



ESCUELA DE DOCTORADO  
INTERNACIONAL DE LA USC

Patricia  
Parada Pena

Tesis doctoral

DESARROLLO DE UN  
HIDROLIZADO DE CLARA DE  
HUEVO PARA SU  
UTILIZACIÓN COMO UN  
INGREDIENTE EN LA  
ELABORACIÓN DE NUEVOS  
PRODUCTOS ALIMENTARIOS

Lugo, 2022



## TESIS DE DOCTORADO

# DESARROLLO DE UN HIDROLIZADO DE CLARA DE HUEVO PARA SU UTILIZACIÓN COMO UN INGREDIENTE EN LA ELABORACIÓN DE NUEVOS PRODUCTOS ALIMENTARIOS

Patricia Parada Pena

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INNOVACIÓN EN SEGURIDAD Y TECNOLOGÍAS ALIMENTARIAS

LUGO

2022

D./Dña. **Patricia Parada Pena**

Título de la tesis: **Desarrollo de un hidrolizado de clara de huevo para su utilización como un ingrediente en la elaboración de nuevos productos alimentarios**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Lugo, 29 de marzo de 2022.**

**Firma electrónica**

La doctoranda, Patricia Parada Pena, declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la Tesis Doctoral que presenta.



D./Dña. **Marta Miguel Castro**

En condición de: **Director/a**

Título de la tesis: **Desarrollo de un hidrolizado de clara de huevo para su utilización como un ingrediente en la elaboración de nuevos productos alimentarios**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **Patricia Parada Pena**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Lugo, 29 de marzo de 2022**

**Firma electrónica**

D./Dña. **Manuel Vázquez Vázquez**

En condición de: **Tutor/a**

Título de la tesis: **Desarrollo de un hidrolizado de clara de huevo para su utilización como un ingrediente en la elaboración de nuevos productos alimentarios**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **Patricia Parada Pena**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Lugo, 29 de marzo de 2022**

**Firma electrónica**

*Para ti, Aline.  
El esfuerzo y la constancia tarde o temprano tienen su recompensa.*

Quisiera agradecer la realización de esta Tesis a Doctoral a muchas personas que, a lo largo de estos años, me han acompañado y que de alguna u otra forma han participado en la decisión o realización de este trabajo.

En primer lugar, agradecérselo a mi directora, Marta Miguel y a la empresa Granja Campomayor, en especial a María Caridad García Busto. Si no fuera por vosotras, no sería posible estar presentando esta Tesis en este momento. Mil gracias por todo vuestro apoyo, confianza y fuerza transmitida.

A mi tutor, Manuel Vázquez, gracias por el impulso en el inicio de este camino así como por todo el apoyo y los consejos durante, y sobre todo en la etapa final del mismo.

A ti Dani tengo demasiadas cosas que agradecerte y espero aún disfrutar de muchos años juntos para tener todavía más motivos por los que darte las gracias todos los días. Gracias por ser mi persona vitamina y por estar siempre a mi lado, incluso aunque nos separen miles de kilómetros.

Gracias a los tres pilares de mi vida, mis padres y mi hermana. Siempre confiando ciegamente en mí y viéndome capaz de conseguir todo lo que me proponga, sea lo que sea.

A mis suegros, Jose y Yoli. Aunque sé que para vosotros era disfrutar de un día con vuestra nieta, para mí era tiempo para sentarme y poder escribir. Muchas gracias por ese tiempo.

A todos mis compañeros del Aula de Productos Lácteos y Tecnologías Alimentarias (APLTA). A los que ya no estáis, a vosotros también.

Muchas gracias a todo “El Grupo” porque de alguna forma u otra tod@s me habéis ayudado en este camino.

## RESUMEN

El objetivo global de la presente Tesis Doctoral ha consistido en el desarrollo, a escala semiindustrial, de un hidrolizado de clara de huevo para que pueda ser utilizado posteriormente como un ingrediente base para la elaboración de nuevos productos alimentarios similares a otros de origen lácteo, como yogures, helados, postres, salsas o untables.

En primer lugar, se llevaron a cabo una serie de estudios a escala de laboratorio para definir el proceso de elaboración para su correcto escalado semiindustrial tomando como referencia el protocolo definido en la patente con número de solicitud 201331886. Los resultados obtenidos en estos ensayos confirmaron la necesidad de incorporar una etapa inicial de precalentamiento de la clara de huevo a la misma temperatura fijada para la hidrólisis. Además, se decidió prescindir de la agitación durante la hidrólisis para minimizar la desestabilización proteica de las proteínas de la clara de huevo, especialmente de la ovotransferrina. Se modificó también el ácido de grado alimentario indicado en la patente (ácido clorhídrico) por uno de uso más común en la industria alimentaria, y se seleccionó el ácido tartárico. Para el proceso de hidrólisis propiamente dicho se estableció un rango de pH de entre 7,0 y 7,5 en lugar de 5,5 como se describía en la patente, a una dosis enzimática de 1 g/L (en lugar de 2 g/L), una temperatura de 55 °C y un tiempo de 120 minutos. Todos estos cambios se realizaron con el objetivo de proporcionar unas mejores características tecnológicas y sensoriales en el producto final en el momento del escalado. La reducción de la dosis de enzima supone, además, un ahorro económico en la elaboración del hidrolizado. También se han incorporado dos etapas una vez finalizada la hidrólisis: una primera etapa de dilución con agua osmotizada en un 50 % para que el producto fuera procesable a nivel industrial, y evitar así la formación de agregados durante la etapa de inactivación enzimática y tratamiento térmico del producto y otra etapa de homogeneización en modo ascendente o descendente para mejorar las características fisicoquímicas y organolépticas del producto final. Los mejores resultados se obtuvieron con la homogeneización descendente (posterior al tratamiento térmico).

Una vez definidos los parámetros óptimos para la elaboración y escalado del hidrolizado de clara de huevo, se llevaron a cabo los ensayos encaminados a obtener el producto a escala semiindustrial. Los resultados demostraron que era posible la

elaboración del hidrolizado de clara de huevo a escala piloto semiindustrial tanto en un intercambiador de placas como en un intercambiador tubular. Además, se comprobó que el hidrolizado de clara de huevo era capaz de resistir temperaturas de pasteurización (70 °C - 300 s y 85 °C durante 10, 24 y 300 s) y de tipo UHT (140 °C - 3 s). En general, la homogeneización en modo descendente favoreció las características finales del producto. Durante el seguimiento de vida útil realizado a las muestras elaboradas y seleccionadas en los diferentes ensayos, se observó que todas ellas, a excepción de la elaborada en el intercambiador de placas, presentaron una tendencia a la gelificación más o menos intensa. No obstante, todas ellas se consideraron viables a nivel industrial a pesar de esta característica menos el hidrolizado de clara de huevo elaborado a temperatura ultra alta en el intercambiador tubular. Por otro lado, también se confirmó la seguridad alimentaria de estos hidrolizados a través de análisis microbiológicos.

Por último, teniendo en cuenta que el destino final del hidrolizado de clara de huevo desarrollado pueda ser su uso como un ingrediente base para la elaboración de otros productos derivados, se realizaron una serie de ensayos para verificar que el hidrolizado desarrollado era capaz de resistir un segundo tratamiento térmico. Se comprobó que el hidrolizado elaborado en un intercambiador tubular a pH neutro era capaz de resistir un segundo tratamiento térmico (tanto de pasteurización como de temperatura ultra alta), simulando su utilización como ingrediente en la elaboración de otros productos finales derivados como batidos o bebidas. También se verificó que es posible acidificar el hidrolizado de clara de huevo antes de someterlo a un segundo tratamiento térmico de pasteurización para la elaboración de productos finales derivados que tienen pH ácido como yogures o salsas. Las muestras obtenidas presentaron unas buenas características organolépticas trascurridas 24 horas desde su elaboración.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
1.1. EL HUEVO. COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA .....	7
1.1.1. Cáscara.....	11
1.1.2. Clara o albumen.....	12
1.1.3. Yema o vitelo .....	13
1.2. PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE HUEVOS .....	13
1.3. HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS.....	21
1.4. HIDROLIZADOS DE CLARA DE HUEVO. PROPIEDADES TECNOLÓGICAS Y BIOACTIVAS.....	25
1.5. DESARROLLO DE UN NUEVO PRODUCTO.....	29
1.5.1. Procesado térmico en continuo.....	33
1.5.1.1. Calentamiento indirecto .....	34
1.5.1.1.1. Intercambiador de calor de placas .....	34
1.5.1.1.2. Intercambiador de calor tubular.....	35
1.5.1.1.3. Intercambiador de calor de superficie rascada .....	37
1.5.1.2. Calentamiento directo .....	38
1.5.2. Proceso de homogeneización .....	39
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
3.1. ENSAYOS DE LABORATORIO PREVIOS AL ESCALADO SEMIINDUSTRIAL PARA LA OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO DE CLARA HUEVO.....	44
3.1.1. Selección de la temperatura de precalentamiento e hidrólisis .....	46
3.1.2. Efecto de la agitación durante el proceso de hidrólisis .....	47
3.1.3. Selección del ácido.....	47
3.1.4. Selección del pH.....	47
3.1.5. Selección de la dosis de enzima .....	48
3.1.6. Efecto del tiempo de hidrólisis .....	48
3.1.7. Selección de condiciones de inactivación de la enzima .....	49
3.2. ESCALADO SEMIINDUSTRIAL DEL HIDROLIZADO DE CLARA DE HUEVO.....	49
3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	55
3.3.1. Análisis del contenido en proteína .....	55
3.3.2. Análisis del tamaño de partícula .....	57



3.3.3.	Análisis de viscosidad.....	59
3.3.4.	Análisis de coagulación .....	60
3.3.5.	Análisis de estabilidad.....	61
3.3.6.	Análisis microbiológico .....	64
3.3.6.1.	Determinación de mohos y levaduras .....	64
3.3.6.2.	Recuento total de aerobios mesófilos .....	66
3.3.6.3.	Determinación de <i>Salmonella</i> spp. ....	67
3.3.6.4.	Determinación de Enterobacterias.....	67
3.3.6.5.	Determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	68
3.3.7.	Análisis sensorial.....	69
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>72</b>
4.1.	ENSAYOS DE LABORATORIO PREVIOS AL ESCALADO SEMIINDUSTRIAL PARA LA OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO DE CLARA DE HUEVO.....	72
4.1.1.	Selección de la temperatura de precalentamiento e hidrólisis .....	73
4.1.2.	Efecto de la agitación durante el proceso de hidrólisis .....	76
4.1.3.	Selección del ácido.....	77
4.1.4.	Selección del pH durante el proceso de hidrólisis .....	83
4.1.5.	Selección de la dosis de enzima .....	85
4.1.6.	Efecto del tiempo de hidrólisis .....	88
4.1.7.	Selección de condiciones de inactivación de la enzima .....	92
4.2.	ESCALADO SEMIINDUSTRIAL DEL HIDROLIZADO DE CLARA DE HUEVO.....	100
4.2.1.	Intercambiador tubular – pasteurización .....	101
4.2.2.	Intercambiador tubular – temperatura ultra alta (UHT).....	113
4.2.3.	Intercambiador de placas – pasteurización .....	118
4.2.4.	Segundo tratamiento térmico.....	126
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>133</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>137</b>

# INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. EL HUEVO. COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA

En la naturaleza, el huevo tiene como finalidad la perpetuación de la especie en los animales ovíparos. Las hembras de estos animales ponen sus huevos con poco o ningún desarrollo embrionario, y este se producirá fuera del cuerpo de la hembra en el caso de los huevos fecundados. El huevo es el gameto (célula reproductiva) que aporta el progenitor femenino en la reproducción sexual. Es un cuerpo unicelular, de forma esférica o más o menos elíptica (que se denomina ovoide). Tras la fecundación, aloja al embrión durante su desarrollo, proporcionándole los compuestos nutritivos que necesita y la protección necesaria.

El huevo de gallina (*Gallus gallus*) se ha considerado desde la antigüedad un alimento muy importante para el hombre. De los componentes esenciales (proteínas, grasas e hidratos de carbono) el huevo está compuesto en gran parte de los dos primeros. Posee un alto contenido en proteínas, con la ventaja de que además son fáciles de digerir y de alto valor biológico. Nutricionalmente, la riqueza en aminoácidos esenciales, y el equilibrio en que dichos aminoácidos se encuentran en las ovoproteínas, hacen de estas la referencia para valorar la calidad de las proteínas procedentes de otros alimentos. El contenido energético por huevo se acerca a las 75 kilocalorías, por lo tanto, el aporte calórico del huevo es relativamente bajo, y no favorece la obesidad. Otra aportación significativa del huevo es la importante cantidad de vitaminas (tabla 1). El aporte de vitamina D es especialmente valioso, ya que ésta es una vitamina que escasea en casi todas las dietas. Los huevos aportan también minerales (fósforo, selenio, hierro, yodo y zinc), que con frecuencia se ingieren en cantidades insuficientes, y que contribuyen a cubrir gran parte del aporte diario de nutrientes recomendado para un adulto. El huevo es, además, una excelente fuente dietética de lecitina o fosfatidilcolina, compuesto de gran interés nutricional por su implicación en diversos procesos metabólicos y en la formación

de membranas celulares, y del neurotransmisor acetilcolina (Instituto de estudios del huevo, 2009). En la tabla 1 se muestra la composición de un huevo de gallina.

Tabla 1. Tablas de composiciones de alimentos (BEDCA, 2021)

Componente	Cantidades por 100 g de porción comestible	
Agua	76,40	g
Energía	150,00	Kcal
	623,00	Kj
Proteína total	12,50	g
Lípidos totales	11,10	g
Ácidos Grasos Saturados	3,10	g
Ácidos Grasos Monoinsaturados	3,97	g
Ácidos Grasos Poliinsaturados	1,74	g
Colesterol	385,00	mg
Hidratos de Carbono	Traza	g
Fibra	0	g
Carbohidratos	traza	g
<b>Minerales</b>		
Calcio	57,00	mg
Hierro	1,90	mg
Potasio	130,00	mg
Magnesio	12,00	mg
Sodio	140,00	mg
Fósforo	200,00	mg
Yoduro	20,00	µg
Selenio	11,00	µg
Zinc	1,30	mg
<b>Vitaminas</b>		
Vitamina A (equivalentes de retinol)	190,00	µg
Vitamina D	1,75	µg
Vitamina E (equivalentes de alfa tocoferol)	1,11	mg
Vitamina B <sub>1</sub> (tiamina)	0,09	mg
Vitamina B <sub>2</sub> (riboflavina)	0,47	mg

<i>Vitamina B<sub>3</sub> (niacina)</i>	3,80	mg
<i>Vitamina B<sub>6</sub> (piridoxina)</i>	0,12	mg
<i>Vitamina B<sub>9</sub> (ácido fólico)</i>	50,00	μg
<i>Vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina)</i>	2,50	μg
<i>Vitamina C (ácido Ascórbico)</i>	0,00	mg

Dado su carácter de alimento básico y muy apreciado por los consumidores, no es de extrañar que el huevo haya sido motivo de interés desde tiempos inmemoriales y aún a día de hoy sea objeto de estudios e investigaciones desde los más diversos ámbitos. Además, debido a la creciente presión que ejerce la sociedad sobre los recursos naturales, cada vez existe una mayor conciencia en cómo se utilizan estos recursos (especialmente el agua dulce) y el impacto a nivel climático que tiene su utilización (a través de la huella de carbono). En este contexto, es importante resaltar que, entre las proteínas de origen animal, las procedentes del huevo son las que poseen una menor huella hídrica y de carbono (Mekonnen & Hoekstra, 2012). En cuanto a la huella de carbono, comparando el contenido proteico de diferentes opciones dietéticas de varios países, se ha concluido que es posible su reducción en un 50 % a través de una dieta “baja en CO<sub>2</sub>” que incluya solo aves pequeñas, huevos y yogures (Gaillac & Marbach, 2021).

El corte transversal de un huevo duro permite diferenciar las partes fundamentales de su estructura: la cáscara, la clara o albumen y la yema, que están separadas entre sí por medio de membranas para mantener su integridad como se puede observar en la figura 1 (Instituto de estudios del huevo, 2009).

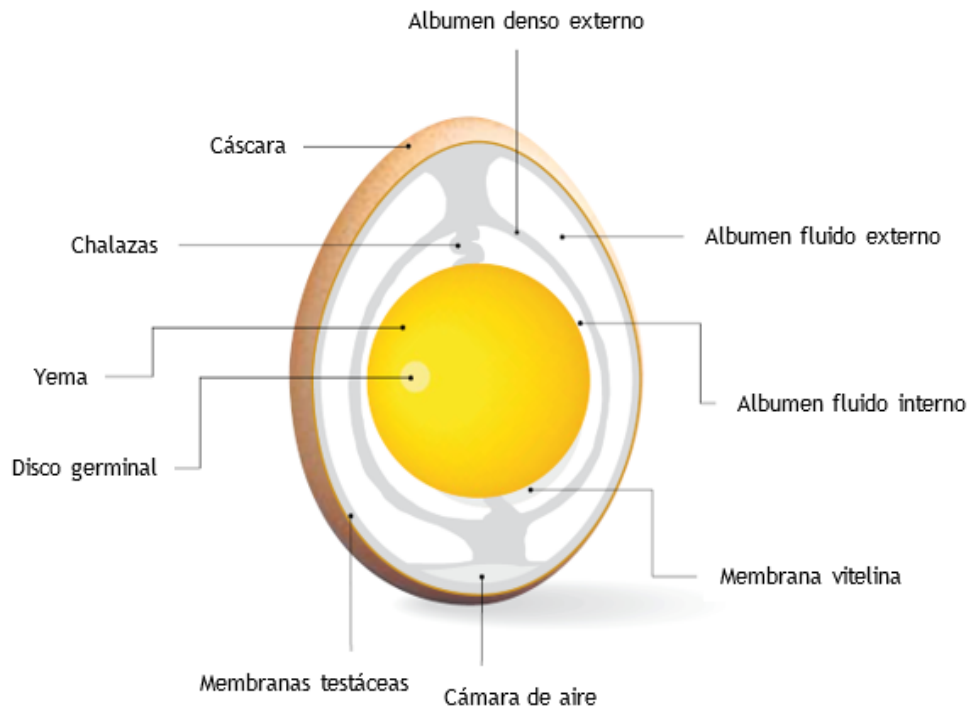


Figura 1. Corte transversal del huevo y sus partes (Instituto de estudios del huevo, 2009)

El peso medio de un huevo está en torno a los 60 g, de los cuales aproximadamente la clara representa el 60 %, la yema el 30 % y la cáscara, junto con las membranas, el 10 % del total (Instituto de estudios del huevo, 2009). En la tabla 2 se muestra el contenido en proteínas, lípidos y carbohidratos de la clara, yema y huevo completo (Base de Datos Española de Composición de Alimentos, BEDCA, 2021). Analizaremos a continuación más detalladamente las partes fundamentales del huevo.

Tabla 2. Composición de la clara, yema y huevo completo (BEDCA, 2021)

Componente	Cantidades por 100 g de porción comestible		
	Proteína (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)
Clara o albumen	10,5	0,1	0,3
Yema o vitelo	16,5	31,5	2,3
Huevo completo	12,5	11,1	traza

### 1.1.1. Cáscara

La cáscara es la cubierta exterior del huevo y tiene gran importancia, ya que mantiene su integridad física y actúa como barrera bacteriológica. Está constituida, en su mayor parte, por una matriz cálcica con un entramado orgánico, en el que el calcio es el elemento más abundante y de mayor importancia. También se encuentran en su composición otros minerales como sodio, magnesio, zinc, manganeso, hierro, cobre, aluminio y boro, en menores concentraciones. La calidad o resistencia de la cáscara depende principalmente del metabolismo mineral de la gallina y, a su vez, de una adecuada alimentación. Otros factores que pueden afectar a la calidad de la cáscara son: las características genéticas, el estado sanitario y la temperatura ambiente. Además, la cáscara consta también de membranas internas y externas, constituidas por fibras proteíno-polisacáridas (50 - 70  $\mu\text{m}$  de espesor), que se separan formando una cámara de aire a nivel del eje más largo del huevo (Instituto de estudios del huevo, 2009).

En los últimos años se ha dedicado especial atención al estudio de la cáscara y al modo de extracción de sus diferentes estructuras, centrándose sobre todo en la membrana de la cáscara del huevo. La membrana, que se encuentra adherida a la cara interna de la cáscara del huevo, se caracteriza por su alto contenido en proteínas, entre las que se incluyen lisozima, ovotransferrina, ovocleidina, clusterina, ovoqueratina, ovodefensina y, especialmente por su contenido en colágeno. También contiene carbohidratos como ácido hialurónico y glucosaminoglicanos. Todos estos componentes ayudan al desarrollo del embrión y le proporcionan protección. Algunos de estos compuestos son de naturaleza antimicrobiana, y juegan también un papel esencial en los procesos metabólicos y de desarrollo (Huang et al., 2010b).

Aunque tradicionalmente la membrana se ha desechado junto con la cáscara, recientemente se han desarrollado métodos de extracción que han permitido el desarrollo de numerosas aplicaciones gracias a sus propiedades químicas y mecánicas, y también a su bajo coste (Park et al., 2016; Baláž, 2014). Dentro de la industria alimentaria, la membrana de la cáscara del huevo se utiliza como ingrediente de algunas salsas como la de soja. Entre las aplicaciones medioambientales de la membrana de la cáscara del huevo, destaca su uso como absorbente de dióxido de carbono y metales pesados (Park et al., 2016). En el campo biomédico, se ha investigado el uso de la membrana como película biocompatible y biodegradable para el

tratamiento de heridas y quemaduras gracias a su elevado contenido en colágeno (Santana et al., 2016; Jensen et al., 2015). Son también numerosas las investigaciones encaminadas al uso de hidrolizados de la membrana o sus péptidos derivados que ayuden en el tratamiento y prevención de enfermedades. Cabe destacar su uso como tratamiento alternativo para facilitar la recuperación articular producida tras la realización de ejercicio físico, o para reducir el dolor articular, especialmente de rodilla (Jensen et al., 2015; Ruff et al., 2009). Es importante además señalar la utilización de esta estructura para la producción de péptidos biológicamente activos, especialmente péptidos con actividad antioxidante (Jain & Anal, 2017; Santana et al., 2016; Huang et al., 2010b; Mendis et al., 2005;). Recientemente se ha demostrado también que la membrana de cáscara de huevo es capaz de reducir la inflamación, al aumentar la secreción de la citoquina antiinflamatoria interleuquina (IL)-10 y disminuir la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-6, aunque la mayoría de los estudios y evidencias en este campo necesitan de estudios en humanos que corroboren su efecto sobre el sistema inmune (Jia et al., 2017; Vuong et al., 2017).

### **1.1.2. Clara o albumen**

La clara de huevo es una estructura de color transparente que rodea a la yema, aunque en ocasiones puede presentar alguna “nube” blanquecina que no supone ningún problema para su consumo y suele estar relacionada con la frescura del huevo. En la clara se distinguen dos partes según su densidad: el albumen denso y el albumen fluido. El albumen denso rodea a la yema y es la principal fuente de riboflavina y de proteína del huevo. El albumen fluido es el más próximo a la cáscara. La clara o albumen está compuesta básicamente por agua (88 %) y proteínas (cerca del 12 %). La proteína más importante, no solo en términos cuantitativos (54 % del total proteico), es la ovoalbúmina, cuyas propiedades son de especial interés tanto desde el punto de vista nutritivo como culinario, muy utilizada por sus propiedades espumantes, gelificantes o emulsionantes. Además, en la clara se encuentran la riboflavina (vitamina B2) y niacina (vitamina B3), que están en mayor cantidad en la clara que en la yema. La cantidad de lípidos y azúcares en la clara es despreciable (Instituto de estudios del huevo, 2009). Sujetando la yema para que quede centrada se encuentran unos engrosamientos del albumen denominados chalazas, con forma de filamentos enrollados que van desde la yema hasta los dos polos opuestos del huevo (Barroeta, 2001).

### 1.1.3. Yema o vitelo

La yema o vitelo es la parte central y anaranjada del huevo. Está rodeada de la membrana vitelina, que da la forma a la yema y permite que esta se mantenga separada de la clara o albumen. Cuando se rompe esta membrana, la yema se desparrama y se mezcla con la clara. En la yema se encuentran las principales vitaminas, lípidos y minerales del huevo y por ello es la parte nutricionalmente más valiosa. Su contenido en agua es de aproximadamente el 50 %. Los sólidos o materia seca se reparten equitativamente entre proteínas y lípidos, quedando una fracción pequeña para vitaminas, minerales y carotenoides. Estos últimos compuestos poseen efecto antioxidante y son responsables del color amarillo, que varía en tono e intensidad en función de la alimentación de la gallina. En el interior de la yema se encuentra el disco germinal o blastodisco, que es un pequeño disco claro en la superficie de la yema, lugar en el que se inicia la división de las células embrionarias cuando el huevo está fecundado, de forma que la yema es la base de los nutrientes necesarios para el embrión (Barroeta, 2001; Cheftel, 1989).

## 1.2. PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE HUEVOS

En la actualidad el consumo de huevo está ampliamente extendido en todo el mundo, lo que ha dado lugar a una actividad de carácter económico cuyos operadores conforman un sector específico en el conjunto de la producción ganadera y la industria alimentaria, el sector avícola. Los pollos domésticos aparecieron hace más de 8.000 años en Asia Sudoriental y fueron introducidos en el resto del mundo por marinos y comerciantes. Hoy son, con diferencia, la especie avícola más importante del mundo. Los huevos de pato, de codorniz y de avestruz son también comercializados para su consumo, pero en su conjunto no tienen la relevancia económica del huevo de gallina (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO, 2020).

En las últimas décadas se han desarrollado razas comerciales de pollos de alto rendimiento para satisfacer la creciente demanda mundial de alimentos de origen animal. Estos pollos se crían específicamente para la producción de carne o huevos y requieren un manejo nutricional y sanitario intensivo para expresar su potencial genético (mientras que una gallina ponedora comercial puede poner más de 300 huevos al año, las gallinas autóctonas a menudo no ponen

más que 40 - 60 huevos) (FAO, 2020). En todas las regiones, la producción de aves de corral se está intensificando, concentrando geográficamente e integrando verticalmente de manera acelerada, y se está vinculando cada vez más a las cadenas de suministro. Esto se traduce en un aumento de la producción mundial de huevos de gallina año tras año desde 1961 hasta 2019, tal y como se observa en la figura 2.

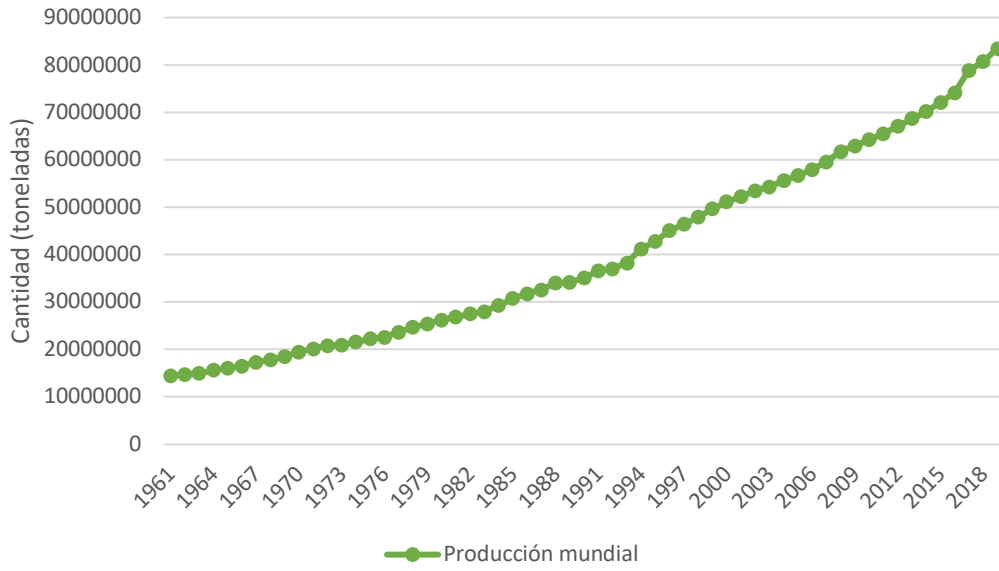


Figura 2. Producción de huevos de gallina en el mundo desde 1961 hasta 2019 (FAOSTAT, 2021)

Según los datos disponibles en la base de datos estadísticos de la FAO, en el año 2019, Asia, América y Europa fueron los continentes que más cantidad de huevos de gallina produjeron con un 62 %, 21 % y 13 % respectivamente; mientras que la producción de África y Oceanía fue mucho menor (figura 3) (FAOSTAT, 2021).

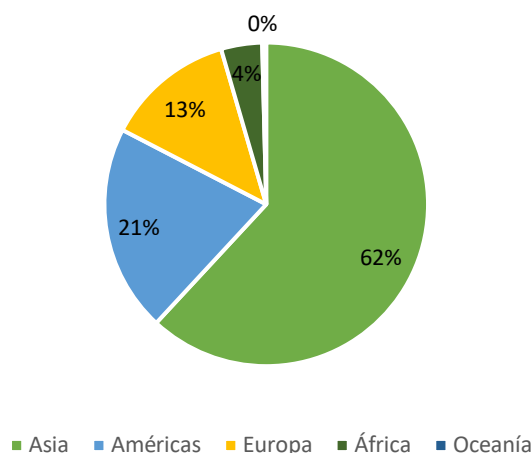


Figura 3. Producción de huevos de gallina por continente en el año 2019 (FAOSTAT, 2021)

Los cinco principales países productores en el año 2019 fueron según indica la FAO: China, Estados Unidos, India, Indonesia y Brasil (figura 4). Sin embargo, destaca China con diferencia como principal país productor; superando en más de 20 millones de toneladas al siguiente productor, Estados Unidos (FAOSTAT, 2021).

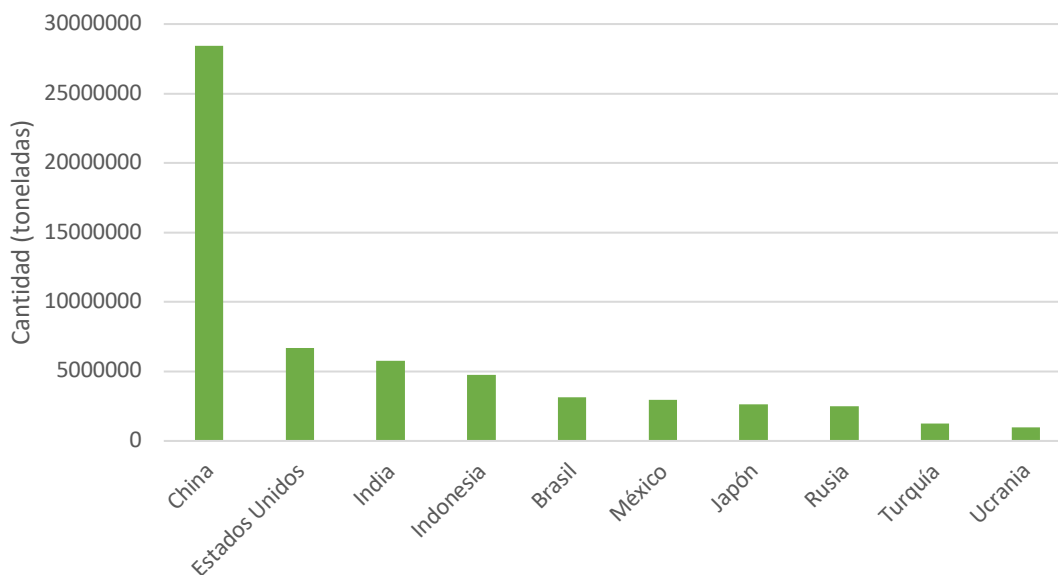


Figura 4. Principales productores de huevos de gallina en el año 2019 (FAOSTAT, 2020)



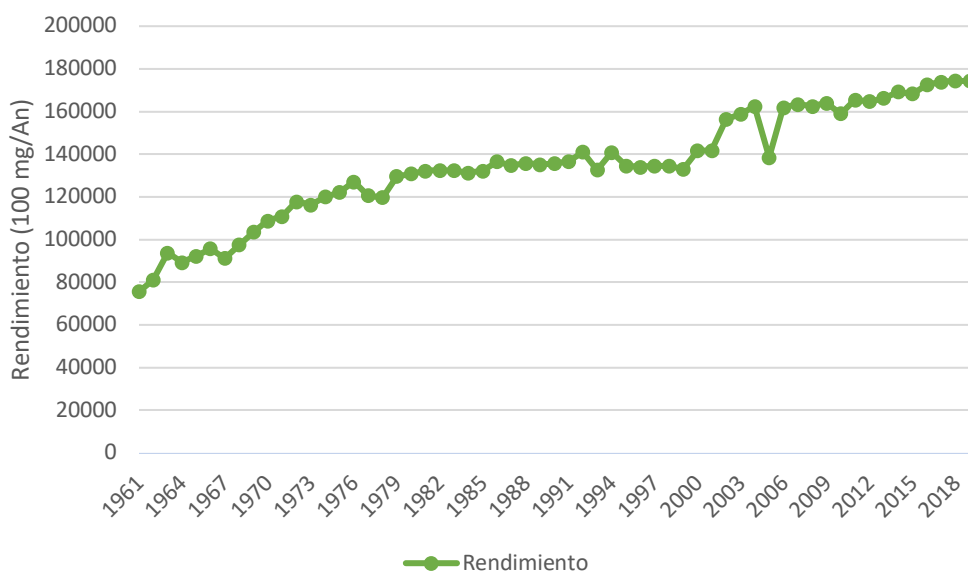
En cuanto a la producción de huevos de gallina en España, desde 1961 hasta 1983 se produjo un aumento paulatino de la producción pasando de casi 25.000 toneladas a 70.000. Desde 1983 hasta 1999 se produjo un descenso progresivo hasta las 57.000 toneladas para, a

partir de esta fecha, volver a aumentar paulatinamente la producción alcanzando en el año 2019 las 81.000 toneladas de huevos (figura 5) (FAOSTAT, 2021).



