

El hígado de cerdo representa un coproducto relevante de la industria porcina. Como resultado de las nuevas tendencias de consumo, se ha producido una disminución de su demanda, por lo que hoy en día presenta un bajo valor comercial. Sin embargo, el hígado de cerdo tiene unas excelentes propiedades nutricionales, presenta un alto contenido en proteínas de elevado valor biológico y tecno-funcional, es rico en minerales y vitaminas y a su vez, tiene un bajo contenido en grasa, por lo que puede considerarse un excelente producto de uso alimentario. Además, estudios recientes han demostrado que el hígado de cerdo presenta alta actividad catalítica para la formación de zinc protoporfirina (ZnPP) debido a la presencia de la enzima ferroquelatasa (FeQ). La ZnPP es un colorante rojo natural y con alta estabilidad que se ha identificado en el Jamón de Parma y también en otros productos cárnicos. Su producción a nivel industrial y adición a productos cárnicos podría ser útil para mejorar su color, evitando o minimizando el uso de nitritos y nitratos. Sin embargo, el proceso enzimático de formación de ZnPP es, en general, lento. En este sentido, están surgiendo tecnologías emergentes, como los ultrasonidos de potencia (US), que han sido aplicados para acelerar e intensificar reacciones enzimáticas, a través de la mejora en los fenómenos de transferencia de materia. Por otra parte, los US también se han empleado para facilitar la extracción de diversos compuestos de interés, incluidas las enzimas. Por lo tanto, desde el punto de vista tecnológico, el uso de US puede resultar interesante para mejorar el proceso enzimático de formación de ZnPP catalizado por la FeQ, obtenida del hígado de cerdo.

Uno de los principales problemas que presenta el hígado de cerdo es que es un órgano muy perecedero, por su elevado contenido en agua. Además, el hígado contiene compuestos orgánicos volátiles (COVs) que generan un fuerte aroma desagradable, lo que provoca un alto rechazo por parte del consumidor. Sin embargo, el hígado tiene una fracción proteica muy interesante desde el punto de vista nutritivo y tecno-funcional, por lo que sería muy conveniente su aprovechamiento por parte de la industria alimentaria. Por ello, con el fin de recuperar la fracción proteica del hígado a nivel industrial, podría ser interesante su deshidratación, para así prologar su vida útil, eliminando su componente mayoritario, que es el agua, lo que facilitaría su manejo y almacenamiento, para su posterior uso en aplicaciones como la extracción de proteínas y/o enzimas. Además, la eliminación o reducción de la fracción grasa

también facilitaría la recuperación de la fracción proteica, y limitaría las reacciones de degradación, como la oxidación e hidrólisis lipídica. Sin embargo, es importante determinar cómo la reducción de agua y grasa puede afectar a las propiedades tecnofuncionales y a la calidad de las proteínas. El secado por aire caliente es una de las operaciones unitarias más importantes en el procesado de alimentos. A pesar de ello, puede provocar cambios significativos que pueden afectar a la calidad del producto, especialmente cuando se emplean temperaturas elevadas. En este sentido, una alternativa al secado convectivo a alta temperatura podría ser el secado convectivo a baja temperatura, que podría mejorar las propiedades del producto. En general, para la eliminación de COVs se usan tratamientos de arrastre por vapor con (AVV) o sin aplicación de vacío (AV). La técnica de AVV es un tratamiento que utiliza el vapor de agua a temperaturas moderadas y a baja presión, el vapor arrastra los COVs de la muestra a tratar, que se condensan en un destilado (vertido). Por otra parte, la extracción mediante CO₂ supercrítico (CO₂-SC) es una tecnología de procesado prometedora para la desodorización de coproductos cárnicos, ya que el CO₂ supercrítico ha sido usado como solvente en aplicaciones alimentarias por sus propiedades fisicoquímicas incluyendo baja viscosidad, densidad similar a la de un líquido y alta difusividad. En bibliografía existen diferentes trabajos que han descrito la capacidad de eliminación de COVs del CO₂-SC en productos como salsa de pescado, agua, trufas, extractos de lavanda y tomillo o aislados proteicos vegetales, entre otros. Sin embargo, hasta la fecha esta tecnología de desodorización no ha sido aplicada en una matriz cárnica como es el hígado de cerdo.

