



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Efecto de la aplicación de ultrasonidos y pulsos eléctricos
en la extracción de proteínas a partir de hígado de cerdo

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

AUTOR/A: González Valcárcel, Laura

Tutor/a: García Pérez, José Vicente

Director/a Experimental: Contreras Ruiz, Marina

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

ALUMNO: Laura González Valcárcel

MASTER UNIVERSITARIO INGENIERÍA AGRONÓMICA

TÍTULO: Efecto de la aplicación de ultrasonidos y pulsos eléctricos en la extracción de proteínas a partir de hígado de cerdo.

TITLE: Effect of the application of ultrasound and Pulsed Electric Fields on protein extraction from pork liver.

TÍTOL: Efecte de l'aplicació d'ultrasons i PEF en l'extracció de proteïnes de fetge de porc.

RESUMEN:

El hígado de cerdo es considerado un co-producto en las industrias cárnicas representando aproximadamente el 3% del peso de la canal. Actualmente, el aprovechamiento del hígado para consumo es muy bajo debido principalmente a su aroma y textura a pesar de que contiene un elevado contenido de proteínas (20% base húmeda) de alto valor biológico. El aislamiento de la proteína del hígado de cerdo puede considerarse un aprovechamiento muy interesante ya que pueden utilizarse como sustitutas de otras proteínas altamente alergénicas en la formulación de alimentos.

El objetivo de este trabajo es analizar el efecto de la aplicación de ultrasonidos de potencia y pulsos eléctricos de alta intensidad en el rendimiento de la extracción de proteínas del hígado de cerdo, así como en las propiedades tecno-funcionales de los aislados proteicos.

Para alcanzar este objetivo, se analizó la influencia de la potencia ultrasónica aplicada (0, 50, 100 W), del tiempo (10, 15, 20 min), y de la temperatura (20, 30, 40 °C) durante la solubilización alcalina de las proteínas. Además, se realizaron pre-tratamientos con pulsos eléctricos de alta intensidad (0,12 y 24 kJ/kg) previo a la extracción de proteínas. A continuación, los aislados proteicos se obtuvieron por precipitación ácida y se liofilizaron. Posteriormente, se determinó el rendimiento de extracción de proteínas, el contenido de proteína del aislado proteico y sus propiedades tecnológicas que incluyen la capacidad de retención de agua (WHC), la capacidad de retención de aceite (OHC), así como la capacidad y estabilidad emulsionante (EA y ES).

La aplicación de ultrasonidos de potencia tuvo un rendimiento significativo en la extracción de proteínas. Esta influyó de modo que a medida que se aumentó la potencia se mejoró las propiedades tecnofuncionales, así las cinéticas de secado a 100 W fueron 1,5 veces más rápidas que las de 0 W. La temperatura influyó en la obtención de mejores propiedades funcionales, siendo la de 30 °C la más óptima y la de 40 °C la más desfavorable. La aplicación de pulsos eléctricos y el tiempo de aplicación de los ultrasonidos no fueron factores significativos

PALABRAS CLAVE: Hígado de cerdo; proteína, nuevas tecnologías, ultrasonidos de potencia, Pulsos eléctricos de alta intensidad, propiedades tecno-funcionales.

Pig liver is considered a co-product in the meat industry, representing approximately 3% of the carcass weight. Currently, the utilisation of liver for consumption is very low, mainly due to its aroma and texture, despite the fact that it contains a high protein content (20% wet basis) of high biological value. The isolation of pork liver protein can be considered a very interesting use as it can be used as a substitute for other highly allergenic proteins in feed formulation.

The aim of this work is to analyse the effect of the application of power ultrasound and high intensity electrical pulses on the protein extraction yield of pig liver, as well as on the techno-functional properties of the protein isolates.

To achieve this objective, the influence of the applied ultrasonic power (0, 50, 100 W), time (10, 15, 20 min), and temperature (20, 30, 40 °C) during the alkaline solubilisation of proteins was analysed. In addition, pre-treatments with pulsed electric fields, (0.12 and 24 kJ/kg) were performed prior to protein extraction. Afterwards, the protein isolates were obtained by acid precipitation and freeze-dried. Subsequently, the protein extraction yield, the protein content of the protein isolate and its technological properties including water holding capacity (WHC), oil holding capacity (OHC), as well as the emulsifying capacity and stability of the protein isolate were determined.

The application of power ultrasound had a significant performance in protein extraction. This was influenced by the fact that as the power was increased the techno-functional properties improved, so that the drying kinetics at 100 W were 1.5 times faster than those at 0 W. Temperature influenced the achievement of better functional properties, with 30°C being the most optimal and 40°C the most unfavourable. The application of electrical pulses and the time of ultrasound application were not significant factors.

KEY WORDS: Pig liver; protein, new technologies, power ultrasound, pulsed electric fields, techno-functional properties.

El fetge de porc és considerat un co-producte en les indústries càrnies representant aproximadament el 3% del pes de la canal. Actualment, l'aprofitament del fetge per a consum és molt baix degut principalment a la seua aroma i textura a pesar que conté un elevat contingut de proteïnes (20% base humida) d'alt valor biològic. L'aïllament de la proteïna del fetge de porc pot considerar-se un aprofitament molt interessant ja poden utilitzar-se com a substitutes d'altres proteïnes altament al·lergògenes en la formulació d'aliments

L'objectiu d'este treball és analitzar l'efecte de l'aplicació d'ultrasons de potència i polsos elèctrics d'alta intensitat en el rendiment de l'extracció de proteïnes del fetge de porc, així com en les propietats tecno-funcionals dels aïllats proteics.

Per a aconseguir este objectiu, es va analitzar la influència de la potència ultrasònica aplicada (0, 50, 100 W), del temps (10, 15, 20 min), i de la temperatura (20, 30, 40 °C) durant la solubilització alcalina de les proteïnes. A més, es van realitzar pre-tractaments amb polsos elèctrics d'alta intensitat (0,12 i 24 kJ/kg) previ a l'extracció de proteïnes. A continuació, els aïllats proteics es van obtenir per precipitació àcida i es van liofilitzar. Posteriorment, es va determinar el rendiment d'extracció de proteïnes, el contingut de proteïna de l'aïllat proteic i les seues propietats tecnològiques que inclouen la capacitat de retenció d'aigua (WHC), la capacitat de retenció d'oli (OHC), així com la capacitat i estabilitat emulsionant (EA i ÉS)

L'aplicació d'ultrasons de potència va tindre un rendiment significatiu en l'extracció de proteïnes. Esta influència de manera que a mesura que es va augmentar la potència es va millorar les propietats tecnofuncionals, així les cinètiques d'assecat a 100 W van ser 1,5 vegades més ràpides que les de 0 W. La temperatura va influir en l'obtenció de millors propietats funcionals, sent la de 30 °C la més òptima i la de 40 °C la més desfavorable. L'aplicació de polsos elèctrics i el temps d'aplicació dels ultrasons no van ser factors significatius

PARAULES CLAU: Fetge de porc; proteïna, noves tecnologies, ultrasons de potència, Polsos elèctrics d'alta intensitat, propietats tecno-funcionals

Anejo I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030 Anexo al Trabajo de Final de Máster

A. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre cero		X		
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables	X			
ODS 13. Acción por el clima				X
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

B. Descripción breve de la alineación del TFM con los ODS, marcados en la tabla anterior, con un grado alto.

ODS 3 Salud y bienestar: El aprovechamiento del hígado de cerdo como co-producto se relaciona con la salud y el bienestar porque es un producto alimenticio que tiene excelentes propiedades nutricionales y además presenta un alto contenido en proteínas de elevado valor biológico y tecno-funcional. Este aspecto es importante ya que dichas proteínas pueden actuar como sustitutas de otras proteínas altamente alergénicas en la formulación de alimentos.

ODS 9 Industria, innovación e infraestructuras: Tecnologías existentes como los pulsos de campos eléctricos o los ultrasonidos no han sido estudiadas con profundidad para la industria agroalimentarias. Estas son ventajosas ya que con los avances tecnológicos se han ido desarrollando y reduciendo así la relación coste respecto a la eficiencia.

ODS 12 Producción y consumo responsables: La utilización de hígados de cerdo, que a menudo son subproductos de la industria cárnica, representa un uso eficiente de recursos animales. Esto no solo contribuye a la sostenibilidad, sino que también puede ayudar a reducir el desperdicio de alimentos, un aspecto clave para la salud global y la seguridad alimentaria.

Además, el uso de ultrasonidos se puede describir como producción responsable ya que la extracción mediante ultrasonidos es un proceso corto y con alta reproducibilidad, reduciendo el consumo de disolvente, por lo que simplifica aspectos como la manipulación, la eliminación de después del tratamiento de las aguas residuales y el consumo de sólo una fracción de la energía fósil necesaria normalmente para una extracción convencional. También se suma el motivo de que permite realizar un proceso más sostenible ya que las reacciones químicas son llevadas a cabo con disolventes y reactivos respetuosos con el medio ambientalmente.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. El hígado de cerdo y la industria cárnica	4
1.2. Aplicaciones del hígado de cerdo.....	5
1.3. Ultrasonidos.....	6
1.3.1. <i>Generalidades</i>	6
1.3.2. <i>Uso de ultrasonidos en procesos de extracción</i>	7
1.4. Pulsos eléctricos	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y METODOS	10
3.1. Materia prima.....	10
3.2. Proceso de extracción y aislamiento de proteínas.	10
3.3. Pretratamiento con pulsos eléctricos de alta intensidad.....	14
3.4. Diseño experimental.	15
3.5. Análisis del contenido en proteína y rendimiento.	16
3.6. Propiedades tecnofuncionales.	18
3.6.1. <i>Capacidad de retención de agua (WHC)</i>	18
3.6.2. <i>Capacidad de retención de aceite (OHC)</i>	19
3.6.3. <i>Actividad emulsionante (EA)</i>	20
3.6.4. <i>Estabilidad emulsionante (ES)</i>	21
3.7. Análisis Estadístico.....	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Rendimiento de extracción de proteínas.....	23
4.2. Contenido de proteína en el aislado proteico.	24
4.3. Propiedades tecnofuncionales.	29
4.3.1. <i>Capacidad de retención de agua (WHC)</i>	29
4.3.2. <i>Capacidad de retención de aceite (OHC)</i>	31
4.3.3. <i>Actividad emulsionante (EA)</i>	33
4.3.4. <i>Estabilidad emulsionante (ES)</i>	34
5. CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFIA	37