Figura 5. Producción de huevos de gallina en España desde 1961 hasta 2019 (FAOSTAT, 2021)

Sin embargo, el rendimiento desde 1961 hasta 2018 en la producción de huevos de gallina en España, ha ido incrementándose de manera gradual desde los 75.000 hasta los 174.000 (100 mg/An) aproximadamente (figura 6) (FAOSTAT, 2021).



**Figura 6. Rendimiento en la producción de huevos de gallina en España desde 1961 hasta 2019 (FAO STAT, 2021)**

Según el informe de consumo alimentario publicado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) para el año 2019, el volumen de compra de huevos descendió un 0,3 % con relación al año 2018. Además, en ese mismo año (2019) el consumo de huevos disminuyó en unidades por persona un 1,4 %. Como puede observarse en la tabla 3, este descenso se produce en todos los tipos de huevos, aunque, en mayor medida en los huevos no ecológicos. Sin embargo, el valor de mercado ha crecido un 1,3 % debido al encarecimiento de este producto, cuyo precio medio cierra en los 2,34 €/kg, lo que supone un aumento del 1,6 %. Son los individuos pertenecientes a la clase social alta y media alta los que realizan un consumo más alto de huevos. Sin embargo, es importante señalar que a lo largo de los meses correspondientes al año 2020, se intensificó la compra de huevos, especialmente durante los meses de abril y mayo, relacionado con la situación de confinamiento provocada por la pandemia de la COVID-19. Esto se traduce en un aumento del consumo de huevos en unidades por persona de un 16,7 %. El precio medio a cierre de ese año se situó en un 2,35 €/kg experimentando una leve variación al alza del 0,4 %.

**Tabla 3. Consumo per cápita de huevos en España - Año 2018, 2019 (MAPA, 2021a) y Año 2020 (MAPA, 2021b)**

Categoría	Consumo per cápita (unidades)		
	2018	2019	2020
Total huevos de gallina	131,48	129,64	151,43
Huevos no ecológicos	116,63	115,40	*
Huevos ecológicos	14,85	14,24	*

\*En el informe correspondiente al año 2020 no figuran las cantidades correspondientes a huevo ecológicos y no ecológicos.

En el año 2020, en España se produjeron 1.154.697 de miles de docenas de huevo de gallina, de los cuales 1.034.109 fueron de cría en jaula y suelo y 120.589 fueron de cría campera y producción ecológica. El desglose de estos datos por Comunidad Autónoma (tabla 4), muestra que Galicia es la séptima comunidad productora por volumen total; la undécima en cría en jaula y en suelo y, lo más destacado, ocupa la segunda posición en cuanto a producción de cría campera y producción ecológica.

**Tabla 4. Producción de huevos de gallina por Comunidad Autónoma - Año 2020 (MAPA, 2021c)**

Comunidad Autónoma	Total (miles de docenas)	Cría en jaula y en suelo (miles de docenas)	Cría campera y producción ecológica (miles de docenas)
Castilla la mancha	290.304	277.827	12.477
Castilla y León	196.054	181.781	14.273
Aragón	172.008	139.175	32.834
C. Valenciana	116.288	105.966	10.322
Cataluña	91.508	85.347	6.162
Andalucía	53.584	49.273	4.311
Galicia	47.561	22.216	25.345
R. De Murcia	32.603	31.597	1.007
Canarias	30.806	29.431	1.375
Extremadura	30.316	29.266	1.050
País Vasco	28.296	21.559	6.737
Navarra	27.980	26.664	1.315
Madrid	20.958	20.605	352
Baleares	8.568	7.428	1.139
La Rioja	3.663	3.318	345

P. de Asturias	2.198	1.119	1.079
Cantabria	2.002	1.536	466
ESPAÑA	1.154.697	1.034.109	120.589

En la figura 7 se observa la evolución en cuanto a producción de huevos de gallina en Galicia desde el 2013 hasta el 2020. En el año 2013 los principales productores eran Pontevedra y Ourense mientras que, en el 2020, Lugo pasó a ser el principal productor seguido de Pontevedra, tras una caída muy importante de la producción a lo largo de los años en Ourense. La producción de huevos en la provincia de A Coruña se ha mantenido más estable a lo largo de los años.

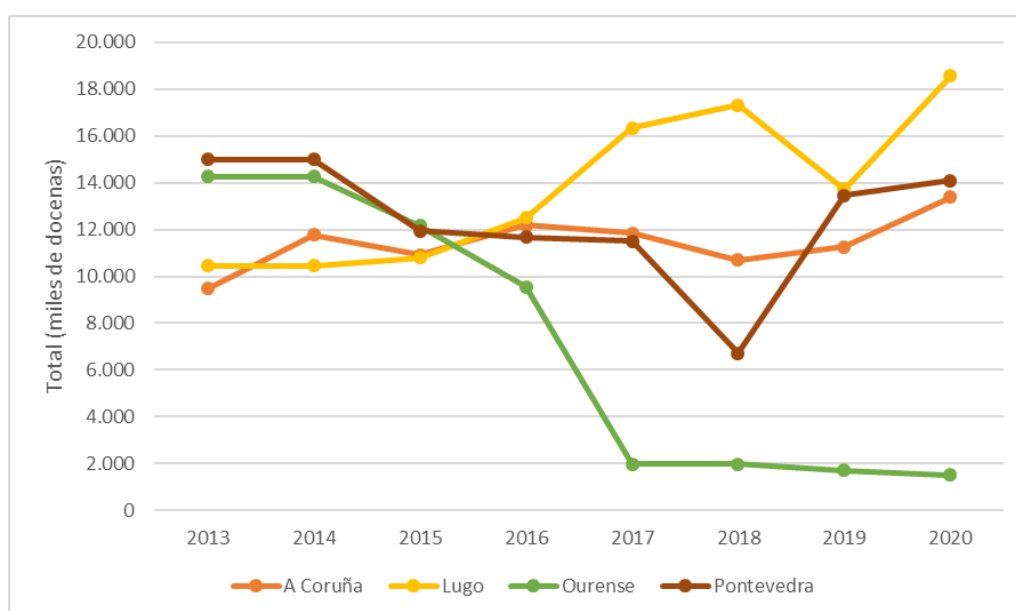


Figura 7. Evolución de la producción de huevos de gallina en Galicia desde el 2013 hasta el 2020

Es importante destacar que la mayor parte de la producción española de huevos se destina al consumo en interior, el 85 %, mientras que solo el 15 % es exportado. De ese 85 % de la producción destinada al consumo interior, el 73 % se destina al consumo dentro del hogar y el 27 % restante a restauración. El resto de la producción, el 15 %, va destinado a la industria (alimentaria y no alimentaria), que en los últimos años ha registrado un importante crecimiento en la utilización de ovoproductos (MAPA, 2021d). La legislación vigente (Reglamento (CE) 853/2004) define a los ovoproductos como "los productos transformados resultantes de la

transformación de huevos, de diversos componentes o mezclas de huevos, o de la transformación subsiguiente de tales productos transformados”. Estos ovoproductos, pueden destinarse al consumo humano directo o a su procesado por industrias u operadores (alimentarios y no alimentarios), o para formar parte de otros productos (Instituto de estudios del huevo, 2009).

El manejo de grandes cantidades de huevos en la industria implica la realización de una serie de operaciones como el almacenamiento, cascado (y generalmente batido) y la gestión de las cáscaras resultantes como residuos, ya que resulta poco práctico el uso de huevos con cáscara. Por ello se desarrolló la industria de procesado del huevo, conocida como de elaboración de ovoproductos, que suministra a cada cliente el producto que requiere, transformado y presentado según los usos previstos. La gama de ovoproductos disponibles en el mercado es muy amplia: huevo entero pasteurizado, clara líquida pasteurizada, yema líquida pasteurizada, huevo entero cocido, huevo deshidratado, clara deshidratada, yema deshidratada y platos preparados. Todos ellos se pueden presentar de forma muy diversa: líquidos refrigerados, congelados, en polvo, etc. En algunos casos, los ovoproductos, en función de las demandas del cliente, contienen ciertos aditivos incorporados, como sal o azúcar, que se añaden para preservar sus cualidades, o están sometidos a otros tratamientos previos, lo que condiciona el uso al que se destine el correspondiente ovoproducto (Instituto de estudios del huevo, 2009).

Un gran número de industrias utilizan el huevo como ingrediente de otros alimentos porque aporta, además de su alto valor nutritivo y sus cualidades organolépticas, una amplia gama de propiedades funcionales que son necesarias o convenientes para los procesos de fabricación de muchos productos alimentarios. La gama de usos alimentarios es muy amplia, incluyendo su uso en catering y restauración, en la elaboración de confitería y repostería, postres lácteos, batidos y helados, mahonesas y salsas, alimentos infantiles, panadería e incluso para la fabricación de algunas bebidas, entre otros. Existen también otros numerosos usos del huevo y sus derivados para fines ajenos al sector alimentario, tales como la preparación de medios de cultivo para microbiología, la conservación del semen para inseminación artificial o la elaboración de champús y adhesivos. También la cáscara tiene sus aplicaciones, pues debido a su composición y estructura se utiliza en la elaboración de dentífricos, abonos, piensos, etc., lo que además evita el coste medioambiental del tratamiento de este residuo (Instituto de estudios del huevo, 2009).

### 1.3. HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS

El nombre de hidrólisis proviene de los vocablos griegos *hydro* (agua) y *lysis* (ruptura). Esta reacción química tiene lugar entre una molécula de agua y otra macromolécula, donde la molécula de agua se divide en los átomos que la componen (hidrógeno y oxígeno) y pasan a formar enlaces químicos con la macromolécula (sustancia que reacciona con el agua) (figura 8). El término se utiliza ampliamente para reacciones de sustitución, eliminación y fragmentación, en las que el agua es el nucleófilo. Esta reacción es importante por el gran número de contextos en los que el agua actúa como disolvente.

Existen diferentes tipos de hidrólisis: ácido-base, de amidas y ésteres, de polisacáridos y enzimática. Este último tipo de hidrólisis, la enzimática, es la empleada en esta Tesis Doctoral y se describe con mayor detalle a continuación.

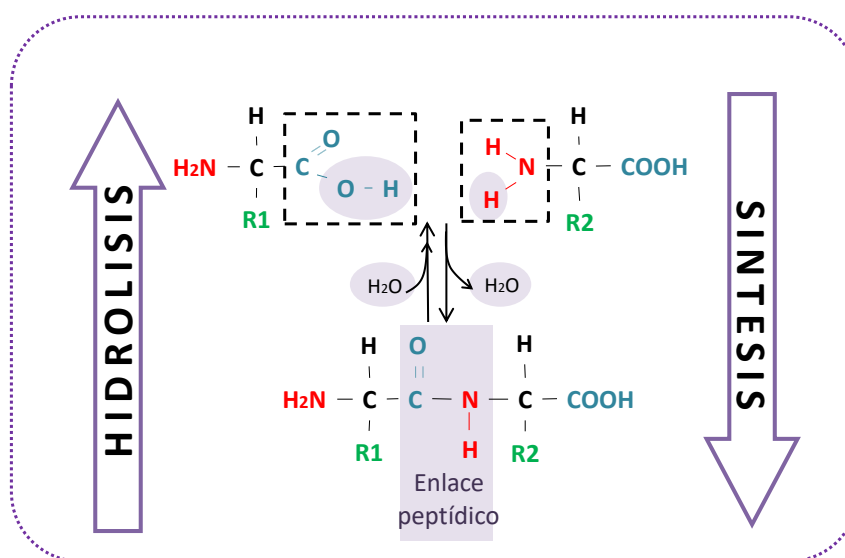


Figura 8. Esquema del proceso de hidrólisis y síntesis de proteínas

Hoy en día, la hidrólisis enzimática se reconoce como un método efectivo, no tóxico y sostenible con el medio ambiente para la mejora de las propiedades funcionales de las proteínas (Pan et al., 2020). La hidrólisis de proteínas por acción enzimática ha sido ampliamente estudiada por Adler-Nissen en los años 80, y sus trabajos siguen vigentes en la actualidad. Este tipo de hidrólisis es la más utilizada en la actualidad para hidrolizar proteínas en tecnología alimentaria, siendo frecuentes en la literatura el uso de enzimas como la tripsina, quimotripsina, alcalasa o la pepsina por citar algunas de las más relevantes. La hidrólisis enzimática de

proteínas resulta especialmente atractiva para los investigadores, principalmente por el hecho de que es predecible si se sabe la secuencia de aminoácidos del sustrato, por tanto, definiendo las condiciones de hidrólisis se originarán siempre los mismos péptidos. Esta hidrólisis dirigida permite la obtención “a la carta” de péptidos concretos, centrándose la labor investigadora en la selección de la proteína a tratar y de las enzimas que van a participar en el proceso. Sin embargo, a la hora de describir en qué consiste la hidrólisis enzimática también se deben tener en cuenta algunas de sus desventajas y/o limitaciones. Las enzimas pueden considerarse un producto caro en comparación con las alternativas de hidrólisis no enzimáticas, el sustrato debe tener las dianas accesibles al medio, las enzimas deben ser inactivadas irreversiblemente para asegurar la total parada de la reacción catalizada y, además, la acción enzimática requiere de un fuerte control de los parámetros de la reacción (Marcet Manrique, 2014). De hecho, en este proceso la enzima utilizada, así como las condiciones de hidrólisis (pH, temperatura y tiempo) y la proteína precursora que se emplee, son factores determinantes para producir los péptidos de interés (Eckert et al., 2013).

Los procesos de hidrólisis enzimática de las proteínas implican, además, un cambio en las propiedades de los alimentos, relacionados con su digestibilidad, calidad nutricional, calidad sensorial, y se utilizan en muchos procesos para mejorar o aumentar las propiedades tecnofuncionales de los alimentos, como mejorar la solubilidad de las proteínas o su capacidad espumante, gelificante y/o aglutinante, entre otras (Benítez et al., 2008). Los hidrolizados enzimáticos de proteínas alimentarias también pueden proporcionar beneficios para la salud debido a la reducción de alérgenos o a la formación de péptidos bioactivos, secuencias de aproximadamente 2 a 20 aminoácidos que se encuentran “inactivos” dentro de la proteína nativa de la que proceden, y que tras hidrólisis enzimática o fermentación (*in vitro* o *in vivo*), se liberan y se convierten en péptidos con actividad biológica (Vizcardo Gutierrez & Zavala Gonzalez, 2016). Estas propiedades pueden resultar interesantes como estrategia a la hora de elaborar nuevos alimentos, sin embargo, no siempre es evidente que la hidrólisis enzimática conduzca a una mejora de dichas propiedades, que en muchos casos podrían verse perjudicadas (Tavano, 2013).



La hidrólisis, o ruptura de enlaces peptídicos, puede cambiar las propiedades de las proteínas de tres modos: disminuyendo el peso molecular, aumentando el número de grupos ionizables o causando la exposición de grupos hidrofóbicos. Así, la hidrólisis enzimática mejora

la solubilidad de las proteínas alimentarias en un intervalo amplio de pH y modula sus propiedades superficiales o interfaciales, esenciales para la estabilización de espumas y emulsiones (Foegeding & Davis, 2011). La longitud y las características de los péptidos formados, en cuanto a sus aminoácidos constituyentes, la presencia de grupos polares e ionizables y su hidrofobicidad determinan las propiedades funcionales resultantes, que dependen, no sólo del grado de hidrólisis, sino también de la especificidad de la enzima y de las características de la proteína empleada como sustrato (Klompong et al., 2007).

La formación de geles alimentarios, es decir, la transformación de un fluido en un sólido a través de la formación de una red macromolecular, requiere que las proteínas nativas se desplieguen y se reasocien mediante interacciones covalentes y no covalentes, lo que tradicionalmente se ha conseguido mediante la aplicación de calor (Totosaus, et al. 2002). En este sentido, los factores que influyen en la capacidad gelificante de las proteínas pueden dividirse entre los que determinan la formación del gel y los que influyen en las propiedades físicas de éste. En ocasiones, la hidrólisis enzimática perjudica la capacidad gelificante de las proteínas al disminuir de forma excesiva su tamaño. Así, la hidrólisis de colágeno con papaína, que da lugar a péptidos de tamaño intermedio, produce una gelatina con suficiente firmeza y viscosidad, mientras que la neutrasa no permite la formación de geles (Damrongrakul, et al. 2008).

Por otra parte, las propiedades básicas que hacen de una proteína un buen agente espumante son su habilidad para: (1) adsorberse rápidamente a las interfases aire-agua durante el batido; (2) experimentar un rápido cambio conformacional en la interfase; y (3) formar una película viscoelástica cohesionada a través de interacciones intermoleculares. De este modo, contribuyen a las tres diferentes fases que son características de los alimentos que contienen espumas: formación, estabilidad y consumo. Es importante considerar todas ellas puesto que, por ejemplo, en muchos productos alimenticios, se parte de espumas húmedas que se transforman en espumas secas en su estructura final (tal es el caso de merengues y bizcochos). Así, las proteínas del suero lácteo pueden reemplazar a las de la clara de huevo en aplicaciones espumantes excepto en aquellas que implican calentamiento u horneado, pues su estabilidad térmica es diferente (Foegeding, et al. 2006). Esto demuestra que, en las respuestas estructurales de las proteínas durante el mezclado con otros ingredientes, el calentamiento y el secado son también esenciales para su funcionalidad.

Como ya se ha comentado con anterioridad, las proteínas hidrolizadas y los péptidos liberados están siendo ampliamente utilizados para mejorar funciones biológicas (Möller et al., 2008), pues los fragmentos peptídicos generados tras la hidrólisis enzimática son capaces de ejercer efectos biológicos específicos sobre el organismo (Di Bernardini et al., 2011). Desde el descubrimiento de los péptidos bioactivos en el año 1979, se han descrito péptidos bioactivos con diversas actividades biológicas como actividad antioxidante, antihipertensiva, inmunomodulante, antimicrobiana, opioide, etc. (Moughan et al., 2014), e incluso más recientemente se han descrito péptidos multifuncionales que pueden ejercer varias actividades biológicas de forma simultánea (Iwaniak et al., 2018; Liao et al., 2018). A lo largo de los últimos años se han descrito péptidos bioactivos derivados de diferentes matrices y proteínas alimentarias, como proteína de soja (Zhang et al., 2018; Moure et al., 2006), proteína de trigo (Zhu et al., 2016; Wang et al., 2007), proteína de chía (Silveira Coelho et al., 2019), proteína de clara de huevo (Liu et al., 2015; Chen et al., 2012a; Chen et al., 2012b; You & Wu, 2011; Shen et al., 2010; Manso et al., 2008; Dávalos et al., 2004), proteína de pescado (Franco et al., 2020; Bougategf et al., 2010; Je et al., 2007; Kim et al., 2007), colágeno (pepino de mar) (Li et al., 2019) y proteína de la leche (Cui et al., 2022; Uluko et al., 2016; Mills et al., 2011; Pihlanto, 2006; Amiot et al., 2004). Sin embargo, si bien la gran mayoría de los estudios llevados a cabo en las últimas décadas se han centrado en el aislamiento de las secuencias de péptidos bioactivos concretos que se liberan tras el proceso de hidrólisis, recientemente se está constatando que la administración de hidrolizados completos podría tener mayor relevancia a nivel fisiológico que la administración de un único péptido aislado, así como un efecto biológico mucho más complejo, además de considerarse productos más interesantes para el desarrollo de alimentos funcionales desde el punto de vista tecnofuncional y organoléptico (Liu et al., 2018).

#### **1.4. HIDROLIZADOS DE CLARA DE HUEVO. PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES Y BIOACTIVAS**

La hidrólisis enzimática se utiliza generalmente para preparar hidrolizados capaces de mejorar la funcionalidad de las proteínas, especialmente su solubilidad y las propiedades emulsionantes (Maria et al., 2017; Navidghasemizad et al., 2014; Jamdar et al., 2010; Benítez et al., 2008). La clara de huevo se considera un componente fundamental debido a sus características tecnofuncionales entre las que destaca por sus propiedades gelificantes y espumantes, y ello hace que se utilice de manera habitual en gran cantidad de alimentos preparados como pasteles, merengues, fideos o pastas (Yüceer, 2020a). Sin embargo, la clara de huevo presenta una limitación importante, y es su alta sensibilidad a la temperatura debido a la desnaturalización de las proteínas, lo que puede afectar de manera relevante a sus propiedades funcionales (Punidades y McKellar, 1999). En cuanto a las propiedades espumantes de la clara de huevo, se ha visto que la contaminación con la yema es una de las variables que afecta de manera más significativa (Strixner & Kulozik, 2011; Wang & Wang, 2009). Por todo ello, la industria de procesado del huevo está enfocada desde hace varios años en el uso de enzimas, con el objetivo de mejorar la rentabilidad en el tratamiento de los ovoproductos y mejorar sus propiedades funcionales, especialmente espumante y gelificante, y se propone el uso de hidrolizados de clara de huevo para enriquecer alimentos preprocesados así como mejorar la nutrición, textura y sabor de los alimentos (Yüceer, 2020b; Lahl & Braunn 1994;).

Además de su alto valor nutricional, las proteínas del huevo o sus derivados (hidrolizados de proteínas, péptidos y aminoácidos) han demostrado poseer diferentes actividades biológicas. Esto ha llamado la atención en los últimos años, tanto de la industria alimentaria como biofarmacéutica, incrementándose su uso como ingredientes funcionales y nutricionales en productos alimenticios (Garcés-Rimón et al., 2016a; Miranda et al., 2015). En la actualidad, se han descrito péptidos derivados de hidrolizados de proteínas de huevo con diferentes actividades biológicas a partir de todos sus componentes proteicos (membranas de la cáscara, clara y yema), aunque la mayoría de los estudios se centran en hidrolizados y péptidos derivados de las proteínas de la clara de huevo (Liu et al., 2017; Sun et al., 2016; Majumder et al., 2015; Nimalaratne et al., 2015; Memarpoor-Yazdi et al., 2012;). Existen algunos estudios que utilizan proteínas aisladas de la clara de huevo, como ovoalbúmina (Kim et al., 2020; Meza-Espinoza

et al., 2018; Grootaert et al., 2017; Chang et al., 2013; Xu et al., 2007; Matoba et al., 1999; Fujita et al., 1995), lisozima (Plat et al., 2017; Carrillo et al., 2016; Memarpoor-Yazdi et al., 2012; You et al., 2010) u ovotransferrina (Rathnapala et al., 2021; Moon et al., 2017; Majumder et al., 2015; Huang et al., 2010a; Shen et al., 2010). Sin embargo, lo más frecuente es realizar la hidrólisis a partir de la clara de huevo completa (Garcés-Rimón et al., 2016b; Nimalaratne et al., 2015; You y Wu, 2011).

La principal propiedad bioactiva estudiada a partir de hidrolizados de proteínas de huevo ha sido la actividad antioxidante (Benedé & Molina, 2020; Meza-Espinoza; 2018; Nimalaratne et al., 2015; Majumder et al., 2015; Liu et al., 2015; Rao et al., 2012a; Memarpoor-Yazdi et al., 2012; You y Wu, 2011; Shen et al., 2010; Xu et al., 2007; Dávalos et al., 2004;). Sin embargo, también es importante destacar distintos estudios en los que se ha demostrado actividad antihipertensiva en péptidos e hidrolizados proteicos derivados del huevo (Lee et al., 2019; Manso et al., 2008; Miguel et al., 2007a; Miguel et al., 2007b; Miguel & Aleixandra, 2006; Miguel et al., 2006; Matoba et al., 1999) actuando en la mayoría de estos casos a través de un mecanismo inhibitor de la enzima convertidora de angiotensina, enzima implicada en la homeostasis cardiovascular y renal, y en consecuencia en el control de la presión arterial (Rao et al., 2012b; Yu et al., 2012a; You & Wu, 2011; Yu et al., 2011a; Yu et al., 2011b; Liu et al., 2010; Miguel et al., 2007c; Miguel & Aleixandre, 2006; Miguel et al., 2004). En menor medida, también se han realizado estudios sobre su capacidad antimicrobiana (Memarpoor-Yazdi et al., 2012), su capacidad como agente vasodilatador (Miguel et al., 2007a), para el tratamiento de la inflamación intestinal (Lee et al., 2009) y por su potencial actividad antidiabética (Yu et al., 2012b).

Es importante señalar que para la obtención del hidrolizado de clara de huevo a nivel semiindustrial, objetivo de la presente Tesis Doctoral, se tomó como referencia la patente con número de solicitud P201331886 y número de publicación internacional WO2015092098 A1 que lleva por título “Composiciones alimentarias saludables que presentan texturas de gel o espuma y que comprenden ovoproductos hidrolizados” de la Dra. Marta Miguel Castro et al., 2015 perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y al chef Mario Sandoval Huertas. En esta patente se engloban ambos aspectos o propiedades comentadas con anterioridad, la tecnofuncional y la bioactiva, y específicamente se basa en el uso de un hidrolizado de huevo y de agentes saborizantes de base no láctea, que permiten la obtención de

composiciones alimentarias saludables, ricas en proteínas de alto valor biológico, con propiedades antioxidantes, bajas en grasa y libres de lactosa y caseína, que son capaces de emular o incluso mejorar las características de sabor, textura y apariencia de platos de cocina dulce y salada con texturas de gel y espuma que emplean como base productos lácteos, y que además pueden ser utilizados como ingredientes en múltiples elaboraciones (Miguel et al., 2015). En esta patente se describe un proceso de hidrólisis enzimática de las proteínas de la clara, la yema o del huevo completo mediante el cual se pueden obtener texturas hasta ahora desconocidas que permiten el desarrollo de una gran versatilidad de nuevos productos elaborados a base de proteínas de la más alta calidad.

El hidrolizado de proteínas de huevo que comprenden las composiciones alimentarias de la patente P201331886 se caracteriza por su sabor neutro y porque no genera retrogusto, lo que se deriva de la utilización de enzimas adecuadas durante el procedimiento de hidrólisis. En la literatura se describe que la producción de hidrolizados de proteína provoca la aparición de sabores amargos, dependiendo del tamaño, secuencia y, fundamentalmente, hidrofobicidad de los aminoácidos que forman los péptidos, sobre todo, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina y triptófano. Aunque se sabe que el uso de exopeptidasas para catalizar la hidrólisis de enlaces peptídicos consigue reducir el amargor (Raksakulthai & Haard, 2003), el ovoproducto desarrollado consigue la obtención de composiciones alimentarias en las que no se reproduce el amargor. Entre las enzimas que consiguen que la composición alimentaria de la invención no produzca amargor destacan las aminopeptidasas derivadas de *Aspergillus* o la alcalasa derivada de *Bacillus*.

Es importante tener en cuenta, además, que los productos con texturas de gel y de espuma tienen cada día una posición más preponderante en la cocina actual y están ampliamente extendidos en el mundo de las especialidades culinarias dulces y los postres, pero también en el de los platos salados. Este tipo de productos, además de por sus características tecnofuncionales y su contenido nutricional, son deseables y muy atractivos para cualquier sector de la población y, están principalmente indicados para personas con requerimientos alimentarios especiales, como, por ejemplo, aquellas que presentan dificultad “mecánica” de masticación y/o deglución.

Las circunstancias de enfermedad, crónica o pasajera, que conducen a una persona a no incluir o a eliminar la leche de vaca, sus derivados y todos los productos que incluyan este alimento en su dieta cotidiana son diversas. La alergia a la caseína y la intolerancia a la lactosa son las afecciones más comunes. La falta de lactasa origina intolerancia a la lactosa, anomalía relativamente frecuente, sobre todo en personas de avanzada edad. Concretamente, la intolerancia a la lactosa constituye el trastorno genético más frecuente en la especie humana, que afecta a más del 50 % de la población mundial. En esta patente se describen y plantean distintas alternativas que buscan que los consumidores que tienen que prescindir de la leche en su dieta, puedan consumir platos de cocina dulce y salada con texturas de gel o de espuma, y que de forma habitual utilizan en su formulación grasas, fuentes de proteína y aditivos. De hecho, es normalmente la inclusión de proteínas y/o aditivos lo que permite obtener productos de características tecnofuncionales (sabor, textura, olor, nivel de acidez, adecuadas propiedades reológicas, estabilidad y apariencia), similares a las de los productos que utilizan leche o derivados lácteos en su composición. Sin embargo, la inclusión de aditivos complica el proceso de elaboración y es responsable de que el producto final sea visto por el consumidor como un alimento poco saludable.

A continuación, se resumen las ventajas técnicas de la composición alimentaria de la patente P201331886:

- Son productos saludables que constituyen una fuente de proteína de alta calidad, bajos en grasas y libres de lactosa y caseína.
- Presentan una fácil masticación y digestión, a diferencia de otras fuentes de proteínas convencionales, carnes, pescados y aves, lo que los hacen especialmente idóneos para poblaciones con algún tipo de limitación mecánica de masticación o problemas de digestibilidad.
- Requieren de un limitado número de ingredientes para su elaboración.
- Son productos económicos en relación con otros alimentos proteicos.
- Pueden ser consumidos por personas con intolerancia a los productos lácteos y personas con problemas de obesidad.
- Permiten un aprovechamiento máximo tanto del huevo entero, como de sus fracciones yema y clara, evitando la generación de subproductos.

La empresa americana Lafoobe LLC es la titular de la licencia de explotación de la patente y, a través de un contrato de sublicencia, en la actualidad es la empresa española de origen gallego, Granja Campomayor S.L., quien posee los derechos de explotación de la patente en España y Europa.

El trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral forma parte de un Proyecto CDTI concedido a la empresa Granja Campomayor S.L. con el objetivo de llevar a cabo el desarrollo del hidrolizado de clara de huevo a escala semiindustrial para que pueda ser utilizado posteriormente como un ingrediente base en la elaboración de nuevos productos alimentarios similares a otros de origen lácteo, como yogures, helados, postres, salsas o untables.

Los trabajos recogidos en la patente de referencia se basan principalmente en la obtención, utilizando el proceso de hidrólisis de un producto final texturizado con diversas aplicaciones culinarias. Sin embargo, en esta Tesis Doctoral, lo que se pretendió fue la obtención de un ingrediente líquido, basado también en la hidrólisis de la clara de huevo, para su comercialización industrial de manera que, diferentes empresas puedan disponer de él para la elaboración de otros productos derivados mediante la adición de otros ingredientes (texturizantes, estabilizantes, saborizantes, etc.) y/o aplicación de otras tecnologías o equipamientos disponibles.

Aunque la empresa Granja Campomayor inició en enero de 2018, tras la firma del contrato de sublicencia, los estudios encaminados al desarrollo semiindustrial e industrial para la comercialización del hidrolizado de huevo, este proyecto CDTI titulado “Nuevos ingredientes alimentarios obtenidos mediante hidrólisis enzimática de la clara del huevo (FOODSHYEGG)”, con referencia IDI-2019110, se llevó a cabo entre agosto de 2019 y julio de 2021.

## **1.5. DESARROLLO DE UN NUEVO PRODUCTO**

La acepción de “nuevo producto” es muy amplia, y tiene diferentes interpretaciones dependiendo de con quién se esté interaccionando. Para un técnico de I+D o tecnólogo de alimentos puede ser un cambio en las características nutricionales o un cambio en el envase,

pero también puede ser, para un departamento de marketing de una empresa, cualquier cambio en la estrategia de venta en cuanto a precio, publicidad o distribución. Desde el punto de vista del consumidor, un nuevo producto es algo que le proporciona “beneficios” alimentarios, sociales o culturales y que le persuade para que lo compre. No solo percibe el alimento en base a sus características físicas, químicas y nutricionales como lo puede ver un tecnólogo de alimentos. Para ellos, el envase y la publicidad del producto son los aspectos que se perciben en primer término. Únicamente cuando el nuevo producto alimentario cubre las demandas esperadas es cuando el consumidor se fideliza. Por otro lado, desde un punto de vista comercial o de mercado, se deben presentar al consumidor los nuevos productos adaptados a sus gustos y a sus necesidades. Estos parámetros pueden verse modificados a lo largo del tiempo, y suelen ser característicos de cada grupo de población o bien se adaptan a los tiempos económicos del momento.