En este contexto, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue evaluar la viabilidad de diferentes tecnologías emergentes para la revalorización del hígado de cerdo como coproducto cárnico para la obtención de compuestos de interés tecnofuncional. Así, se analizó el efecto de la aplicación de US, empleando diferentes tiempos y modos de aplicación (continuo y pulsado) sobre la extracción de FeQ del hígado de cerdo, determinando la actividad de la enzima mediante el análisis de las cinéticas de formación de ZnPP y caracterizando el campo acústico empleado y la eficiencia energética de las diferentes condiciones ensayadas. Además, se evaluó la viabilidad del uso de US, aplicados a intensidades moderadas y bajas, para la mejora de la reacción enzimática de formación de ZnPP catalizada por FeQ a partir de

diferentes sustratos: hígado de cerdo homogeneizado (Hhc) e hígado de cerdo homogeneizado, con adición de oxihemoglobina (Hhc+OxiHb) procedente de sangre porcina. También se estudió el proceso de secado en un amplio rango de temperaturas (de -10 a 70°C) y de desgrasado para la estabilización del hígado de cerdo y su posterior uso para la extracción de FeQ y el aprovechamiento de la fracción proteica. Por último, se evaluó el proceso de desodorización del hígado de cerdo deshidratado mediante dos técnicas: AVV y la extracción mediante CO₂-SC.

La extracción de FeQ se realizó a partir de hígado de cerdo descongelado homogeneizado con una solución tampón estándar a temperatura de refrigeración (4 °C), mediante agitación mecánica convencional (30 min) y mediante extracción asistida por US (400 W). Los tratamientos de US se realizaron con aplicación continua y pulsada (0.5 s ON / 0.5 s OFF), a diferentes tiempos de extracción (1, 2.5 y 5 min). La actividad enzimática se evaluó cuantificando la ZnPP obtenida a partir de sustratos exógenos (protoporfirina IX y ZnSO₄) a 37 °C, estudiando la cinética de formación durante 120 min. Además, también se investigó la intensificación de la reacción enzimática de la FeQ para formar ZnPP, mediante la aplicación de US en Hhc y Hhc+OxiHb. La formación de ZnPP se llevó a cabo a 37 °C en condiciones de anaerobiosis, analizándose la cantidad formada a diferentes tiempos de incubación (6, 12, 18, 24 y 48 h). La aplicación de US se realizó mediante un baño ultrasónico, utilizando agua como elemento transmisor y se mantuvo la temperatura constante mediante la recirculación del agua. Se aplicaron dos potencias: una moderada (36.53 W/L) y otra baja (7.05 W/L), la aplicación se llevó a cabo de forma intermitente (30 min ON, 30 min OFF). De este modo, se buscaron las condiciones del proceso que condujeran a mejorar la interacción entre la enzima y los sustratos de la reacción enzimática y la posterior difusión de la ZnPP aplicando potencias que no llevaran asociadas la degradación del enzima. En cuanto a los tratamientos de secado del hígado de cerdo, se realizaron experimentos de secado en un amplio rango de temperatura (-10 a 70 °C). Se evaluó la influencia de la temperatura de secado sobre la actividad enzimática y la concentración de FeQ aparente extraída del hígado tras su deshidratación. Ambos parámetros se calcularon a partir de la cinética de formación de ZnPP, usando extractos de hígado deshidratado a diferentes temperaturas y comparándolo con la cinética obtenida a partir del extracto de FeQ de hígado fresco. Además de evaluar la influencia del secado sobre la capacidad catalítica de la FeQ

para la formación de ZnPP, se estudió el efecto de la temperatura de secado (moderada-alta 70 °C y moderada-baja 40 °C), así como el posterior proceso de desgrasado, sobre las propiedades fisicoquímicas del hígado de cerdo y tecno-funcionales de la fracción proteica del hígado. Una vez llevada a cabo la estabilización del hígado mediante el secado, se estudió su posible desodorización, con el fin de eliminar los COVs característicos del aroma desagradable del hígado. Los tratamientos se realizaron mediante dos técnicas diferentes: la desodorización por AVV y a través de CO₂-SC. Una vez llevado a cabo el proceso de desodorización, se analizaron los COVs residuales en el hígado, mediante la técnica de micro-extracción en fase sólida, con espacio de cabeza, combinado con cromatografía de gases (HS-SPME-GC/MS).