Índice de Figuras

Figura 1.-Parámetros de la onda ultrasónica.	6
Figura 2.-Hígado de cerdo envasado al vacío.....	10
Figura 3.- Montaje experimental para la extracción convencional de proteínas.	11
Figura 4.- Montaje experimental para la extracción con ultrasonidos	11
Figura 5.-Filtración del sobrenadante de la centrifugación.	12
Figura 6.- Aspecto de la muestra tras la precipitación ácida.....	12
Figura 7.-Liofilizador.....	13
Figura 8.- Aislado proteico liofilizado.	13
Figura 9.-Hígado de cerdo tras tratamiento de PEF.	14
Figura 10.- Montaje experimental del sistema PEF: Generador y cámara de seguridad para la realización del tratamiento.....	14
Figura 11.-Portamuestras con aislado proteico	17
Figura 12.-Tubos agitados de la prueba WHC	18
Figura 13.-Fase solida separada del aceite no absorbido.	19
Figura 14.-Material para EA y ES	20
Figura 15.-Fases separadas de la emulsión.....	21
Figura 16.-Tubos eppendorf en baño.	22
Figura 17.- Influencia de la potencia ultrasónica aplicada en las proteínas del aislado obtenido. Se muestra los valores medio e intervalos LSD.....	25
Figura 18.- Influencia de la temperatura aplicada en el rendimiento de aislado proteico. Se muestran los valores medios e intervalos LSD.....	27
Figura 19.- Influencia de la potencia ultrasónica aplicada en el rendimiento de aislado proteico. Se muestran los valores medios e intervalos LSD	27
Figura 20.- Influencia de la potencia ultrasónica aplicada y PEF en el rendimiento de aislado proteico. Se muestran los valores medios e intervalos LSD.....	28
Figura 21.- . Influencia de la temperatura aplicada en la propiedad tecnofuncional WHC. Se muestran los valores medios e intervalo LSD.	30
Figura 22.- Influencia de los pulsos eléctricos aplicados en la propiedad tecnofuncional WHC. Se muestran los valores medios e intervalo LSD.	31
Figura 23.- Influencia de la potencia ultrasónica aplicada en la propiedad tecnofuncional OHC. Se muestran los valores medios e intervalo LSD.	32
Figura 24.- Influencia de la temperatura aplicada en la propiedad tecnofuncional EA. Se muestran los valores medios e intervalo LSD.	34

Índice de Tablas

Tabla 1. Experiencias con ultrasonidos.....	15
Tabla 2.-Experiencias con ultrasonidos y PEF	16
Tabla 3.-Valores de la extracción de proteínas con ultrasonidos.....	23
Tabla 4.- Valores de la extracción de proteínas con ultrasonidos.....	24
Tabla 5.-Influencia de la potencia ultrasónica para el contenido de proteínas.	24
Tabla 6.- Influencia de la potencia ultrasónica y pulsos eléctricos para el contenido de proteínas.	25
Tabla 7.-Valores finales de las extracciones ultrasonidos, Temperatura y tiempo.	26
Tabla 8.-Valores finales de las extracciones US y PEF	28
Tabla 9.-Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la WHC de ultrasonidos, tiempo y temperatura.	29
Tabla 10.- Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la WHC para ultrasonidos y PEF.	30
Tabla 11.- Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la OHC de ultrasonidos, tiempo y temperatura.	31
Tabla 12.- Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la OHC para ultrasonidos y PEF.	32
Tabla 13.- Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la EA de ultrasonidos, tiempo y temperatura.	33
Tabla 14.- Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la EA para ultrasonidos y PEF.	33
Tabla 15.- Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la ES de ultrasonidos, tiempo y temperatura.	34
Tabla 16.- Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la ES para ultrasonidos y PEF.	35

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El hígado de cerdo y la industria cárnica

La industria cárnica es el primer sector de la industria española de alimentación y bebidas, con una cifra de negocio de 33.218 millones de euros en 2023, que representa un 2,72% del PIB español, el 27,30% del PIB de la industria alimentaria, y el 4,53% de la facturación total de la industria española. Estas cifras indican que el sector cárnico del país es uno de los más importantes solo por detrás del energético y automovilístico y al nivel de la industria química y metalúrgica. Además, la producción de carne de porcino tiene especial relevancia ya que España tiene una cuota del 4,8% en la producción mundial, siendo desde 2021 el tercer productor mundial solo por detrás de China y EEUU (34,3% y 11,7%) y el primer productor de porcino de la UE (ANICE, 2024).

En España, se sacrificaron desde enero de 2023 hasta febrero de 2024 más 5 millones de cerdos, lo que representa aproximadamente unas 550 mil toneladas de carne y teniendo en cuenta que el hígado supone un 3% del peso de la canal, la producción de hígado superó las 16 mil toneladas (MAPAMA). Por tanto, sería necesario buscar nuevos aprovechamientos para el hígado ya que se espera que se incremente la producción debido a las tendencias del mercado de nuestros días, y esto puede agudizar el problema medioambiental para las industrias del sector cárnico que representa su eliminación.

A lo largo de los años el consumo de hígado ha ido disminuyendo y se ha creado un rechazo en la sociedad durante el siglo XXI. En la UE, cada año se producen más de 20 millones de toneladas de subproductos animales procedentes de mataderos, industrias que producen alimentos para consumo humano y ganado muerto procedente de explotaciones agrícolas (EFSA, 2023). El aprovechamiento de algunos de estos subproductos, como el hígado de cerdo, podría ser una oportunidad considerable tanto nutricional como económica para la sociedad.

El aprovechamiento del hígado de cerdo como co-producto es interesante ya que es un producto alimenticio que tiene excelentes propiedades nutricionales, presenta un alto contenido en proteínas de elevado valor biológico y tecno-funcional, es rico en retinol, vitaminas y minerales y, además, tiene un bajo contenido en grasa, por lo que se considera un excelente producto de uso alimentario (Seong et al., 2014). Las proteínas que contiene el hígado de cerdo pueden actuar como sustitutas de otras proteínas altamente alergénicas en la formulación de alimentos por lo que sería su aprovechamiento muy útil para la industria alimentaria.

A pesar de todas estas características, el hígado de cerdo tiene un rechazo en el mercado y un bajo consumo debido a sus características organolépticas

como el aroma causado por los compuestos orgánicos volátiles (COVs) y la textura menos tierna. Además, los sabores desagradables pueden volverse intensos durante el procesamiento o almacenamiento del hígado que causa la oxidación de ácidos grasos insaturados catalizada por hierro (Imet al., 2004). Por otro lado, el hígado de cerdo es un órgano muy perecedero ya que tiene un alto contenido en agua, por lo que presenta problemas de conservación.

1.2. Aplicaciones del hígado de cerdo

El hígado de cerdo, como se ha mencionado anteriormente, contiene una elevada fracción proteica que las industrias alimentarias podrían usar como estrategia para revalorizar dicho coproducto. Debido a su rechazo en el mercado, el principal uso en la industria alimentaria es en el paté, pero esta producción no abastece la elevada producción del hígado de cerdo.

Una importante aplicación es la elaboración de comida para animales de compañía donde se destaca la fuente de proteínas. Otro uso sería la extracción de la enzima Transglutaminasa ya que esta se presenta en el hígado y músculos de los mamíferos y en ciertos tejidos vegetales (Jozami et al., 2003). Gracias a ella se desarrollan nuevos productos como la carne reconstruida. Del hígado de cerdo también se extraen vitaminas como el niacina y la A, B6, B12 además de ácido fólico por lo que se tiene cierta relevancia en la industria farmacéutica.

A pesar de los diferentes usos del hígado por parte de la industria alimentaria animal y como uno de los ingredientes principales en los productos de pasta de hígado, se han realizado pocos estudios sobre la caracterización de las propiedades tecnofuncionales de la proteína del hígado de cerdo (Liselot et al., 2016).

En un futuro se prevé que las aplicaciones se centren en la extracción proteica para ser un ingrediente tecnofuncional en alimentos. Esto resultaría interesante por motivos como dar textura por su capacidad de formar geles o por la necesidad actual de las proteínas en la dieta para evitar carencias alimenticias.

La mayoría de los que presentan buenas propiedades espumantes (clara de huevo, proteínas de la leche, gluten) tienden a ser alergénicos (Zayas, 1997). Por ello encontrar proteínas alternativas como las del hígado de cerdo que poseen la capacidad de formar y estabilizar espumas es algo interesante para el sector de las industrias agroalimentarias. El hecho de que no haya evidencias de alergias asociadas al hígado de cerdo lo hace de mayor importancia.

1.3. Ultrasonidos

1.3.1. Generalidades

El desarrollo de las nuevas tecnologías de procesado de alimentos y desarrollo de nuevos productos con funcionalidades específicas supone un desafío en la actualidad para la industria agroalimentaria. Es por ello que hay una constante búsqueda de tecnologías emergentes que permitan un procesado de los alimentos de una manera más sencilla y conservando sus características y propiedades (Ashokkumar et al., 2008). Los ultrasonidos han tenido diversas aplicaciones ya que han demostrado ser un método eficaz y se han ido expandiendo a distintos ámbitos desde la limpieza hasta la medicina.

Se refiere a ultrasonidos el conjunto de ondas mecánicas cuya frecuencia es superior a la que percibe el oído humano, es decir, por encima de los 20 kHz. Dichas ondas viajan por la superficie a una velocidad determinada dependiendo de la naturaleza del material (Knorr et al., 2004). Hay dos tipos, ultrasonidos de señal, que se emplea para el control de procesos o productos, y ultrasonidos de potencia, que se utilizan para intensificar o mejorar los mismos.

Las frecuencias más usadas en la industria agroalimentaria son las de alta frecuencia (100 kHz – 1 MHz) y las de baja potencia ($<1 \text{ W cm}^{-2}$). Las bajas potencias son las más indicadas para que la muestra no sufra cambios como deterioro o pérdida de sus características por el bajo calor que generar y su poco efecto en la estructura de los compuestos de interés (Demirdoven & Baysal, 2008).

Las ondas ultrasónicas cuentan con los siguientes parámetros: la amplitud (altura de la onda, intensidad o volumen del sonido), la frecuencia (periodos o ciclos que ocurren en un segundo), el periodo (tiempo empleado en completar un ciclo), la velocidad (depende del medio a atravesar) y longitud de onda (lo que recorre una onda en un ciclo o periodo). En la Figura 1 se pueden ver los parámetros representados en una propagación de la onda ultrasónica.

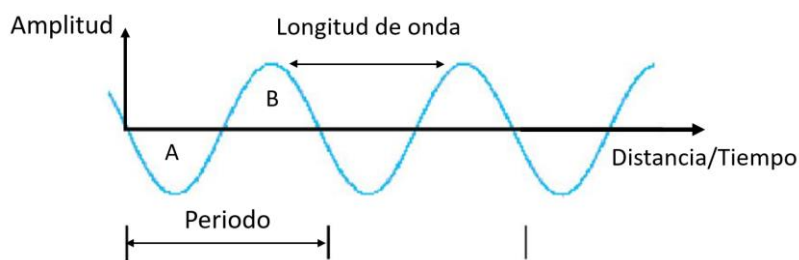


Figura 1.-Parámetros de la onda ultrasónica.

