochemical reactors: scale up aspects and comparison of novel configuration with conventional reactors. *Separation and Purification Technology*, *34*(1), 25-34.
- Henchion, M., McCarthy, M., & O'Callaghan, J. (2016). Transforming Beef By-products into Valuable ingredients: Which spell/recipe to Use? *Frontiers in Nutrition*, *3*.
- Herrero, A., Ordóñez, J., de Avila, R., Herranz, B., De la Hoz, L., & Cambero, M. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, *77*(3), 331-338.
- Herrero, M., Havlík, P., Valin, H., Notenbaert, A., Rufino, M. C., Thornton, P. K., . . . Obersteiner, M. (2013). Biomass use, production, feed efficiencies, and greenhouse gas emissions from global livestock systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(52), 20888-20893.
- Hughes, E., Cofrades, S., & Troy, D. J. (1997). Effects of fat level, oat fibre and carrageenan on frankfurters formulated with 5, 12 and 30% fat. *Meat Science*, *45*(3), 273-281. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740\(96\)00109-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740(96)00109-X)
- Inklaar, P. A., & Fortuin, J. (1969). Determining the emulsifying and emulsion stabilizing capacity of protein meat additives. *Food technology*.
- Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., & Bawa, A. (2012). Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *J Food Sci Technol*, *49*(3), 278-293.
- Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., & Bawa, A. S. (2012). Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *J Food Sci Technol*, *49*(3), 278-293. doi: 10.1007/s13197-011-0290-7
- Ji, J.-b., Lu, X.-h., Cai, M.-q., & Xu, Z.-c. (2006). Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, *13*(5), 455-462.
- Jin, S., Kim, I., Jung, H., Kim, D., Choi, Y., & Hur, S. (2007). The development of sausage including meat from spent laying hen surimi. *Poultry science*, *86*(12), 2676-2684.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C., & O'Donnell, C. P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, *46*(1), 60-67.
- Knorr, D. (2003). Impact of non-thermal processing on plant metabolites. *Journal of Food Engineering*, *56*(2), 131-134.

- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., & Lee, D.-U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 15(5), 261-266.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppäla, A., Rantamäki, P., & Tupasela, T. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 9(8), 307-319.
- Krausmann, F., Erb, K.-H., Gingrich, S., Lauk, C., & Haberl, H. (2008). Global patterns of socioeconomic biomass flows in the year 2000: A comprehensive assessment of supply, consumption and constraints. *Ecological Economics*, 65(3), 471-487.
- Kristinsson, H. G., & Ingadottir, B. (2006). Recovery and properties of muscle proteins extracted from tilapia (*Oreochromis niloticus*) light muscle by pH shift processing. *Journal of Food Science*, 71(3).
- Lee, S.-J., Kim, E.-K., Hwang, J.-W., Oh, H.-J., Cheong, S.-H., Moon, S.-H., . . . Park, P.-J. (2010). Purification and characterisation of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of duck processing by-products. *Food Chemistry*, 123(2), 216-220.
- Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J. d. C., Braga, A. R. C., Egea, M. B., & Fernandes, K. F. (2016). A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 950.
- Li, H., Pordesimo, L., & Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37(7), 731-738.
- López, M. A., & Martos, F. C. (2004). Iron availability: An updated review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(8), 597-606.
- Lynch, S., Mullen, A. M., O'Neill, E., & Álvarez, C. (2017). Harnessing the potential of blood proteins as functional ingredients. A review of the state of art in blood processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. doi: 10.1111/1541-4337.12254
- Lynch, S. A., Mullen, A. M., O'Neill, E. E., & García, C. Á. (2017). Harnessing the Potential of Blood Proteins as Functional Ingredients: A Review of the State of the Art in Blood Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 330-344.
- Marti, D. L., Johnson, R. J., & Mathews Jr, K. H. (2012). WHERE'S THE (NOT) MEAT? BYPRODUCTS FROM BEEF AND PORK PRODUCTION. *Journal of Current Issues in Globalization*, 5(4), 397.
- Mason, R. L., Gunst, R. F., & Hess, J. L. (2003). Designs and analyses for fitting response surfaces. *Statistical Design and Analysis of Experiments: With Applications to Engineering and Science, Second Edition*, 568-613.
- Mason, T. (1998). Power ultrasound in food processing—the way. *Ultrasound in food processing*, 105.
- Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28-41.
- Mohammadi, R., Mohammadifar, M. A., Mortazavian, A. M., Rouhi, M., Ghasemi, J. B., & Delshadian, Z. (2016). Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 190, 186-193.
- Moholkar, V. S., Rekveld, S., & Warmoeskerken, M. M. (2000). Modeling of the acoustic pressure fields and the distribution of the cavitation phenomena in a dual frequency sonic processor. *Ultrasonics*, 38(1), 666-670.
- Mokrzycki, W., & Tatol, M. (2011). Palette Generation in L* a* b* Colour Space Using ΔE . *Computer Recognition Systems 4*, 95, 279.
- Montero Castillo, P. M., Ligardo, M., Alejandro, Y., González, J., & Cristina, L. (2015). Protein Quality of Rice Drinks Fortified with Bovine and Porcine Blood Plasma. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 68(1), 7487-7496.
- Moulton, K., & Wang, L. (1982). A Pilot-Plant Study of Continuous Ultrasonic Extraction of Soybean Protein. *Journal of Food Science*, 47(4), 1127-1129.