Actualmente existen múltiples razones por las que una empresa decide añadir “nuevos productos” o servicios a su cartera. Entre ellas, se encuentran: la adecuación a nuevas exigencias de los clientes y/o consumidores, identificación de demandas de mercado, disminución de sus ventas, incorporación de valor añadido a sus productos, uso de materias primas nuevas o poco explotadas, adaptación a nuevas tecnologías o para lograr un mejor aprovechamiento de las infraestructuras de la empresa. Esta incorporación de los nuevos productos o servicios de la empresa, pueden hacerse a través de la adquisición de licencias, concesiones o patentes; a través de la contratación de empresas o técnicos especializados que desarrollen el producto o llevando a cabo el desarrollo en la propia empresa. A la hora de desarrollar “un nuevo producto”, la empresa debe de tener claro a qué grupo de alimentos va a enfocar el nuevo desarrollo. A continuación, se describe una de las múltiples clasificaciones sobre grupos de alimentos (Guía para el desarrollo de producto alimenticios, 2015).

- Alimentos que aportan beneficios adicionales a la salud: aquellos que además de aportar los nutrientes básicos, brindan beneficios adicionales como la prevención o el tratamiento de enfermedades (productos fortificados, enriquecidos o alimentos nutracéuticos).
- Alimentos dirigidos a determinados segmentos de mercado: para poblaciones con necesidades nutricionales específicas (comida para bebés, deportistas, población hipertensa, etc.).

- Alimentos de conveniencia: son los que facilitan su preparación y consumo (alimentos precocidos o preparados, refrigerados o congelados, con envases fáciles de utilizar y transportar, aptos para calentar en microondas u horno, fraccionados en porciones individuales, etc.).
- Alimentos identificados por su procedencia: alimentos preparados que se asocian a una región o a un grupo étnico (comida china, comida árabe, comida mexicana...)
- Alimentos orgánicos: son los que se producen bajo un conjunto de procedimientos particulares que buscan minimizar el uso de productos sintéticos. En general se requieren certificaciones especiales para poder comercializarlos (frutas y verduras producidas sin pesticidas, herbicidas y/o fertilizantes artificiales).
- Alimentos de vida útil prolongada: son alimentos tratados física o químicamente para conservarlos durante un mayor período de tiempo (deshidratados, congelados, pasteurizados, tratados a temperaturas ultra altas (denominados comúnmente UHT; *del inglés: ultra high temperature*), conservas en lata, dulces, acidificados, fermentados, etc.).

Una cuestión importante que hay que tener en cuenta a la hora de desarrollar un nuevo producto alimenticio es que no se trata de un proceso lineal, sino que cada resultado que se obtiene sirve para ajustar y mejorar los pasos anteriores. De esta forma se realizan a tiempo los cambios y correcciones que permiten mejorar la idea original y ahorrar tiempos y recursos en el desarrollo de esta hasta conseguir un producto de calidad. Dentro de los parámetros de calidad de un alimento, además de la inocuidad, otras características que determinan el valor o la aceptabilidad de los alimentos por parte del consumidor son el valor nutricional y las propiedades sensoriales (aspecto, color, textura, aroma y sabor). Además, hay que tener en cuenta que, durante la fase de puesta en marcha de un determinado proceso o producto, las empresas necesitan recursos para validar muestras a pequeña escala, con el objetivo de buscar la mayor rentabilidad y evitar la producción en exceso durante el desarrollo de estas pruebas muchas veces se recurre al escalado de prototipos. Este escalado, es un recurso rentable para las empresas de alimentos que están comenzando o aquellas que se encuentran evaluando nuevas formulaciones o procesos, ya que permite un ahorro de los costes derivados de la mano de obra, paradas productivas, nuevo equipamiento, etc.

En el caso de esta Tesis Doctoral, lo que se plantea es el desarrollo, a escala semiindustrial, de un hidrolizado de clara de huevo para que pueda ser utilizado posteriormente como un ingrediente base en la elaboración de nuevos productos alimentarios. Se diseñará un nuevo protocolo de elaboración para que el hidrolizado que sea viable posteriormente a nivel industrial tomando como referencia la patente con número de solicitud 201331886 y realizada a escala de laboratorio. Durante la realización de estos trabajos no se deben perder de vista dos aspectos de gran importancia en prácticamente todas las etapas de producción y desarrollo de un producto alimenticio y ya mencionados anteriormente: el aspecto hedónico o sensorial y la seguridad alimentaria.

Se sabe que el éxito o el fracaso de un alimento o bebida en el mercado depende en gran medida de las reacciones totalmente subjetivas del consumidor. Algunos investigadores han sugerido que el éxito de un producto va a depender principalmente de su calidad sensorial, utilizando la aceptabilidad y preferencia como indicadores del consumo de alimentos, y afirman que la aceptabilidad, preferencia e intención de compra son la base del éxito de un producto en el mercado (MacFie, 2007; Lee & O'Mahony, 2005). Por lo tanto, las características del producto alimenticio (parámetros fisicoquímicos y, principalmente, sensoriales/afectivos) se consideran fundamentales en la aceptabilidad y preferencia de un alimento o bebida (Costell et al., 2010). No obstante, si hay un requisito indispensable a la hora de desarrollar un “nuevo producto” es la seguridad alimentaria del mismo. Esta circunstancia nos obliga a realizar estudios de conservación del alimento, para conocer su vida útil o periodo de tiempo durante el cual el “nuevo producto” mantiene sus características de calidad sensorial y la seguridad y estabilidad microbiológica. Con este objetivo, en función del producto que se esté elaborando, puede ser necesario aplicar un tratamiento térmico sobre el mismo, y hay que tener en cuenta que esta etapa del proceso puede modificar las características fisicoquímicas y/o sensoriales del producto final.

El procesado térmico consiste en el uso de elevadas temperaturas con el objetivo de destruir y/o inactivar microorganismos o enzimas presentes en los alimentos preservando de este modo la seguridad alimentaria. Para ello, los alimentos se deben calentar a una temperatura y tiempo concretos para conseguir un producto comercialmente estéril. Como medio de calentamiento se utiliza vapor de agua saturado o bien agua caliente a sobrepresión. El procesado térmico puede llevarse a cabo de forma continua o discontinua. En los tratamientos térmicos en continuo el

producto se somete normalmente a un tratamiento térmico con una alta temperatura ( $> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y un tiempo bastante corto, unos pocos segundos. En los tratamientos térmicos en discontinuo la temperatura de tratamiento térmico es más baja ( $75 - 85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pero el tiempo de tratamiento es más largo (minutos). Algunos de los problemas o inconvenientes asociados al procesado de los alimentos mediante métodos en discontinuo son, la aparición de compuestos derivados de la reacción de Maillard, la pérdida de color y/o la ausencia de reproducibilidad. Por ejemplo, los alimentos líquidos o semilíquidos tales como leches, zumos o salsas tratados térmicamente en el propio envase o en discontinuo suelen sufrir de sobreprocesado debido a los largos periodos de tiempo a los que está sometido el producto durante el tratamiento térmico para poder alcanzar la esterilidad comercial. Por todo ello, una de las principales fuerzas impulsoras que está y ha estado detrás del desarrollo de los procesos térmicos en continuo ha sido la mejora de la calidad de los alimentos (aspecto, color, textura, aroma y gusto o sabor) manteniendo siempre la seguridad del producto.

#### **1.5.1. Procesado térmico en continuo**

En el procesado térmico en continuo, también denominado procesado en flujo continuo, el alimento es procesado térmicamente antes de que sea colocado dentro de un envase adecuado (higiénico o estéril). Todo el proceso se realiza en línea en un intercambiador de calor con diferentes secciones para la fase de calentamiento y enfriamiento (si fuera necesaria). Existen dos modos de llevar a cabo el procesado térmico en continuo, mediante métodos indirectos o directos. El calentamiento por métodos indirectos implica la existencia de una superficie de transmisión de calor entre el alimento y el medio de calentamiento. En el caso de calentamiento por métodos indirectos se distinguen: el intercambiador de calor de placas, el intercambiador de calor tubular y el intercambiador de calor de superficie rascada. En el caso de los métodos directos, el alimento y el medio de calentamiento están en contacto directo. Dentro de estos métodos de calentamiento se incluye la inyección de vapor y la infusión de vapor. En la figura 9 se muestra un esquema de las diferentes opciones o métodos de calentamiento (indirectos y directos) dentro del procesado térmico en continuo.



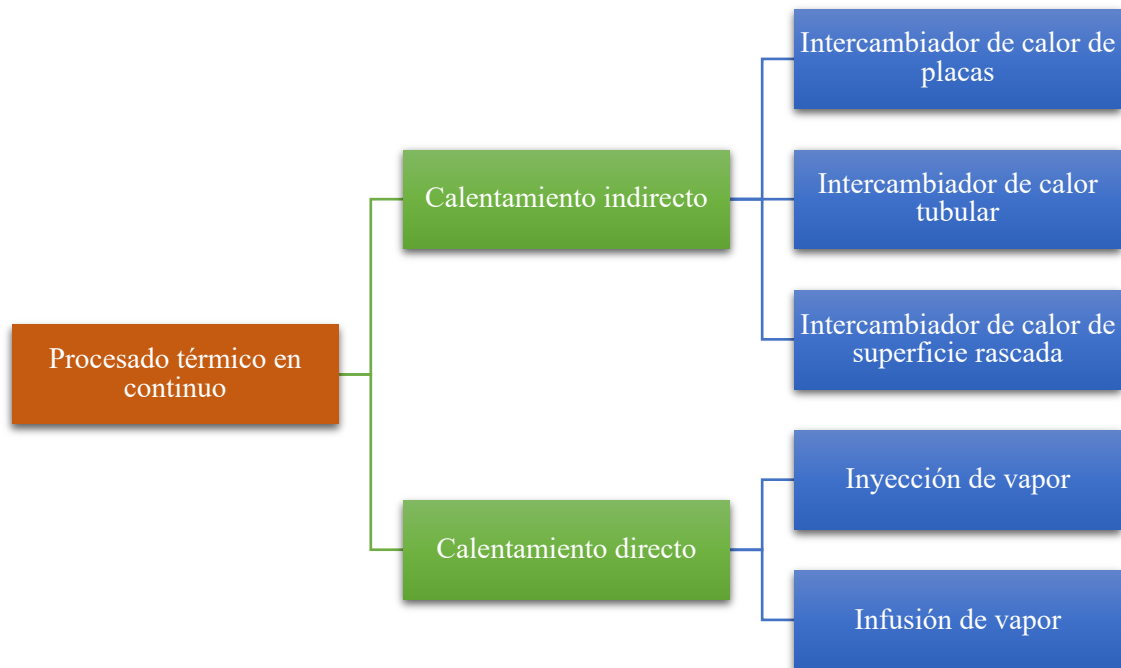


Figura 9. Métodos de procesamiento térmico en continuo

#### 1.5.1.1. Calentamiento indirecto

##### 1.5.1.1.1. Intercambiador de calor de placas

Un intercambiador de calor de placas consiste en una serie de planchas verticales de acero inoxidable montadas en un soporte. Las planchas o placas forman canales paralelos por los que el alimento líquido y el medio de calentamiento (agua o vapor) son bombeados en contracorriente por canales adyacentes (figura 10). La estanqueidad del conjunto se consigue mediante juntas de goma que evitan la fuga del medio de calentamiento o la mezcla de éste con el producto a procesar. La superficie de estas placas es corrugada para hacer que el flujo entre las mismas sea de tipo turbulento, lo que, junto con la velocidad de flujo inducido por la bomba, reduce el grosor de la película del alimento a procesar, consiguiendo así coeficientes de conductividad térmica muy elevados. En este tipo de procesamiento térmico en continuo, el alimento se bombea desde un tanque de regulación a la sección de regeneración, donde se precalienta con el vapor que cede el alimento ya pasteurizado. Seguidamente el alimento se calienta hasta la temperatura de pasteurización en la sección de calentamiento, y se mantiene a esta temperatura durante el tiempo necesario para completar el tratamiento en el tubo de

mantenimiento. Si la temperatura de pasteurización no se ha alcanzado, una válvula de desvío de flujo desvía automáticamente el alimento al tanque de regulación para ser repasteurizada. El producto pasteurizado se enfría seguidamente en la sección de regeneración (que precalienta simultáneamente al flujo de entrada). Por último, el producto se enfría con agua fría y, si es necesario, con agua preenfriada en la sección de enfriamiento.

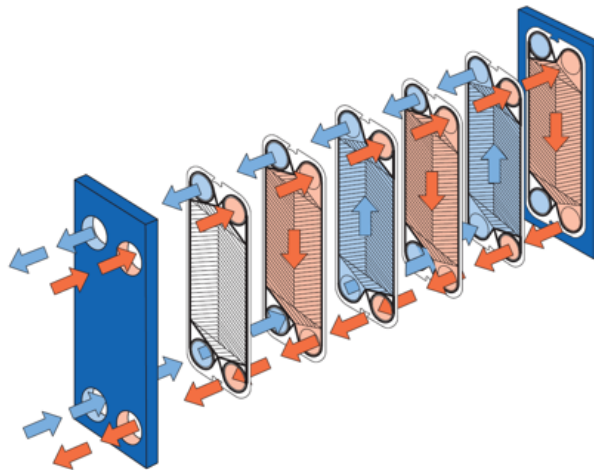


Figura 10. Principio de funcionamiento de un intercambiador de placas (tomada de: <https://blog.froztec.com/como-opera-un-intercambiador-de-calor-alfa-laval-alfanova>)

Tradicionalmente los intercambiadores de placas se han utilizado en los procesos de pasteurización y se han adaptado para aguantar temperaturas y presiones elevadas requeridas para los procesos UHT. Este método está bien establecido para el procesado de alimentos homogéneos de baja viscosidad y bajo nivel de acidez (pH superior a 4,6) como leche, leche saborizada, cremas, bebidas vegetales como las realizadas a base de soja y otras alternativas lácteas. El mismo proceso también se utiliza para esterilizar alimentos preparados como sopas, salsas, postres, preparaciones a base de tomate y frutas, y alimentos para bebés.

#### 1.5.1.1.2. Intercambiador de calor tubular

En el intercambiador de calor de tipo tubular el producto se bombea a lo largo de un tubo o de múltiples tubos que están fijados en el interior de un tubo más grande. En el espacio entre los dos tubos, se bombea el medio de calentamiento o enfriamiento a contracorriente con el alimento, maximizando la eficiencia del intercambio de calor. La resistencia mecánica de estos tubos les permite operar a altas temperaturas y presiones. La turbulencia en los tubos se

consigue mediante la velocidad que alcanza el alimento, y también gracias a la presencia de una superficie corrugada en el interior de los tubos que mejora la eficiencia de la transmisión de calor.

Existen diferentes diseños de intercambiadores de calor tubulares. El diseño más sencillo es el monotubo. Este consiste básicamente en un tubo que se encuentra en el interior de otro tubo (figura 11A). El alimento fluye a través del tubo central y está rodeado de un tubo exterior que contiene el medio de calentamiento o enfriamiento. Como el medio de calentamiento rodea al producto, este tipo de sistema permite un calentamiento muy suave en el caso de alimentos particulados.

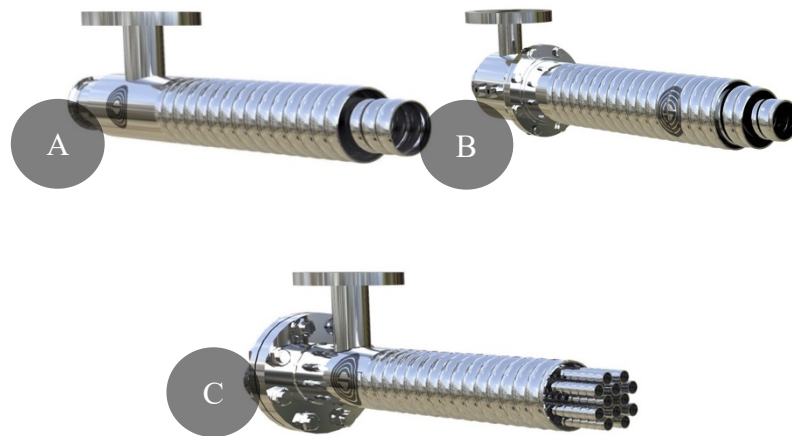


Figura 11. Tipos de intercambiadores tubulares (tomada de: <https://www.sacome.com/intercambiador-tubular-usos-ventajas-aplicaciones/>)

Un diseño más complejo es el intercambiador de calor tubular concéntrico (figura 11B). Este intercambiador generalmente está formado por una carcasa y tubos concéntricos. Los tubos concéntricos tienen un diseño de canal simple donde el alimento fluye a través de un tubo que está rodeado por un segundo tubo que lo envuelve conteniendo el medio de calentamiento o enfriamiento. La transmisión de calor con este sistema es más eficiente ya que el alimento se encuentra rodeado por el medio calefactor o refrigerante a través de dos superficies. Un tercer diseño dentro de los intercambiadores de calor tubulares es el sistema múltiple (figura 11C). Este sistema puede constar de dos o de varios tubos paralelos, a través de los que fluye el alimento, rodeado por un tubo de revestimiento que contiene el medio de calentamiento o

enfriamiento; esto permite que el medio calefactor o refrigerante circule entre y alrededor de cada tubo. Los tubos pueden ser corrugados o lisos dependiendo del nivel de turbulencia y de la eficiencia de transmisión de calor requeridos.

Los intercambiadores de calor tubulares permiten procesar una gran variedad de alimentos y no solo aquellos de baja viscosidad como los intercambiadores de placas, sino que también pueden manejar productos de viscosidad más alta y que pueden contener partículas, tales como sopas o salsas.

#### *1.5.1.1.3. Intercambiador de calor de superficie rascada*

Este intercambiador está formado por un tubo (similar a los monotubos simples) con una carcasa exterior por donde circula el medio de calentamiento o enfriamiento (figura 12). El tubo central de procesamiento contiene un eje que está conectado a un motor y está soportado por cojinetes en ambos extremos. El eje tiene cuchillas insertadas, que están diseñadas para raspar la superficie de calentamiento del tubo en el momento que el motor activa la rotación del eje. Este diseño ofrece una forma de procesamiento para productos altamente viscosos que contienen partículas, y que tradicionalmente han sido procesados mediante operaciones en discontinuo más lentas, lo cual permite una fabricación reproducible de productos de alta calidad. Este diseño es ideal para productos viscosos porque la rotación provoca turbulencia dentro de la cámara de calentamiento, aumentando de este modo la transmisión de calor dentro del alimento. Además, las cuchillas rascan la superficie de calentamiento reduciendo la acumulación de producto en las paredes, algo que ocurre de forma habitual en alimentos altamente viscosos, favoreciendo de nuevo la transmisión de calor en el producto que se está procesando y reduciendo el ensuciamiento del equipo.

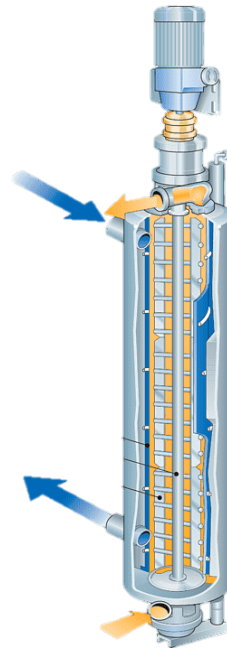


Figura 12. Intercambiador de calor de superficie rascada (modificada de: <https://www.freepng.es/png-i9t1h4/>)

#### 1.5.1.2. Calentamiento directo

Como se ha mencionado al inicio del apartado 1.5.1, existen dos métodos principales para el calentamiento del producto por métodos directos: mediante inyección con vapor pasteurizado dentro del producto (inyección de vapor) o mediante inyección del producto en el vapor (infusión de vapor). Ambos sistemas trabajan sobre la base de que el vapor entra en contacto con el producto y esto provoca un calentamiento prácticamente instantáneo. Este contacto del medio de calentamiento con el producto es la principal diferencia entre los métodos de calentamiento indirectos y directos en el procesamiento en continuo.

El principio básico de ambos sistemas, inyección o infusión de vapor es pasar el alimento desde un tanque equilibrado a un sistema de pretratamiento, usualmente formado por un intercambiador de calor de placas a 70 – 80 °C. Este tipo de tanques se utilizan para asegurar el buen funcionamiento de los sistemas de bombeo, ya que evitan la cavitación regulando la presión y facilitan un caudal uniforme en toda la línea de producción. Después, este alimento se pasará a través de la bomba principal mediante un sistema de inyección o infusión de vapor. Después de mantener el alimento durante el tiempo requerido, el alimento pasa a través de una válvula reductora situada dentro del enfriador. El mecanismo de enfriamiento para este sistema

debe ser también rápido y debe eliminar además el agua adicional que se añadió durante el periodo de calentamiento. Para conseguir esto, el alimento se pasa a una cámara de vacío, provocando que el producto hierva de forma instantánea y elimine el exceso de fluido mientras reduce la temperatura a la de precalentamiento (antes de la inyección). La inyección de vapor es más adecuada para productos homogéneos de baja viscosidad tales como leche o zumos, y actualmente existen muchos tipos diferentes de inyectoros de vapor disponibles. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la inyección de vapor puede dañar bastante los productos debido al método agresivo de calentamiento que tiene lugar. Además, la condensación rápida del vapor provoca cambios de presión en el líquido, y esto puede dar lugar a la formación de agregados; es por ello, que normalmente los productos procesados mediante este método se homogeneizan con frecuencia después del tratamiento térmico, lo que se conoce como homogeneización en modo descendente. En caso de que la etapa de homogeneización se incorpore antes del tratamiento térmico, se denomina homogeneización en modo ascendente. Es importante tener en cuenta que para regular la temperatura de homogeneización se emplean métodos indirectos (intercambiadores de calor tubular o de placas). Los sistemas de infusión de vapor se diseñaron para obtener un proceso más suave que el que se consigue mediante la inyección de vapor, se utilizan para los mismos tipos de productos, y también se pueden modificar para manejar partículas pequeñas presentes por ejemplo, en los zumos.

### **1.5.2. Proceso de homogeneización**

El proceso de homogeneización se ha utilizado desde hace muchos años en la industria láctea para reducir el tamaño del glóbulo de grasa a valores de entre 1 y 10  $\mu\text{m}$ , con el fin de incrementar la estabilidad de la emulsión y evitar el desnatado y la coalescencia durante el posterior periodo de almacenamiento de la leche y de otros productos lácteos (Hayes & Kelly, 2003a; Hayes & Kelly; 2003b; Thiebaud et al., 2003; Vachon et al., 2002; Paquin, 1999). Durante este proceso, la leche es forzada a pasar, usando una bomba, a través de espacios muy reducidos de una válvula ajustable a una temperatura de entre 45 y 50  $^{\circ}\text{C}$ , y presión determinada, normalmente menor a 50 MPa. Esto causa un incremento de la velocidad del fluido y una posterior pérdida de la presión a su paso por la válvula que provoca cavitación, efectos de roce, turbulencia y coalescencia en la superficie, efectos que al combinarse reducen el tamaño del glóbulo de grasa de la leche. La rápida depresión del fluido produce también un cambio de la temperatura, favoreciendo la formación de burbujas de gas (o cavidades) en el

interior, y que forman un núcleo que crece y causan la ruptura del glóbulo graso (Hayes et al., 2005; Thiebaud et al., 2003; Vachon et al., 2002; Guerzoni et al., 1999).

En la actualidad, moderadas presiones de homogeneización (20 a 50 MPa) se utilizan en las industrias alimentarias, farmacéutica y cosmética para dispersar fases no micelares, estabilizar emulsiones y/o preparar productos con unas adecuadas propiedades reológicas así como organolépticas (Diels et al., 2005; Hayes et al., 2005; Flourey et al., 2004; Hayes & Kelly, 2003a; Paquin, 1999).

## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

El **objetivo global** de la presente Tesis Doctoral ha consistido en el desarrollo, a escala semiindustrial, de un hidrolizado de clara de huevo para que pueda ser utilizado posteriormente como un ingrediente base en la elaboración de nuevos productos alimentarios similares a otros de origen lácteo, como yogures, helados, postres, salsas o untables.

Para conseguir este objetivo global se propusieron los siguientes **objetivos parciales**:

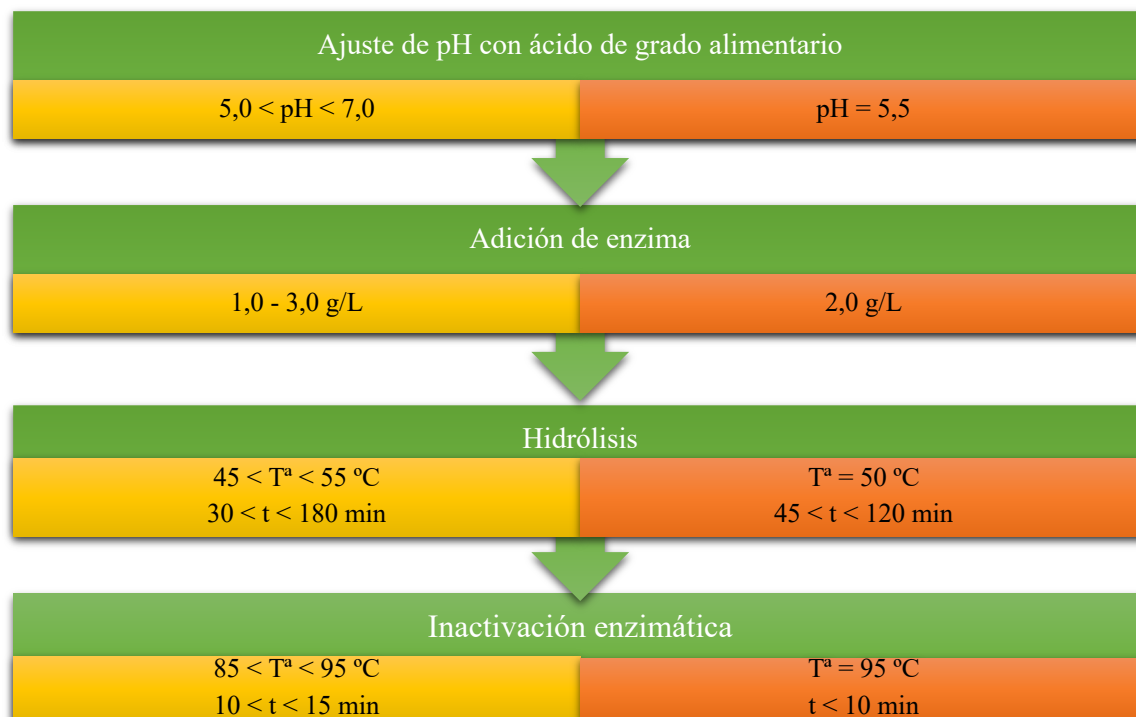
1. Diseñar el proceso de elaboración del hidrolizado a escala de laboratorio estudiando los diferentes parámetros implicados en la hidrólisis de la clara de huevo (temperatura, tiempo de hidrólisis, pH, dosis y parámetros de inactivación de la enzima).
2. Adaptar el protocolo de obtención del hidrolizado a escala de laboratorio para su correcto escalado semiindustrial: fase de precalentamiento, selección del pH final del hidrolizado, elección del tratamiento térmico y homogeneización.
3. Evaluar el impacto del tratamiento térmico (pasteurización o UHT), equipamiento empleado (intercambiador de calor de placas o tubular) y tipo de homogeneización (ascendente o descendente) en las características fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas del hidrolizado final.
4. Analizar el impacto de un segundo tratamiento térmico sobre el hidrolizado ya elaborado, para simular el proceso al que podría ser sometido en caso de utilizarse como un ingrediente base para la elaboración de otros productos finales. Evaluar el

# MATERIAL Y MÉTODOS

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. ENSAYOS DE LABORATORIO PREVIOS AL ESCALADO SEMIINDUSTRIAL PARA LA OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO DE CLARA HUEVO**

Para llevar a cabo este estudio se tomó como referencia el protocolo de elaboración descrito en la patente P201331886 y esquematizado en la figura 13 con los parámetros genéricos (en color amarillo) y específicos (en color naranja). Se utilizó clara de huevo pasteurizada comercial proporcionada por la empresa Granja Campomayor (Granja Campomayor, S.L., Palas de Rei, Lugo). En el protocolo de hidrólisis, lo primero que se realiza es una disminución del pH de la clara de huevo pasteurizada, que habitualmente se encuentra en torno a 9, a un valor de entre 5,0 y 7,0 con un ácido de grado alimentario (ácido clorhídrico al 37 %, Panreac, España). Una vez realizado el ajuste de pH, se adiciona la enzima (F750MDP, Biocatalysts, Cardiff, Reino Unido) en una dosis de entre 1 y 3 g/L de clara de huevo, y se deja incubando en agitación a la temperatura de hidrólisis (45 - 55 °C) durante un tiempo comprendido entre 30 y 180 minutos. Por último, se realiza la inactivación de la enzima a una temperatura de entre 85 y 95 °C durante un tiempo comprendido entre 10 y 15 minutos. En la patente, en función del producto final a elaborar, antes, durante o después de la etapa de inactivación enzimática, se pueden adicionar agentes aromatizantes y/o saborizantes. Este protocolo permite obtener texturas de tipo gel-crema y/o texturas de espuma. Esto se logra sometiendo el producto obtenido de la hidrólisis a un proceso de centrifugación, mediante el cual se produce la separación del producto en dos fases. La fase superior líquida o sobrenadante se emplea para conseguir la textura de espuma mediante agitación con varillas mientras que la fase inferior o precipitado presenta una textura más viscosa y se emplea para conseguir texturas de tipo gel o crema.



**Figura 13.** Esquema del proceso de obtención del hidrolizado de clara de huevo genérico (amarillo) y específico (naranja) detallado en la patente con número de solicitud 201331886

Tras el análisis inicial del protocolo de la patente se observó la necesidad de realizar un nuevo diseño del protocolo de elaboración del hidrolizado de clara de huevo a nivel de laboratorio de forma previa a su escalado piloto.

En la tabla 5 se muestran los cambios o modificaciones realizados para el nuevo diseño del protocolo, así como los parámetros estudiados y las determinaciones analíticas realizadas en cada uno de ellos. Cada uno de estos ensayos se realizó modificando en el protocolo original basado en la patente y detallado en la figura 13 el parámetro a evaluar, y manteniendo fijas el resto de las variables definidas. En la tabla 5 se indican también los análisis realizados a las muestras obtenidas en cada uno de estos ensayos. La metodología seguida para cada una de las determinaciones analíticas indicadas viene especificada en el apartado 3.3.

**Tabla 5. Resumen de los ensayos realizados a escala laboratorio, parámetros evaluados y determinaciones analíticas**

Estudio realizado	Parámetros evaluados	Determinaciones analíticas
Selección de la temperatura de precalentamiento e hidrólisis	Temperatura de 50 o 55 °C	Determinación de proteína Sensorial
Efecto de la agitación durante el proceso de hidrólisis	Agitación o reposo durante el proceso de hidrólisis	Sensorial
Selección del ácido	Empleo de ácido clorhídrico (ácido control), ácido cítrico, ácido láctico o ácido tartárico para el ajuste de pH previo a la hidrólisis	Seguimiento de pH Sensorial
Selección del pH durante el proceso de hidrólisis	Efecto del ajuste de pH a 7,5 o 7,0 durante la fase de hidrólisis	Coagulación
Selección de la dosis de enzima	Efecto de la dosis de enzima de 1 o 2 g/L de clara	Coagulación Sensorial
Efecto del tiempo de hidrólisis	Duración de la hidrólisis de 120 o 540 min	Coagulación Tamaño de partícula Sensorial
Selección de condiciones de inactivación de la enzima	Tratamiento térmico Dilución de un 0 a un 50 % Homogeneización ascendente (antes del tratamiento térmico) o descendente (después del tratamiento térmico) pH final del hidrolizado: básico (8,0), neutro (7,0) o ácido (4,2)	Tamaño de partícula Sensorial

A continuación, se detallan los ensayos realizados y esquematizados en la tabla 5 junto con el equipamiento y material empleado.

### 3.1.1. Selección de la temperatura de precalentamiento e hidrólisis

Con el objetivo de seleccionar la temperatura más adecuada tanto en la fase de precalentamiento como en la fase de hidrólisis, la clara de huevo pasteurizada se hidrolizó en un procesador de alimentos Thermomix TM5 (Vorwerk, Wuppertal, Alemania) (figura 14A) a la temperatura de hidrólisis de 50 y 55 °C según el protocolo definido en la figura 13. Las muestras resultantes se filtraron para, por un lado, analizar la cantidad de sedimento generado durante el proceso de hidrólisis y analizar su contenido proteico y, por el otro, para realizar un análisis sensorial por parte del panel de cata interno del APLTA. La metodología utilizada en cada caso se detalla en el apartado 3.3.

### 3.1.2. Efecto de la agitación durante el proceso de hidrólisis

Para evaluar el efecto de la agitación en la formación del sedimento generado durante el proceso de hidrólisis, se llevó a cabo la hidrólisis de la clara de huevo pasteurizada a una temperatura de 55 °C un procesador de alimentos Thermomix TM5 (Vorwerk) en agitación y en reposo. Las muestras obtenidas se analizaron sensorialmente.