1.3.2. Uso de ultrasonidos en procesos de extracción

La extracción mediante ultrasonidos es un proceso corto y con alta reproducibilidad, reduciendo el consumo de posibles solventes del proceso, por lo que simplifica aspectos como la manipulación, dar una mayor pureza del producto final, la eliminación de después del tratamiento de las aguas residuales y el consumo de sólo una fracción de la energía fósil necesaria normalmente para una extracción convencional (Chemat et al., 2011)

En cuanto a lo que se refiere con las extracciones de proteína mediante ultrasonidos, estas han sido probadas en distintos productos como la soja, el sorgo o la colza. En el caso de este último, se ha comprobado que los ultrasonidos mejoraron significativamente en las extracciones alcalinas con precipitación acida en las proteínas (Dong et al., 2011). Se concluye que la extracción comprende una fase de calentamiento y agitación, parte sustituible por los ultrasonidos, debido a que la energía procedente del colapso de las burbujas de cavitación favorece la inserción del solvente mientras se eleva la temperatura de la muestra y se produce una constante agitación que mejora el intercambio de materia. (Knorr et al., 2004).

La aplicación de los ultrasonidos en la industria cárnica no ha sido estudiada ampliamente todavía, sin embargo, esta opción cada vez está cogiendo una mayor importancia por ser económica, simple, reproducible y eficiente en cuanto a la mejora del rendimiento en los procesos industriales de extracción.

1.4. Pulsos eléctricos

Los pulsos eléctricos de alto voltaje o intensidad, o en inglés Pulsed Electric Fields (PEF), son una tecnología emergente que ofrece varias ventajas en términos de seguridad alimentaria y calidad del producto.

La tecnología basada en la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje consiste en la aplicación de voltajes intermitentes de alta intensidad en periodos cortos de tiempo, generalmente de microsegundos, sobre un material fluido, semifluido o sólido situado entre dos electrodos. La intensidad del tratamiento dependerá del campo eléctrico generado, el cual está determinado por el voltaje aplicado y la distancia entre los electrodos y de la energía aplicada (kJ/kg).

Los tratamientos térmicos muchas veces provocan pérdidas de los nutrientes esenciales y cambios en sus propiedades organolépticas, por eso, el uso de los pulsos eléctricos ha resultado ser una alternativa de interés con

alternativa a los cambios indeseables generados por procesos como la pasteurización (Knorr et al., 2001; Barroso-Espach et al., 2003).

En la industria agroalimentaria el uso de PEF permite aumentar la vida útil de los alimentos a través de la inactivación de los microorganismos, facilita los procesos de pelado y cortado de vegetales y frutas, y favorece los fenómenos de transferencia de masa en procedimientos como la extracción de aceites. Además, los pulsos eléctricos son utilizados en alimentos fluidos que pueden tolerar altas intensidades de campo, que tengan una baja conductividad eléctrica y que no formen burbujas (IFT, 2001).

Hay varios estudios sobre los pulsos eléctricos como pre-tratamientos para diferentes extracciones. Se conoce que incrementa el rendimiento de la extracción de compuestos a partir de manzana, zanahorias y cocos (Bazhal y Vorobiev, 2000; Bazhal et al., 2001; Knorr, 2003; Fincan et al., 2004).

El interés por la aplicación de PEF en el proceso de elaboración de productos cárnicos ha aumentado por su potencial para inducir cambios en la microestructura de la carne debido a las mejoras de sus propiedades funcionales y su calidad. No obstante, este efecto es complejo de estudiar ya que depende tanto de los parámetros de tratamiento como de las propiedades de la carne y de las condiciones de la carne en el pre y postratamiento (Alahakoon et al., 2016).

En cuanto a lo que se refiere con las extracciones de proteína, hay estudios que afirman que la mayoría de estas se pueden extraer con éxito cuando se usa campos eléctricos de alta intensidad y a medida que aumenta el campo eléctrico y la energía aplicada (Meglic et al., 2015).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue analizar la aplicación de nuevas tecnologías en la extracción de proteínas del hígado de cerdo, así como en las propiedades tecno-funcionales de los aislados proteicos. En concreto, se abordó el análisis de #1 estudiar la influencia de la aplicación de ultrasonidos durante la etapa de solubilización de las proteínas y #2 evaluar la viabilidad de un pretratamiento con PEF antes de la etapa de solubilización.

Para alcanzar ambos objetivos generales se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Determinar el rendimiento de extracción de proteínas a partir del hígado de cerdo.
- Cuantificar el contenido de proteínas del aislado proteico.
- Evaluar las distintas propiedades tecnológicas del aislado proteico: capacidad de retención de agua (WHC), capacidad de retención de aceite (OHC), actividad emulsionante (EA) y estabilidad emulsionante (ES).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materia prima

En este trabajo experimental se utilizaron hígados de cerdo frescos, (Figura 2), que fueron adquiridos en un mercado local (Cabañal, Valencia). El hígado se envasó a vacío y posteriormente, se congeló (-18°C) hasta el inicio de las experiencias.



Figura 2.-Hígado de cerdo envasado al vacío.

3.2. Proceso de extracción y aislamiento de proteínas.

Para llevar a cabo la extracción de proteínas del hígado de cerdo, se siguió el procedimiento que será descrito en el presente trabajo. En primer lugar, para la preparación de las muestras se trituraron 40 g de hígado y se mezcló en una proporción 1:10 con agua destilada (40g/400mL). Posteriormente, se homogeneizó usando un ultra-Turrax (IKA, modelo yellowline DI 25), a una velocidad de 11.500 rpm durante 1 min. Las condiciones alcalinas ayudan a obtener una alta solubilización de las proteínas (Feliu-Alsina N. et al., 2023). Por ello, se necesita que las proteínas tengan un pH de 8,5 por lo que se usara Hidróxido de Sodio (NaOH) de 2 mol.

El siguiente paso es el de la solubilización que depende en la que se modificaron el tiempo (10, 15, 20 min), la temperatura (20, 30, 40 °C) de extracción y la potencia de ultrasonidos (0, 50, 100 W).

En el caso de las experiencias de extracción convencional sin ultrasonidos (0 W), la muestra se colocó en un vaso de precipitados de x mL dentro de un baño con temperatura controlada (Termostato de inmersión Termotronic 100) (Figura 3) mientras la muestra era agitada (Heidolph al nivel 5 de agitación) para conseguir un proceso de calentamiento homogéneo.

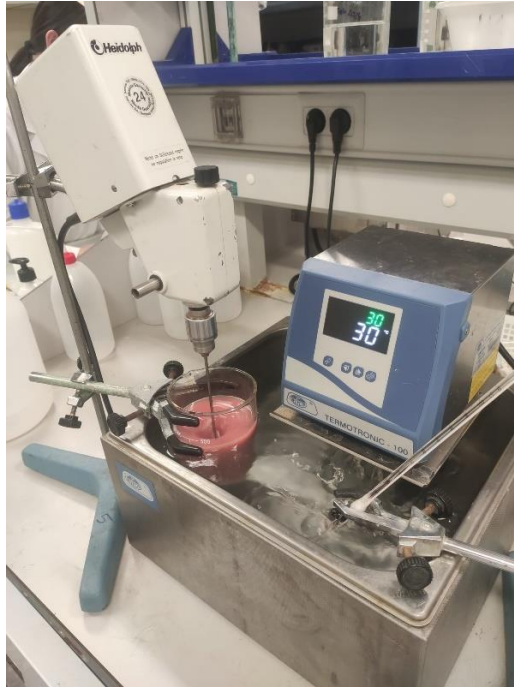


Figura 3.- Montaje experimental para la extracción convencional de proteínas.

En las experiencias con aplicación de ultrasonidos (US), la muestra disuelta en agua era colocada un vaso de precipitados donde se colocaba debajo del equipo de ultrasonidos (UP400St Hielscher, Alemania) (Figura 4). En este caso, la temperatura de la muestra se controlaba mediante un protocolo de control ON-OFF actuando sobre una bomba que recirculaba agua glicolada a 0°C por la camisa del vaso de precipitados y que permitía que esta fuera constante. Se realizaron experiencias modificando la potencia eléctrica aplicada (50 y 100 W).

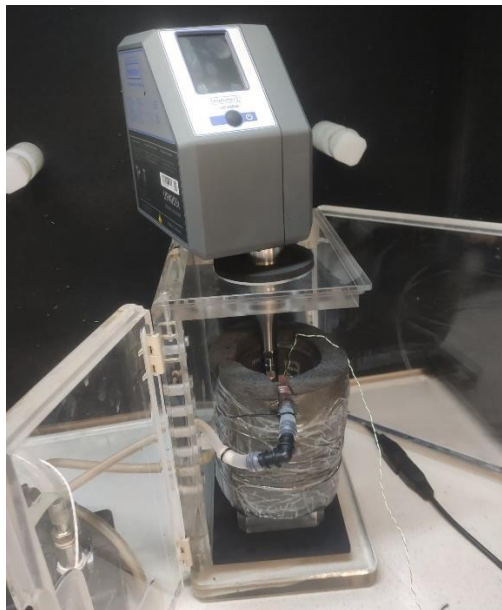


Figura 4.- Montaje experimental para la extracción con ultrasonidos

Una vez realizada la solubilización, el líquido obtenido se separó en 4 alícuotas que se centrifugaron (Digicen 21 R, Ortoalresa) durante 15 min a una velocidad de 5000 rpm con una temperatura de 2°C para separar el precipitado. Una vez finalizada la centrifugación, se filtran el sobrenadante para obtener la parte sobrenadante, la parte de interés, como se ve en la Figura 5.



Figura 5.-Filtración del sobrenadante de la centrifugación.

El punto isoeléctrico de las proteínas de hígado de cerdo es 4,5 (Feliu-Alsina et al., 2023), por lo que, una vez obtenido el sobrenadante filtrado, se cambia el pH hasta 4,5 con ácido clorhídrico 2 M. De esta forma, se precipitan las proteínas del resto de componentes solubles en la disolución ácida. Este proceso se realiza en refrigeración (4 °C) durante 24 h. El precipitado de aislado proteico de la proteína de hígado de cerdo se muestra en la Figura 6.



Figura 6.- Aspecto de la muestra tras la precipitación ácida.

Una vez centrifugada la muestra nuevamente, se puede observar el aislado proteico en cada alícuota. Por tanto, para obtener solo esa parte se debe realizar una última filtración donde el líquido será desechado. La parte solida será congelada en las mismas condiciones que la materia prima.

Finalmente, el aislado proteico se liofilizó (LyoMicron, Coolvacuum) durante 24 h a una temperatura del condensador de $-80,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un vacío de 998,21 mbar. (Figura 7). El procedimiento de la liofilizadora consiste en el secado cuyo principio es la sublimación del hielo de un producto congelado (Mayer et al, 2006). Este proceso se hace esencialmente para eliminar el agua convirtiéndola de solido a gas. El aislado proteico liofilizado se muestra en la Figura 8.