- Mullen, A., & Álvarez, C. (2016). Offal: types and composition. *The Encyclopedia of Food and Health*, 4, 152-157.
- Mullen, A. M., Álvarez, C., Zeugolis, D. I., Henschion, M., O'Neill, E., & Drummond, L. Alternative uses for co-products: Harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. *Meat Sci*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.243>
- O'Flynn, C. C., Cruz-Romero, M. C., Troy, D. J., Mullen, A. M., & Kerry, J. P. (2014). The application of high-pressure treatment in the reduction of phosphate levels in breakfast sausages. *Meat Science*, 96(1), 633-639. doi: <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.028>
- O'Riordan, D., Kinsella, J., Mulvihill, D., & Morrissey, P. (1989). Gelation of plasma proteins. *Food Chemistry*, 33(3), 203-214.
- Ockerman, H., & Hansen, C. (2000). Sausage containers. *Animal by-product processing and utilization*. CRC Press, Boca Raton, Fla, 285-323.
- Omana, D. A., Xu, Y., Moayedi, V., & Betti, M. (2010). Alkali-aided protein extraction from chicken dark meat: Chemical and functional properties of recovered proteins. *Process Biochemistry*, 45(3), 375-381.
- Patist, A., & Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 147-154.
- Pelletier, N., & Tyedmers, P. (2010). Forecasting potential global environmental costs of livestock production 2000–2050. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18371-18374.
- Penteado, M. D. V. C., Lajolo, F. M., & Santos, N. P. D. (1979). Functional and nutritional properties of isolated bovine blood proteins. *J Sci Food Agric*, 30(8), 809-815.
- Pimentel, D., & Pimentel, M. (2003). Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *The American journal of clinical nutrition*, 78(3), 660S-663S.
- Povey, M., & McClements, D. (1988). Ultrasonics in food engineering. Part I: Introduction and experimental methods. *Journal of Food Engineering*, 8(4), 217-245.
- Riesz, P., & Kondo, T. (1992). Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(3), 247-270.
- Salgado, P. R., Fernández, G. B., Drago, S. R., & Mauri, A. N. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1433-1440.
- Selmane, D., Christophe, V., & Gholamreza, D. (2008). Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties. *Meat Sci*, 79(4), 640-647. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.10.029
- Sharma, S., Singh, R., & Rana, S. (2011). Bioactive peptides: a review. *Int J Bioautomation*, 15(4), 223-250.
- Shukla, T. (1992). Microwave ultrasonics in food processing. *Cereal foods world (USA)*.
- Solomon, S. (2007). *Climate change 2007-the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC* (Vol. 4): Cambridge University Press.
- Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323-331.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., & de Haan, C. (2006). *Livestock's long shadow: environmental issues and options*: Food & Agriculture Org.
- Suslick, K. S. (1988). *Ultrasound: its chemical, physical, and biological effects*: VCH Publishers.
- Swamy, K., & Narayana, K. (2001). Intensification of leaching process by dual-frequency ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(4), 341-346.
- Tahergorabi, R., Beamer, S. K., Matak, K. E., & Jaczynski, J. (2011). Effect of isoelectric solubilization/precipitation and titanium dioxide on whitening and texture of proteins