### 3.1.3. Selección del ácido

Para seleccionar el ácido más adecuado previo al inicio de la hidrólisis, se utilizaron varios ácidos de grado alimentario diferentes: ácido clorhídrico (PanReac AppliChem, Barcelona, España), ácido cítrico (Andesia Químicos Industriales, Bogotá, Colombia), ácido láctico (PanReac AppliChem) y ácido tartárico (Agrovin, Ciudad Real, España). La hidrólisis se llevó a cabo a 55 °C de temperatura, un pH de 7,5 y durante 120 minutos. La selección del ácido se realizó en base a los resultados obtenidos tras la evaluación sensorial de los hidrolizados realizada por el panel de cata interno del APLTA con cada uno de los ácidos utilizados. Con el objetivo de analizar si el incremento de pH observado durante la hidrólisis en los ensayos anteriores de selección de ácido se debía al propio proceso de hidrólisis o al poder estabilizante de la proteína presente en la clara de huevo, se prepararon dos muestras hidrolizadas igualmente a 55 °C: a una de las muestras se le adicionó la enzima y a la otra no. Se realizó el seguimiento de pH cada 30 minutos durante todo el tiempo de “hidrólisis” (120 minutos) en ambas muestras.

### 3.1.4. Selección del pH

Se realizó un estudio para evaluar posibles diferencias en las características tecnológicas del hidrolizado final (especialmente en cuanto a estabilidad térmica y propiedades organolépticas) al realizar la hidrólisis dentro de los valores en los que se encuentra el rango óptimo de actuación de la enzima. Para ello se prepararon dos hidrolizados de clara de huevo pasteurizada ajustando el pH de la hidrólisis a 7,0 y 7,5 respectivamente, utilizando ácido tartárico (Agrovin, Ciudad Real). Los hidrolizados obtenidos se caracterizaron a través de un estudio de coagulación en reómetro siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.4.

### **3.1.5. Selección de la dosis de enzima**

Para investigar la dosis de enzima más adecuada en el proceso de hidrólisis, se llevó a cabo la elaboración de dos hidrolizados empleando la enzima F750MDP (Biocatalysts) en una dosis enzimática de 1 o 2 g/L de clara de huevo pasteurizada, respectivamente. Los hidrolizados obtenidos se caracterizaron a través de un estudio de coagulación en reómetro siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.4. y a nivel sensorial a través del panel de cata interno del APLTA.

### **3.1.6. Efecto del tiempo de hidrólisis**

Con el fin de determinar el tiempo óptimo de incubación durante la hidrólisis, se elaboraron dos hidrolizados de clara de huevo pasteurizada estableciendo un tiempo de hidrólisis de 120 y 540 minutos, respectivamente. Una vez transcurrido el tiempo fijado de hidrólisis para cada una de las muestras, se procedió a realizar la inactivación enzimática en el propio procesador de alimentos Thermomix TM5 (Vorwerk) calentando los hidrolizados a 85 °C durante 3 minutos. Debido a la formación de agregados de gran tamaño durante el proceso de inactivación enzimática, parte del hidrolizado ya sometido al tratamiento térmico de inactivación enzimática se procesó a través de un homogeneizador APV Lab - 2000 (SPX Flow, Charlotte, Estados Unidos) en modo descendente (después del tratamiento térmico) en una sola etapa a 150 bares de presión (figura 14B) con el objetivo de romper esos agregados y obtener un hidrolizado con unas características adecuadas para su análisis instrumental. A las muestras finales obtenidas tras la homogeneización se les realizó un estudio de coagulación en el reómetro, análisis de tamaño de partícula y evaluación sensorial siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.



Figura 14. A) Thermomix TM5 (Vorwerk), B) Homogeneizador APV Lab - 2000 (SPX) (tomada de: <https://aplta.es/instalaciones/planta-piloto/salas-de-apoyo/>)

### 3.1.7. Selección de condiciones de inactivación de la enzima

Se probaron diferentes combinaciones de tiempo y temperatura para seleccionar las condiciones más adecuadas en el proceso de inactivación enzimática. Se utilizó para ello el procesador de alimentos Thermomix TM5 (Vorwerk), y las temperaturas de inactivación probadas fueron de: 70, 80, 90 y 95 °C durante 3 minutos. Dentro de este estudio, se evaluaron además las características de los hidrolizados obtenidos tras la inactivación enzimática a 80 °C durante 3 minutos pero incorporando una etapa de dilución, previa a la inactivación enzimática con un 0, 10, 20, 30, 40 y 50 % de dilución con agua osmotizada. Por último, los hidrolizados diluidos, se subdividieron para ser sometidos a una etapa de homogeneización en el equipo APV Lab - 2000 (SPX Flow). Una parte del hidrolizado se homogeneizó antes de la inactivación enzimática (modo ascendente) y la otra parte, después de la inactivación (modo descendente). A las muestras finales se les realizó un análisis del tamaño de partícula (metodología descrita en el apartado 3.3.2) y un análisis sensorial por el panel de cata interno del APLTA.

## 3.2. ESCALADO SEMIINDUSTRIAL DEL HIDROLIZADO DE CLARA DE HUEVO

Una vez definidos los parámetros óptimos en los ensayos de laboratorio, se procedió a llevar a cabo el escalado a nivel piloto del proceso de obtención del hidrolizado de clara de

huevo. Para este proceso de escalado se utilizó el equipamiento piloto disponible en las instalaciones del APLTA cuya descripción detallada se explica a continuación.

El precalentamiento de la clara de huevo se llevó a cabo en un intercambiador de calor de placas (Tetra Pak, Pully, Suiza) que consta de dos secciones de trabajo: calentamiento y enfriamiento. En este caso, únicamente se utilizó la sección de calentamiento ajustando el valor al parámetro establecido para el posterior proceso de hidrólisis. El caudal de trabajo fue de 1.000 L/h (figura 15A).



Figura 15. A) Intercambiador de calor de placas (Tetra Pak) (tomada de: <https://aplta.es/wp-content/uploads/2021/05/APLTA-Linea-de-pretratamientos-y-mezclas.pdf>) y B) Depósito para la hidrólisis (Pierre Guerin) (tomada de: <https://aplta.es/wp-content/uploads/2021/05/APLTA-Linea-de-productos-fermentados.pdf>)

Para el proceso de hidrólisis, se empleó un depósito de fermentación (lactofermentador) de 300 litros de capacidad (Pierre Guerin, Burgos, España). Se trata de un depósito ultralimpio con sistema de calentamiento por vapor, refrigeración con agua y agua helada, y agitación. Es posible presurizar con aire estéril y está totalmente automatizado para controlar la temperatura durante el proceso. Dispone además de agitación específica para el tratamiento de texturas delicadas (figura 15B). Para la etapa de inactivación enzimática y tratamiento térmico a escala

piloto se utilizaron dos tratamientos térmicos diferentes (pasteurización y temperatura ultra alta). Los equipos utilizados para estos tratamientos térmicos fueron:

- A. Pasteurizador (Perinox, Albacete, España) compuesto por un intercambiador de placas que consta de cinco secciones de trabajo diferenciadas: dos secciones de recuperación-calentamiento, dos secciones de mantenimiento intercambiables de longitud diferente en función del tiempo de tratamiento a aplicar, y sección de enfriamiento. El caudal de trabajo es variable entre los 500 y los 1.000 L/h (figura 16A). En el caso de necesitar una etapa de homogeneizado, se acopla el homogeneizador Ariete NS3011H (GEA, Parma, Italia) con doble etapa de homogeneización tanto en fase ascendente como descendente. El caudal de trabajo de este equipo es de 600 L/h y trabaja a una presión máxima de 500 bares (figura 16B).
- B. Equipo Tetra Therm Aseptic Pilot 300T (Tetra Pak) para tratamiento a temperaturas ultra altas (UHT) aunque, en este trabajo también se empleó para tratamientos térmicos de pasteurización, al ser un equipo tubular y no de placas (como el pasteurizador) hace que el producto se comporte de manera diferente a pesar de realizar el mismo tratamiento térmico de pasteurización. Este equipo tiene un caudal nominal de 300 L/h (con homogeneizador de 225 L/h). La configuración del equipo puede realizarse de diferentes modos (figura 16C):
  - Tratamiento indirecto: dos secciones de calentamiento y otras dos de enfriamiento (agua de red o agua helada) mediante intercambiador tubular liso, ajustables de manera independiente.
  - Tratamiento directo: una sección de calentamiento indirecto, una sección de inyección de vapor con cámara de expansión posterior y dos de secciones de enfriamiento (agua de red y agua helada) ajustables de manera independiente.

Para la etapa de homogeneizado, se acopló el homogeneizador piloto de dos etapas Tetra Alex S05 (Tetra Pak) en flujo ascendente o descendente. Se utilizó además una cabina de flujo laminar modelo 00-ADAPLAMINAR (TDI, Madrid, España) para recoger asépticamente las muestras en botellas esterilizadas de 0,25 o 0,5 litros.



Figura 16. A) Pasteurizador (Perinox), B) Homogeneizador Ariete NS3011H (GEA) (tomadas de: <https://aplta.es/wp-content/uploads/2021/05/APLTA-Linea-de-pretratamientos-y-mezclas.pdf>) y C) Equipo UHT Tetra Therm Aseptic Pilot 300T (Tetra Pak) (tomada de: <https://aplta.es/wp-content/uploads/2021/05/APLTA-Linea-de-productos-esteriles.pdf>) ubicados en el APLTA

Los parámetros evaluados en el hidrolizado de clara de huevo a escala piloto, así como el equipamiento empleado y las determinaciones analíticas realizadas en cada muestra se presentan en la tabla 6. La descripción de las determinaciones analíticas llevadas a cabo se detalla en el apartado 3.3.

En estos ensayos se comprobó el efecto de la homogeneización antes o después del tratamiento térmico (modo ascendente o descendente) con una misma presión de

homogeneización (150 + 50 bares) y un mismo tratamiento térmico de pasteurización (85 °C durante 10 segundos), a un pH neutro de 7,0 (muestra 1A y muestra 1D) y a un pH ácido de 4,2 (muestra 2A y muestra 2D) en un intercambiador tubular. Para comparar el efecto del tratamiento térmico, se llevó a cabo la preparación de un hidrolizado con las mismas condiciones que la muestra 1D a excepción del tratamiento térmico. En este caso, se realizó el tratamiento térmico a temperatura ultra alta (UHT): 140 °C durante 3 segundos (muestra 3D). Todos estos hidrolizados se diluyeron un 50 % con agua osmotizada.

Por último, en un intercambiador de placas, se probaron diferentes combinaciones de tiempo y temperatura (todas ellas de pasteurización), con homogeneización en modo ascendente y pH neutro de 7,0. Se evaluaron diferentes presiones de homogeneización (desde 150 a 500 bares) con el hidrolizado diluido un 50 % en agua osmotizada (muestras 4A - 11A).

**Tabla 6. Parámetros establecidos para el tratamiento térmico de los hidrolizados elaborados y determinaciones analíticas**

Equipamiento	Muestra	Dilución (%)	pH <sub>final</sub>	TT (°C)	H	Presión (bar)	Determinaciones analíticas
Intercambiador tubular  Pasteurización	Muestra 1A	50	7,0	85 (10s)	A	150+50	Seguimiento de pH Coagulación Tamaño de partícula Sensorial
	Muestra 1D	50	7,0	85 (10s)	D	150+50	
	Muestra 2A	50	4,2	85 (10s)	A	150+50	
	Muestra 2D	50	4,2	85 (10s)	D	150+50	
Intercambiador tubular  UHT	Muestra 3D	50	7,0	140 (3s)	D	150+50	Tamaño de partícula Sensorial Viscosidad
Intercambiador de placas  Pasteurización	Muestra 4A	50	7,0	85 (24s)	A	150	Tamaño de partícula Sensorial Viscosidad
	Muestra 5A	50	7,0	85 (24s)	A	250	
	Muestra 6A	50	7,0	85 (24s)	A	500	
	Muestra 7A	50	7,0	85 (24s)	A	150+100	
	Muestra 8A	50	7,0	85 (300s)	A	250	
	Muestra 9A	50	7,0	70 (300s)	A	150	
	Muestra 10A	50	7,0	70 (300s)	A	250	
	Muestra 11A	50	7,0	70 (300s)	A	150+100	

TT: tratamiento térmico; H: homogeneización; D: descendente; A: ascendente

De todos los hidrolizados de clara de huevo elaborados y, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se seleccionaron aquellos que presentaban *a priori* unas mejores características fisicoquímicas y sensoriales, y se sometieron a un estudio de vida útil. Las muestras seleccionadas para el seguimiento de vida útil se indican en la tabla 7. La metodología de estos análisis se describe en el apartado 3.3. El tiempo para el seguimiento de vida útil se estableció en 40 días a temperatura de refrigeración (4 – 6 °C) para las muestras pasteurizadas elaboradas en el intercambiador tubular (muestra 1A, muestra 1D y muestra 2D) y en intercambiador de placas (muestra 11A). En el caso de la muestra elaborada a temperatura ultra alta en el intercambiador tubular (muestra 3D), el tiempo de vida útil se estableció en 150 días con la muestra almacenada a temperatura ambiente.

**Tabla 7. Hidrolizados seleccionados para su caracterización fisicoquímica y microbiológica**

Equipamiento	Muestra	Dilución (%)	pH	TT (°C)	H	Presión (bar)	Determinaciones analíticas
Intercambiador tubular  Pasteurización	Muestra 1A	50	7,0	85 (10s)	A	150+50	Sensorial Viscosidad Estabilidad de fases Microbiología
	Muestra 1D	50	7,0	85 (10s)	D	150+50	
	Muestra 2D	50	4,2	85 (10s)	D	150+50	
Intercambiador tubular  UHT	Muestra 3D	50	7,0	140 (3s)	D	150+50	Sensorial Estabilidad de fases Microbiología
Intercambiador de placas  Pasteurización	Muestra 11A	50	7,0	70 (300s)	A	150+100	Sensorial Estabilidad de fases Microbiología

TT: tratamiento térmico; H: homogeneización; D: descendente; A: ascendente

Por último, se llevaron a cabo una serie de ensayos a partir de la muestra 1D (tabla 6) con el fin de evaluar el comportamiento del hidrolizado como ingrediente tras someterlo a un segundo tratamiento térmico. Todos los ensayos de este estudio se llevaron a cabo con homogeneización en modo descendente. En la tabla 8 se indica la muestra de hidrolizado seleccionada junto con los parámetros de trabajo empleados para el segundo tratamiento térmico. Concretamente se realizaron los siguientes ensayos: se evaluó el efecto de un tratamiento térmico de iguales características al que sufrió la muestra en el primer tratamiento

(muestra 1D - 2TNP); el efecto a un segundo tratamiento térmico a temperatura ultra alta (muestra 1D - 2TNA) y el efecto de un segundo tratamiento térmico de pasteurización idéntico al primero, pero con acidificación previa del hidrolizado a un pH de 4,2 (muestra 1D - 2TAP). A las muestras finales obtenidas se les realizó una evaluación sensorial por parte del panel de cata interno del APLTA y un análisis de tamaño de partícula siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.

**Tabla 8. Parámetros establecidos para el segundo tratamiento térmico de los hidrolizados de clara de huevo elaborados**

Equipamiento	Hidrolizado base	Muestra	pH <sub>final</sub>	TT (°C)	H	Presión (bar)	Determinaciones analíticas
Intercambiador tubular	Muestra 1D	Muestra 1D - 2TNP	7,0	85 (10s)	D	150+50	Evaluación sensorial Tamaño de partícula
	Muestra 1D	Muestra 1D - 2TNA	7,0	140 (3s)	D	150+50	
	Muestra 1D	Muestra 1D- 2TAP	4,2	85 (10s)	D	150+50	

TT: tratamiento térmico; H: homogeneización; D: descendente; A: ascendente

### 3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

En este apartado se describen las diferentes técnicas y determinaciones analíticas que se han utilizado en los diferentes estudios realizados con el hidrolizado de clara de huevo en esta Tesis Doctoral.

#### 3.3.1. Análisis del contenido en proteína

La determinación del contenido proteico de las diferentes muestras se realizó siguiendo el método Kjeldahl descrito en la norma UNE-EN ISO (Una Norma Española – Norma Europea y del inglés: *International Organization for Standardization*) 8968-1 (ISO, 2002). Para ello, la muestra se calentó en un baño de agua a una temperatura entre 38 y 40 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron al tubo de digestión (Foss, Hillerød, Dinamarca), dos pastillas del catalizador Kjeldahl de Cu (Panreac, Castellar del Vallés,

Barcelona), 2 – 3 g de muestra (agitando la muestra antes de pesar) y 13 mL de ácido sulfúrico (Scharlab, Sentmenat, España). Se agitó la mezcla y se dejó reposar durante 5 minutos.

A continuación, se colocaron los tubos con la muestra y los reactivos en la unidad de digestión Kjeldatherm (Gerhardt Analytical Systems, Königswinter, Alemania) y se cubrieron con la unidad de recogida de gases. Se ajustó la temperatura de la unidad de digestión a 420 °C y se dejó digerir hasta que la muestra quedó transparente. Cuando la muestra pasó a ser transparente, se dejó otros 15 minutos más. El tiempo de digestión total fue de entre 40 y 60 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de digestión, se sacaron los tubos de la unidad de digestión y se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos aproximadamente.

Seguidamente, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se añadieron 50 mL de ácido bórico (Scharlab) con unas gotas del indicador Kjeldahl (preparado con 2 g de rojo de metilo, 1 g de azul de metileno y 500 mL de etanol (Panreac). Se colocó en el soporte correspondiente de la unidad de destilación KjelFlex K-360 (Büchi Labortechnik, Essen, Alemania), comprobando que el tubo de salida del destilado burbujease dentro del ácido bórico. También se colocó el tubo que contenía la muestra en su soporte. Se dosificaron 40 mL de hidróxido sódico (Scharlab) y se dejó destilar hasta alcanzar un volumen de destilado de 150 mL. Una vez finalizada la destilación se procedió a realizar la valoración con ácido clorhídrico (HCl) (Scharlab) 0,1 N. El punto final de la valoración se alcanzó cuando la disolución se puso rosa fuerte. Se puede determinar también este punto potenciométricamente, a un pH entre 4,3 y 4,6.

En este procedimiento, es necesario llevar a cabo el análisis de un blanco, repitiendo todo el proceso pero añadiendo 2 mL de agua y 0,20 g de sacarosa en vez de muestra, que actúa como material orgánico para que se consuma el ácido sulfúrico durante la digestión (simulando el proceso de digestión de la muestra). El destilado no debe ser rosa y el volumen de HCl gastado no debe ser superior de 0,15 mL.

La eficacia del proceso de digestión y destilación se comprobó añadiendo 0,08 g de triptófano (Panreac), junto con 0,15 g de sacarosa, pesado en todos los casos con una aproximación de 0,1 mg en una balanza de precisión BL 224 (XS Instruments, Carpi, Italia). El contenido de nitrógeno en % (m/m) es de 13,72 % en el triptófano. La recuperación de nitrógeno para el triptófano debe estar entre el 98 y el 100 %. Por último, se preparó una disolución de sulfato de amonio (Panreac) de 0,05 mol/L de concentración, se pipetearon 10 mL

y se añadieron a un tubo de digestión junto con 50 mL de agua. Una vez obtenido el volumen gastado en la valoración se procedió a la realización de los siguientes cálculos:

$$\% N = \frac{1,40 \cdot (v_m - v_b) \cdot N}{P}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% N \cdot 6,38$$

Donde:

- $N$ : normalidad del HCl (0,1)
- $v_m$ : volumen en mL de ácido clorhídrico utilizado en la muestra
- $v_b$ : volumen en mL de ácido clorhídrico utilizado en el blanco
- $P$ : peso en gramos de la muestra utilizada en la determinación

El contenido en nitrógeno se expresa con 3 decimales y el de proteína con 2 decimales.

La diferencia entre los duplicados no debe ser mayor del 0,035 % en proteína y del 0,0055 % para el contenido en nitrógeno.

### 3.3.2. Análisis del tamaño de partícula

Para la determinación del tamaño de partícula de las muestras elaboradas se empleó un equipo Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) (figura 17) cuyo rango de medida se encuentra entre 0,02 y 2.000 micras. El método de análisis se fundamenta en la difracción de luz que se produce cuando un láser pasa a través de una suspensión de partículas. Es importante resaltar que la distribución del tamaño fundamental de las partículas obtenida por esta técnica está basada en volumen, quiere decir que los valores obtenidos en cada intervalo de tamaño corresponden con el volumen ocupado por las partículas de ese tamaño dividido entre el volumen total de partículas en la muestra.





Figura 17. Equipo Mastersizer 2000 (Malvern Instruments) (tomada de: <https://aplta.es/wp-content/uploads/2021/05/APLTA-Equipos-APF.pdf>)

Para la determinación, se introdujo la muestra a analizar en la unidad de dispersión (que contiene 100 mL de agua destilada) hasta que la obscuración del equipo fuese la adecuada. Este parámetro, el de obscuración, depende de las propiedades ópticas de la muestra que se esté analizando y es determinado directamente por el equipo. Se considera un nivel adecuado de obscuración entre un 5 y 15 % y, para ello, normalmente es suficiente con introducir entre 2 y 5 gotas de muestra en la unidad de dispersión. Una vez conseguida la obscuración correcta, se procedió a realizar la medida por triplicado a una temperatura de 23 °C aproximadamente.

El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante el software propio del equipo, Malvern Application 5.60 (Malvern Instruments) obteniéndose los siguientes parámetros:

- $D(4,3)$ : diámetro medio de la distribución en volumen
- $d(0,1)$ : tamaño en micras por debajo del cual queda el 10 % de la distribución (denominado también percentil 10)
- $d(0,5)$ : tamaño en micras por debajo del cual queda el 50 % de la distribución y también por encima (denominado también percentil 50 o más comúnmente “mediana”)
- $d(0,9)$ : tamaño en micras por debajo del cual queda el 90 % de la distribución (denominado también percentil 90)

### 3.3.3. Análisis de viscosidad

El análisis de viscosidad se realizó utilizando un reómetro de esfuerzo controlado AR – G2 (TA Instruments, New Castle, Estados Unidos) (figura 18), equipado con una geometría de platos paralelos de 60 mm de diámetro, que permite estudiar como varía la viscosidad del producto en un amplio rango de velocidades de cizalla y a una determinada temperatura (10 °C). Para el análisis, no es necesario realizar ninguna preparación previa de la muestra, simplemente se colocan aproximadamente 1,5 mL de muestra en el plato del equipo, se baja la geometría seleccionada y se retira el exceso de la muestra sobrante.



Figura 18. Reómetro AR - G2 (TA Instruments) (tomada de: <https://aplta.es/wp-content/uploads/2021/05/APLTA-Equipos-APF.pdf>)

Las curvas de flujo obtenidas se ajustan a un modelo matemático mediante el software TRIOS versión 3.1.4.3607 del propio reómetro (TA Instruments), que expresa con una ecuación la relación entre la viscosidad y la velocidad de cizalla para así obtener los distintos parámetros de viscosidad (figura 19):

- $\mu_0$ : viscosidad del producto en condiciones de reposo
- $\mu_{50}$ : se corresponde aproximadamente con la viscosidad que tiene el producto dentro de la boca
- $\mu_{90}$ : se corresponde aproximadamente con la viscosidad que tiene el producto cuando se traga

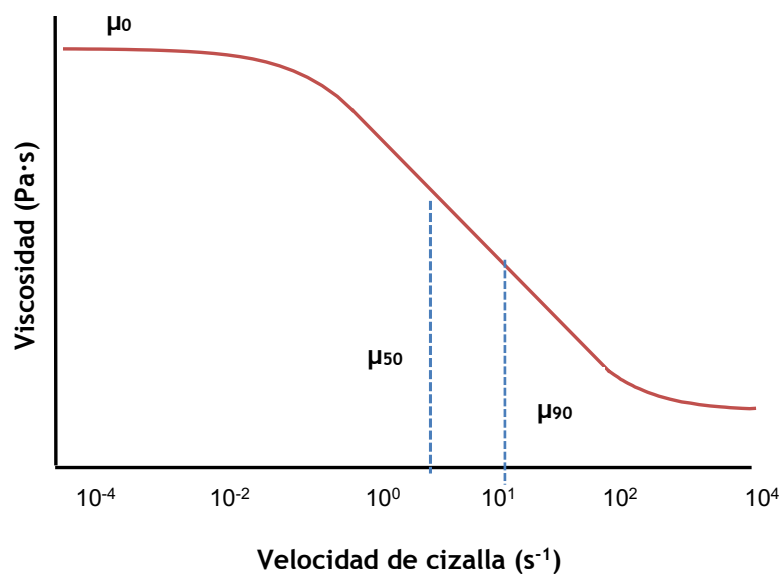


Figura 19. Ejemplo de una curva de flujo obtenida en un reómetro

### 3.3.4. Análisis de coagulación

Para llevar a cabo el estudio de coagulación en las diferentes muestras, se utilizó de nuevo el reómetro de esfuerzo controlado AR - G2 (TA Instruments) equipado con una geometría de platos paralelos de 60 mm de diámetro, que se taparon para minimizar la evaporación. En este tipo de análisis, se realiza una “rampa de temperatura” para calentar la muestra a una velocidad constante de 1 °C por minuto desde 35 °C hasta 85 °C, en condiciones de baja frecuencia (simulando el reposo de la muestra). Para realizar este análisis, tampoco es necesario llevar a cabo ninguna preparación previa de la muestra y se procede de igual modo que en el apartado anterior. El reómetro realiza un análisis continuo de los valores del módulo elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) durante la rampa de temperatura registrándose en el software del equipo. Se define como punto de coagulación de la muestra la temperatura a la cual se produce el cruce entre ambos módulos ( $G'$  y  $G''$ ). El valor de  $G'$  a la temperatura final da una idea aproximada de la fuerza de gel obtenida en cada muestra al finalizar el proceso.

Además, con este análisis se obtienen valores de la tangente de pérdidas ( $\tan \delta$ ), que aporta una clara indicación de si predominan las propiedades elásticas o viscosas. Si la tangente posee un valor menor de 1, las propiedades elásticas dominan sobre las viscosas (predomina el

carácter sólido-gel sobre el líquido y las partículas se encuentran altamente asociadas). Por el contrario, si el valor es superior a 1, las propiedades viscosas dominan sobre las elásticas (las partículas no se encuentran muy asociadas).

### 3.3.5. Análisis de estabilidad

Para llevar a cabo la medida de la estabilidad a lo largo del tiempo se empleó un equipo de medida de turbidez, Turbiscan Lab Expert (Formulacion, Toulouse, Francia). Se trata de un instrumento óptico que permite caracterizar dispersiones líquidas, suspensiones y/o emulsiones (batidos, zumos, leche, natas, yogures líquidos...) a lo largo de la vida útil, y en el que es posible determinar, además, si existen fenómenos de sedimentación, cremado, floculación y/o coalescencia.

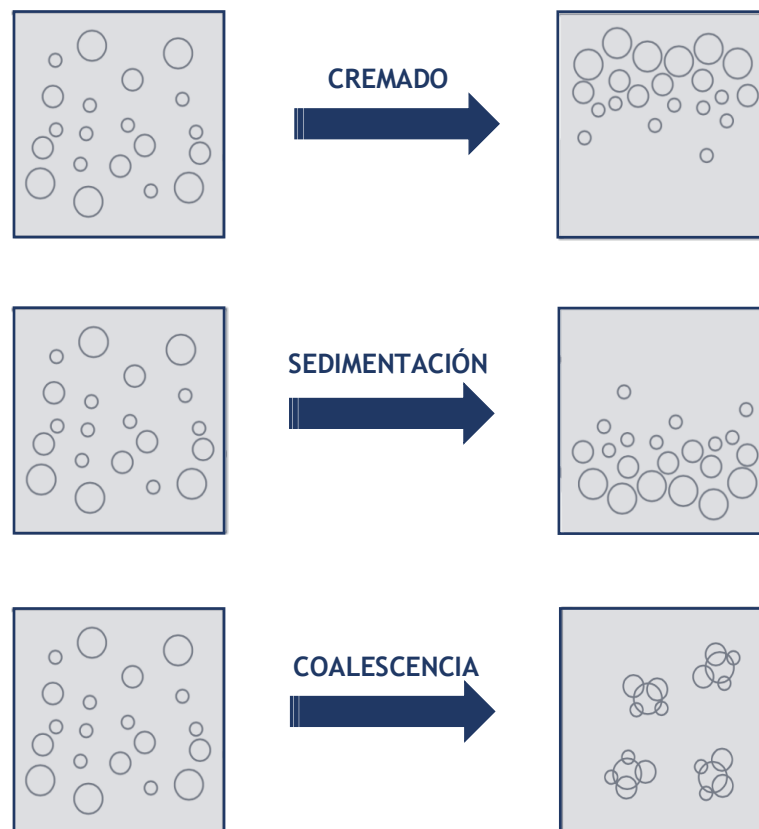


Figura 20. Tipos de desestabilización (modificada de: <https://iesmat.com/wp-content/uploads/action-bt/bcf4b17a2a368109183f9c375be9fa91/FOR-TUR%20Turbiscan%20IESMAT%20brochure.pdf>)

Las muestras elaboradas se introdujeron en los tubos de análisis, previamente esterilizados en autoclave (AUTOTESTER 6, JP Selecta, Barcelona, España), dentro de una cabina de flujo laminar modelo 00-ADAPLAMINAR (TDI) para que no se contaminasen y no perdieran su esterilidad (en el caso de tratarse de muestras estériles). El equipo basa sus medidas en la detección de luz dispersada de una fuente de infrarrojo cercano ( $\lambda = 880 \text{ nm}$ ), como aparece esquematizado en la figura 21. El modo de funcionamiento típico es la realización de barridos a diferentes tiempos. En cada barrido, la cabeza de detección (compuesta por la fuente de luz y dos detectores) escanea la muestra por completo cada  $40 \mu\text{m}$  (se realizan 1.125 tomas de puntos por cada scan) y se obtienen datos de luz reflejada y transmitida en función de la posición.

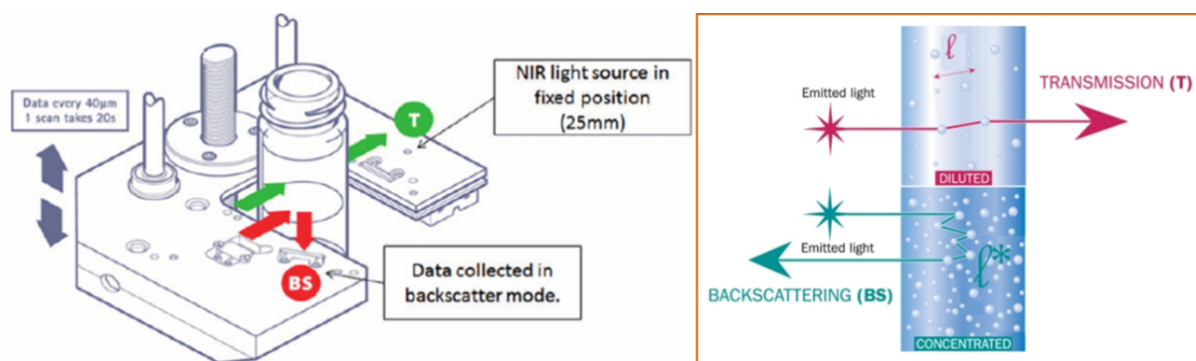


Figura 21. Esquema de funcionamiento de una medida en el Turbiscan (tomada de:

<https://www.formulation.com/en/applications-and-library/library#tags-thermal-analysis,%20food-beverages> - Sedimentation studies.pdf)

En la gráfica obtenida del análisis (figura 22) se representa en el Eje Y el nivel de *backscattering* (BS) de la muestra, y en el Eje X la posición (de izquierda a derecha se corresponde con la parte inferior y superior en la muestra). Si en la zona de la derecha el nivel de BS disminuye con el tiempo, ocurre lo que se conoce como fenómeno de clarificación superior; si la disminución del BS ocurre en la zona de la izquierda, ocurre el fenómeno de clarificación inferior. Cuanto más anchas y altas sean estas zonas, mayor será la clarificación e intensidad de este fenómeno. Debido a que este fenómeno de clarificación consiste en la migración de partículas de una zona de la muestra a otra, está ligada a otros dos fenómenos que dependerán de a qué zona se produzca esa migración. En la clarificación inferior, la migración de las partículas de la muestra se produce hacia la parte superior de la misma. Por lo tanto, en esta zona superior de la muestra (parte de la derecha de la gráfica) se produce un aumento de la señal de BS indicando que se está produciendo el fenómeno de cremado.