Figura 7.-Liofilizador.



Figura 8.- Aislado proteico liofilizado.

En cada condición experimental ensayada, el proceso de obtención de aislado proteico se realizó para obtener la cantidad necesaria para analizar sus propiedades tecnológicas y contenido de nitrógeno.

3.3. Pretratamiento con pulsos eléctricos de alta intensidad.

Respecto al proceso de extracción de proteína con la combinación de pulsos eléctricos y ultrasonidos se siguió un proceso de extracción similar exceptuando la parte previa a la trituración del hígado de cerdo. Para realizar el tratamiento PEF, el hígado se cortaba en fragmentos de 40 gramos y se colocaba en la cámara de tratamiento junto con 400 mL de agua de la red pública (Figura 9). Se aplicaron pulsos cuadrados monopolares (Energy Pulse Systems, Portugal) de 10 kV de amplitud, anchura 25 μ s a una frecuencia de 10 Hz (Figura 10). Se realizaron dos tratamientos modificando el número de pulsos aplicados, 250 y 500, lo que incide en la energía aplicada a la muestra 12 y 24 kJ/kg.



Figura 9.-Hígado de cerdo tras tratamiento de PEF.

En la Figura 10 se observa como el tratamiento PEF conlleva una salida de solutos del interior celular debido al efecto de electroporación que provoca. Finalizado el tratamiento PEF, se siguió el proceso de extracción de proteína explicado en la sección 3.2. “Proceso de extracción y aislamiento de proteínas.”



Figura 10.- Montaje experimental del sistema PEF: Generador y cámara de seguridad para la realización del tratamiento

3.4. Diseño experimental.

Mediante el programa Statgraphics se obtuvieron 2 diseños experimentales: extracción con ultrasonidos y combinado ultrasonidos y PEF. En la Tabla 1 se pueden ver las 15 experiencias realizadas y sus condiciones para la comparativa del uso de ultrasonidos o su ausencia.

El diseño experimental de la Tabla 1 (solo US) se denomina Box-Behnken con 3 factores: ultrasonidos (US), tiempo (t) y Temperatura (T) y a 3 niveles: US: 0, 50 y 100 W; t: 10, 15 y 20 min; T: 20, 30 y 40 °C.

Tabla 1. Experiencias con ultrasonidos

Experiencias		
US (W)	t (min)	T (°C)
50	20	20
100	15	20
0	15	20
50	20	40
0	15	40
100	10	30
50	10	20
100	20	30
100	15	40
0	20	30
50	10	40
0	10	30
50	15	30
50	15	30
50	15	30

Por otro lado, en la Tabla 2 se observan las 12 experiencias que se realizaron para poder comparar el uso de los ultrasonidos o la ausencia de estos y los pulsos eléctricos. En todas las experiencias la temperatura y el tiempo de los ultrasonidos fue constante: 30°C y 15 minutos. El diseño experimental de la Tabla 2 se realizó considerando 2 factores: pulsos eléctricos (PEF) y US y 2 niveles: PEF: 250 y 500 pulsos; US: 0 y 100 W.

Tabla 2.-Experiencias con ultrasonidos y PEF

Experiencias			
PEF	US (W)	t (min)	T (°C)
250	0	15	30
250	100	15	30
500	0	15	30
500	100	15	30
250	0	15	30
250	100	15	30
500	0	15	30
500	100	15	30
250	0	15	30
250	100	15	30
500	0	15	30
500	100	15	30

3.5. Análisis del contenido en proteína y rendimiento.

El análisis del contenido de proteína se realizó en el laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SCSIE) de la Universitat de València. Se determinó el porcentaje en peso de los elementos CHNS a través de un analizador elemental. Esta técnica es fundamental en la química orgánica y en el análisis elemental de diversos compuestos, incluyendo alimentos (Cachola., 2022). El análisis de CHNS requiere una combustión a alta temperatura en un ambiente rico en oxígeno y se basa en el método clásico de Pregl-Dumas. Esta combustión se puede llevar a cabo tanto en condiciones estáticas o dinámicas. En dicha combustión el nitrógeno se transforma en gas nitrógeno/óxidos de nitrógeno y estos son arrastrados fuera de la cámara mediante un gas portador inerte pasados sobre una superficie de cobre caliente para eliminar el oxígeno no consumido en la combustión inicial y convertir los óxidos de nitrógeno en gas nitrógeno. En la Figura 11, se muestran la muestra (0.02 g) de aislado proteico liofilizado que se mandó al SCSIE, para cada condición experimental se mandó una única muestra.

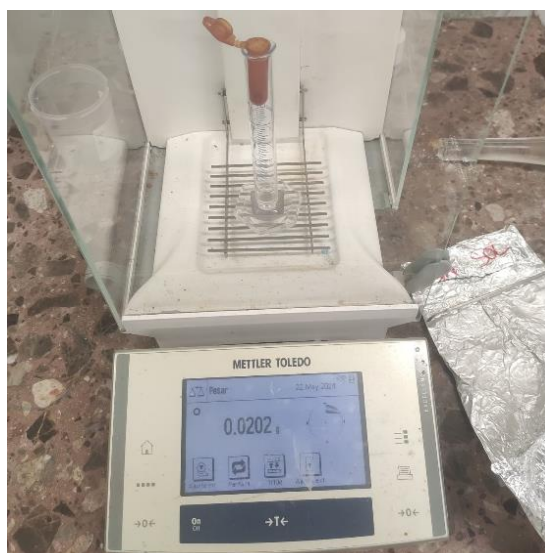


Figura 11.-Portamuestras con aislado proteico

Una vez obtenido el porcentaje de N de la muestra, éste se debe multiplicar por un valor dependiente del tipo de muestra (REF) para calcular la masa de proteína. En este caso, se utilizó el valor de 6.25 debido a que este factor de conversión está tabulado para cada grupo de alimentos. Esto significa que 1 gramo de nitrógeno corresponde a 6.25 gramos de proteína.

Para calcular el rendimiento del aislado, se realizó una relación proporcional de la cantidad de aislado proteico y el porcentaje de proteínas cada 100 gramos (Ecuación 1):

$$\frac{\text{Gramos de aislado proteico}}{100 \text{ gramos de hígado}} = \frac{\text{Porcentaje de proteínas en la muestra}}{\text{Porcentaje de proteínas en 100 gramos}}$$

(Ecuación 1)

Los resultados obtenidos del laboratorio, siendo transformados previamente por el factor 6,25, son el porcentaje de proteínas en 100 gramos según la experiencia. Por tanto, para calcular el porcentaje de proteínas de la muestra se debe de despejar esta expresión matemática para cada una de las experiencias realizadas.

Para obtener el contenido de proteínas en el aislado de cada una de las experiencias, se debe realizar otra expresión matemática que relacione nuevamente los gramos de hígado de cada una de ellas. Se toma como valor medio de proteínas de 100 de hígado fresco el valor calculado en el utilizado en el presente trabajo (18%) para hacer los cálculos:

$$\frac{\text{Gramos de hígado fresco de la experiencia}}{100 \text{ gramos de hígado fresco}} = \frac{\text{Contenido de proteínas}}{\text{Proteínas en 100 gramos}}$$

(Ecuación 2)

Para obtener el rendimiento de la extracción se relaciona el porcentaje de las proteínas de extracto proteico de cada experiencia con la cantidad de proteínas totales que había inicialmente en el hígado fresco en cada una. Este resultado se pasará a porcentaje.

$$\frac{\text{Porcentaje de proteínas en el extracto proteico}}{\text{Porcentaje de proteínas en el hígado fresco}} * 100$$

(Ecuación 3)

3.6. Propiedades tecnofuncionales.

Una vez obtenido el aislado proteico de las diferentes experiencias, se estudió las diferentes propiedades tecnológicas que incluyen la capacidad de retención de agua (WHC), la capacidad de retención de aceite (OHC), así como la capacidad y estabilidad emulsionante (EA y ES).

3.6.1. Capacidad de retención de agua (WHC).

La capacidad de retención de agua, (Water-holding capacity), definida como la cantidad de agua retenida por la muestra sin ser sometida a ningún tipo de estrés (Rodríguez et al., 2015). Se determinó colocando 0,5 g de aislado proteico en un tubo de centrifuga previamente pesado al que se agregaron 7,5 mL de tampón fosfato para obtener un pH similar a la carne al mezclarse. Posteriormente, se agitó en un vortex durante un minuto más tres agitaciones manuales cada 10 min a temperatura ambiente (Figura 12).

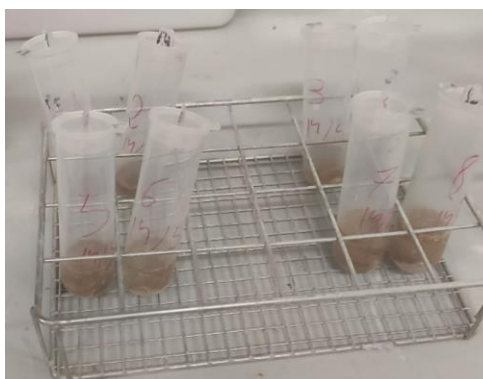


Figura 12.-Tubos agitados de la prueba WHC

A continuación, se centrifugó a 7000 rpm durante 15 min para separar el sobrenadante que se descartó. Mientras que el sólido fue secado durante 25 min a 50°C siguiendo el protocolo descrito por Mesías et al., (2017).

$$WHC \left(\frac{g \text{ agua}}{g \text{ aislado}} \right) = \frac{Wf - Wi}{Ws}$$

(Ecuación 4)

Donde,

Wi: peso seco inicial (g)

Wf: peso final (g)

Ws: peso del aislado (g)

3.6.2. Capacidad de retención de aceite (OHC).

La capacidad de retención de aceite (Oil-holding capacity), es la habilidad de un material, como proteínas o fibras, para absorber y retener aceite, afectando la textura y calidad de productos alimentarios. Se determinó colocando 0,5 gramos de la muestra en un tubo de centrifuga previamente pesado al que se agregaron 3 mL de aceite de maíz. Esta mezcla fue agitada en el vortex durante un minuto más tres agitaciones manuales cada 10 min a temperatura ambiente para que las proteínas sigan reteniendo aceite. A continuación, se centrifugó a 5000 rpm durante 25 min para separar la fase la sólida con el aceite como se ve en la Figura 13.



Figura 13.-Fase solida separada del aceite no absorbido.