- recovered from dark chicken-meat processing by-products. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 896-903. doi: 10.1016/j.lwt.2010.10.018
- Taskaya, L., Chen, Y. C., Beamer, S., Tou, J. C., & Jaczynski, J. (2009). Compositional characteristics of materials recovered from whole gutted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) using isoelectric solubilization/precipitation. *J Agric Food Chem*, 57(10), 4259-4266. doi: 10.1021/jf803974q
- Tatake, P. A., & Pandit, A. B. (2002). Modelling and experimental investigation into cavity dynamics and cavitation yield: influence of dual frequency ultrasound sources. *Chemical Engineering Science*, 57(22), 4987-4995.
- Tian, J., Wang, Y., Zhu, Z., Zeng, Q., & Xin, M. (2014). Recovery of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Protein Isolate by High-Intensity Ultrasound-Aided Alkaline Isoelectric Solubilization/Precipitation Process. *Food and Bioprocess Technology*, 8(4), 758-769. doi: 10.1007/s11947-014-1431-6
- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., . . . Swackhamer, D. (2001). Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science*, 292(5515), 281-284.
- Toldra, F., Aristoy, M. C., Mora, L., & Reig, M. (2012). Innovations in value-addition of edible meat by-products. *Meat Sci*, 92(3), 290-296. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.04.004
- Trostle, R. (2008). *Global agricultural supply and demand: factors contributing to the recent increase in food commodity prices*: US Department of Agriculture, Economic Research Service Washington, DC.
- Ünsal, M., & Aktaş, N. (2003). Fractionation and characterization of edible sheep tail fat. *Meat Science*, 63(2), 235-239.
- Van, D. M. P. C. (2001). Food products processed from offal components: Google Patents.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161-169. doi: 10.1016/j.ifset.2007.04.014
- Villamiel, M., & de Jong, P. (2000). Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(2), 472-478.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303-313.
- Waldron, K. (2007). *Waste minimization, management and co-product recovery in food processing: an introduction* (Vol. 1): Woodhead Publishing Limited: Cambridge, UK.
- Wani, A. A., Kaur, D., Ahmed, I., & Sogi, D. (2008). Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 41(8), 1514-1520.
- Weidema, B., Wesnæs, M., Hermansen, J., Kristensen, T., Halberg, N., Eder, P., & Delgado, L. (2008). Environmental improvement potentials of meat and dairy products. *JRC Scientific and technical reports*.
- Yang, Z. R. Y. (2003). The extracting technology of flavonoids compounds [J]. *Food and Machinery*, 1, 007.
- Zeugolis, D. I., Paul, G. R., & Attenburrow, G. (2009). Cross-linking of extruded collagen fibers— A biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89(4), 895-908.
- Zeugolis, D. I., Paul, R. G., & Attenburrow, G. (2008). Engineering extruded collagen fibers for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 108(5), 2886-2894. doi: 10.1002/app.27208
- Zhu, K.-X., Sun, X.-H., & Zhou, H.-M. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles. *Journal of Cereal Science*, 50(2), 266-271.

- Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(5), 951-957.
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., & Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, *124*(4), 1296-1307.
- Garde-Cerdán, T., Arias-Gil, M., Marsellés-Fontanet, A. R., Ancín-Azpilicueta, C., & Martín-Belloso, O. (2007). Effects of thermal and non-thermal processing treatments on fatty acids and free amino acids of grape juice. *Food Control*, *18*(5), 473-479.
- Henchion, M., McCarthy, M., & O'Callaghan, J. (2016). Transforming Beef By-products into Valuable ingredients: Which spell/recipe to Use? *Frontiers in Nutrition*, *3*.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C., & O'Donnell, C. P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, *46*(1), 60-67.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppäla, A., Rantamäki, P., & Tupasela, T. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science & Technology*, *9*(8), 307-319.
- Lee, S.-J., Kim, E.-K., Hwang, J.-W., Oh, H.-J., Cheong, S.-H., Moon, S.-H., . . . Park, P.-J. (2010). Purification and characterisation of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of duck processing by-products. *Food Chemistry*, *123*(2), 216-220.
- Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J. d. C., Braga, A. R. C., Egea, M. B., & Fernandes, K. F. (2016). A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6), 950.
- López, M. A., & Martos, F. C. (2004). Iron availability: An updated review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *55*(8), 597-606.
- Marti, D. L., Johnson, R. J., & Mathews Jr, K. H. (2012). WHERE'S THE (NOT) MEAT? BYPRODUCTS FROM BEEF AND PORK PRODUCTION. *Journal of Current Issues in Globalization*, *5*(4), 397.
- Montero Castillo, P. M., Ligardo, M., Alejandro, Y., González, J., & Cristina, L. (2015). Protein Quality of Rice Drinks Fortified with Bovine and Porcine Blood Plasma. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, *68*(1), 7487-7496.
- Mullen, A., & Álvarez, C. (2016). Offal: types and composition. *The Encyclopedia of Food and Health*, *4*, 152-157.
- Mullen, A. M., Álvarez, C., Zeugolis, D. I., Henchion, M., O'Neill, E., & Drummond, L. Alternative uses for co-products: Harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. *Meat Sci.* doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.243>
- Pimentel, D., & Pimentel, M. (2003). Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *The American journal of clinical nutrition*, *78*(3), 660S-663S.
- Sharma, S., Singh, R., & Rana, S. (2011). Bioactive peptides: a review. *Int J Bioautomation*, *15*(4), 223-250.
- Tahergorabi, R., Beamer, S. K., Matak, K. E., & Jaczynski, J. (2011). Effect of isoelectric solubilization/precipitation and titanium dioxide on whitening and texture of proteins recovered from dark chicken-meat processing by-products. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(4), 896-903. doi: 10.1016/j.lwt.2010.10.018
- Taskaya, L., Chen, Y. C., Beamer, S., Tou, J. C., & Jaczynski, J. (2009). Compositional characteristics of materials recovered from whole gutted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) using isoelectric solubilization/precipitation. *J Agric Food Chem*, *57*(10), 4259-4266. doi: 10.1021/jf803974q
- Tian, J., Wang, Y., Zhu, Z., Zeng, Q., & Xin, M. (2014). Recovery of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Protein Isolate by High-Intensity Ultrasound-Aided Alkaline Isoelectric

- Solubilization/Precipitation Process. *Food and Bioprocess Technology*, 8(4), 758-769. doi: 10.1007/s11947-014-1431-6
- Trostle, R. (2008). *Global agricultural supply and demand: factors contributing to the recent increase in food commodity prices*: US Department of Agriculture, Economic Research Service Washington, DC.
- Waldron, K. (2007). *Waste minimization, management and co-product recovery in food processing: an introduction* (Vol. 1): Woodhead Publishing Limited: Cambridge, UK.
- Zeugolis, D. I., Paul, G. R., & Attenburrow, G. (2009). Cross-linking of extruded collagen fibers— A biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89(4), 895-908.
- Zeugolis, D. I., Paul, R. G., & Attenburrow, G. (2008). Engineering extruded collagen fibers for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 108(5), 2886-2894. doi: 10.1002/app.27208

Referencias online

FAO. How to Feed the World in 2050. (2009). Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf. Consultado en Mayo 2017.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)., 2013. *FAO Statistical Yearbook 2013: World Food and Agriculture*. FAO, Rome, Italy. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e/i3107e.PDF>. Consultado en Mayo de 2017.

FAO., 2010a. *Poultry, Meat, and Eggs. Agribusiness handbook*. Food and agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/012/al175e/all175e.pdf>. Consultado en Mayor de 2017.