Los resultados experimentales mostraron que la aplicación de US intensificó en gran medida la extracción de la enzima FeQ del hígado de cerdo. Así, la aplicación de US durante la extracción de FeQ condujo a una mejora de la actividad enzimática y consecuentemente a un aumento de la formación de ZnPP. Por ejemplo, cuando se aplicó US en modo continuo, se observó que la actividad enzimática de la FeQ extraída aumentó un 33.3 % para 1 min de aplicación de US (4314 J aplicados), un 30.8 % para 2.5 min (10785 J aplicados) y un 25.6 % para 5 min (21570 J aplicados), en comparación con la extracción convencional. Que la mayor actividad enzimática se obtuviera con el menor tiempo de aplicación de US en continuo, pone de manifiesto que una exposición prolongada a la energía ultrasónica, podría conducir a la degradación de la enzima, probablemente por los efectos de la cavitación en el medio. Por otra parte, la aplicación pulsada de US en el tratamiento de 5 min aumentó la actividad enzimática un 10.3 % (7384 J aplicados), en comparación con el método convencional. Sin embargo, cuando se aplicaron US en modo pulsado para tiempos más cortos (1 y 2.5 min), la actividad enzimática fue inferior en un 12.8 % para 1 min (1476 J aplicados) y un 10.3 % para 2 min (3690 J aplicados), en comparación con el método convencional. Como es el caso de muchos procesos asistidos por US, existe un umbral de energía necesaria para observar el efecto de los mismos; así, probablemente, en el caso de la aplicación pulsada a tiempos menores de 5 min, no se observaron diferencias con la extracción convencional, al no alcanzarse el umbral energético necesario. Además del aumento significativo de la actividad enzimática, la cantidad formada de ZnPP a partir de la aplicación de US en modo continuo aumentó

respecto a la extracción convencional, un 24.6 % para 1 min, un 14.9 % para 2.5 min y un 13.9 % para 5 min. En cuanto a la aplicación pulsada de US, se observó un aumento de un 4.8 % de cantidad formada de ZnPP para 5 min, sin embargo, para tiempos más cortos de extracción, la ZnPP formada fue similar a la obtenida con los extractos convencionales de FeQ. En este sentido, tanto el tiempo de aplicación de US, como el modo empleado (continuo/pulsado), resultaron ser determinantes en el rendimiento de la extracción de FeQ. Entre todas las condiciones ensayadas, la óptima fue la aplicación de US de forma continua durante 1 min. Por tanto, los US son una técnica de intensificación de gran interés para mejorar la extracción de FeQ del hígado de cerdo, proporcionando una mayor actividad enzimática probablemente debido a cambios estructurales que podrían favorecer tanto la localización de los sustratos en el sitio activo, la difusión del producto o ambos procesos y reduciendo el tiempo con respecto al método de extracción convencional.

En cuanto a la formación de ZnPP asistida por US a partir Hhc y de Hhc+OxiHb, el máximo de ZnPP formado cuando se aplicaron US a baja potencia (7.05 W/L) fue de 0.405 mmol ZnPP/L en Hhc y 0.449 mmol ZnPP/L en Hhc+OxiHb, alcanzándose este valor a las 12 h, mientras que sin aplicación de US el máximo se alcanzó a las 24 h, siendo éste de 0.322 mmol ZnPP/L en Hhc y 0.430 mmol ZnPP/L en Hhc+OxiHb. Sin embargo, cuando se aplicaron US a moderada potencia (36.53 W/L) fue solo de 0.037 mmol ZnPP/L a 24 h de incubación, debido a que el sistema de control de temperatura no pudo evitar el aumento de temperatura en el medio de reacción generado por la aplicación de US. Para esta potencia, la temperatura del medio de reacción se elevó por encima del punto de consigna (37 °C), fluctuando alrededor de 50 °C, a pesar de que la temperatura del baño de US se mantuviera a 37 °C. Así pues, los US a baja potencia provocaron una micro agitación en el medio de reacción, que mejoró la actividad enzimática, facilitando el contacto de la enzima FeQ con los sustratos, así como la difusión de la ZnPP. Por lo tanto, mediante la aplicación de US durante la reacción enzimática de formación de ZnPP, se produce una reducción del tiempo de formación de ZnPP de un 50 % y un aumento de la concentración de ZnPP final alcanzada, siendo un método eficaz para intensificar la reacción enzimática de formación de ZnPP.

En relación al secado de hígado de cerdo a diferentes temperaturas (de -10 a

70 °C), los resultados revelaron que el aumento de la temperatura de secado influyó tanto en la actividad enzimática como en la concentración de FeQ aparente. Así, la condición óptima se encontró en el rango de 10 a 20 °C, donde el valor promedio de la actividad enzimática y la concentración de FeQ aparente fue de 0.00065 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ y 0.277 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$, respectivamente. Sin embargo, a las temperaturas extremas de secado se obtuvieron los valores más bajos de actividad enzimática y concentración de FeQ aparente (0.0005 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ y 0.021 $\mu\text{mol/L}$ y 0.00033 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ y 0.072 $\mu\text{mol/L}$, para -10 y 70 °C, respectivamente). Por tanto, el proceso de secado a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente (entre 10 y 20 °C), demostró ser un método eficaz en la estabilización del hígado de cerdo para la posterior extracción de FeQ, manteniéndose la concentración de FeQ aparente con respecto al hígado de cerdo fresco.