Por último, se vertió el aceite no absorbido en una probeta para leer el volumen de este y poder usarlo en la siguiente fórmula para obtener los resultados.

$$OHC \left(\frac{g \text{ aceite}}{g \text{ aislado}} \right) = \frac{(Vi - Vf) * \rho}{Wi}$$

(Ecuación 5)

Donde,

V_i: volumen del aceite añadido (mL)

V_f: volumen del aceite libre. (mL)

ρ : densidad del aceite (g/mL)

W_i: cantidad de proteína añadida (g)

3.6.3. Actividad emulsionante (EA).

La actividad emulsionante (emulsifying activity) se refiere a la eficiencia de un agente emulsionante para reducir la tensión superficial entre dos fases inmiscibles, como el aceite y el agua, permitiendo la formación de una emulsión. Esta tiene un papel importante relacionado con sus aplicaciones como ingredientes alimentarios. Las proteínas por su naturaleza son buenos agentes emulsionantes en alimentos, actúan como surfactantes, pero esto depende de su capacidad para formar películas que puedan rodear los glóbulos con la finalidad de disminuir la tensión en la interfase de los líquidos aceite-agua (Stone et al., 2015).

La actividad emulsionante y la estabilidad emulsionante fue determinada por el método de Yasumatsu et al. 1972. Para la fase acuosa se usará la mezcla del aislado proteico (0,7 g) con 10,5 mL de tampón de pH 8 para solubilizar y aceite de soja (Figura 14), con otros 10,5 mL por experiencia, para la fase grasa. Se usó NaOH para subir el pH de las proteínas y el tampón hasta pH 8,5 para tener una máxima solubilidad. Se utilizaron tubos eppendorf para centrifuga con medidas ya que se necesita saber el volumen de cada fase.



Figura 14.-Material para EA y ES

El procedimiento consistió en agitar la mezcla durante 20 min para solubilizar las proteínas con la fase acuosa y a continuación añadir el aceite de soja para mezclarlo con ayuda del Ultra-Turrax. Una vez homogeneizada la muestra, esta se centrifugo a 1300 rpm durante 5 min a 20°C para tener ambas fases separadas como se ve en la Figura 15.

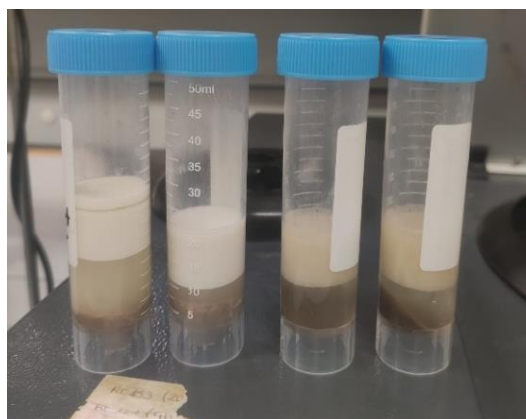


Figura 15.-Fases separadas de la emulsión.

Se midieron ambas fases y su total para saber el resultado de la actividad emulsionante mediante la Ecuación 6 que comprende una división entre la emulsión y la altura total de la mezcla (Yasumatsu et al., 1972).

$$EA\% = \frac{\text{altura de la emulsión}}{\text{altura total}}$$

(Ecuación 6)

3.6.4. Estabilidad emulsionante (ES).

La estabilidad de la emulsión, o en inglés, emulsion stability (ES) depende de la capacidad de las gotas emulsionadas de permanecer en una fase dispersa sin separarse por la floculación o coalescencia. Si la carga neta es más alta de una proteína en la interfase aceite-agua la repulsión entre gotas será mayor por lo que se mejorará la estabilidad de la emulsión formada (Lean et al., 2017).

Para la estabilidad emulsionante se calentaron las mismas muestras que se usaron en el apartado anterior a 80°C mediante un baño durante 30 min (Figura 16). Inmediatamente después se enfriaron con agua fría durante 5 min y se llevaron nuevamente a la centrifuga, con las condiciones anteriormente descritas, donde se podrá ver el nuevo resultado con las alturas de ambas fases.



Figura 16.-Tubos eppendorf en baño.

Se aplica la Ecuación 7 (Yasumatsu et al.,1972) con las nuevas alturas de las fases en el tubo.

$$ES\% = \frac{\text{Nueva altura de la emulsión}}{\text{Altura total}}$$

(Ecuación 7)

3.7. Análisis Estadístico

Para analizar la influencia de los ultrasonidos y su combinación con el PEF en los parámetros cinéticos se empleó el análisis de varianza multifactorial: ANOVA y se han establecido los grupos homogéneos respecto de la media mediante los intervalos LSD (Least Significant Difference) de Fisher, con un nivel de confianza del 95%. Se consideró un p-valor de 0,05 para la significación estadística, realizándose el análisis estadístico en el software Statgraphics Centurion XIX (Statgraphics Technologies Inc., VA, USA).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Rendimiento de extracción de proteínas

Los datos experimentales obtenidos de la primera parte, la extracción de proteínas solo con ultrasonidos, se muestra en la Tabla 3, donde se encuentra el peso del hígado fresco (g), el nombre asignado a cada experiencia, las condiciones y la proteína extraída. Se observa que la experiencia con mayor cantidad de proteína extraída en polvo es la U5, seguida de la U1 y U8. Ambas con ultrasonidos, por lo que se puede relacionar este hecho con que el uso de estos aumente la extracción de las proteínas.

Tabla 3.-Valores de la extracción de proteínas con ultrasonidos.

Peso (g)	Nº	Experiencias			Resultado
		US (W)	t (min)	T (°C)	Proteína (g)
40,40	A4	0	15	20	6,44
40,10	A5	0	20	30	6,28
40,15	A6	0	15	40	5,75
40,40	A7	0	10	30	6,03
40,47	U1	100	15	20	7,18
40,37	U2	50	10	20	6,68
40,31	U3	100	20	30	6,72
40,36	U4	100	10	30	6,72
40,54	U5	50	10	40	7,56
40,08	U6	50	20	20	6,75
40,18	U7	50	15	30	6,85
40,50	U8	50	15	30	7,00
39,96	U9	50	15	30	6,95
40,29	U10	50	20	40	6,11
40,01	U11	100	15	40	5,76

Por otra parte, se han obtenido los resultados de la combinación de ultrasonidos y pulsos eléctricos y de igual manera se ha realizado una tabla para su comparación, con las mismas columnas que en la anterior, pero con los dos únicos factores de PEF y US ya que la temperatura y el tiempo fueron constantes. La experiencia con mayor cantidad de proteína extraída en polvo es la P4, como se observa en la Tabla 4, seguida de P12 y P10, todas ellas comparten nuevamente el hecho de usar ultrasonidos en su proceso.

Tabla 4.- Valores de la extracción de proteínas con ultrasonidos y pulsos eléctricos.

Peso (g)	Nº	Experiencias		Resultado
		PEF	US (W)	Proteínas (g)
40,9	P1	250	0	3,26
43,5	P2	250	100	5,08
40,68	P3	500	0	2,87
45,43	P4	500	100	5,74
40,87	P5	250	0	3,05
45,3	P6	250	100	5,42
40,96	P7	500	0	2,64
43,5	P8	500	100	5,49
40,8	P9	250	0	3,63
43,5	P10	250	100	5,55
40,37	P11	500	0	3,24
42,67	P12	500	100	5,58

4.2. Contenido de proteína en el aislado proteico.

En el estudio realizado en el presente trabajo, se relacionó la extracción de proteínas con el uso de ultrasonidos y la combinación de ultrasonidos y PEF. Los resultados obtenidos del primer análisis, el contenido de proteínas, dieron los resultados expuestos en las Tablas 5 y 6. Cada experiencia tiene dos valores ya que se realizó dos pruebas para cada una.

En la Tabla 5 se aprecia que los valores más altos son para las experiencias U9 (65%), A5 (64,19%) y A6 (64,13%). La experiencia U9 es la única que cuenta con ultrasonidos.

Tabla 5.-Influencia de la potencia ultrasónica para el contenido de proteínas.

Nº	Porcentaje de proteínas en la muestra	
	1	2
A4	61,38	63,75
A5	63,75	64,19
A6	61,88	64,13
A7	63,63	62,94
U1	60,88	61,81
U2	62,19	62,44
U3	62,81	62,88
U4	62,94	63,06
U5	62,13	61,63
U6	62,56	62,13
U7	62,31	63,00
U8	61,75	62,69
U9	65,00	64,44
U10	63,00	61,88
U11	63,06	61,75

Por otro lado, en la Tabla 6, los valores más elevados del porcentaje de proteína están en P5 (76,13%), P7 (75,5%) y P1 (74,25%). Los tres tienen en común que no se usa ultrasonidos en la extracción, además de que P1 y P5 cuentan un número de pulsos aplicados de 250.

Tabla 6.- Influencia de la potencia ultrasónica y pulsos eléctricos para el contenido de proteínas.

Nº	Porcentaje de proteínas en la muestra	
	1	2
P1	73,19	74,25
P2	61,38	61,81
P3	75,31	75,19
P4	59,69	59,94
P5	76,13	74,81
P6	66,19	66,38
P7	74,88	75,50
P8	65,38	66,94
P9	70,31	70,94
P10	63,63	63,88
P11	68,50	68,06
P12	65,06	64,56

En cuanto al porcentaje de proteína en el aislado proteico, el efecto de ultrasonidos es estadísticamente significativo ($p < 0,05$), por lo que hay diferencias entre los diferentes niveles de ultrasonidos. El grupo con US (W) = 100 tiene una media (25,55) y una desviación estándar (1,58) significativamente más alta en comparación con los grupos con US (W) = 0 y 50. Los intervalos de confianza no se superponen completamente, indicando diferencias significativas entre los niveles (Figura 17).

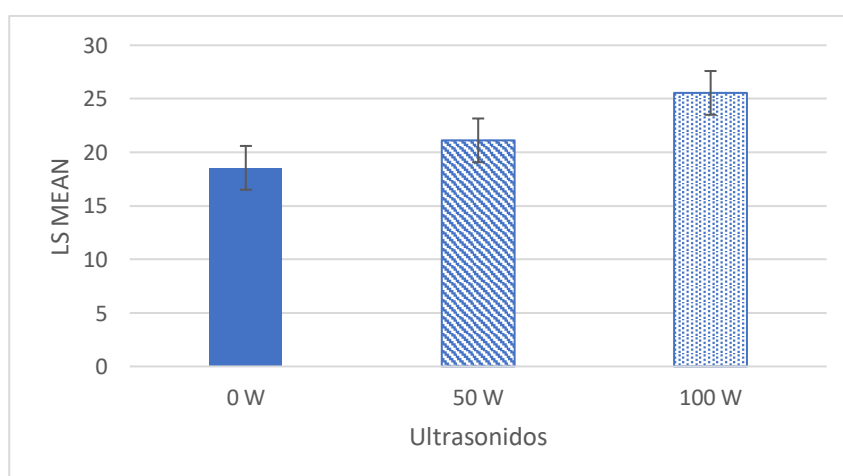


Figura 17.- Influencia de la potencia ultrasónica aplicada en las proteínas del aislado obtenido. Se muestra los valores medio e intervalos LSD.