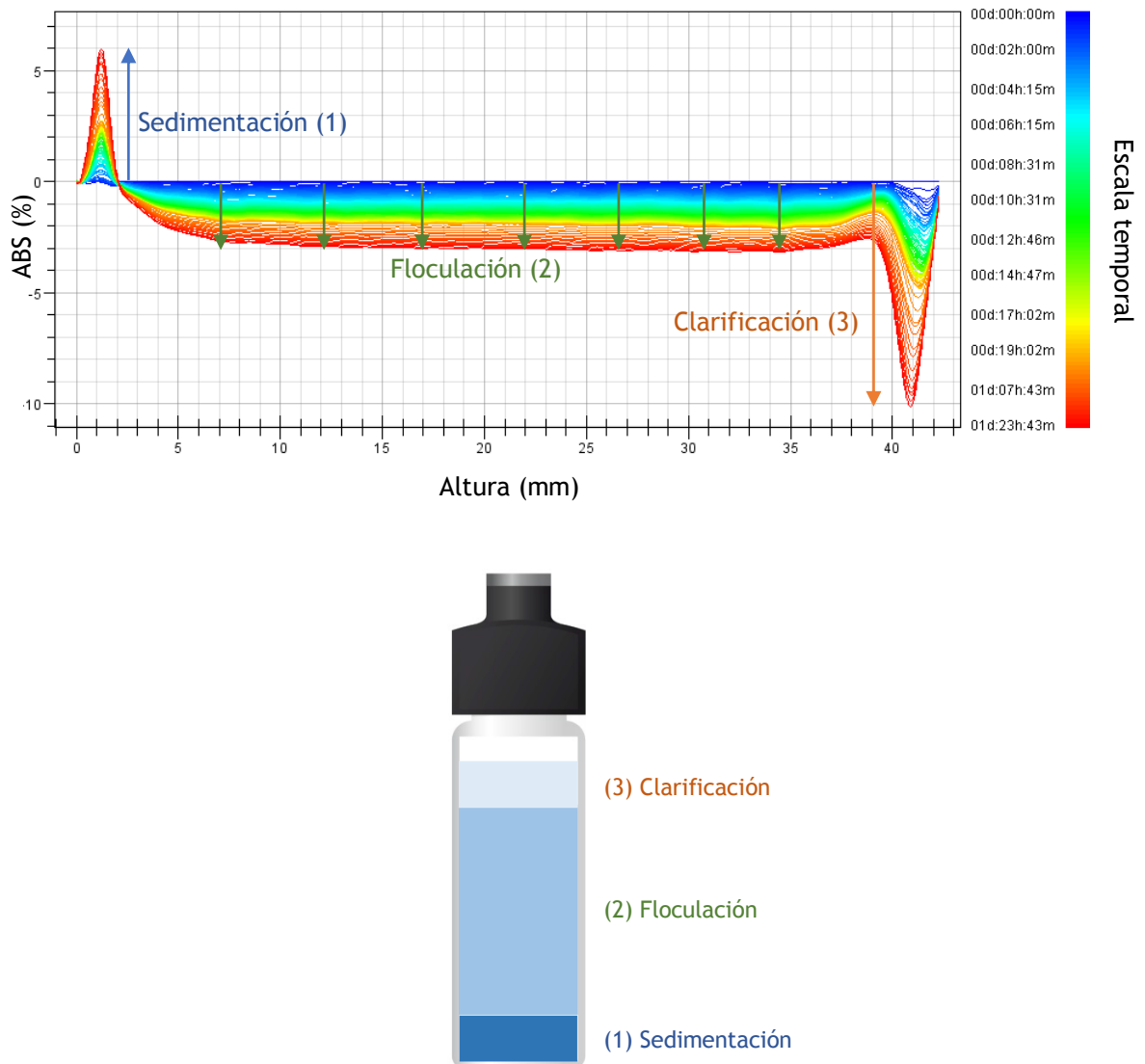


Figura 22. Ejemplo de los fenómenos de sedimentación, floculación y clarificación (modificada de: <https://www.formulation.com/en/applications-and-library/library#tags-thermal-analysis,%20food-beverages> - Sedimentation studies.pdf)

Por el contrario, si en la zona izquierda de la gráfica (zona inferior de la muestra) se produce un aumento de BS, ocurre lo que se conoce como fenómeno de sedimentación, debido a la migración de parte de las partículas presentes en la muestra desde la parte superior (clarificación superior) hacia la inferior. Por último, si en la zona del medio de la gráfica se produce tanto un aumento como una disminución de BS, es que se están dando procesos de agregación que

implican una variación del tamaño de partícula, y se conocen como fenómenos de coalescencia y/o floculación.

En la figura 23 se presenta un ejemplo de una muestra estable a lo largo del tiempo en la que no se observa ninguno de los fenómenos descritos anteriormente.

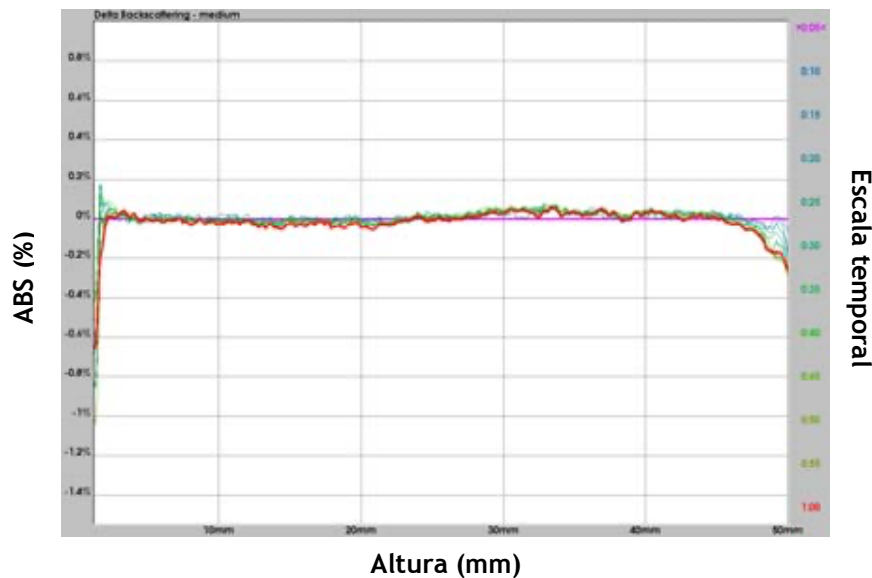


Figura 23. Ejemplo de una muestra estable a lo largo del tiempo (tomada de: <https://www.formulation.com/en/applications-and-library/library#tags-thermal-analysis,%20food-beverages>)

### 3.3.6. Análisis microbiológico

Para llevar a cabo el estudio de la vida útil desde el punto de vista microbiológico, se llevó a cabo la determinación de los siguientes microorganismos: mohos y levaduras, aerobios mesófilos, *Salmonella* spp, Enterobacterias y *Listeria monocytogenes* de acuerdo con la legislación vigente.

#### 3.3.6.1. Determinación de mohos y levaduras

La determinación de mohos y levaduras en las diferentes muestras se realizó siguiendo el método de recuento en placa indicado en la norma ISO 6611 (ISO, 2004). En primer lugar se preparó el medio base Cloranfenicol Glucosado Agar (CGA), (Scharlab) según las

especificaciones indicadas por el fabricante. Con el medio base listo para usar, se fundió el agar (CGA) durante el mínimo tiempo necesario para conseguir una total licuefacción y se mantuvo a 44 – 47 °C. A continuación, se transfirieron 0,1 mL de muestra a analizar y sus diluciones seriadas (normalmente entre 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>) a las placas estériles. Después se añadieron 10 – 15 mL del medio completo a las placas, se homogeneizó por agitación y se dejó solidificar en una superficie fría, dejándolo incubar a 25 °C durante 5 días sin invertir las placas. Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las unidades formadoras de colonias (ufc) de las levaduras y los micelios de los mohos (contando únicamente aquellas placas que contenían menos de 150 ufc o micelios). El número de colonias contadas multiplicado por el factor de dilución de la placa da como resultado el número de ufc por gramo de muestra (ufc/g).

El número de microorganismos por gramo o mililitro de producto (N), se calculó siguiendo la ecuación:

$$N = \sum \frac{c}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2)} \cdot d$$

Donde:

- c: suma de colonias contadas en todas las placas retenidas
- n<sub>1</sub>: número de placas retenidas en la primera dilución
- n<sub>2</sub>: número de placas retenidas en la segunda dilución
- d: factor de dilución correspondiente a la primera dilución

Se usaron “n” correlativos teniendo en cuenta todas las diluciones efectuadas. Se redondearon los resultados a dos cifras significativas de 1,0 a 9,9 multiplicado por 10<sup>x</sup> en donde “x” corresponde con la dilución correspondiente. Cuando el número a redondear era 5, si el número anterior era par, se redondeó a ese número; si era impar, se redondeó al siguiente. Por ejemplo, 28.500 se redondearía a 28.000 y 11.500 se redondearía a 12.000.

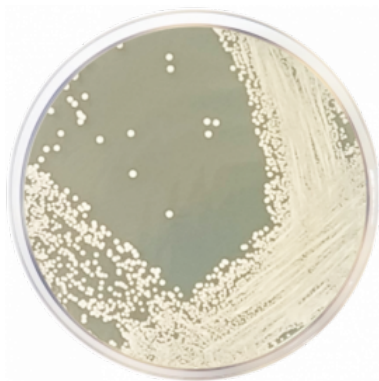


Figura 24. Medio de cultivo Cloranfenicol Glucosado Agar (CGA) para la determinación de mohos y levaduras - (Condalab, Madrid, España) (tomada de: <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/140-14508-agar-glucosa-cloranfenicol.html>)

### 3.3.6.2. Recuento total de aerobios mesófilos

Para realizar el recuento total de aerobios mesófilos se siguió el método de recuento en placa indicado en la norma UNE-EN ISO 4833-1 (ISO, 2014). Para ello, se preparó la cantidad de Plate Count Agar (PCA) (Scharlab) deseada según las especificaciones del fabricante. A continuación, se sembró 1 mL de la dilución deseada (normalmente entre  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) en la placa, y se añadieron unos 10 mL del agar a temperatura de unos 45 °C mezclando cuidadosamente. Una vez coagulado el medio, se incubaron las placas en posición invertida a 30 °C durante 72 h.



Figura 25. Medio de cultivo Plate Count Agar (PCA) para el recuento total de aerobios mesófilos (Scharlab) (tomada de: <https://www.scharlab.com/productos-producto-catalogo-productos-detalle-referencia.php?r=01-161-500&dw=>)

### 3.3.6.3. Determinación de *Salmonella* spp.

La determinación de *Salmonella* spp. se realizó siguiendo el método de enriquecimiento en medio específico y siembra en medio cromogénico. En primer lugar, se introdujeron asépticamente 25 g de la muestra a analizar en 225 mL de medio Salmonella Enrichment (Bioser, Barcelona, España), y se homogeneizó todo en un Masticator Basic 400 mL (IUL, Barcelona, España). Por otro lado, se añadió una pastilla de IRIS Salmonella Supplement (Bioser), y se dejó incubar a  $41,5 \pm 1,0$  °C durante  $18 \pm 2$  horas. Por último, se inocularon 10 µl de este medio de enriquecimiento obtenido en IRIS Salmonella Agar (Bioser) y se incubó a  $37 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 3$  horas. Se consideró un resultado positivo en caso de crecimiento de colonias color rosa magenta.

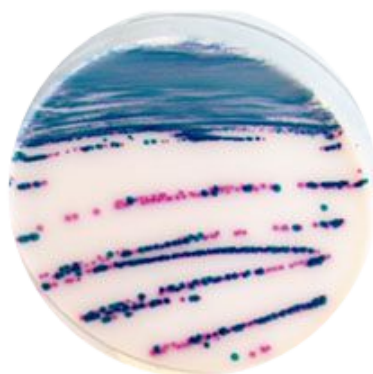


Figura 26. Medio de cultivo IRIS Salmonella Agar para la determinación de *Salmonella* spp. (Bioser) (tomada de: <https://www.bioser.com/productos/confirm-salmonella-481p/>)

### 3.3.6.4. Determinación de Enterobacterias

Para la determinación de Enterobacterias se siguió el método de recuento en placa siguiendo la norma UNE-EN ISO 21528-1 (ISO, 2018a). Por un lado, se preparó la cantidad de agar Violet Red Bile Glucose (VRBG) (Bioser) deseado y se llevó a ebullición. Por otro lado, se pesaron 10 g de muestra y se diluyeron en 90 mL de agua de peptona tamponada para, seguidamente, homogeneizar la mezcla. A continuación, se sembró 1 mL de la dilución (normalmente entre  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) deseada en la placa (por duplicado) y se añadieron unos 15 mL del agar atemperado a unos 45 °C, mezclando cuidadosamente en todas direcciones. Una vez que el medio se solidificó, se añadieron otros 10 mL más de medio atemperado para hacer una sobrecapa y se incubaron las placas en posición invertida a 37 °C durante 24 h. Para la lectura

se escogieron aquellas placas que tenían menos de 150 colonias de color rojo-púrpura. El número de microorganismos por gramo o mililitro de producto (N), se calculó siguiendo la misma ecuación del apartado 3.3.6.2.



Figura 27. Medio de cultivo Violet Red Bile Glucose (VRBG) para la determinación de Enterobacterias (Bioser) (tomada de: <https://www.bioser.com/productos/vrbg-agar-violet-red-bile-glucose-agar-46p/>)

#### 3.3.6.5. Determinación de *Listeria monocytogenes*

La determinación de *Listeria monocytogenes* en las muestras seleccionadas se realizó siguiendo el método cromogénico descrito en la norma UNE-EN ISO 11290-1 (ISO, 2018b) y que consta de los siguientes pasos:

*a. Enriquecimiento selectivo primario:*

- Se pesaron 25 g de muestra y se añadieron 225 mL de caldo Fraser ½ (Bioser).
- Se incubó a  $30 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 2$  horas.

*b. Enriquecimiento selectivo secundario:*

- Al finalizar la incubación, se inoculó 0,1 mL de caldo Fraser ½ (Bioser) al final de la incubación en 10 mL de caldo Fraser 1 (Bioser).
- Se incubó a  $37 \pm 1$  °C durante  $48 \pm 2$  horas.

c. *Aislamiento e incubación:*

- Con un asa de inocular estéril, se sembró caldo de enriquecimiento al final de la incubación y se aisló en la superficie del Agar Listeria según Ottaviani y Agosti (A.L.) (Bioser).
- Se incubaron las placas del revés a  $37 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 3$  horas y, en caso necesario, durante  $24 \pm 3$  horas más.

Se consideró un resultado positivo si crecían colonias de color verde azulado con halo opaco (colonias típicas). En este caso, era necesaria además una prueba de confirmación mediante un test rápido API Listeria (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia).

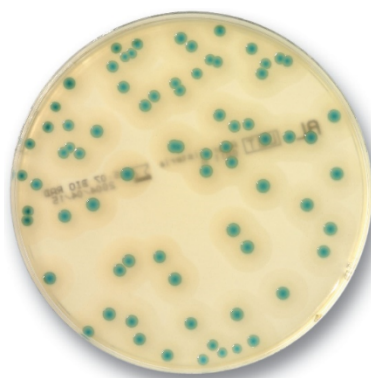


Figura 28. Medio de cultivo Agar Listeria según Ottaviani y Agosti (A.L.) para la determinación de *Listeria monocytogenes* (Bioser) (tomado de: <https://www.bioser.com/productos/a-l-agar-listeria-segn-ottaviani-y-agosti-1734p/>)

### 3.3.7. Análisis sensorial

En esta Tesis Doctoral se realizaron también una serie de análisis sensoriales básicos con el objetivo de ir seleccionando los hidrolizados o muestras más prometedoras en cada ensayo realizado. Aunque estos análisis no se realizaron siguiendo ningún método o protocolo oficial, si se estandarizó el protocolo a seguir y se realizaron teniendo en cuenta esas normas oficiales, y es por ello que se llevaron a cabo en la sala de cata informatizada del APLTA (figura 29), que está homologada para realizar este tipo de análisis y diseñada de acuerdo con la norma en vigor UNE-EN ISO 8589:2010 (ISO, 2010) para salas de cata, donde se dispone de los recursos necesarios para la preparación y evaluación sensorial de las diferentes muestras, y que está dotada de:

- Diez cabinas dispuestas en dos filas entre las que se sitúa un pasillo para distribuir las muestras.
- Sistema de iluminación led que ofrece una gama de condiciones muy amplia al permitir establecer 18 modos de color, con 10 intensidades y brillos diferentes.
- Programa informático FIZZ Network (Biosystemes, Couternon, Francia) para registro y tratamiento de datos.
- Local de preparación de muestras: situado en un lugar independiente de la sala de cata, y que se utiliza para realizar todas las operaciones previas de preparación (codificación, planificación del orden de presentación, colocación de las muestras en su medio de presentación - copas de cristal, platos, placas Petri, etc.).
- Cocina totalmente equipada para poder reproducir preparaciones culinarias en condiciones controladas.

La evaluación sensorial de las muestras se llevó a cabo por el panel de cata interno del APLTA, y en todos los casos los análisis fueron evaluados por entre 10 - 12 personas. Se evaluaron principalmente aspectos organolépticos básicos (apariencia, color, olor, textura y sabor) para hacer una primera clasificación discriminatoria de los productos obtenidos, y se descartaron aquellos que presentaban sabores, olores y/o texturas desagradables.



Figura 29. Sala de cata - APLTA (tomada de: <https://aplta.es/instalaciones/laboratorios/>)

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En el presente apartado se muestran los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral y la discusión de los mismos. En primer lugar, se exponen los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo a escala de laboratorio con el objetivo de diseñar el proceso de elaboración del hidrolizado de clara de huevo (tomando como protocolo de referencia el de la patente) para su posterior escalado semiindustrial y que hacen referencia a los objetivos específicos 1 y 2. A continuación, se exponen y discuten los resultados correspondientes a los objetivos específicos 3 y 4 obtenidos tras llevar a cabo el escalado piloto del hidrolizado de clara de huevo, así como el análisis del impacto de un segundo tratamiento térmico sobre el hidrolizado ya elaborado. Al finalizar este bloque se incluye un apartado de conclusiones e investigaciones y perspectivas futuras.

### **4.1. ENSAYOS DE LABORATORIO PREVIOS AL ESCALADO SEMIINDUSTRIAL PARA LA OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO DE CLARA DE HUEVO**

Tras la lectura y revisión detallada de la patente de referencia, se determinó que era necesario un rediseño del proceso de elaboración del hidrolizado para que fuera viable su elaboración industrial. Por ello, y tras este análisis inicial se decidió realizar una serie de ensayos previos en el laboratorio para rediseñar y optimizar el proceso de elaboración del hidrolizado de clara de huevo. Esto nos permitió afinar los parámetros de elaboración con el objetivo de evitar problemas posteriores en el escalado semiindustrial. A continuación, se discuten los resultados obtenidos a escala de laboratorio con el fin de definir los parámetros óptimos para el posterior escalado semiindustrial del hidrolizado de clara de huevo.

#### 4.1.1. Selección de la temperatura de precalentamiento e hidrólisis

El primer punto crítico detectado en el proceso de elaboración fue la ausencia de una primera etapa de “precalentamiento” de la clara de huevo pasteurizada que después se va a hidrolizar. A nivel semiindustrial e industrial, debido a los volúmenes que se manejan, es necesario tratar o precalentar inicialmente la clara de huevo a través de un procesador térmico para ajustar la temperatura a la definida para el proceso de hidrólisis. A escala de laboratorio, este paso no es estrictamente necesario ya que, al emplear o trabajar con cantidades mucho más pequeñas (0,5 – 1 litro), se puede calentar relativamente rápido en un procesador de alimentos convencional.

En los ensayos realizados, se precalentó e hidrolizó la clara de huevo a 50 y 55 °C. Se escogieron estas dos temperaturas, una porque era la indicada en la patente de referencia, 50 °C y, la otra porque era la indicada como óptima para la enzima utilizada según indicaciones del fabricante, 55 °C (figura 30).

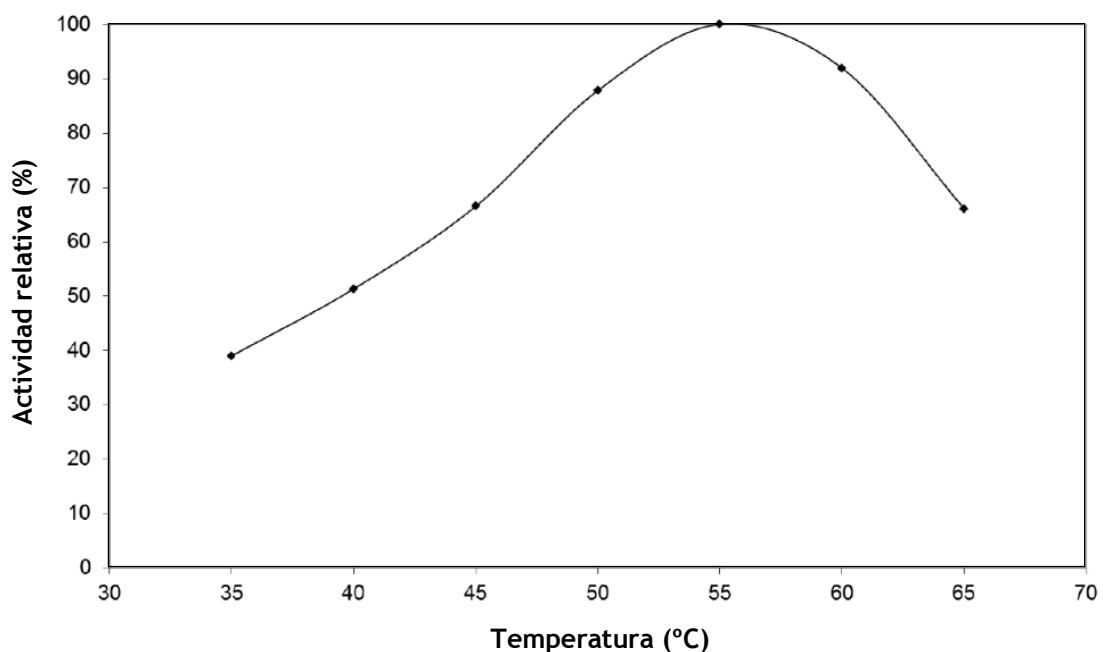


Figura 30. Curva de actividad en función de la temperatura para la enzima F750MDP (tomada de:

<https://www.biocatalysts.com/enzyme-products/?product=587>)

Se observó que cuanto mayor era la temperatura de precalentamiento y de hidrólisis, mayor era la cantidad de sedimento presente en el hidrolizado final (figura 31).



Figura 31. Filtrado obtenido de la hidrólisis a 50 °C (izq.) y a 55 °C (drcha.)

Se sabe que las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias tienen un gran impacto en la calidad y los atributos organolépticos de los alimentos y que, además, están relacionadas con sus características estructurales. Las características estructurales de las proteínas alimentarias pueden sufrir modificaciones transitorias o permanentes durante el procesamiento provocadas por el estrés mecánico, químico y/o térmico. Por lo tanto, los procesos destinados a lograr una modificación estructural determinada (y, por lo tanto, una propiedad particular), deben afinarse teniendo en cuenta los aspectos cinéticos y termodinámicos. En este contexto, también debe tenerse en cuenta la composición de los alimentos, ya que las propiedades fisicoquímicas de los mismos (concentración, pH, presencia de cosolutos, etc.) afectan a la estabilidad termodinámica y/o cinética incluso de sistemas tan simples como una sola proteína en solución (Barbiroli et al., 2017). Se decidió por ello llevar a cabo la determinación del contenido proteico en cada una de las muestras obtenidas en este ensayo. En la tabla 9 se muestran los resultados del análisis de proteína obtenidos en la clara de huevo inicial, en los hidrolizados finales y en el residuo originado en cada uno de ellos.

**Tabla 9. Resultados del análisis de proteína del sedimento originado durante la hidrólisis de clara de huevo a 50 y 55 °C respectivamente**

Muestra	Proteína % (m/m)
Clara de huevo inicial	11,02
Hidrolizado - 50 °C	10,93
Hidrolizado - 55 °C	10,98
Sedimento obtenido de la hidrólisis a 50 °C	16,74
Sedimento obtenido de la hidrólisis a 55 °C	17,14

Como se puede observar en la tabla 9, el contenido en proteína de la clara de huevo inicial y el de los dos hidrolizados preparados, fue muy similar. En cuanto al análisis de proteína de los sedimentos obtenidos tras el filtrado de cada uno de los hidrolizados, independientemente de la cantidad originada en cada uno de ellos (mayor en el hidrolizado obtenido a mayor temperatura de hidrólisis), el contenido también fue similar y en ambos casos se obtuvieron valores altos en cuanto a porcentaje de proteína. Por todo ello, se pensó que el origen del sedimento observado se debía a una desestabilización parcial de las proteínas presentes en la clara de huevo durante el proceso de hidrólisis debido a la temperatura y al pH establecidos; de manera que se esperaría a más temperatura, mayor cantidad de proteína coagulada y sedimento en el producto final. En nuestro caso, al haber tan poca diferencia entre las temperaturas ensayadas no se observaron grandes diferencias respecto a la cantidad de proteína encontrada en el sedimento a pesar de que, a nivel visual, sí se aprecia una clara diferencia en cuanto a cantidad de residuo generado tras la hidrólisis. Este hecho pudiera estar relacionado con la diferente desestabilización de las proteínas y diferente capacidad de formación de espuma. Como se ha descrito en el apartado de Introducción, la ovoalbúmina y la ovotransferrina son las proteínas mayoritarias en la clara de huevo, presentes en un 54 y un 12 % respectivamente. Sus puntos isoeléctricos y temperaturas de desnaturalización son 4,5 y 84 °C en el caso de la ovoalbúmina y 6,1 y 61 °C para la ovotransferrina (Guérin-Dubiard et al., 2005; Li-Chan et al., 1995). Teniendo en cuenta esta información, se podría sugerir que el sedimento generado se debe a un porcentaje de ovotransferrina desestabilizada que se produce por los parámetros de temperatura y pH fijados para la hidrólisis de la clara de huevo. Esta desestabilización de la

ovotransferrina, más próximo a su temperatura de desnaturalización en el caso del ensayo realizado a 55°C, puede que haya generado péptidos con mayor capacidad de formar espumas que, añadido al ligero aumento del contenido en proteínas, se perciba de forma visual como una mayor cantidad de sedimento generado.

A nivel sensorial, no se detectaron diferencias entre los hidrolizados elaborados a diferentes temperaturas de precalentamiento e hidrólisis, 50 y 55 °C, respectivamente. Es decir, las temperaturas estudiadas no parecen afectar a las propiedades organolépticas del hidrolizado final.

#### **4.1.2. Efecto de la agitación durante el proceso de hidrólisis**

A partir de los resultados obtenidos acerca del efecto de la temperatura de precalentamiento e hidrólisis, se decidió investigar el impacto que podía tener el realizar la hidrólisis en reposo o en agitación. Para ello se eligió llevar cabo la hidrólisis a una temperatura de 55 °C, es decir, la temperatura óptima de actuación de la enzima, y también la temperatura a la que probablemente se produzca mayor desestabilización proteica por estar más próxima a la temperatura de desestabilización de la ovotansferrina (61 °C).

Como se puede observar en la figura 32, en este caso también se apreció una clara diferencia en la cantidad de sedimento observado al realizar la hidrólisis con agitación (muestra A) o en reposo (muestra R). La cantidad de sedimento fue menor al realizar la hidrólisis en reposo, consiguiendo de esta forma disminuir las pérdidas de producto y, aunque pequeñas, probablemente también pérdidas de proteína durante el proceso de hidrólisis. En este caso no podemos descartar algo similar a lo ocurrido con la diferencia de temperatura. Se sabe que cuanto mayor es la agitación, mayor es la capacidad espumante de un producto, y es posible que esa mayor cantidad de sedimento observado a nivel visual pueda ser debida de la misma forma que en el apartado anterior, a una mayor capacidad de formación de espuma en el caso del hidrolizado producido en agitación.

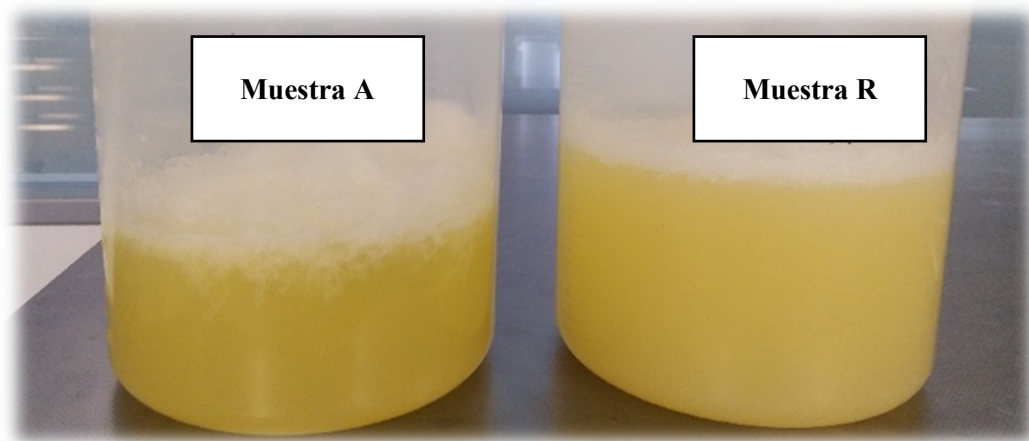


Figura 32. Hidrólisis de la clara de huevo a 55 °C con agitación - muestra A (izq.) y en reposo - muestra R (drcha.)

Como la cantidad de sedimento observado a 55 °C y en reposo era muy pequeña, se seleccionaron estos parámetros de trabajo para la elaboración del hidrolizado; manteniendo de esta forma la temperatura óptima de actuación de la enzima durante el proceso de hidrólisis, a la vez que se consigue reducir la cantidad de residuo o sedimento generado realizando el proceso de hidrólisis en reposo.

#### 4.1.3. Selección del ácido

En la patente de referencia utilizada para el diseño del protocolo de elaboración del hidrolizado, viene especificado la utilización de un ácido de grado alimentario para el proceso de acidificación y ajuste de pH para la preparación. Como ya se ha comentado en la Introducción, la hidrólisis va a depender en gran medida de las condiciones en las que se encuentre la enzima y su relación con el sustrato. En este caso, el sustrato que se utilizó fue clara de huevo que de manera natural posee un pH básico en torno a 9 (Asociación Española de Industrias de Ovoproductos, INOVO, 2011), y por lo tanto, se requiere de un proceso de acidificación para disminuir el pH del sustrato hasta conseguir el pH óptimo de actuación de la enzima que se utilizará en el proceso de hidrólisis. Según el proceso descrito en la patente con número de solicitud 201331886, la clara de huevo debe acidificarse hasta un pH de 5,5 empleando un ácido de grado alimentario. En concreto, el tipo de ácido empleado en la patente

(ácido clorhídrico al 37 %), es un ácido de uso poco habitual en la industria alimentaria, y aunque existe este ácido de grado alimentario, se consideró conveniente sustituirlo por otro de uso más generalizado a nivel industrial. En la industria alimentaria se suelen emplear ácidos orgánicos débiles como el ácido acético, láctico, benzoico, sórbico y cítrico (Palop & Martínez, 2006; Brul & Coote, 1999; Lambert & Stratford, 1999; Stratford & Anslow, 1998). La selección de uno u otro se basa en el coste, eficacia en la inhibición del desarrollo microbiano o sabor que aporta, entre otros factores (Palop & Martínez, 2006).

El acidulante más utilizado por la industria alimentaria es el ácido cítrico (E330) (Dziezak, 1990; Andrés, 1985). Debido a su gran versatilidad, por no ser ópticamente activo (Arnold, 1975), se puede utilizar para prácticamente cualquier aplicación (bebidas, productos lácteos, condimentos, salsas, caramelos, etc.) (Dziezak, 1990; Gardner, 1972; Kosobe, 1967). En la mayoría de las bebidas, es la primera opción como acidulante. El principal motivo es su acidez específica, entre relativamente suave y ligeramente punzante, y el efecto refrescante en la mayoría de los sabores a fruta (Brenntag Food & Nutrition, 2021).

Otro de los ácidos orgánicos más utilizados por la industria de la alimentación es el ácido láctico (E270) (Gardner, 1972). Está presente de forma natural en muchos alimentos fermentados y se produce comercialmente mediante fermentación microbiana de carbohidratos a partir de leche (lactosa), almidones, glucosa (azúcar de la uva) y sacarosa (azúcar de caña) (Brenntag Food & Nutrition, 2021). Otra forma de obtención sería por síntesis en laboratorio a partir de etanol y cianuro de sodio. De utilizarse ácido láctico obtenido por fermentación de la lactosa presente en la leche, podría contener trazas de proteína de la leche, y debería informarse en el etiquetado, ya que su presencia puede ocasionar problemas de salud en determinados grupos de población. La intolerancia a la lactosa es una patología común en muchas partes del mundo y se estima que aproximadamente el 70 % de la población mundial se ve afectada por la deficiencia de la enzima lactasa ( $\beta$ -galactosidasa) (Brown-Esters et al., 2012) necesaria para romper el disacárido lactosa en sus dos componentes glucosa y galactosa (Vénica et al., 2011; Vente-Spreuwenberg et al., 2003). Cuando se tiene una disminución o ausencia de lactasa, la lactosa no digerida en el intestino delgado pasa al intestino grueso y allí es fermentada por las bacterias de la flora intestinal produciendo desórdenes intestinales, problema que se denomina intolerancia a la lactosa. Los individuos con este problema sufren de molestos síntomas, tales como diarreas, distensión abdominal, náuseas, flatulencias, pérdida de apetito, cólicos

intestinales, etc. (Vénica et al., 2011). Esta intolerancia a la lactosa, sin embargo, no debe confundirse con la alergia a la proteína de la leche de vaca. La alergia a las proteínas lácteas es una reacción hacia las proteínas (principalmente hacia la  $\beta$ -lactoglobulina, la caseína, la  $\alpha$ -lactoalbúmina y la seroalbúmina) provocada por el sistema inmune; a diferencia de la intolerancia a la lactosa que es un problema causado por el sistema digestivo como ya ha sido mencionado (Vénica et al., 2011; Castañón, 2005). En la industria alimentaria el ácido láctico se utiliza para productos de confitería, como componente de encurtidos y refrescos, en la industria de la panificación y productos lácteos entre otros (Andrés, 1985). Una de sus principales características es que presenta un sabor ácido suave en contraste con el sabor picante de otros ácidos (Holten et al., 1971) lo cual supone una ventaja a la hora de no enmascarar o dominar a otros sabores aromáticos débiles.