La temperatura de secado también influyó en las propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales del hígado de cerdo, siendo la temperatura de 40 °C la que conllevó una menor degradación de proteínas en comparación con el hígado de cerdo deshidratado a 70 °C. El proceso de desgrasado contribuyó a mejorar ciertas propiedades tecno-funcionales de las proteínas, como la capacidad espumante, obteniendo un valor promedio un 397 % mayor en las muestras desgrasadas respecto a las muestras sin desgrasar. También, la estabilidad de formación de espuma en las muestras deshidratadas-desgrasadas a 40 °C fue la más alta (13.76 min). Sin embargo, respecto a la capacidad emulsionante no se vio afectada entre las diferentes muestras analizadas (deshidratadas y deshidratadas-desgrasadas). Por lo tanto, los procesos de secado y desgrasado, aplicados para facilitar la extracción de la fracción proteica, deben ajustarse de acuerdo con las necesidades de propiedades funcionales de las proteínas hepáticas obtenidas.

En cuanto a la eliminación de COVs, los resultados mostraron que ambas técnicas de desodorización (AVV y CO₂-SC) fueron eficaces en la reducción y eliminación COVs característicos del hígado del cerdo. A través del AVV la concentración de COVs se redujo en su conjunto un 67.55 %, mientras que mediante CO₂-SC se redujo un 81.25 %, con respecto al hígado de cerdo deshidratado sin desodorizar. Además, tras la aplicación de CO₂-SC se eliminaron COVs característicos del olor desagradable del hígado de cerdo como (E,E)- 2,4-heptadienal (pescado), 1-

octen-3-ol (setas) y 1-onanol (grasa y verde de naturaleza). Asimismo, mediante la extracción con CO₂ supercrítico se redujo el contenido de grasa un 24.9 %, en comparación con la muestra sin desodorizar. Por lo tanto, la aplicación de CO₂-SC puede ser una técnica con alto potencial en la eliminación de COVs en hígado de cerdo, mejorando los resultados de la técnica convencional de AVV y posibilitando un desgrasado de las muestras de forma simultánea.

Así pues, se puede concluir que las tecnologías emergentes como los US mejoraron el proceso de extracción de FeQ, así como su actividad enzimática en la formación de ZnPP. Además, mediante el secado y desgrasado del hígado, es posible alargar la vida útil del hígado, con el objetivo de revalorizar este coproducto para su posterior uso en varias aplicaciones tecnológicas en la industria alimentaria. Así, a partir del hígado deshidratado se extrajo FeQ con actividad catalítica para la formación del pigmento ZnPP, y a partir del hígado deshidratado-desgrasado se recuperó la fracción proteica del hígado, la cual presentaba excelentes propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales, de elevado interés al haberse obtenido a partir de un coproducto cárnico. La extracción mediante CO₂-SC resultó ser una alternativa a la técnica convencional de AVV para la eliminación COVs, además, simultáneamente, se redujo el contenido en grasa.

Con el fin de mejorar el conocimiento sobre las aplicaciones desarrolladas para el aprovechamiento del hígado de cerdo, se recomienda profundizar en los siguientes aspectos no abordados en la presente Tesis Doctoral. Así, sería necesario abordar la optimización del tratamiento ultrasónico mediante el estudio de otras variables relevantes, como la relación hígado-solvente, la temperatura, el pH o la densidad de potencia. También sería interesante profundizar en la búsqueda de otros sustratos que puedan ser fuente de FeQ para la formación de ZnPP y de otras tecnologías emergentes que permitan mejorar el proceso enzimático de formación del pigmento. Además, se podría estudiar la aplicación de US para mejorar la formación de ZnPP en productos cárnicos crudo-curados a los que se les ha añadido previamente un extracto enzimático rico en FeQ, procedente del hígado de cerdo, sometidos a un campo ultrasónico moderado durante tiempos comprendidos entre 12 y 24 h. Adicionalmente, se podría estudiar el uso de otras técnicas de secado que minimicen o eviten la exposición al oxígeno, como el secado a vacío o la liofilización, con el objetivo de

preservar la actividad catalítica de la FeQ para la formación de ZnPP. Finalmente, se recomienda investigar más acerca del tratamiento de CO₂-SC combinado con otras tecnologías emergentes como los US, que faciliten la extracción de un mayor número de COVs sobre la matriz sólida del hígado de cerdo.