Por otro lado, aunque los otros dos factores no sean significativos en el Análisis de la Varianza, se observó que el tiempo de tratamiento de 10 minutos tiene la media (23,56) más alta en comparación con 15 y 20 minutos. Los intervalos de confianza para 10 minutos no se superponen con los intervalos de confianza para 20 minutos, lo que sugiere que el tiempo de tratamiento puede tener un efecto, aunque no sea significativo, en el porcentaje de proteínas. Por otra parte, la temperatura de 30°C muestra la media más alta, mientras que 40°C muestra la más baja.

En las Tabla 7 y 8 se exponen la media de los dos resultados de la aplicación de las Ecuaciones 1 y 2 y la relación entre ambas como resultado de la cantidad de proteínas extraídas, Ecuación 3. La Tabla 7 es referida a las experiencias con 3 factores: US, tiempo y temperatura.

Tabla 7.-Valores finales de las extracciones ultrasonidos, Temperatura y tiempo.

Nº	Media y desviación estándar	
	Proteínas del aislado proteico (g)	Rendimiento (%)
A4	4,03 ± 0,08	55,40 ± 1,05
A5	4,02 ± 0,01	55,66 ± 0,19
A6	3,62 ± 0,05	50,12 ± 0,9
A7	3,81 ± 0,02	52,47 ± 0,29
U1	4,41 ± 0,02	60,46 ± 0,46
U2	4,16 ± 0,01	57,28 ± 0,11
U3	4,22 ± 0,01	58,20 ± 0,06
U4	4,23 ± 0,03	58,28 ± 0,06
U5	4,68 ± 0,01	64,10 ± 0,26
U6	4,21 ± 0,01	58,33 ± 0,2
U7	4,29 ± 0,02	59,14 ± 0,45
U8	4,36 ± 0,02	59,74 ± 0,45
U9	4,5 ± 0,01	62,53 ± 0,27
U10	3,82 ± 0,02	52,60 ± 0,47
U11	3,59 ± 0,04	49,91 ± 0,52

En el caso de las experiencias con distintas combinaciones de ultrasonidos, tiempo y temperatura, se observa que, además de los ultrasonidos, la temperatura también tiene un impacto estadísticamente significativo en el rendimiento y este es mayor a temperaturas de 20°C y 30°C, mientras que disminuye significativamente a 40°C (Figura 18). Temperaturas más bajas son ventajosas porque reduce los costes de fabricación. En un estudio de extracción de proteína de frijol se encontró que el rendimiento mejoró con el incremento de la temperatura hasta 30 °C y decreció a partir de esa temperatura (Wang et al. 2011). En otro estudio con proteína de maní el rendimiento de extracción fue dependiente de la temperatura con óptimos rendimientos a 40°C, mientras que

más altas temperaturas, registraron más bajos rendimientos siendo más acentuado el descenso cuando la temperatura se incrementó a 70°C (Kain et al. 2009). En un estudio con proteína de soja se reporta una tendencia decreciente en el rendimiento en el rango de temperatura desde 30°C hasta 50°C, acentuándose esta tendencia hasta 70°C (Rosenthal et al. 1998).

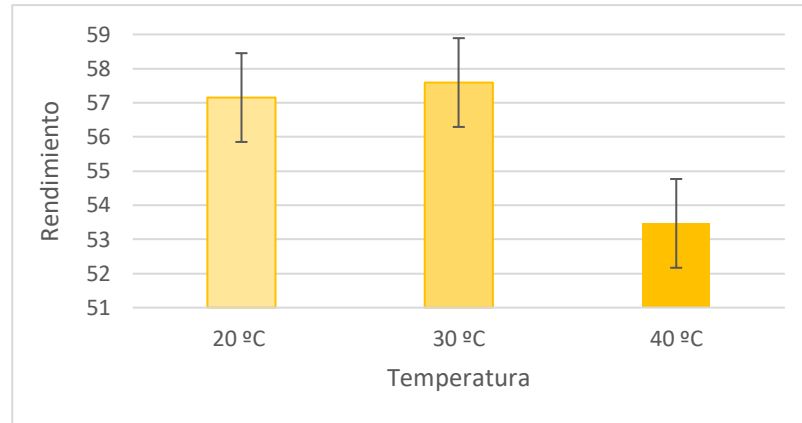


Figura 18.- Influencia de la temperatura aplicada en el rendimiento de aislado proteico. Se muestran los valores medios e intervalos LSD.

Respecto al tiempo, este no es significativo estadísticamente ($p > 0,05$), sin embargo, el rendimiento disminuye ligeramente a medida que aumenta el tiempo, con el mayor rendimiento a los 10 minutos y el menor a los 20 minutos. El hecho de que no sea significativo concuerda con estudios anteriores donde se observa que el rendimiento de la extracción de las proteínas no aumenta si la extracción se prolongara durante más tiempo (Rosenthal et al. 1998).

Volviendo a los ultrasonidos, en la Figura 19, el nivel 50 W (media de 58,88) muestra un rendimiento significativamente mayor comparado con 0 y 100 W debido a que sus intervalos de confianza no se solapan tanto, lo cual sugiere una diferencia significativa estadística ($p < 0,05$).

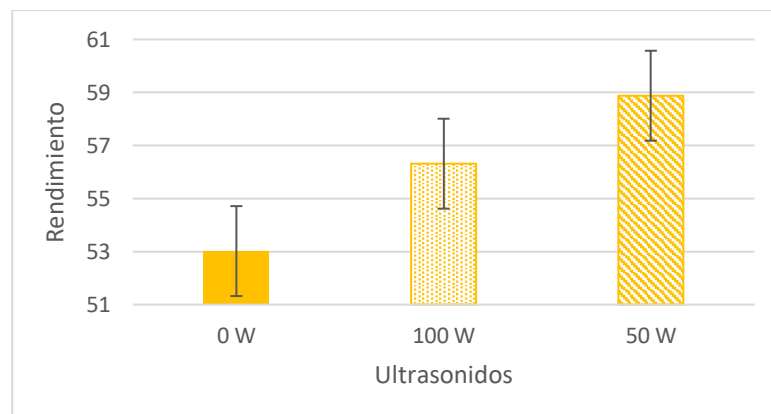


Figura 19.- Influencia de la potencia ultrasónica aplicada en el rendimiento de aislado proteico. Se muestran los valores medios e intervalos LSD

En la Tabla 8 se muestran la media y la desviación estándar de los 2 factores: US y PEF.

Tabla 8.-Valores finales de las extracciones US y PEF

Nº	Media y desviación estándar	
	Proteínas del aislado proteico (g)	Rendimiento (%)
P1	2,40 ± 0,02	32,64 ± 0,24
P2	3,13 ± 0,01	39,96 ± 0,14
P3	2,16 ± 0,00	29,49 ± 0,02
P4	3,43 ± 0,01	41,98 ± 0,09
P5	2,30 ± 0,02	31,29 ± 0,27
P6	3,59 ± 0,01	44,06 ± 0,06
P7	1,99 ± 0,01	26,92 ± 0,11
P8	3,63 ± 0,04	46,39 ± 0,55
P9	2,56 ± 0,01	34,91 ± 0,15
P10	3,54 ± 0,01	45,19 ± 0,09
P11	2,21 ± 0,01	30,45 ± 0,10
P12	3,62 ± 0,01	47,09 ± 0,18

En el caso de las experiencias con PEF y ultrasonidos, este primero no es significativo estadísticamente. En cambio, el nivel de 100 W (media de 44,12) tiene un rendimiento significativamente mayor en comparación con 0 W (media de 30,95), como se indica por los intervalos de confianza no superpuestos (Figura 20).

Estudios previos con ultrasonidos afirman que el uso de ultrasonidos mejora el rendimiento de la extracción (Acuña A., 2017) concordando así con el presente análisis estadístico.

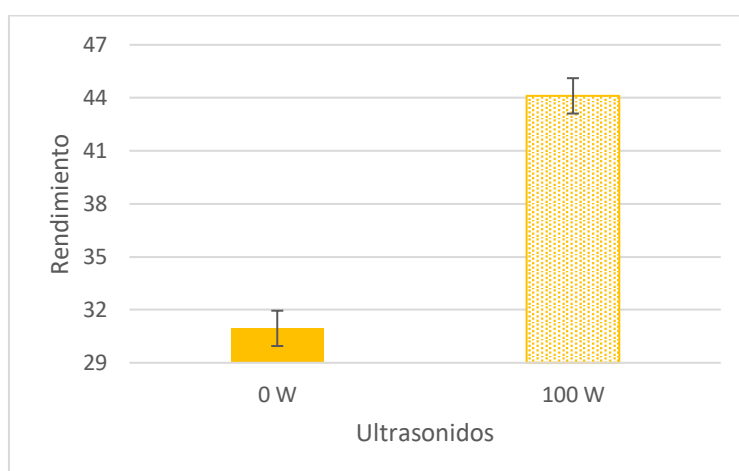


Figura 20.- Influencia de la potencia ultrasónica aplicada y PEF en el rendimiento de aislado proteico. Se muestran los valores medios e intervalos LSD.

4.3. Propiedades tecnofuncionales.

4.3.1. Capacidad de retención de agua (WHC).

Para las pruebas tecnofuncionales de la capacidad de retención del agua de las proteínas se obtuvieron los resultados expuestos en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9.-Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la WHC de ultrasonidos, tiempo y temperatura.

Nº	Media y desviación estándar
A4	1,98 ± 0,03
A5	1,94 ± 0,04
A6	2,21 ± 0,07
A7	1,82 ± 0,02
U1	2,13 ± 0,03
U2	1,87 ± 0,01
U3	2,20 ± 0,03
U4	2,01 ± 0,06
U5	2,44 ± 0,16
U6	2,14 ± 0,02
U7	2,10 ± 0,01
U8	2,06 ± 0,03
U9	1,88 ± 0,01
U10	2,30 ± 0,08
U11	2,50 ± 0,09

Se observó que los factores significativos en la capacidad de retención de agua de los aislados proteicos fueron los ultrasonidos y la temperatura, siendo 100 W y 40°C los de mayor interés respecto a la mejora de la capacidad de retención de agua. Esta temperatura también ha sido previamente observada como un efecto significativo ($p < 0,01$) sobre la retención de agua en harina de trigo sarraceno (Gallego et al., 2019). En estudios previos con ultrasonidos sobre las características funcionales del aislado de proteína de hígado animal se concluyó que el uso de ultrasonidos mejoraba la capacidad de retención de agua/aceite. (Zou et al., 2017). También se han encontrado evidencias en un estudio sobre la combinación de ultrasonidos y pulsos eléctricos en carne de pechuga de pollo (Roobab et al., 2024) donde se afirma que un pretratamiento con US mejora la capacidad de retención de agua. Ambos estudios concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

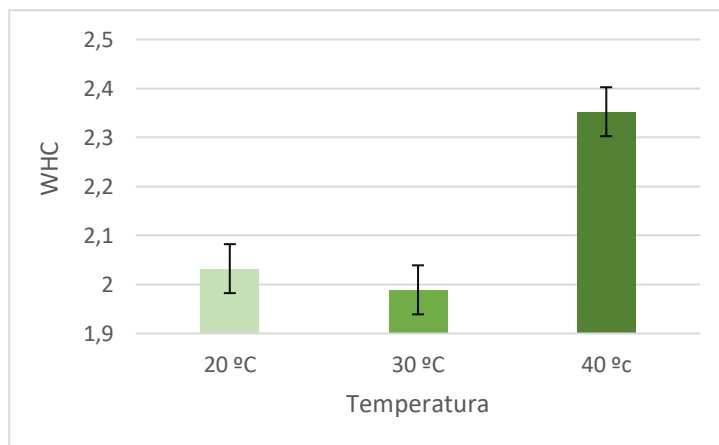


Figura 21.-. Influencia de la temperatura aplicada en la propiedad tecnofuncional WHC. Se muestran los valores medios e intervalo LSD.