Por último, el ácido tartárico (E334) es un ácido orgánico que está presente de forma natural en muchas frutas y que se produce comercialmente como precipitado natural del vino (Brenntag Food & Nutrition, 2021). Presenta un fuerte sabor ácido y la capacidad de incrementar los sabores de frutas en los que se encuentra como un componente natural. Se utiliza de forma habitual en bebidas aromatizadas de uva y lima como acidulante y potenciador del sabor. También es capaz de actuar sinérgicamente con antioxidantes para prevenir la rancidez y decoloración del queso (Gardner, 1972). Además, presenta un buen poder secuestrante y estabiliza colores y vitaminas, y es por ello por lo que también se utiliza con frecuencia en la industria de la panificación y en productos de confitería, frutas, verduras, productos gelificados, helados y grasas (Andrés, 1985).

Concretamente, en la industria de las bebidas, otros de los ácidos más empleados son el ácido málico (cuando se necesita un potenciador de sabor fuerte y generalmente en combinación con el ácido cítrico) y el ácido fosfórico (en bebidas de tipo “cola” para aportar un perfil de sabor específico y un fuerte efecto sobre el pH). En bebidas alcohólicas, generalmente en las afrutadas y refrescantes, y en las bebidas con bajo contenido en alcohol, se suele utilizar el ácido málico (Brenntag Food & Nutrition, 2021). En confitería, el ácido málico y el ácido fumárico proporcionan una acidez más persistente que otros ácidos alimentarios con la misma concentración. El ácido málico potencia los sabores afrutados y multiplica el impacto de los edulcorantes de alta intensidad (Brenntag Food & Nutrition, 2021).

En alimentos salados, los acidulantes desempeñan por lo general una función reguladora del tiempo de conservación (pescado en escabeche, carne procesada), y pueden mejorar la eficiencia de procesado, así como ayudar a estabilizar la calidad de la carne fermentada y en quesos. Las combinaciones de acidulantes se utilizan mucho en las mezclas de especias que se espolvorean sobre aperitivos y en una variedad de carnes, pescados y mariscos procesados. El ácido succínico se utiliza como típico potenciador del sabor umami y, a bajas concentraciones, proporciona el impacto de sabor necesario (Brenntag Food & Nutrition, 2021).

Teniendo en cuenta esta información, se decidió realizar una serie de ensayos para evaluar otros posibles acidulantes, más frecuentes en la industria alimentaria, para realizar el ajuste de pH previo al proceso de hidrólisis. Estos ensayos se realizaron ajustando el valor de pH al óptimo para la actuación de la enzima (7,5) en lugar del indicado en la patente (5,5). De esta forma, se trabajaría en las condiciones óptimas de la enzima, y podría suponer un ahorro económico en la cantidad de acidulante empleado para la elaboración del hidrolizado y, se minimizaría presencia de sedimentos procedentes de la desestabilización proteica de la ovoalbúmina y especialmente de la ovotransferrina al realizar el proceso de hidrólisis más alejados de su punto isoelectrico como se comentó anteriormente en el apartado 4.1.1. Los ácidos seleccionados para el estudio fueron el ácido clorhídrico (que se utilizó como control del proceso original), ácido cítrico, ácido láctico y ácido tartárico.

En la tabla 10 se muestra el valor de pH inicial de la clara de huevo pasteurizada empleada para el ensayo y el valor de pH de esa misma clara ya precalentada a 55 °C que, como se puede observar ya disminuye ligeramente.

**Tabla 10. Valores de pH de la materia prima utilizada en el ensayo: clara de huevo y clara de huevo precalentada**

Muestra	pH	Temperatura (°C)
Clara de huevo	8,93	6,0
Clara de huevo precalentada	8,39	55,0

En la tabla 11 se muestran los resultados del seguimiento de pH realizado durante el proceso de preparación de los hidrolizados para la selección del ácido. Destaca que, a pesar de realizar el ajuste previo a la hidrólisis de todas las muestras a un valor de 7,5 aproximadamente,



en los productos finales el valor de pH fue incrementándose hasta alcanzar valores próximos a 8,0.

**Tabla 11. Resultados del seguimiento de pH durante el proceso de hidrólisis con distintos ácidos (clorhídrico, tartárico, láctico y cítrico)**

Muestra	Ácido clorhídrico		Ácido tartárico		Ácido láctico		Ácido cítrico	
	pH	T <sup>a</sup> (°C)	pH	T <sup>a</sup> (°C)	pH	T <sup>a</sup> (°C)	pH	T <sup>a</sup> (°C)
Clara inicial	9,17	9,7	9,17	9,7	9,17	9,7	9,17	9,7
Clara precalentada	8,75	55,8	8,75	55,8	8,75	55,8	8,75	55,8
Ajuste de pH (teórico 7,5)	7,45	55,2	7,45	55,2	7,50	55,7	7,48	55,3
Producto final	7,90	55,0	7,90	54,9	7,84	55,3	7,92	55,0

Para determinar si el incremento de pH observado durante la hidrólisis era debido al propio proceso de hidrólisis (ocasionado por la actividad enzimática) o al poder tampón de la clara de huevo, se llevó a cabo un ensayo en el que se precalentó a 55 °C una cantidad de clara de huevo que se dividió en dos muestras en el momento de la adición de la enzima. De esta forma, se obtuvieron dos productos: uno con enzima (hidrolizado – muestra H) y otro sin enzima (no hidrolizado - muestra NH). Se realizó un seguimiento de pH cada 30 min durante el tiempo fijado de “hidrólisis” de 120 minutos para ambas muestras. Los resultados del seguimiento se presentan en la tabla 12.

**Tabla 12. Seguimiento de pH clara de huevo pasteurizada con enzima (muestra H) y sin enzima (muestra NH)**

Tiempo (min)	MUESTRA H - Con enzima		MUESTRA NH - Sin enzima	
	pH	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)
0	7,57	55,7	7,56	55,3
30	7,76	55,5	7,68	55,2
60	8,00	55,4	7,91	55,2
90	8,14	55,3	8,03	55,4
120	8,16	55,3	8,06	55,9

Del estudio del seguimiento de pH cada 30 minutos realizado, se observó que el incremento en los valores de pH era similar en ambas muestras independientemente de que se adicionase o

no enzima. Es decir, el aumento de pH no parece estar relacionado con el proceso de hidrólisis y sí con el poder tampón de la proteína presente en la clara de huevo. Cuando el proceso de hidrólisis no se controla, el pH de la solución (enzima-sustrato) cambia después del inicio de la hidrólisis debido a la formación de grupos amino nuevos, los cuales son capaces de liberar o aceptar protones, dependiendo del pH de la hidrólisis. De forma general a un pH bajo todos los grupos amino están protonados y solamente parte de los grupos carboxilo están desprotonados, resultando en una captación neta de protones por cada enlace peptídico roto, causando un incremento del pH. A pH neutro y alcalino la hidrólisis resulta en una disminución de pH, pues todos los carboxilos están desprotonados y solamente parte de los grupos amino están protonados. Con el fin de prevenir un cambio de pH durante la hidrólisis, la reacción debería de llevarse a cabo en un sistema *buffer* o en un sistema de *pH-stat* en el cual el pH se fija en el valor deseado (Benítez et al., 2008). Sin embargo, en nuestro caso se produjo un incremento de pH tanto en la muestra hidrolizada como en la no hidrolizada, y por lo tanto este incremento se ha relacionado con la resistencia de la propia clara de huevo a la reducción del pH por parte del ácido. Los propios alimentos contienen sistemas químicos estabilizadores del pH que los protegen de cambios repentinos en la acidez o en la alcalinidad. Estos sistemas estabilizadores son combinaciones de ácidos y bases débiles presentes de forma natural y que actúan químicamente para reducir los cambios en el pH de una solución ajustando las proporciones de ácido y de base. Este sistema estabilizador parece ser responsable de que el valor de pH final de las muestras tras la hidrólisis sea prácticamente idéntico al de la clara de huevo inicial precalentada a 55 °C.

En el estudio sensorial realizado por el panel de cata interno del APLTA para la selección del ácido, se vio que el ácido cítrico se asociaba con una acidez intensa y refrescante de corta duración. En cuanto al ácido tartárico, provocaba una sensación similar al ácido cítrico en cuanto al tiempo de duración; sin embargo, a diferencia del ácido cítrico, este ácido respetaba más el sabor “natural” del hidrolizado y su sabor era similar al percibido con el ácido clorhídrico (ácido control). Por último, la acidez apreciada en el hidrolizado acidificado con ácido láctico, fue descrita como más intensa que en los otros dos hidrolizados y con una duración de sabor más prolongada y suave. En el test de preferencia fueron seleccionados como favoritos el ácido láctico y el ácido tartárico. Por una decisión del equipo de marketing de la empresa, se optó por utilizar el ácido tartárico como acidulante ya que como comentamos anteriormente dependiendo del origen de la síntesis del ácido láctico, este podría contener trazas de proteína de la leche (si

se utiliza esta como sustrato inicial). En el artículo 9 del Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor se indica la obligatoriedad de mencionar “todo ingrediente o coadyuvante tecnológico [...] que cause alergias o intolerancias y se utilice en la fabricación o la elaboración de un alimento y siga estando presente en el producto acabado, aunque sea en una forma modificada”. Por lo tanto, leyendo el etiquetado del producto el consumidor ya sabría si contiene o no algún alérgeno de los 14 grupos indicados en dicho reglamento y entre los que se encuentra la leche. Sin embargo y aunque se escoja un ácido láctico de diferente origen, es posible que ciertos consumidores con alergia a la proteína de la leche rechacen el producto por desconocimiento, y es por ello por lo que se optó por el uso del ácido tartárico ya que además no se observaron diferencias sensoriales entre ambos ácidos. Por otro lado, uno de los objetivos finales del desarrollo de este hidrolizado de clara de huevo es utilizarlo como ingrediente base para el desarrollo de productos y alimentos similares a aquellos de origen lácteo pero sin que estén producidos a partir de leche (yogures, cremas, helados, salsas...), por lo que parece poco práctico incluir el ácido láctico en su desarrollo.

#### **4.1.4. Selección del pH durante el proceso de hidrólisis**

Una vez seleccionado el ácido tartárico como acidulante para el ajuste de pH, se realizó un estudio de coagulación para evaluar posibles diferencias al ajustar el pH para la hidrólisis a 7,5 o a 7,0. Aunque no hay una gran diferencia entre estos valores, sí puede suponer una gran diferencia en las características tecnológicas del producto final: estabilidad térmica de la proteína y/o mejores cualidades organolépticas. Se establecen estos valores de pH por ser los valores que se encuentran dentro del rango óptimo de actuación de la enzima según viene indicado en la ficha técnica proporcionada por el fabricante (figura 33).

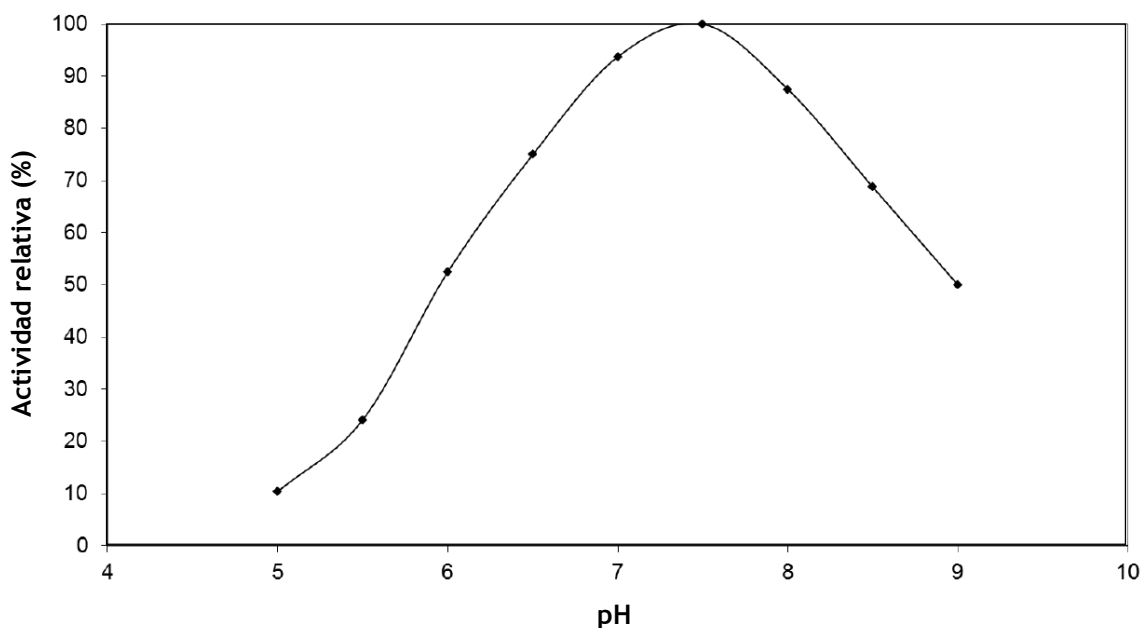


Figura 33. Curva de actividad en función del pH para la enzima F750MDP (tomada de: <https://www.biocatalysts.com/enzyme-products/?product=587>)

En la figura 34 se muestra el resultado obtenido del estudio de coagulación realizado a los dos hidrolizados tras 2,5 horas (180 minutos) de hidrólisis y con un ajuste de pH de 7,0 y 7,5, respectivamente. Aunque a temperaturas bajas la muestra ajustada a pH 7,5 presenta una mayor estructuración interna (mayores valores de  $G'$ ), a partir de los 68 °C aproximadamente, ambas muestras ya presentan una estructuración interna muy similar con apenas diferencias en los parámetros analizados. Con estos resultados no se aprecian diferencias entre el hidrolizado ajustado a pH 7,0 o 7,5 por lo que se establece este rango como el óptimo para realizar la hidrólisis.

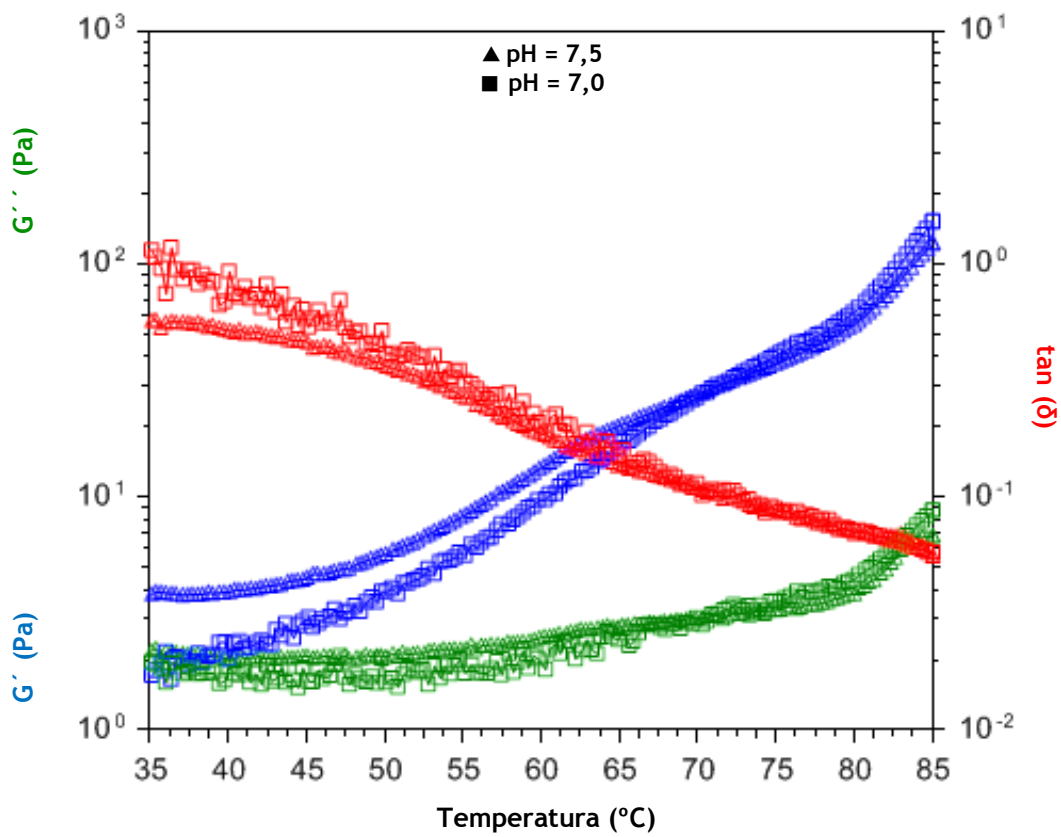


Figura 34. Estudio de coagulación - Rampa de temperatura en oscilatorio: pH 7,5 (triángulo) y pH 7,0 (cuadrado).  $G'$  (módulo elástico),  $G''$  (módulo viscoso) y  $\tan \delta$  (tangente de pérdidas)

#### 4.1.5. Selección de la dosis de enzima

En esta Tesis Doctoral y según se describe en la patente con número de solicitud P201331886 la enzima utilizada para llevar a cabo la hidrólisis fue una aminopeptidasa. Cuando se utilizan proteasas para producir hidrolizados de proteínas pueden originarse sabores amargos desagradables. El amargor es debido a la exposición de residuos hidrofóbicos. Los aminoácidos que se asocian con la presencia de sabor amargo son valina, isoleucina, fenilalanina, triptófano, leucina y tirosina (Pedersen, 1994). La enzima F750MDP es una exopeptidasa de alto rendimiento y con un bajo nivel de actividad endopeptidasa desarrollado por fermentación de *Aspergillus oryzae* para la hidrólisis de proteínas en condiciones básicas o neutras, y se utiliza principalmente para reducir el sabor amargo de sustratos sometidos a hidrólisis (Pap et al., 2020). Esta enzima se ha utilizado en la hidrólisis de proteínas y concentrados de proteínas del suero lácteo (Korzhev et al., 2017; Mel'nikova et al., 2017; Ponomarev et al., 2017) y para la

hidrólisis del residuo obtenido de la extracción del aceite de semillas de cáñamo (Pap et al., 2020). En las indicaciones de la ficha técnica del fabricante, se establecen como rangos óptimos de actuación de la enzima 45 – 55 °C para la temperatura y 5,5 – 7,5 para el pH. No obstante, los valores óptimos serían 55 °C (figura 30) para la temperatura, y 7,5 para el pH (figura 33).

Continuando con los trabajos de optimización del proceso de obtención del hidrolizado para su posterior escalado piloto, se llevó a cabo un estudio para evaluar, en este caso, la dosis de enzima establecida e indicada en la patente. Si es posible obtener un hidrolizado con unas características idénticas o similares, pero con una dosis inferior de enzima, se conseguiría una mejora económica en el proceso de elaboración. Se decidió por ello utilizar para este estudio la dosis más baja recomendada en la patente (1 g/L) así como la dosis óptima indicada por el fabricante y también indicada en la patente (2 g/L). En los resultados obtenidos cuando se compararon las gráficas de la rampa de temperatura (estudio de coagulación) para la dosis enzimática de 1 y 2 g/L, se observó un comportamiento y estructuración muy similar (figura 35). Sin embargo, a temperaturas inferiores a 77 °C, con la dosis de 1 g/L de enzima era posible apreciar una mayor diferencia entre sus módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), siendo mayor el elástico. Es decir, con la dosis enzimática de 1 g/L la muestra ya presenta cierta estructura a temperaturas inferiores a 77 °C, mientras que con la dosis enzimática de 2 g/L esta estructuración es mucho menor ya que, hasta que no se alcanzan los 77 °C, ambos módulos (elástico y viscoso) son prácticamente paralelos. A partir de esta temperatura (77 °C), el comportamiento es prácticamente idéntico, así como la fuerza del gel resultante. Por lo tanto, se podría decir que apenas hay diferencia en el comportamiento de las muestras por el incremento en la dosis de enzima durante la hidrólisis.

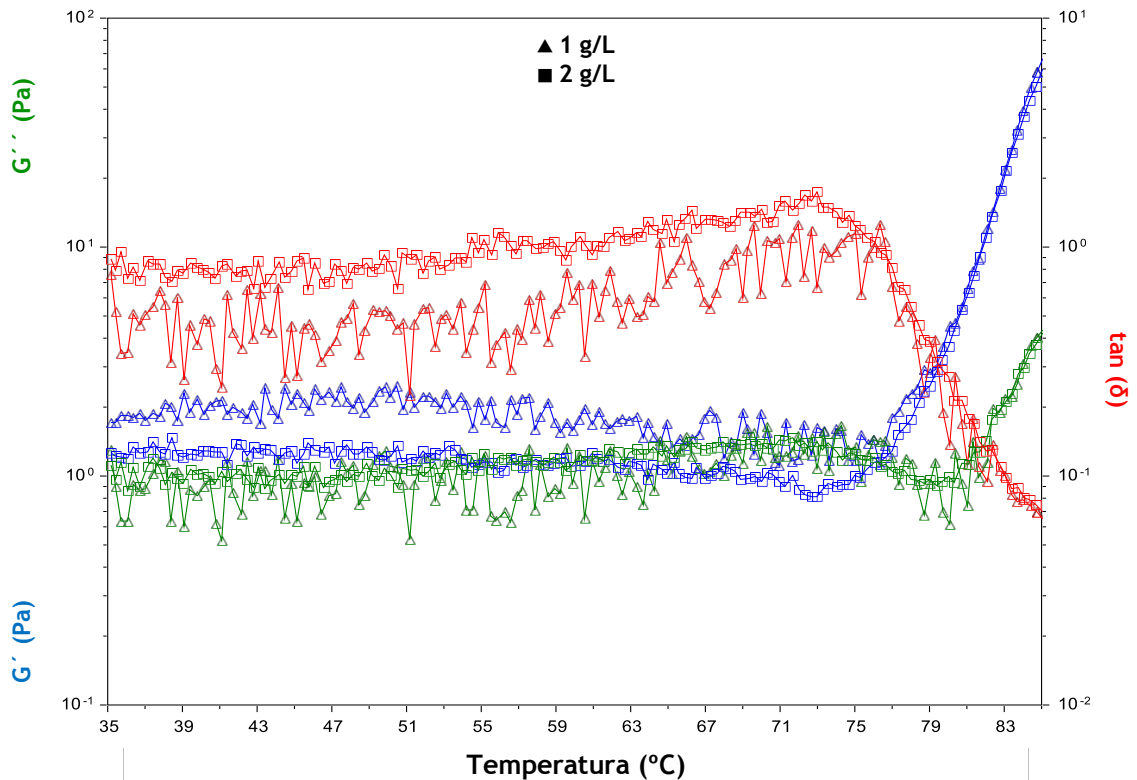


Figura 35. Estudio de coagulación - Rampa de temperatura en oscilatorio: Dosis enzimática de 1 g/L (triángulo) y 2 g/L (cuadrado).  $G'$  (módulo elástico),  $G''$  (módulo viscoso) y  $\tan \delta$  (tangente de pérdidas)

A nivel organoléptico se apreció una mayor intensidad de olor y sabor a la enzima en la dosis de 2 g/L sin que llegase a producir rechazo o se considerase un aspecto negativo en el producto final. Por lo tanto, ambas dosis se consideraron aceptables a nivel organoléptico por las características finales de los hidrolizados elaborados. A partir de estos resultados, se estableció como dosis enzimática 1 g/L en lugar de los 2 g/L definidos en la patente para la elaboración del hidrolizado y su escalado a piloto. De hecho, la dosis enzimática seleccionada coincide con la utilizada por otros autores para la hidrólisis de proteínas en otras matrices alimentarias como la leche (Ponomarev, et al., 2017). Al no existir diferencias en el comportamiento del producto final con las dosis testadas, se puede reducir la dosis de enzima utilizada y conseguir así un ahorro en el coste de producción del producto, lo que supone una mejora para la posterior comercialización del producto por parte de la empresa.

#### 4.1.6. Efecto del tiempo de hidrólisis

Otro de los aspectos más críticos observados al analizar el proceso descrito en la patente fue optimizar la duración del tiempo de hidrólisis, establecida en un mínimo de 30 y en un máximo de 180 minutos. Este aspecto es importante a nivel productivo ya que, desde el punto de vista económico, repercute en gran medida la duración del proceso. Sin embargo, y teniendo en cuenta los posibles problemas de coagulación a los que posiblemente habría que enfrentarse en el escalado durante la fase de inactivación enzimática, se decidió investigar el efecto de un aumento del tiempo de hidrólisis de los 45 – 120 minutos indicados a 540 minutos para evaluar si con este incremento de tiempo en la actuación de la enzima se conseguía una mayor ruptura de enlaces en las moléculas presentes en la clara de huevo, y se mejoraba así la estabilidad térmica del hidrolizado final, pese a introducir un proceso más largo. También se tuvo en cuenta la posibilidad de que, con este aumento del tiempo de hidrólisis, se podrían perjudicar las propiedades organolépticas (olor y/o sabor). La correlación entre el grado de hidrólisis y la formación de péptidos amargos ha sido ampliamente estudiada (O’Sullivan et al., 2017; Meinlschmidt et al., 2016; Sun, 2011; Saha & Hayashi, 2001; Slattery & Fitzgerald, 1998; Adler-Nissen & Olsen, 1979), donde la ruptura de enlaces peptídicos y la liberación de pequeños péptidos con residuos de aminoácidos hidrófobos conduce a un aumento del amargor. No obstante, también hay publicaciones donde se sugiere lo contrario y no siempre un mayor grado de hidrólisis se relaciona con un incremento del amargor (Daher et al., 2021).

Los hidrolizados obtenidos tras el tiempo de hidrólisis establecidos (120 y 540 minutos) fueron tratados térmicamente a 85 °C durante 3 minutos para inactivar la enzima. Tras realizar este tratamiento térmico se detectó la presencia de agregados de gran tamaño en los hidrolizados que imposibilitaron su análisis en el reómetro y tampoco fue posible la determinación de su tamaño de partícula, por lo que se decidió someter los hidrolizados elaborados a un proceso de homogeneización (homogeneizador APV Lab) en modo descendente (porque se realizó después del tratamiento térmico), en una sola etapa y a 150 bares de presión (obteniendo las muestras 120D y 540D). Con este equipo se consigue una disminución del tamaño de partícula del producto que se está procesando por un aumento de la presión (Hayes et al., 2005; Thiebaud et al., 2003; Vachon et al., 2002; Guerzoni et al., 1999); esto a su vez lo que permite es mejorar las características organolépticas del producto final (menor astringencia y/o arenosidad) y

favorecer la activación y/o dispersión de algunos ingredientes (Diels et al., 2005; Hayes et al., 2005; Flourey et al., 2004; Hayes & Kelly, 2003a; Paquin, 1999).

En la figura 36 se muestra el aspecto de los hidrolizados obtenidos tras 120 y 540 minutos de hidrólisis una vez realizados el tratamiento térmico de inactivación enzimática y la homogeneización. Como se puede apreciar, la incorporación de la fase de homogeneización permitió obtener un producto con menos agregados, más liso y menos viscoso que su equivalente sin homogeneizar. Estas muestras homogeneizadas sí se consideraron aptas para poder llevar a cabo los análisis planteados.



**Figura 36. Muestras hidrolizadas durante 120 min (izq.) y 540 min (drcha.) - Sin homogeneización (abajo) y con homogeneización (arriba)**

En la figura 37 se muestran los resultados obtenidos tras realizar el estudio de coagulación en los hidrolizados elaborados con un tiempo de hidrólisis de 120 y 540 minutos, respectivamente y homogeneizados en modo descendente (después del tratamiento térmico de inactivación enzimática). El producto obtenido con un tiempo de hidrólisis de 120 minutos partía ya inicialmente de una cierta estructura ( $G' > G''$ ) y la fuerza de gel se fue incrementando paulatinamente con el aumento de la temperatura. Sin embargo, con un tiempo de hidrólisis de 540 minutos, la muestra presentó inicialmente una estructura totalmente líquida ( $G' < G''$ ) hasta los 55 °C, que es cuando comenzó a estructurarse y aumentar su carácter viscoso. A partir de esa temperatura, la estructura se fue fortaleciendo paulatinamente a medida que aumentaba

la temperatura y, a pesar de esta diferencia inicial, ambas muestras terminaron con una estructura y fuerza de gel similar.

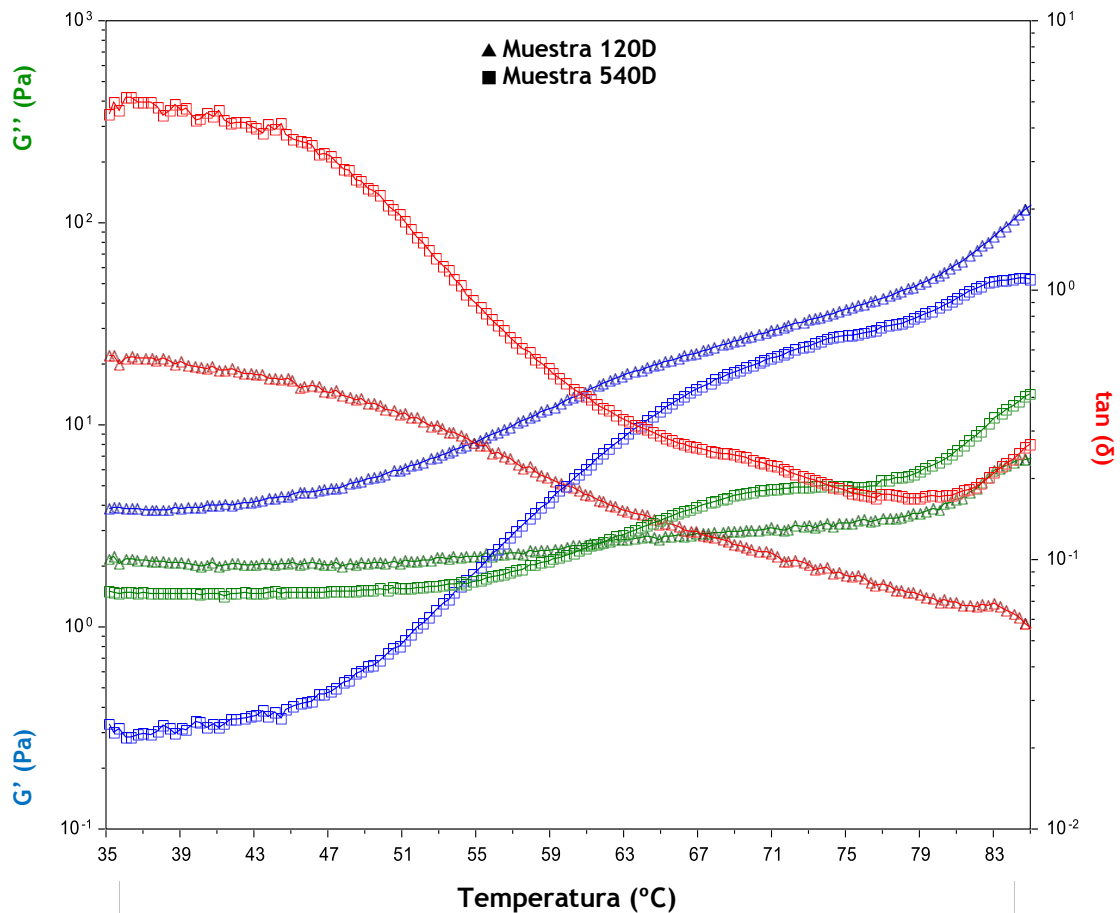


Figura 37. Estudio de coagulación - Rampa de temperatura en oscilatorio: Muestra 120D (triángulo) y muestra 540D (cuadrado). G' (módulo elástico), G'' (módulo viscoso) y tan δ (tangente de pérdidas)

En la tabla 13 y en la figura 38 se muestran los resultados y la representación gráfica del análisis del tamaño de partícula de los hidrolizados elaborados (tratados térmicamente y homogeneizados en modo descendente). Se observó que el tamaño de partícula medio era prácticamente el doble en el caso del hidrolizado obtenido tras 540 minutos de hidrólisis (muestra 540D), pasando de un tamaño de partícula medio de 65 micras con 120 minutos de hidrólisis (muestra 120D) a 115 micras en el hidrolizado realizado durante 540 min. La muestra 120D presentó además una distribución de tamaño de partícula inferior a la de la muestra 540D, al encontrarse la gráfica desplazada hacia la izquierda (figura 38).