Los resultados obtenidos respecto a las pruebas realizadas con el pretratamiento con pulsos eléctricos de alta intensidad se exponen en la Tabla 10.

Tabla 10.- Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la WHC para ultrasonidos y PEF.

Nº	Media y desviación estándar
P1	2,05 ± 0,40
P2	1,91 ± 0,01
P3	2,16 ± 0,06
P4	2,21 ± 0,04
P5	1,83 ± 0,13
P6	2,07 ± 0,19
P7	2,07 ± 0,12
P8	1,99 ± 0,07
P9	1,97 ± 0,01
P10	1,97 ± 0,04
P11	2,04 ± 0,01
P12	2,15 ± 0,08

El único factor significativo estadísticamente ($p < 0,05$), es el uso del PEF, siendo el nivel 500 el que tiene una media significativamente más alta en comparación con el nivel 250 (Figura 22). Los intervalos de confianza no se superponen, indicando que la diferencia entre los niveles 250 y 500 es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

El tratamiento de PEF provoca un impacto en la microestructura de la carne debido a la electroporación de las membranas celulares. Esta tiene un papel importante en la síntesis de componentes biológicos como proteínas y nucleótidos. Se ha informado que la electroporación en las membranas celulares también aparece en la superficie de la fibra muscular. Estudios previos

(Alahakoon et al., 2016) indican que los cambios en las fibras musculares pueden tener un efecto en varios parámetros de calidad de la carne, siendo uno de estos la capacidad de retención de agua. Según algunos autores, el uso de electricidad sobre carne de pollo mejora la capacidad de retención de agua (Xu et al., 2023).

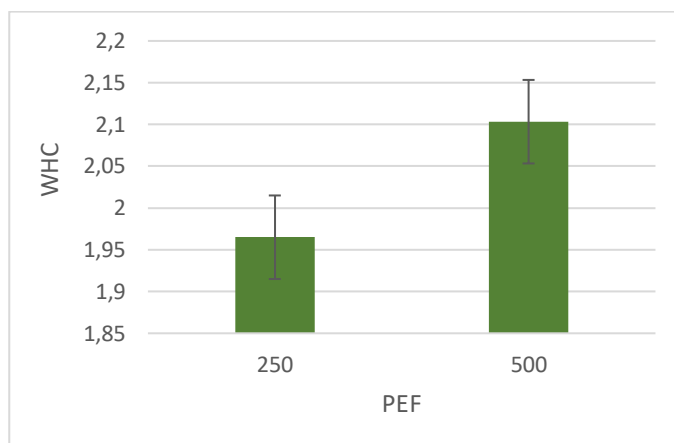


Figura 22.- Influencia de los pulsos eléctricos aplicados en la propiedad tecnofuncional WHC. Se muestran los valores medios e intervalo LSD.

4.3.2. Capacidad de retención de aceite (OHC).

Para las pruebas tecnofuncionales de la capacidad de retención del aceite del aislado proteico se obtuvieron los resultados mostrados en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11.- Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la OHC de ultrasonidos, tiempo y temperatura.

Nº	Media y desviación estándar
A4	2,77 ± 0,03
A5	2,57 ± 0,25
A6	2,53 ± 0,19
A7	4,21 ± 0,04
U1	4,51 ± 0,20
U2	3,19 ± 0,43
U3	3,80 ± 0,24
U4	4,82 ± 0,14
U5	3,03 ± 0,70
U6	3,76 ± 0,09
U7	3,76 ± 0,09
U8	3,60 ± 0,03
U9	2,80 ± 0,79
U10	4,36 ± 0,08
U11	3,12 ± 0,04
U12	3,16 ± 0,08

Tabla 12.- Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la OHC para ultrasonidos y PEF.

Nº	Media y desviación estándar
P1	3,30 ± 0,05
P2	3,55 ± 0,01
P3	3,59 ± 0,00
P4	3,07 ± 0,01
P5	2,92 ± 0,04
P6	2,98 ± 0,18
P7	2,82 ± 0,39
P8	2,81 ± 0,04
P9	2,19 ± 0,02
P10	2,54 ± 0,31
P11	2,34 ± 0,16
P12	2,58 ± 0,05

En el análisis estadístico realizado para la Tabla 11 se observó que los factores significativos son de nuevo los ultrasonidos y la temperatura. Se observa un aumento gradual en las medias de OHC a medida que aumenta el nivel de los ultrasonidos (0, 50, 100 W), Figura 23. Esto puede deberse a que el uso de los ultrasonidos rompe las moléculas para producir péptidos más pequeños (Beltrán et al., 2023) y estos aumenta su área superficial, lo que favorece la interacción con el agua y el aceite. La mejora de propiedades funcionales de la proteína original como absorción de agua o aceite se debe al menor tamaño de los péptidos, incremento de grupos NH₄⁺ y COO⁻ y exposición de grupos hidrófobos (Vioque y Millán, 2005).

Por otro lado, 30°C proporciona el mayor valor para OHC (3,76) y es significativamente mejor en comparación con 40°C. Las diferencias entre 20°C y 30°C, así como entre 20°C y 40°C, no son significativas.

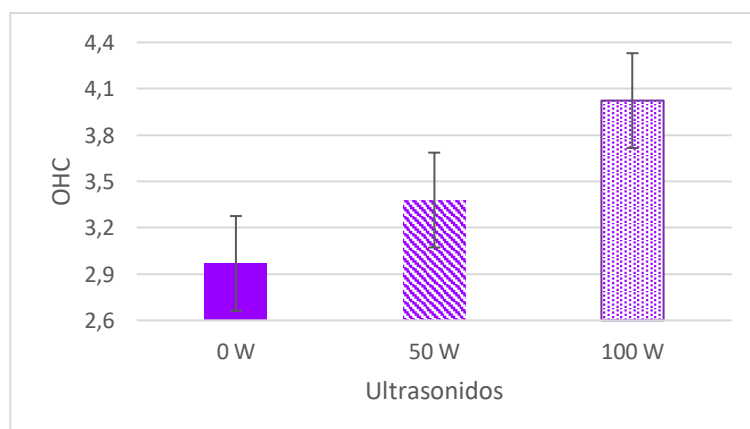


Figura 23.- Influencia de la potencia ultrasónica aplicada en la propiedad tecnofuncional OHC. Se muestran los valores medios e intervalo LSD.

4.3.3. Actividad emulsionante (EA).

Los resultados de las pruebas tecnofuncionales de la actividad emulsionante para los dos tipos de experiencias se exponen en las Tablas 13 y 14.

Tabla 13.- Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la EA de ultrasonidos, tiempo y temperatura.

Nº	Media y desviación estándar
A4	13,0 ± 0,00
A5	13,5 ± 1,00
A6	12,5 ± 0,00
A7	12,75 ± 0,25
U1	14,25 ± 0,75
U2	12,50 ± 0,00
U3	14,5 ± 1,50
U4	14,5 ± 0,00
U5	10,75 ± 0,25
U6	13,25 ± 0,25
U7	14,00 ± 0,00
U8	13,50 ± 0,00
U9	13,50 ± 0,00
U10	11,00 ± 0,00
U11	10,25 ± 0,03
U12	11,25 ± 1,25

Tabla 14.- Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la EA para ultrasonidos y PEF.

Nº	Media y desviación estándar
P1	11,00 ± 0,00
P2	11,25 ± 0,25
P3	2,50 ± 0,00
P4	11,75 ± 0,25
P5	10,00 ± 0,00
P6	10,5 ± 0,25
P7	10,5 ± 0,00
P8	11,75 ± 0,75
P9	11,90 ± 0,05
P10	10,75 ± 0,25
P11	12,00 ± 0,00
P12	11,00 ± 0,00

Se concluyó que la temperatura más óptima para la actividad emulsionante es la de 30 °C, ya que presentó la media significativa más alta (13,77) en comparación con los otros dos factores (Figura 24).

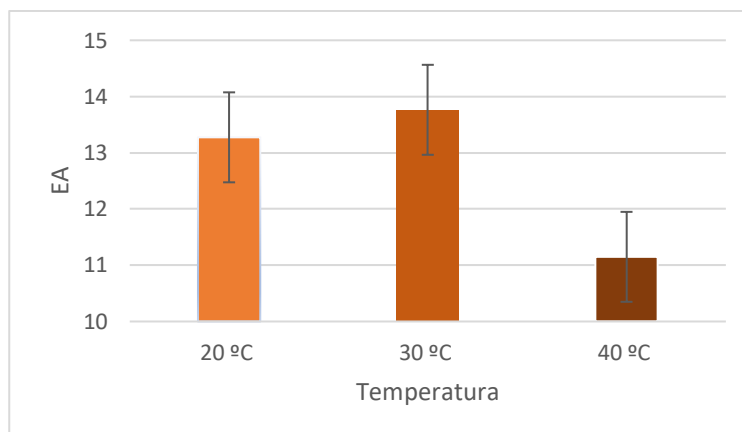


Figura 24.- Influencia de la temperatura aplicada en la propiedad tecnofuncional EA. Se muestran los valores medios e intervalo LSD.

4.3.4. Estabilidad emulsionante (ES).

Por último, la prueba de estabilidad emulsionante, cuyos resultados se exponen en las Tablas 15 y 16 con sus correspondientes factores.

Tabla 15.- Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la ES de ultrasonidos, tiempo y temperatura.

Nº	Media y desviación estándar
A4	10,75 ± 0,25
A5	10,25 ± 0,25
A6	11,00 ± 0,50
A7	12,00 ± 0,50
U1	11,50 ± 1,00
U2	11,50 ± 0,00
U3	13,75 ± 1,75
U4	12,00 ± 0,00
U5	9,75 ± 0,25
U6	11,25 ± 0,25
U7	12,25 ± 0,25
U8	11,50 ± 0,00
U9	12,25 ± 0,25
U10	10,50 ± 0,00
U11	10,50 ± 0,00
U12	11,25 ± 1,25

Tabla 16.- Media y desviación estándar de los valores obtenidos en la ES para ultrasonidos y PEF.

Nº	Media y desviación estándar
P1	10,0 ± 0,00
P2	9,25 ± 0,25
P3	2,00 ± 0,00
P4	10,75 ± 1,25
P5	12,50 ± 0,00
P6	9,75 ± 0,25
P7	9,50 ± 0,00
P8	12,25 ± 0,75
P9	12,35 ± 0,05
P10	9,95 ± 0,05
P11	10,00 ± 0,00
P12	9,95 ± 0,05

Como en el anterior apartado, los resultados estadísticos en ambas tablas son similares respecto a su significancia, siendo el único factor de interés la temperatura en la Tabla 15, siendo 30°C significativamente mejor en comparación. Que esta temperatura sea la misma para las tres anteriores pruebas (OHC, EA y ES) es debido a que están relacionadas ya que la capacidad de retención del aceite se parte para saber si una proteína es adecuada para la formación de la emulsión (Mares et al., 2023). Este hecho también ocurre en los factores significativos estadísticamente para ultrasonidos y PEF ya que ninguna de estas pruebas tecnofuncionales tienen significancia ($p < 0,05$).

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas en este trabajo se muestran a continuación:

1. Para el rendimiento del aislado proteico el uso de la potencia ultrasónica aplicada de 100 W es estadísticamente significativo ($p < 0,05$) ya que se ha obtenido la media más alta (25,55) respecto a 50 W (21,11) y 0 W (18,55). Además, se observó que, a cuanto más potencia ultrasónica, mejor era el rendimiento.
2. Respecto a las propiedades tecnofuncionales, la temperatura más óptima para obtener mejores resultados es la de 30°C. Este hecho puede ser beneficioso en aspectos como el ahorro energético y la reducción del riesgo de la desnaturalización de las proteínas. El uso de ultrasonidos es eficiente para la capacidad de retención de agua y aceite, por lo que su uso es conveniente en aquellas pruebas que requieran de ello. Respecto al uso de pulsos eléctricos, este es significativo ($p < 0,05$) en la capacidad de absorción del agua, por lo que este método se puede utilizar si se requiere potenciar esta característica en los alimentos.
3. El tiempo no ha mostrado diferencias significativas ($p > 0,05$) por lo que se pueden usar menores tiempos ofreciendo así ventajas como mayor producción, menor uso de energía y disminución de costos. El uso de pulsos eléctricos de alta intensidad tampoco ha mostrado diferencias significativas, por tanto, como normalmente un aumento en el número de pulsos provoca un aumento en el tiempo de tratamiento se podrá acelerar el tratamiento ya que el tratamiento de PEF no será necesario.

6. BIBLIOGRAFIA

Abril Gisbert B. (2023). Aplicación de tecnologías emergentes para la obtención de zinc protoporfirina y proteínas funcionales a partir de coproductos cárnicos. Universidad Politécnica de Valencia. <https://dspace.upv.es/bitstream/handle/10251/192244/Abril%20-%20Aplicacion%20de%20tecnologias%20emergentes%20para%20la%20obtencion%20de%20Zinc-protoporfirina%20y%20proteinas....pdf?sequence=4&isAllowed=y>

Agriculture and rural development. (2024) Market situation for pigmeat. https://agriculture.ec.europa.eu/data-and-analysis/markets/overviews/market-observatories/meat_en#pigmeat

ANICE. (2024). Asociación nacional de industrias de la carne en España (ANICE). Consultado el 16-09-2024 de https://www.anice.es/industrias/el-sector/el-sector-carnico-espanol_171_1_ap.html

Jozami Barreiro, F., & Seselovsky, R. (2003). Usos de la transglutaminasa en la industria alimentaria. Elaboración de carne reconstituída. *Invenio*, 6(10), 157-164.

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

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*, Volume 9, Issue 2, Pages 155-160. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1466856407001221>

Knorr D., Zenker, M. Heinz V., Lee D. (2004) *Applications and potential of ultrasonics in food processing*, *Trends in Food Science & Technology*. Volume 15, Issue 5, Pages 261-266. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224403003066>

Demirdöven, A., & Baysal, T. (2008). The Use of Ultrasound and Combined Technologies in Food Preservation. *Food Reviews International*, 25(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/87559120802306157>

Rodríguez, A., (2015) *Introducción (II). Los ultrasonidos*. Web: Conservación de alimentos con ultrasonidos. <https://neveratecnopole.wordpress.com/2015/04/19/introduccion-ii-ultrasonidos/>

Águila CM, Esquivel SL, Rodríguez GC. *Historia y desarrollo del ultrasonido en la Imagenología*. *Acta Med Cent*. 2019;13(4):601-615. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=90162>

Dong X. Y., Guo, L. L., Wei, F., Li, J. F., Jiag, M. L., Che, 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*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4339>

Chemat F., Zill E., Kamran Khan M. (2011) *Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction*, *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 18, Pages 813-835. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417710002385>

- Mayer, L. E., Bertoluzzo, S. M., & Bertoluzzo, M. G. (2006). *Conservación de alimentos diseño y construcción de un liofilizador*. Invenio, 9(17), 147-157. <https://www.redalyc.org/pdf/877/87791711.pdf>
- Cerón-Carrillo, T.G., Palou, E. y Lopéz-Malo, A (2010) "Pulsos eléctricos: fundamentos y aplicaciones en alimentos". *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4 (1), pp 9-26. https://www.researchgate.net/profile/Tere-Ceron/publication/267098717_Pulsos_electricosfundamentos_y_aplicaciones_en_alimentos/links/5446ef540cf22b3c14e0b815/Pulsos-electricosfundamentos-y-aplicaciones-en-alimentos.pdf
- Mesías M. and Morales F. J. (2017) *Effect of Different Flours on the Formation of Hydroxymethylfurfural, Furfural, and Dicarbonyl Compounds in Heated Glucose/Flour Systems*. Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN)
- Yasumatsu K, Sawada K, Moritaka S, Misaki M, Toda J, Wada T and Ishii K, (1972). *Whipping and emulsifying properties of soybean products*. *Agric Bioi Chem* 36:719-727
- Reyes Granda, D.A. (2022) *Determinación de la capacidad emulsionante de proteína de la arveja para su aprovechamiento y valorización en la industria alimentaria*. Universidad Politécnica Salesiana. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/23674/1/UPS-CT010154.pdf>
- Cachola Maldito Lowden, V.M. (2022). *Preparación y caracterización de carbón activado de cáscara de coco. aplicaciones en la adsorción de solutos en disolución acuosa*. Universidad de Extremadura. https://dehesa.unex.es:8443/bitstream/10662/14622/1/TDUEX_2022_Cachola_Maldito.pdf
- Acuña González A. (2017). *Efecto de ultrasonidos en el proceso de extracción de proteínas de co-productos animales y escalado del proceso*. Universidad de Oviedo.
- Gallego Gallego C. (2019). *Estudio de las propiedades funcionales de harinas de trigo sarraceno obtenidas a partir de granos tratados con altas presiones hidrostáticas*. Universidad de Valladolid. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/38353/TFM-L485.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Zou Y., P.P. Li, K. Zhang, L. Wang, M.H. Zhang, Z.L. Sun, C. Sun, Z.M. Geng, W.M. Xu, D.Y. Wang. (2017) *Effects of ultrasound-assisted alkaline extraction on the physiochemical and functional characteristics of chicken liver protein isolate*. *Poultry Science*, Volume 96, Issue 8, Pages 2975-2985. <https://doi.org/10.3382/ps/pex049>.
- Roobab U., Chen B., Madni G.M, Tong Z.G, Zeng X., Abdi G., Hussain S., Aadil R.M. (2024). *Evaluation of ultrasound and pulsed electric field combinations on the cooking Losses, texture Profile, and Taste-Related amino acids of chicken breast meat*, *Ultrasonics Sonochemistry*. Vol 107. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106919>.
- Xu Y., Zhang D., Xie F., Xin Li, Schroyen M, Chen L., Hou C. (2023). *Changes in water holding capacity of chilled fresh pork in controlled freezing-point storage assisted by different modes of electrostatic field action*. *Meat Science*, Volume 204. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109269>.
- Wang, M; Jiang, L; Yang, L; Qi, LIU; Xiaonan, S. 2011. *Optimization of Extraction Process of Protein Isolate from Mung Bean*. *Procedia Engineering* 15(1)5250-5258. https://www.researchgate.net/publication/271637751_Optimization_of_Extraction_Process_of_Protein_Isolate_from_Mung_Bean

Kain, RJ; Chen, Z; Sonda TS; Abu-Kpawoh, JC. 2009. Study on the Effect of Control Variables on the Extraction of Peanut Protein Isolates from Peanut Meal (*Arachis hypogaea* L.). *American Journal of Food Technology* (4):47-55 <https://scialert.net/fulltext/?doi=ajft.2009.47.55>

Rosenthal, A; Pyle, DL; Niranjana, K. 1998. Simultaneous Aqueous Extraction of Oil and Protein from Soybean: Mechanisms for Process Design. *Department of Food Science and Technology* 76(1): parte c. <https://doi.org/10.1205/096030898532124>

Marez Maldonado D.M., Ramos Herrera O.J. (2023). *Caracterización electroforética de proteínas de la hormiga chicatana (Atta mexicana) y evaluación de sus propiedades funcionales*. Instituto Politécnico Nacional.

Mcwatters, K.H.; Cherry, J.P. (1977). *Emulsification, foaming and protein solubility properties of defatted soybean, peanut, fieldpea and pecan flours*. *J. Food Sci.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb08395.x>

Khalid, E.; Babiker, E.; EL Tinay, A. (2003). *Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influenced by pH and/or salt concentration*. *Food Chem.* [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00555-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00555-1)

Jayaprakasha, H.; Brueckner, H. (1999). *Whey protein concentrate: A potential functional ingredient for food industry*. *J. Food SciTech* <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20193037156>

Alahakoon, AU, Faridnia, F., Bremer, PJ, Silcock, P., Oey, I. (2016). Efectos de los campos eléctricos pulsados en la calidad y funcionalidad del tejido de la carne. En: Miklavcic, D. (eds.) *Handbook of Electroporation*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26779-1_179-1

Beltrán Cortijo, R., Rojo de Benito, E.M., Bolado Rodríguez, S. (2023). *Diseño de un proceso de extracción mediante ultrasonidos y filtración tangencial para la valorización de biomasa algal crecida en aguas residuales de purines*. Universidad de Valladolid.

Vioque, J. Millán, F. (2005). *Los hidrolizados proteicos en alimentación: Suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional*. Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación <http://hdl.handle.net/10261/5750>