Tabla 13. Resultados obtenidos del análisis de tamaño de partícula en micras ( $\mu\text{m}$ )

Muestra	D(4,3)	d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)
Muestra 120D	64,92	4,94	27,23	183,05
Muestra 540D	115,43	11,62	77,48	256,89

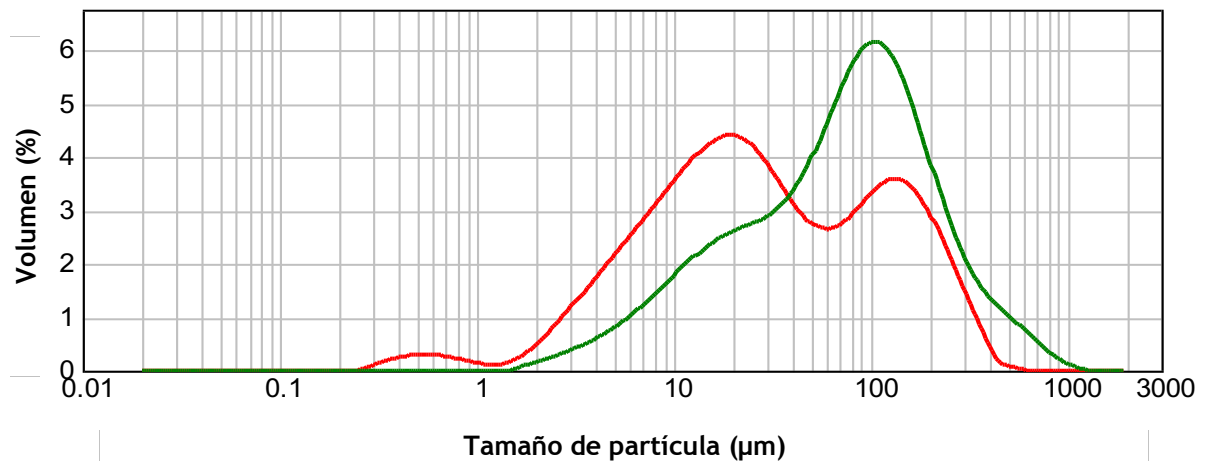


Figura 38. Distribución del tamaño de partícula de las muestras: Muestra 120D (rojo) y Muestra 540D (verde)

A nivel sensorial, se observó que el hidrolizado obtenido con un mayor tiempo de hidrólisis (540 minutos) presentaba agregados de mayor tamaño, más compactos y de mayor viscosidad que el hidrolizado obtenido tras 120 minutos y sometido a ese mismo proceso. No obstante, una vez homogeneizadas las muestras a 150 bares de presión, ya no se apreciaban diferencias a nivel visual (figura 36), en cuanto a presencia de agregados y de viscosidad. En cuanto a sabor, se apreció que el hidrolizado obtenido con un mayor tiempo de hidrólisis (540 minutos) tenía un ligero amargor no apreciable en el hidrolizado obtenido con 120 minutos de hidrólisis. Aunque el amargor no era excesivo, en la prueba de preferencia realizada por los catadores, salió elegido el hidrolizado elaborado con el menor tiempo de hidrólisis, coincidiendo con los resultados de otros investigadores donde un mayor tiempo de hidrólisis está asociado a un incremento del amargor (O'Sullivan et al., 2017; Meinschmidt et al., 2016; Sun, 2011; Saha & Hayashi, 2001; Slattery & Fitzgerald, 1998; Adler-Nissen & Olsen, 1979).

#### 4.1.7. Selección de condiciones de inactivación de la enzima

La etapa final en un proceso de hidrólisis consiste en la inactivación de la enzima para detener su efecto proteolítico. Esta inactivación puede realizarse por métodos químicos (cambios de pH) y/o físicos (cambios de temperatura). La fase de inactivación enzimática supuso también un punto crítico importante en el diseño del protocolo de elaboración. Es importante además tener en cuenta que, a nivel industrial y semiindustrial, esta fase se puede utilizar además como tratamiento térmico del producto con el objetivo de alargar la vida útil del ingrediente obtenido. Esta fase es especialmente sensible ya que la combinación de tiempo y temperatura necesaria para poder alcanzar una destrucción microbiana que garantice la seguridad alimentaria del hidrolizado de clara de huevo puede ocasionar la coagulación de las proteínas, y ocasionar problemas en el ingrediente final a distintos niveles. A nivel tecnológico, es necesario controlar este nivel de coagulación ya que, si supera un cierto grado, puede llegar a atascar por completo el equipo de procesado térmico empleado, impidiendo así su tratamiento. A nivel sensorial, puede ocasionar problemas organolépticos en el ingrediente final como sensación de astringencia y/o arenosidad en boca. Estos últimos aspectos pueden afectar al grado de aceptación por parte de los consumidores del producto desarrollado. Teniendo en cuenta que el producto desarrollado podría ser utilizado como ingrediente en la elaboración de otros productos derivados, sería probable que también afectase organolépticamente a estos últimos. No obstante, es posible tratar térmicamente un producto en el que la proteína coagula parcialmente en el interior de un equipo de procesado térmico industrial, tipo intercambiador de placas o tubular, y conseguir un producto final con buenas características tecnológicas y sensoriales. Sin embargo, para conseguirlo, normalmente es necesario incorporar una etapa de homogeneización en modo ascendente (antes del tratamiento térmico) o descendente (después del tratamiento térmico).

Este proceso de homogeneización se ha estudiado ampliamente en la elaboración de leche UHT. Se ha visto como su eficiencia en la reducción del tamaño de los glóbulos de grasa, afecta de manera determinante a la estabilidad de este producto durante su almacenado, retardando la agregación de los glóbulos de grasa y evitando así fenómenos como el cremado y adhesión de la grasa a las paredes del envase (Lu et al., 2013; Ramsey & Swartzel, 1984). Se ha visto también como la presión de homogeneización provoca cambios en la percepción sensorial de los alimentos que se consumen en estado emulsionado, como es el caso de la leche. En helados,

la homogeneización de la grasa se emplea para proporcionar una emulsión estable y se considera un procedimiento esencial durante el proceso de elaboración de la mezcla de helado (Berger, 1997). También se ha investigado la importancia que tiene la homogeneización en las bebidas vegetales, siendo un factor importante en la estabilidad del producto final (Ferragut et al., 2015). En todos estos casos, la homogeneización permite que los ingredientes de la bebida se mezclen completamente (favoreciendo su dispersión y/o activación) y hace que los gránulos de proteína y los glóbulos de grasa se refinen y dispersen por completo para mejorar el sabor (Liu et al., 2019). Además, para favorecer aún más la disminución del tamaño de partícula, es posible homogeneizar en las mismas condiciones repetidamente (homogeneización multipaso) (Berger, 1997) o se puede incrementar la presión en la segunda etapa de homogeneización (Liu et al., 2019).

Según las indicaciones del fabricante, la inactivación de la enzima se consigue por un aumento de temperatura superior a 80 °C durante al menos 10 minutos. En la patente de referencia este proceso viene descrito de la siguiente manera “la aminopeptidasa de *Aspergillus* se inactiva calentando a 95 °C durante 10 minutos”. Por lo tanto, fue necesario establecer o definir el tratamiento térmico más adecuado que permitiese, por un lado, la inactivación enzimática y, por el otro, la obtención de un producto que fuese procesable posteriormente a escala piloto y que, además, consiguiese en ese mismo proceso una reducción efectiva de la carga microbiana. La reducción de la carga microbiana permite alargar la vida útil del producto y que pueda ser consumido de forma segura. Aunque a escala laboratorio no es posible reproducir las condiciones de temperaturas ultra altas (tipo UHT) de los productos estériles, sí es posible testar diferentes combinaciones de tiempo y temperatura empleando para ello un procesador de alimentos Thermomix TM5 y hacerse una idea de la estabilidad térmica del producto para el posterior escalado. Con este objetivo, se sometió al hidrolizado de clara de huevo a diferentes temperaturas de inactivación (70, 80, 90 y 95 °C) durante 3 minutos. Los resultados mostraron que durante el estudio de inactivación enzimática se produjo la formación de agregados de gran tamaño cuando se aplicaban temperaturas superiores a los 70 °C (figura 39). Se ha descrito que a temperaturas superiores a 61 °C la clara de huevo sufre una pérdida de fluidez debido a la desnaturalización de las proteínas presentes en la clara de huevo, mayoritariamente ocasionado por la ovoalbúmina (Damodaran & Paraf, 1997). Este hecho, además de incapacitar el uso de ciertos equipos a nivel industrial por la obturación de los

mismos, puede dar lugar a características organolépticas no deseadas como astringencia y arenosidad.



Figura 39. Aspecto de los hidrolizados elaborados tras el tratamiento térmico a más de 70 °C

Por ello, y con el fin de poder realizar el escalado semiindustrial, se planteó la necesidad de incorporar una etapa intermedia a la inactivación enzimática que evitase o disminuyese la formación de esos agregados. Se decidió llevar a cabo la dilución del hidrolizado con agua osmotizada y se realizó una homogeneización previa o posterior al tratamiento térmico (modo ascendente y descendente respectivamente) según se especifica en la tabla 14.

Tabla 14. Diluciones de las diferentes muestras obtenidas del hidrolizado de clara de huevo

Muestra	Dilución (%)
Muestra D0	0
Muestra D10	10
Muestra D20	20
Muestra D30	30
Muestra D40	40
Muestra D50	50

En la figura 40 se muestra el aspecto del hidrolizado tras el tratamiento térmico con diluciones crecientes desde un 0 hasta un 50 % y con homogeneización descendente (después

del tratamiento térmico) o ascendente (antes del tratamiento térmico). En la imagen se observa de forma clara como la homogeneización descendente fue capaz de romper los agregados formados durante el tratamiento térmico y obtener así un producto final mucho menos viscoso y de aspecto líquido. Estas características se hacían más evidentes cuanto mayor era la dilución. De igual forma se apreció en el estudio sensorial que, cuanto mayor era la dilución, menos perceptible se hacía la astringencia y la arenosidad del producto final en boca. Con la homogeneización ascendente, los productos obtenidos eran percibidos como más astringentes que sus equivalentes tras la homogeneización en modo descendente.

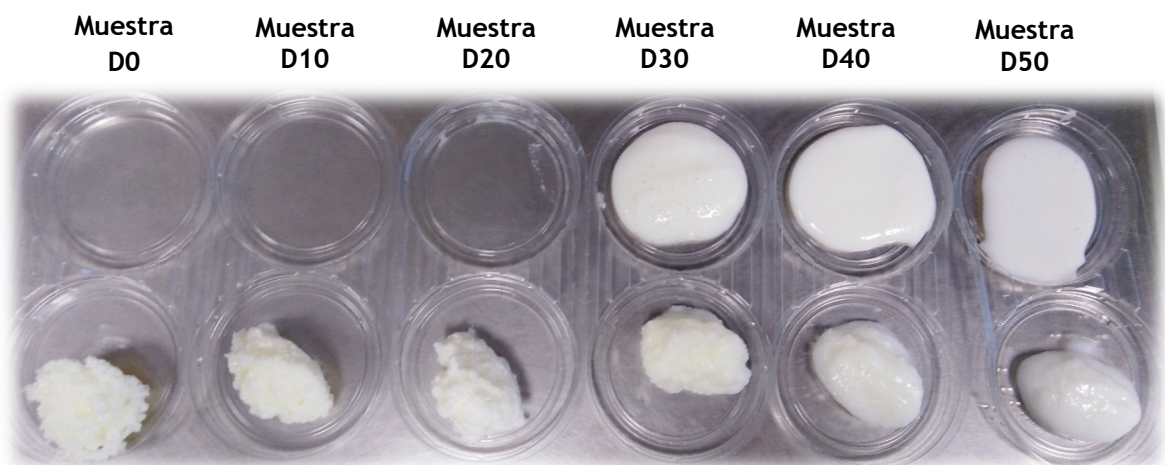


Figura 40. Muestras de hidrolizado de clara de huevo diluidas con agua osmotizada desde un 0 hasta un 50% de izquierda a derecha - Homogeneización descendente (arriba) y homogeneización ascendente (abajo)

Los resultados mostraron que con diluciones inferiores al 30 %, no era posible realizar el proceso de homogeneización descendente debido a la alta viscosidad y dureza de los agregados formados durante el tratamiento térmico. Por lo tanto, se concluyó que sería necesaria una dilución mínima aproximada de entre un 30 y un 50 % con homogeneización descendente o ascendente para obtener un producto final que fuera viable escalar a piloto con temperaturas de inactivación y tratamiento térmico superiores a 70 °C.

Los resultados del análisis de tamaño de partícula y su representación gráfica se presentan en la tabla 15 y en la figura 41, respectivamente. En este caso tampoco fue posible realizar el análisis de las muestras con una dilución inferior al 30 % debido a su elevada viscosidad. Por

el mismo motivo, para las diluciones de un 30 y un 40 % respectivamente, solo se pudo realizar el análisis de las muestras homogeneizadas en modo descendente ya que, las muestras homogeneizadas en modo ascendente presentaban una textura muy densa y con agregados de gran tamaño.

Tabla 15. Resultados obtenidos del análisis de tamaño de partícula en micras ( $\mu\text{m}$ )

Muestra	Homogeneización	D(4,3)	d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)
Muestra D30	Descendente	283,95	17,70	163,06	726,67
Muestra D40	Descendente	93,18	6,94	36,37	279,38
Muestra D50	Ascendente	222,89	11,40	43,60	738,53
	Descendente	19,33	0,30	9,56	39,91

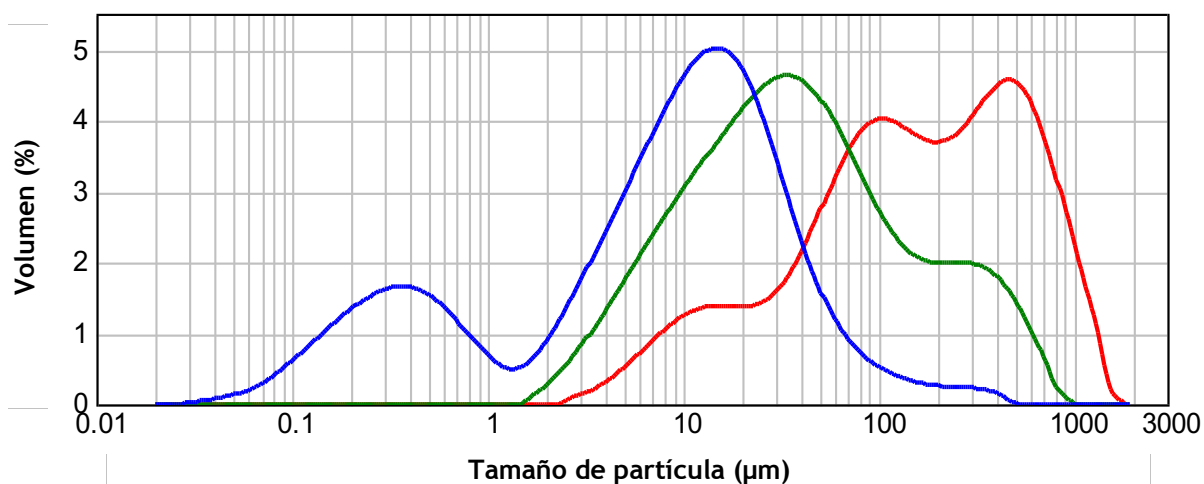


Figura 41. Distribución del tamaño de partícula de las muestras: muestra D30 (rojo), muestra D40 (verde), y muestra D50 (azul), en modo homogeneización descendente

De los resultados mostrados en la tabla anterior y de su representación gráfica, se pudo concluir que cuanto mayor era la dilución del hidrolizado de clara de huevo tratado térmicamente y homogeneizado, menor era el tamaño de partícula del producto final (muestra D30 – diluido 30 %, muestra D40 – diluido 40 % y muestra D50 – diluido 50 %) ya que, como se ha visto en otros trabajos, la estabilidad térmica y formación de agregados durante el tratamiento térmico de un producto está muy relacionado con su contenido proteico (Nawaz et al., 2021; Manassero et al., 2020; Singh et al., 2019). Comparando los resultados obtenidos, en la muestra diluida un 50% con homogeneización ascendente y descendente, se evidencia el

efecto beneficioso que supone llevar a cabo la homogeneización de forma posterior al tratamiento térmico, es decir en modo descendente, ya que se observa una disminución clara del tamaño de partícula medio del producto final, pasando de 223 a 19,3 micras.

Por último, como ya se comentó al principio de este apartado, otro método de inactivación enzimática, además de la temperatura que ya hemos comentado, es a través de cambios químicos mediante la modificación del pH. Estos cambios de pH también pueden influir en la conservación del producto final y sus características organolépticas de manera que, cuanto más ácido sea el producto final, mejor será su conservación frente al crecimiento de microorganismos no deseados que puedan perjudicar la salud de los consumidores y/o las características organolépticas del producto. Además, cuanto más ácido sea el producto, menor deberá de ser el tratamiento térmico (combinación tiempo y temperatura) a la que tiene que ser sometido para su conservación, evitando de esta forma la desestabilización de la proteína y la formación de agregados. Por otro lado, como el hidrolizado de clara de huevo va a utilizarse como un ingrediente más para la elaboración de otros productos derivados, el pH del mismo también podría afectar a su elaboración ya que, estos productos derivados pueden presentar desde un pH básico hasta un pH ácido. Para ello, se llevó a cabo la preparación del hidrolizado de clara de huevo que, una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis establecido se subdividió en tres muestras para realizar el ajuste de pH del producto final a un valor de pH básico (8,0), neutro (7,0) y ácido (4,2). El ajuste de pH a 8,0 no fue necesario realizarlo porque, como ya se vio en el apartado 4.1.3, a pesar de realizar el ajuste del pH de la clara de huevo a un valor de 7,5 para la hidrólisis, debido al poder tampón o estabilizador de la propia clara de huevo, una vez transcurrido el tiempo fijado para la hidrólisis, el pH final del mismo se encuentra en torno a 8,0. En los resultados obtenidos a nivel sensorial, únicamente se observaron diferencias cuando se comparó el hidrolizado ácido con los otros dos (básico y neutro). El hidrolizado ácido, presentó una mayor astringencia y arenosidad en boca. Sin embargo, estas características, apenas fueron perceptibles en los otros dos hidrolizados y, de ellos, se seleccionó por sus mejores atributos sensoriales el de pH neutro (7,0). No obstante, no se descarta la utilización del hidrolizado ácido para la elaboración de productos derivados ya que esas características organolépticas pueden enmascarse o atenuarse con la incorporación de otros ingredientes.

A continuación y a modo de resumen se muestra un esquema (figura 42) del protocolo y parámetros definidos tras los ensayos realizados a escala de laboratorio en esta primera parte de la Tesis Doctoral. Este nuevo diseño nos permitirá abordar la segunda parte de esta Tesis Doctoral con el objetivo de establecer el protocolo de elaboración del hidrolizado de clara de huevo a escala semiindustrial.

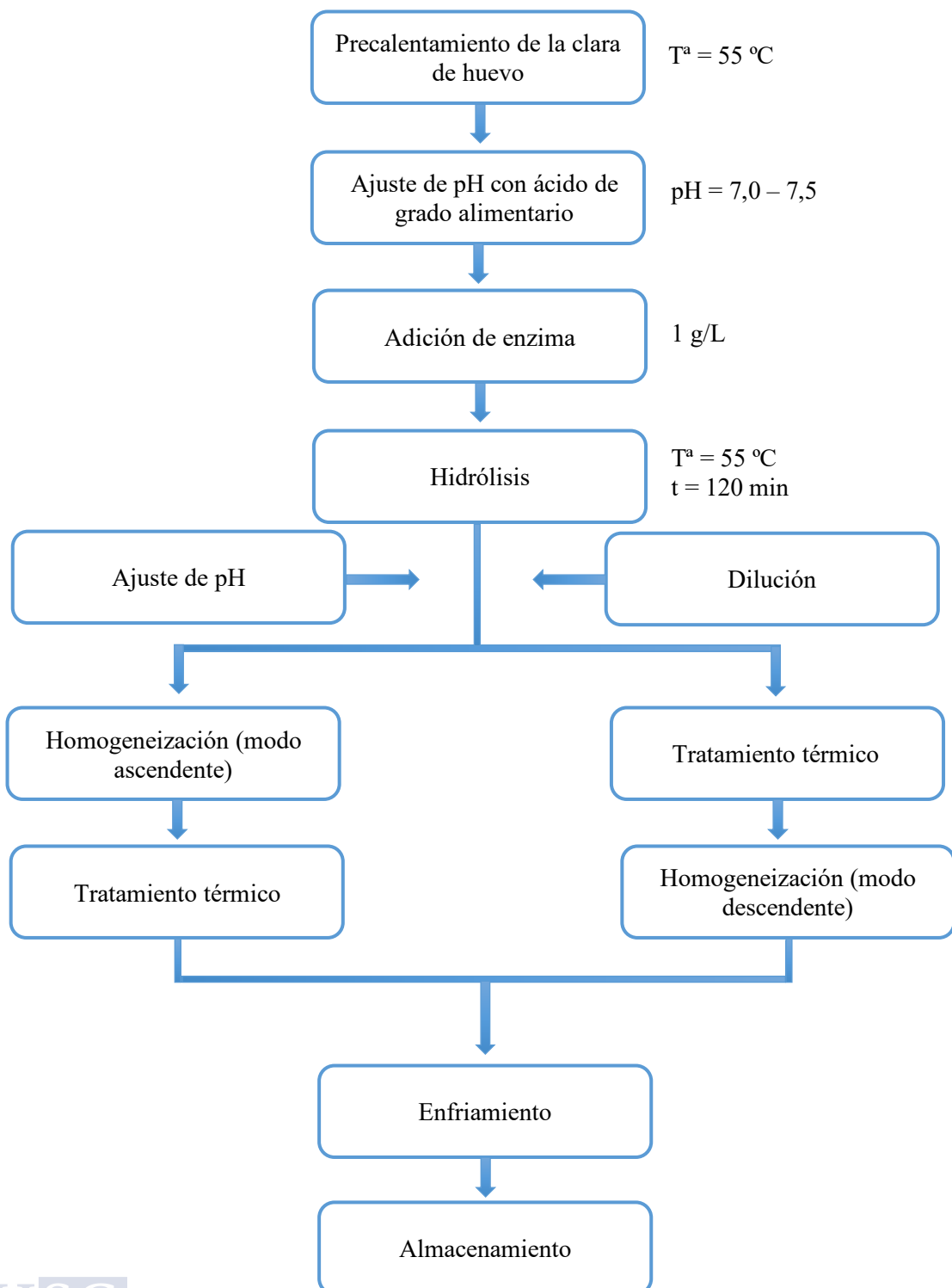


Figura 42. Esquema de trabajo con las condiciones optimizadas a escala de laboratorio para proceder a su escalado semiindustrial

## 4.2. ESCALADO SEMIINDUSTRIAL DEL HIDROLIZADO DE CLARA DE HUEVO

Como ya se ha explicado en la Introducción, es necesario realizar un estudio piloto, nivel semiindustrial, previo al escalado industrial con el objetivo de verificar que el proceso de elaboración desarrollado para el hidrolizado de clara de huevo es totalmente reproducible. Los resultados obtenidos en este estudio semiindustrial se presentan y discuten a continuación.

Ya se ha comentado en el apartado anterior, que una vez finalizado el proceso de hidrólisis, es necesario someter el hidrolizado a un tratamiento térmico con el objetivo de inactivar la enzima; este tratamiento térmico, puede aprovecharse además para reducir la carga microbiana, con el objetivo de conseguir alargar su vida útil, y que pueda ser utilizado durante periodos más largos de tiempo con total seguridad. En este contexto, en función del tratamiento térmico realizado, es posible conseguir una vida útil más larga y ahorrar costes derivados del almacenamiento en refrigeración (4 – 6 °C aprox.) que requiere un producto pasteurizado, si se sometiera el hidrolizado de clara de huevo a un tratamiento térmico a temperaturas ultra altas (UHT); el tratamiento UHT supondría además una mayor facilidad en la gestión y transporte del producto, lo que supondría una ventaja a la hora de iniciar la comercialización del hidrolizado. A escala laboratorio, se llegó a la conclusión de que para poder someter el producto a un tratamiento térmico superior a 70 – 75 °C era necesario someterlo a una dilución previa que evitase la formación de grandes agregados de proteína no procesables a nivel industrial en los equipos previstos para realizar este tratamiento térmico. Es por ello por lo que en este apartado además de desarrollar y optimizar las mejores condiciones para el escalado semiindustrial del hidrolizado de clara de huevo en base a los parámetros obtenidos en el apartado anterior mediante el uso de intercambiadores tubulares y de placas para conseguir la pasteurización del mismo, se programaron también experimentos encaminados a establecer las condiciones óptimas de escalado semiindustrial del tratamiento UHT en el hidrolizado de clara de huevo. Aunque hoy en día hay intercambiadores de placas capaces de alcanzar temperaturas ultra altas, lo más habitual es que para este tipo de tratamientos se utilicen intercambiadores tubulares. En el caso del equipamiento disponible en el APLTA, si se requiere de un tratamiento UHT solo es posible llevarlo a cabo utilizando el intercambiador tubular.

#### 4.2.1. Intercambiador tubular – pasteurización

A través del proceso y parámetros definidos a escala de laboratorio, se llevó a cabo la preparación de las muestras indicadas en la tabla 16 junto con los parámetros establecidos para el tratamiento térmico. Todas las muestras elaboradas fueron tratadas a la misma temperatura de pasteurización (85 °C durante 15 segundos) y homogeneizadas con la misma presión (150 bares). Las variables estudiadas en este ensayo fueron el pH y el tipo de homogeneización. La muestra 1 fue elaborada con un pH final de 7,0 y la muestra 2 con un pH final de 4,2. A su vez, estas dos muestras fueron subdivididas en dos para ser homogeneizadas en modo ascendente (muestra 1A y muestra 2A) y en modo descendente (muestra 1D y muestra 2D).

**Tabla 16. Parámetros establecidos para el tratamiento térmico de los hidrolizados elaborados y determinaciones analíticas**

Equipamiento	Muestra	Dilución (%)	pH <sub>final</sub>	TT (°C)	H	Presión (bar)	Determinaciones analíticas
Intercambiador tubular	Muestra 1A	50	7,0	85 (10s)	A	150+50	Seguimiento de pH Coagulación Tamaño de partícula Sensorial
	Muestra 1D	50	7,0	85 (10s)	D	150+50	
Pasteurización	Muestra 2A	50	4,2	85 (10s)	A	150+50	
	Muestra 2D	50	4,2	85 (10s)	D	150+50	

TT: tratamiento térmico; H: homogeneización; D: descendente; A: ascendente

En la tabla 17 se muestra el resultado del control de pH realizado durante el proceso de elaboración. Las muestras finales obtenidas tras el tratamiento térmico, independientemente del tipo de homogeneización realizada, presentaron un ligero incremento en el valor de pH respecto al valor de pH al que se ajustaron las muestras (7,0 en el caso de la muestra 1 y 4,2 en la muestra 2). Esto pudo deberse a que, una vez ajustado el pH, las muestras no fueron procesadas inmediatamente en el intercambiador tubular por lo que, durante ese tiempo de espera el poder tampón o estabilizante observado anteriormente pudo afectar a las muestras provocando ese ligero incremento en el valor de pH.

Tabla 17. Resultados del seguimiento de pH

Muestra	pH <sub>inicial</sub>	pH <sub>final</sub>
Clara pasteurizada	9,35	--
Clara precalentada	9,35	8,80
Ajuste de pH (antes de hidrólisis)	8,80	7,50
Hidrolizado	7,50	7,50
Hidrolizado diluido (50 %)	7,45	7,80
Muestra 1	7,80	7,00
Muestra 1A	7,00	7,41
Muestra 1D	7,00	7,27
Muestra 2	7,88	4,25
Muestra 2A	4,40	4,50
Muestra 2D	4,40	4,55

En la figura 43A se muestran los resultados tras el análisis de coagulación realizado para el hidrolizado a pH neutro homogeneizado en modo descendente (muestra 1D) y para el hidrolizado a pH neutro homogeneizado en modo ascendente (muestra 1A). La muestra 1D presentaba ya una estructura inicial que fue fortaleciéndose paulatinamente con el incremento de la temperatura ( $G' > G''$ ). Por el contrario, el hidrolizado a pH neutro homogeneizado en modo ascendente (muestra 1A) comienza a estructurarse a partir de los 50 °C (cambio de  $G' < G''$  a  $G' > G''$ ) incrementándose la fuerza del gel con el aumento de la temperatura. Al finalizar el tratamiento, la fuerza del gel formado fue muy similar en ambos casos, siendo ligeramente superior en el caso del hidrolizado homogeneizado en modo descendente (muestra 1D).

Si se compara la muestra ácida (muestra 2) homogeneizada en ascendente (muestra 2A) o en descendente (muestra 2D) (figura 43B), se observa que ambas muestras presentaron desde el inicio una estructura de tipo gel ( $G' > G''$ ). Sin embargo, la fuerza del gel y el comportamiento de cada muestra con la temperatura fue diferente. El hidrolizado con pH ácido y homogeneizado en ascendente (muestra 2A) tuvo una fuerza de gel inicialmente superior al de la muestra homogeneizada en descendente (muestra 2D). No obstante, a partir de los 75 °C aproximadamente, la fuerza del gel de la muestra homogeneizada en descendente empezó a superar el de la muestra en ascendente. En cuanto al comportamiento de las muestras con la

temperatura, se observó que la muestra homogeneizada en ascendente apenas se vio afectada por el aumento de la temperatura. Por el contrario, la muestra homogeneizada en descendente, a partir aproximadamente de los 60 °C, ya se empezó a ver bastante afectada con el aumento de la temperatura de manera que, a mayor temperatura, mayor estructura de gel.

Las muestras homogeneizadas en descendente tanto a pH neutro (muestra 1D) como ácido (muestra 2D) presentaron una estructura de tipo gel inicialmente ( $G' > G''$ ) (figura 43C). La diferencia es que la muestra neutra presentó un ligero incremento en su estructuración con el aumento de la temperatura mientras que, en la muestra ácida, como ya se comentó anteriormente, su estructura de gel se fue incrementando a la vez que aumentaba la temperatura a partir de los 60 °C.

Por último, cuando se compararon las muestras del hidrolizado a pH neutro (muestra 1) y a pH ácido (muestra 2) (figura 43D) ambas homogeneizadas en modo ascendente (muestra 1A y muestra 2A), presentaron un comportamiento totalmente diferente durante el proceso, aunque la fuerza del gel final fue muy similar. Por un lado, el hidrolizado ácido presentó una fuerte estructura desde el comienzo del proceso ( $G' > G''$ ), que apenas se vio afectada por el incremento de la temperatura mientras que, por el contrario, se observó que el hidrolizado neutro tenía una estructura líquida hasta los 50 °C y, fue a partir de esa temperatura, cuando empezó a tomar estructura (cambio de  $G' < G''$  a  $G' > G''$ ) y a formarse un gel cada vez más fuerte a medida que aumentaba la temperatura.

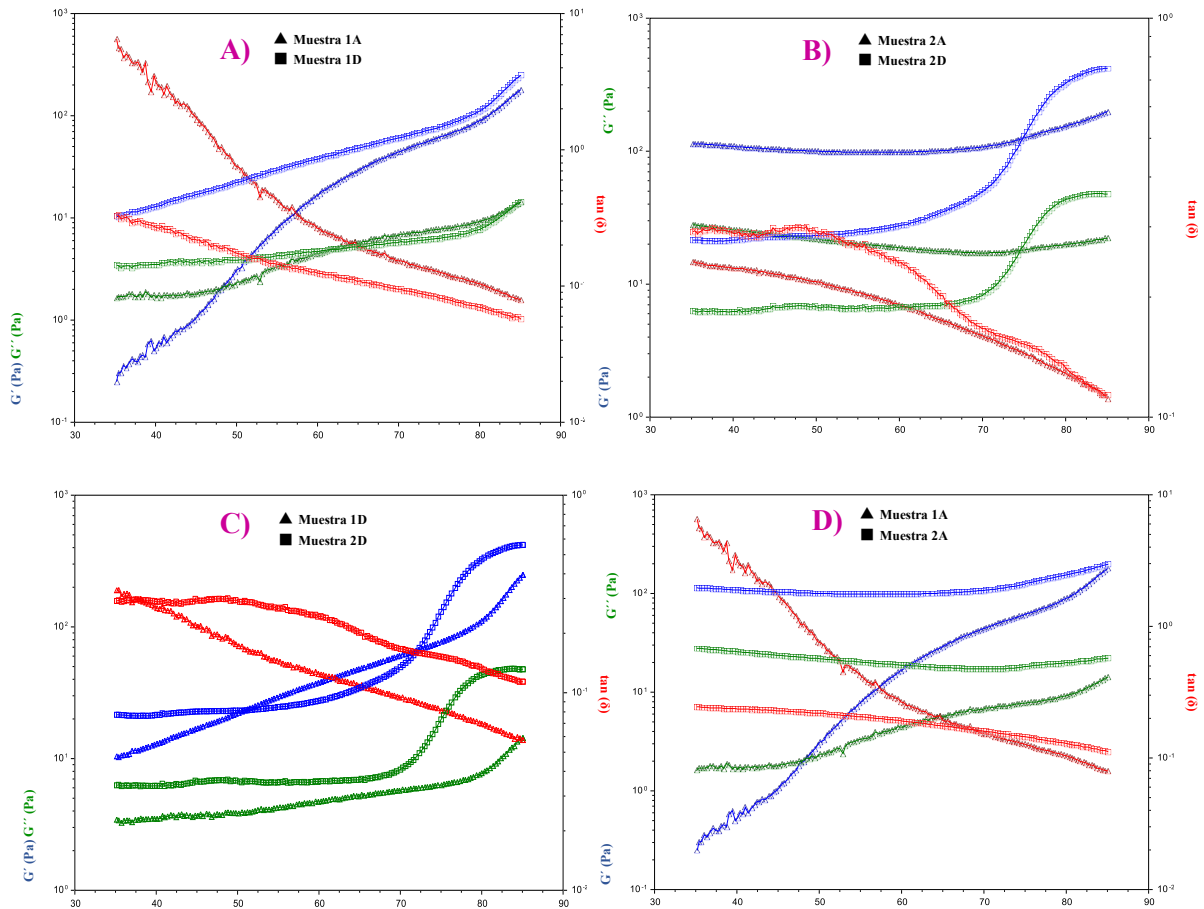


Figura 43. Viscosidad - curva de flujo: A) Muestra 1A (triángulo) y Muestra 1D (cuadrado), B) Muestra 2A (triángulo) y Muestra 2D (cuadrado), C) Muestra 1D (triángulo) y Muestra 2D (cuadrado) y D) Muestra 1A (triángulo) y Muestra 2A (cuadrado).  $G'$  (módulo elástico),  $G''$  (módulo viscoso) y  $\tan \delta$  (tangente de pérdidas)

En la tabla 18 se muestran los resultados del análisis del tamaño de partícula de las diferentes muestras elaboradas. Se observa como el tamaño de partícula medio disminuyó cuando se llevó a cabo la homogeneización en modo descendente, y esta disminución es especialmente notoria en la muestra ácida (muestra 2D).

Tabla 18. Resultados obtenidos del análisis de tamaño de partícula en micras ( $\mu\text{m}$ )

Muestra	D(4,3)	d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)
Muestra 1A	14,84	6,40	13,25	25,72
Muestra 1D	18,63	2,85	10,63	27,35
Muestra 2A	55,54	10,11	46,94	113,09
Muestra 2D	7,01	2,00	4,39	12,14

Aunque la muestra 1A y 1D tenían un tamaño de partícula medio muy similar, como se observa en la representación gráfica de la distribución del tamaño de partícula de la figura 44, la gráfica correspondiente a la muestra 1D presenta una mayor cantidad de partículas de menor tamaño (entre 0,1 y 1 micras) y de mayor tamaño (100 micras) mientras que la muestra 1A sus partículas eran más uniformes y se concentraban en el rango de 1 a 100 micras.

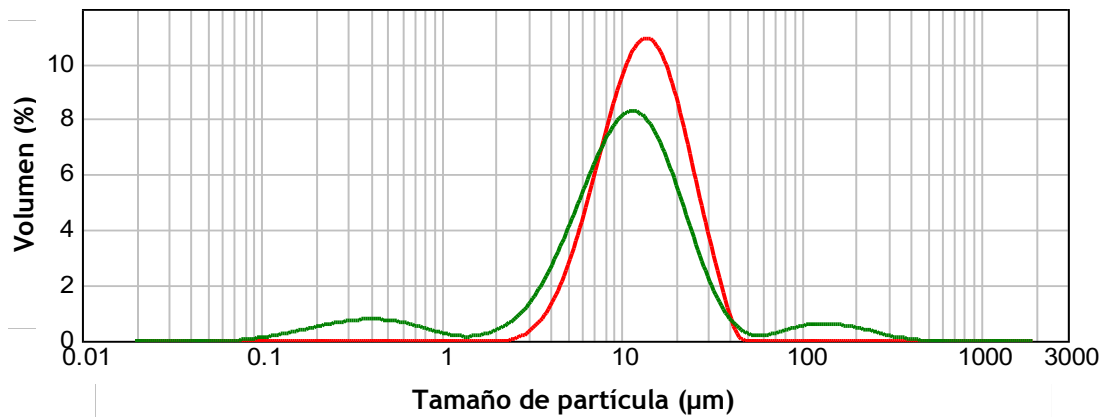


Figura 44. Distribución del tamaño de partícula: Muestra 1A (rojo) y Muestra 1D (verde)

Por el contrario, en la representación gráfica de las muestras 2A y 2D (figura 45) se observó claramente como la homogeneización en modo descendente hizo disminuir el tamaño de las partículas de la muestra desplazándose la gráfica hacia la izquierda (zona de partículas de menor tamaño).

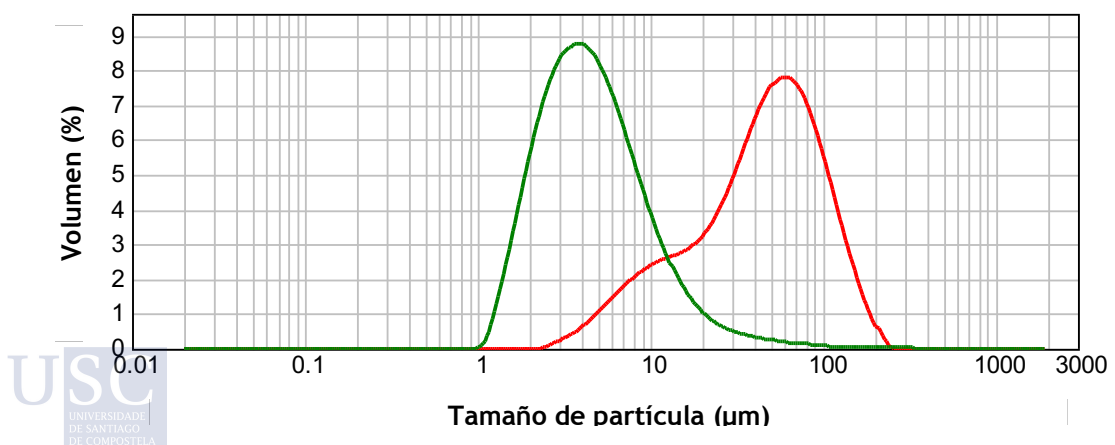



Figura 45. Distribución del tamaño de partícula: Muestra 2A (rojo) y Muestra 2D (verde)

Los resultados de la evaluación sensorial realizada en cada una de las muestras mostraron que los hidrolizados de clara de huevo elaborados en modo ascendente presentaban una ligera arenosidad y astringencia apenas perceptible en sus análogos homogeneizados en modo descendente. En la prueba de preferencia, se seleccionó como favorita la muestra 1D (hidrolizado a pH neutro, pasteurizado y homogeneizado en modo descendente). Esta muestra presentó una viscosidad ligeramente superior a la del mismo hidrolizado pero homogeneizado en modo ascendente (muestra 1A). Respecto a las muestras ácidas, la evaluación sensorial reveló que estas muestras presentaban una mayor viscosidad que los hidrolizados neutros. Del mismo modo que ocurría en el caso de las muestras con pH neutro, la muestra ácida homogeneizada en ascendente (muestra 2A) presentó también mayor astringencia, acidez y viscosidad que su análogo elaborado en descendente (muestra 2D). Además, cuando se evaluó el comportamiento de las muestras con el paso del tiempo se observó que los hidrolizados homogeneizados en modo ascendente presentaban tendencia a clarificar y, con mayor intensidad la muestra con un pH ácido (muestra 2A) (figura 46).



 **Figura 46.** Estado de las muestras elaboradas tras 24 horas desde su fabricación y conservadas a temperatura de refrigeración

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, como las muestras que mejores resultados presentaron a nivel organoléptico fueron las elaboradas con un pH neutro se seleccionaron

ambas, tanto la muestra realizada con homogeneización ascendente como descendente (muestra 1A y muestra 1D), para realizar el estudio de vida útil durante 40 días a temperatura de refrigeración (4 – 6 °C). Además, para tener información sobre el comportamiento de un hidrolizado final con pH ácido, también se seleccionó la muestra 2D para realizar este mismo seguimiento. Se seleccionó la muestra ácida elaborada en modo descendente porque al tener un tamaño de partícula medio mucho menor que la elaborada en modo ascendente, lo esperable sería que presentase un mejor comportamiento con el paso del tiempo, especialmente a nivel de estabilidad de fases. Además, a nivel visual ya se comprobó que la muestra homogeneizada en ascendente (muestra 2A) tendía a clarificar. En la tabla 19 se presenta un resumen de las muestras seleccionadas y las determinaciones analíticas establecidas para el seguimiento de vida útil.

**Tabla 19. Hidrolizados seleccionados para su caracterización fisicoquímica y microbiológica**

Equipamiento	Muestra	Dilución (%)	pH	TT (°C)	H	Presión (bar)	Determinaciones analíticas
Intercambiador tubular	Muestra 1A	50	7,0	85 (10s)	A	150+50	Sensorial Viscosidad Estabilidad de fases Microbiología
	Muestra 1D	50	7,0	85 (10s)	D	150+50	
Pasteurización	Muestra 2D	50	4,2	85 (10s)	D	150+50	

TT: tratamiento térmico; H: homogeneización; D: descendente; A: ascendente

Del análisis sensorial realizado durante el seguimiento de vida útil a las muestras seleccionadas no se apreciaron diferencias importantes en el sabor, olor o textura entre las muestras hidrolizadas con pH neutro homogeneizadas en modo descendente (muestra 1D) o en modo ascendente (muestra 1A). En cuanto a la muestra hidrolizada con un pH ácido y homogeneizada en ascendente (muestra 2A) se observó que presentaba una elevada acidez en boca y una astringencia bastante intensa desde el inicio del estudio de su vida útil. Con el paso del tiempo, todas las muestras sufrieron una evolución más o menos intensa a nivel de propiedades físicas y, a los 40 días de vida útil, todas las muestras (1D, 1A y 2A) estaban ligeramente gelificadas. Esta característica fue menos intensa en las muestras homogeneizadas en modo ascendente (muestra 1A y muestra 2A). En todos los casos, si las muestras se agitaban ligeramente la estructura formada se rompía recuperando el aspecto inicial del seguimiento. Al

final del seguimiento de vida útil, también se apreció una diferencia visual importante entre las muestras homogeneizadas en modo ascendente, y la muestra 1D en cuanto a la estabilidad de fases, haciéndose perfectamente visible una clarificación superior en la muestra neutra homogeneizada en ascendente (muestra 1A) y la muestra ácida homogeneizada en ascendente (muestra 2A). En la muestra 1D apenas se percibió ninguna desestabilización visual.

Los resultados obtenidos en relación con la viscosidad se presentan en la tabla 20 junto con los valores de viscosidad para dos referencias comerciales (Danup y Actimel). Como se puede observar, al inicio del estudio de vida útil (día 0) la viscosidad de las muestras 1D y 1A fue muy parecida y, la de la muestra 2A fue mucho menor. Sin embargo, durante el seguimiento de vida útil hasta el día 40, la muestra 1D evolucionó de manera diferente alcanzando viscosidades muy superiores a la de las otras muestras (tabla 20 y figura 47). La muestra 1A permaneció con unos valores de viscosidad prácticamente iguales a los del inicio del seguimiento y, la muestra 2A evolucionó ligeramente aumentando su viscosidad con el transcurso del tiempo.

Comparando las muestras de hidrolizados de clara de huevo elaboradas con las referencias comerciales (sin saber en qué momento de su vida útil fueron analizadas), se observa que a excepción de la muestra 1D a día 40, las muestras de hidrolizado de clara de huevo presentaron una viscosidad inferior a las de las referencias comerciales.

Tabla 20. Resultados viscosidad - curva de flujo: muestra 1D, muestra 1A y muestra 2A

Muestra	Día	Temperatura (°C)	$\eta_0$ (cP)	$\eta_{50}$ (cP)	$\eta_{90}$ (cP)
Muestra 1D	0	10	1.561	142	103
	40	10	5.673	550	339
Muestra 1A	0	10	1.858	129	93
	40	10	1.088	131	97
Muestra 2A	0	10	523	20	14
	40	10	708	36	26
Danup	--	10	2.520	339	276
Actimel	--	10	2.309	143	97

A continuación, se muestran las curvas de flujo obtenidas en el reómetro para cada una de las muestras a día 0 y a día 40 (figura 47). Este análisis corrobora lo observado en el estudio de viscosidad, y como se comentó anteriormente, la muestra que sufrió un incremento de

viscosidad mayor fue la muestra 1D mientras que las muestras 1A y 2A fueron más estables y sufrieron solo un ligero aumento de viscosidad. Este incremento de la viscosidad, en el caso de la muestra 1A únicamente se aprecia en condiciones de reposo ( $\eta_0$ ) debido seguramente a la estructura de tipo gel formada inicialmente como se explicó anteriormente. En el resto de las muestras, al romperse la estructura de tipo gel formada, las muestras presentaron una viscosidad ligeramente superior a la inicial en el caso de la muestra 2A y, bastante superior en el caso de la muestra 1D.

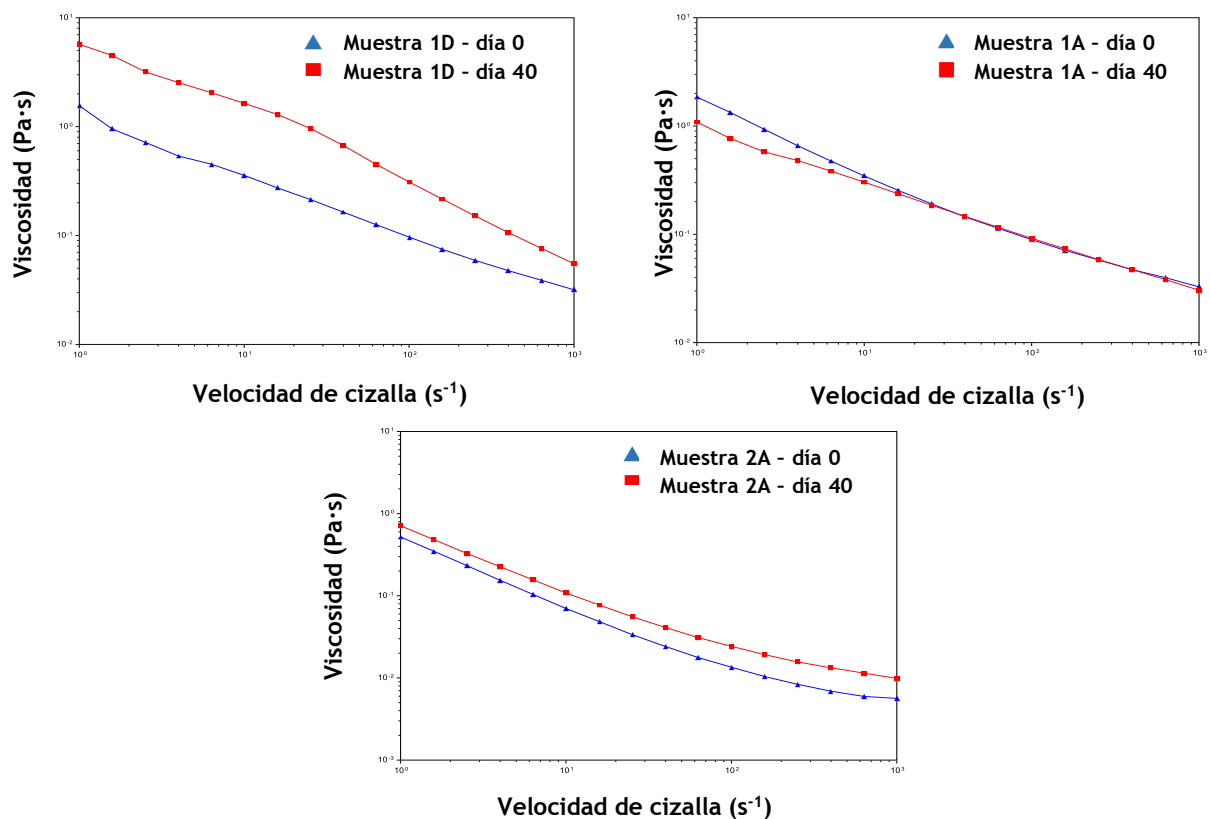
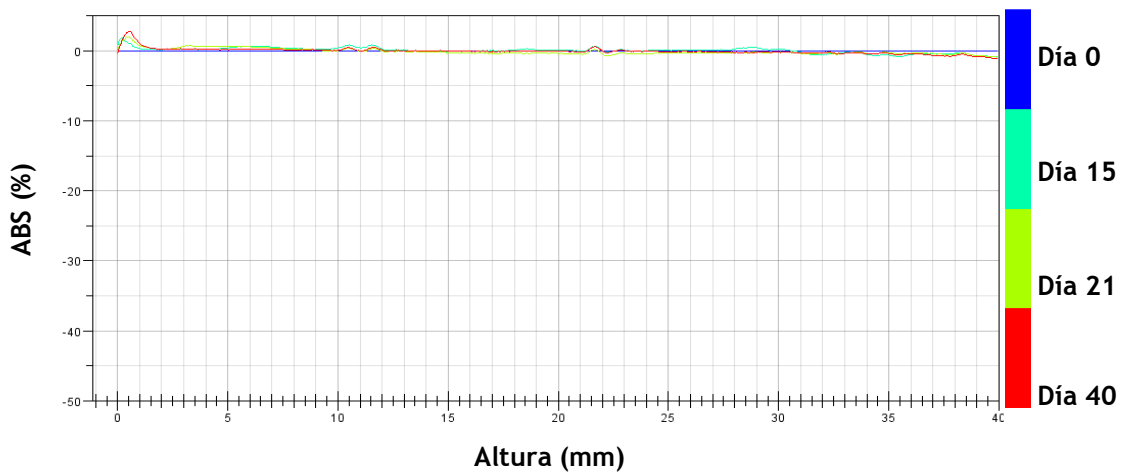


Figura 47. Evolución viscosidad - curva de flujo a 10°C: Muestra 1D - arriba izq., Muestra 1A - arriba drch. y Muestra 2A - abajo

A continuación, se presentan los resultados obtenidos tras realizar el estudio de estabilidad de fases, para lo que se llevaron a cabo medidas de la turbidez con las muestras almacenadas en refrigeración durante el estudio de vida útil. Se muestra el perfil de BS para cada uno de los hidrolizados elaborados en la figura 48 (neutro descendente – muestra 1D), figura 49 (neutro ascendente – muestra 1A) y figura 50 (ácido descendente – muestra 2A). Como se puede

observar, la muestra 1D apenas sufrió variación durante el seguimiento de vida útil. La única característica que presentó fue una ligera clarificación apenas perceptible a nivel visual. Esto pudo ser debido a la formación de una estructura tipo gel mayor que en el resto de las muestras durante los primeros 15 días y que no permitió el movimiento de las partículas dentro de la muestra (figura 48).



**Figura 48.** Hidrolizado tratado térmicamente a temperatura de pasteurización en un intercambiador tubular (muestra 1D)

En las otras dos muestras (muestra 1A y muestra 2A) se apreció con mayor intensidad la clarificación superior y sedimentación, siendo ambas ligeramente superiores en la muestra 2A. En estas dos muestras, el gel formado no fue tan firme como el de la muestra 1D, de ahí que las partículas posiblemente presentaran un mayor movimiento dentro de la muestra durante el tiempo que se prolongó el estudio de la vida útil de los productos.

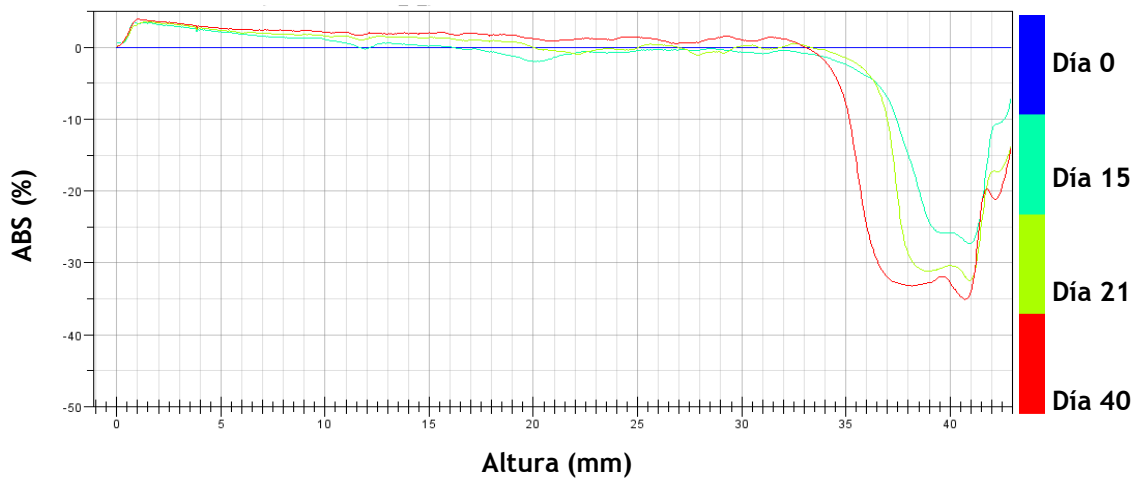


Figura 49. Hidrolizado tratado térmicamente a temperatura de pasteurización en un intercambiador tubular (muestra 1A)

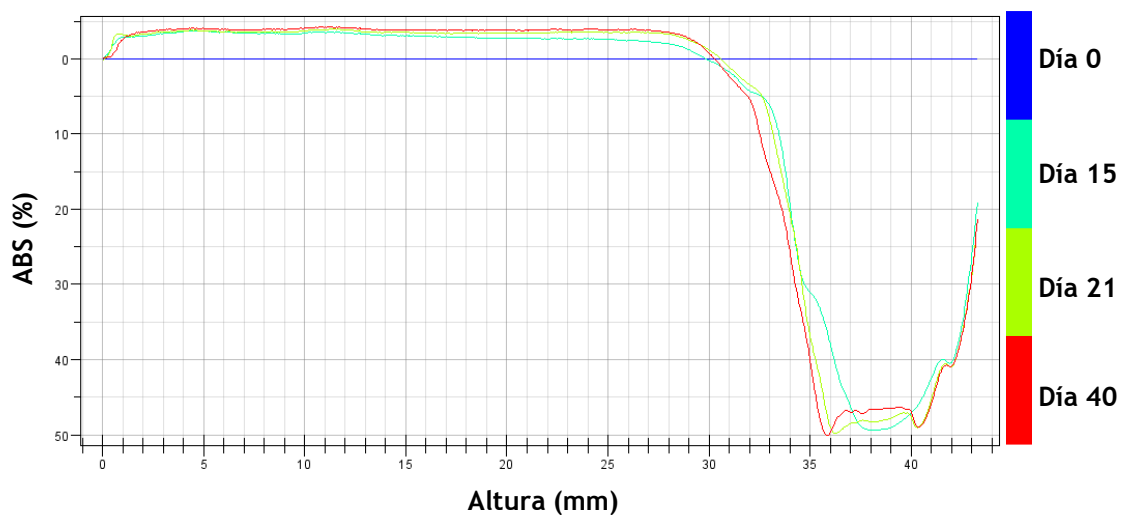


Figura 50. Hidrolizado tratado térmicamente a temperatura de pasteurización en un intercambiador tubular (muestra 2A)

Estos resultados concuerdan con lo observado visualmente en las muestras analizadas. En la figura 51 se presenta una imagen del aspecto de las muestras pasteurizadas a final del estudio de la vida útil (día 40), en la que se observa que la muestra 1D apenas sufrió variación en la estabilidad.



Figura 51. Hidrolizados tratados térmicamente a temperatura de pasteurización en un intercambiador tubular (muestra 1D, muestra 1A y muestra 2A) tras 40 días almacenadas en refrigeración

Los resultados del análisis microbiológico realizado al final del estudio de vida útil, a día 40, en las diferentes muestras se presentan en la tabla 21. Se observó crecimiento de aerobios mesófilos tanto en la muestra 1D como en la 1A; no obstante, el recuento es mucho superior en la muestra 1D a pesar de que ambas muestras fueron preparadas y conservadas de igual forma a excepción del modo de homogeneización realizado en cada una de ellas. Esto nos lleva a pensar que en algún punto, seguramente en el envasado, la muestra 1D sufrió alguna pequeña contaminación, de ahí el mayor recuento. No se observó crecimiento de mesófilos en la muestra 2A. Esta muestra, aunque también está pasteurizada, tiene un pH ácido que favorece la conservación de la misma evitando el crecimiento de estos microorganismos. En todas las muestras (1A, 1D y 2A) se cumplió la legislación vigente en ovoproductos en cuanto al recuento total de mohos y levaduras, *Salmonella* spp., Enterobacterias y *Listeria monocytogenes*.

Tabla 21. Resultados del análisis microbiológico para la muestra 1D, muestra 1A y muestra 2A (día 40)

Día	Muestra	Mohos y levaduras (ufc/mL)	Recuento total de aerobios mesófilos (ufc/g)	Salmonella spp.	Enterobacterias (ufc/g)	Listeria monocytogenes
40	Muestra 1D	< 1	700.000.000	Ausencia en 25 g	< 1	Ausencia en 25 g
	Muestra 1A	< 1	50	Ausencia en 25 g	< 1	Ausencia en 25 g
	Muestra 2A	< 1	< 1	Ausencia en 25 g	< 1	Ausencia en 25 g

De los resultados obtenidos, se considera que la muestra que mejor estabilidad microbiológica presentó fue la muestra 1D a pesar de que al final de la vida útil presentaba recuento microbiológico (aerobios mesófilos) y una viscosidad bastante elevada. A priori, estos aspectos no se consideraron motivos suficientes para descartar esta muestra como favorita ya que, como se comentó anteriormente, el aspecto microbiológico se consideró que venía de una contaminación posterior al tratamiento térmico ya que, esta muestra sufrió el mismo tratamiento térmico que la muestra 1A, y siendo iguales salvo por el tipo de homogeneización que no afecta al aspecto microbiológico, los resultados de microbiología deberían de ser iguales en ambas muestras. De igual forma, esta contaminación pudo afectar en cierta medida al incremento de viscosidad en la muestra. Por otro lado, aunque se trata de una muestra con una viscosidad relativamente elevada (sobre todo en condiciones de reposo), se consideró que todavía era viable su utilización como un posible ingrediente a la hora de preparar otros productos derivados que suelen presentar también una cierta viscosidad. Además, cabe destacar que a la hora de preparar estos otros productos el hidrolizado sería sometido a procesos de mezcla y cizallas que romperían la estructura de este y por lo tanto, disminuiría su viscosidad.

#### 4.2.2. Intercambiador tubular – temperatura ultra alta (UHT)

Con el objetivo de desarrollar un ingrediente con tratamiento térmico a temperatura ultra alta (UHT) que permitiera disponer de un hidrolizado con una mayor vida útil y de fácil manejo al no necesitar transporte ni almacenamiento en refrigeración (como si necesitan los ingredientes pasteurizados) se llevó a cabo un estudio para evaluar la posibilidad de utilizar este tipo de tratamiento térmico.

En el apartado anterior, en la prueba de pasteurización y posterior prueba sensorial se seleccionó el ingrediente con pH neutro homogeneizado en descendente (muestra 1D) como favorita por sus características organolépticas y fisicoquímicas (a pesar de las características comentadas anteriormente relativas a la viscosidad y recuento de aerobios mesófilos). Es por esto por lo que se decidió realizar este ensayo sobre el hidrolizado preparado con estas mismas características a excepción del tratamiento térmico, que en este caso sería tipo UHT en lugar de un tratamiento de pasteurización (muestra 3D). En el caso de los hidrolizados ácidos, por el propio pH del producto, un tratamiento térmico tan intenso podría provocar una gran desestabilización proteica. Además, la relación tiempo y temperatura del tratamiento térmico necesaria para reducir el crecimiento microbiano en un producto ácido es muy inferior, que en el caso de un producto de pH neutro, por lo que este tipo de tratamiento no tiene sentido para este tipo de productos. En concreto, el tratamiento térmico seleccionado fue de 140 °C durante 3 segundos con homogeneización descendente a 150+50 bares de presión (muestra 3D, tabla 22).

**Tabla 22. Parámetros establecidos para el tratamiento térmico del hidrolizado elaborado y determinaciones analíticas**

Equipamiento	Muestra	Dilución (%)	pH <sub>final</sub>	TT (°C)	H	Presión (bar)	Determinaciones analíticas
Intercambiador tubular  UHT	Muestra 3D	50	7,0	140 (3s)	D	150+50	Tamaño de partícula Sensorial Viscosidad

TT: tratamiento térmico; H: homogeneización; D: descendente; A: ascendente

Los resultados obtenidos se compararon con la muestra 1D, apartado 4.2.1, tratada térmicamente en el intercambiador tubular pero, a temperatura de pasteurización y con homogeneización en modo descendente (presión de 150+50 bares). Comparando el tamaño de partícula de ambas muestras (tabla 23), se observa como un mismo hidrolizado tratado térmicamente en un mismo equipo y con el mismo tipo de homogeneización, presenta un menor tamaño de partícula si se somete a un tratamiento térmico a temperatura ultra alta que si simplemente es pasteurizado. Esto en principio podría suponer una mejora tanto en el manejo y conservación del hidrolizado, como ya hemos mencionado anteriormente, pero también en sus propiedades fisicoquímicas (especialmente a nivel de estabilidad de fases).

Tabla 23. Resultados obtenidos del análisis de tamaño de partícula en micras ( $\mu\text{m}$ )

Muestra	D(4,3)	d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)
Muestra 1D	18,63	2,85	10,63	27,35
Muestra 3D	0,53	0,13	0,28	1,10

Los resultados obtenidos en el análisis sensorial realizado determinaron que la muestra 3D presentó un buen aspecto visual, baja viscosidad y textura lisa (sin astringencia ni arenosidad en boca). Sin embargo, uno de los aspectos más destacados por los catadores fue el intenso olor a huevo “cocido” que presentaba la muestra. No obstante, al dejar airear la muestra durante unos minutos, ese olor se iba mitigando hasta desaparecer casi por completo. Este aspecto no había ocurrido anteriormente en ninguna de las muestras preparadas y, está relacionado con la temperatura de tratamiento térmico. En este caso, con la temperatura seleccionada se produce la rotura de la estructura terciaria de las proteínas presentes en la clara de huevo liberándose los iones sulfuro de estos aminoácidos. Se forman grupos sulfidrilos ( $\text{SH}^-$ ) y sulfuro de hidrógeno ( $\text{SH}_2$ ) causantes de ese olor característico (Lucas, 2010).

Por último, en la tabla 24 se muestran los resultados del análisis de viscosidad realizado a la muestra 3D siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.3. Además, en la tabla 24 se han incluido también los resultados de viscosidad obtenidos de dos muestras comerciales. Como se puede observar, la viscosidad del hidrolizado está muy por debajo tanto de la muestra 1D como de las referencias comerciales como Danup y Actimel, no obstante, hay que tener en cuenta que este hidrolizado será empleado como ingrediente para la elaboración de productos similares a las referencias comerciales incluidas. Con la adición de ingredientes texturizantes, la viscosidad aumenta, por lo tanto, será en ese punto cuando haya que comparar la viscosidad final de los productos elaborados con los de las referencias comerciales aquí incluidas.

Tabla 24. Resultados viscosidad - curva de flujo: muestra 1D, muestra 3D y referencias comerciales (Danup y Actimel)

Muestra	Temperatura (°C)	$\eta_1$ (cP)	$\eta_{50}$ (cP)	$\eta_{90}$ (cP)
Muestra 1D	10	1.561	142	103
Muestra 3D	10	95,1	14,5	12,9
Danup	10	2.520,0	339,4	276,2
Actimel	10	2.309	143,1	97,3

En la tabla 25 se indican los análisis realizados durante el seguimiento de vida útil realizado a la muestra 3D durante 150 días a temperatura ambiente.

Tabla 25. Hidrolizado seleccionado para el estudio de su vida útil durante 150 días a temperatura ambiente

Equipamiento	Muestra	Dilución (%)	pH <sub>final</sub>	TT (°C)	H	Presión (bar)	Determinaciones analíticas
Intercambiador tubular UHT	Muestra 3D	50	7,0	140 (3s)	D	150+50	Sensorial Estabilidad de fases Microbiología

TT: tratamiento térmico; H: homogeneización; D: descendente; A: ascendente

Durante el seguimiento de vida útil, se llevó a cabo un punto de control a día 40, y se observó que la muestra se encontraba totalmente gelificada. Al agitar la muestra, esta estructura se rompía recuperando la forma líquida y poco viscosa que presentaba inicialmente, de la misma forma que ocurría en las preparaciones anteriores pasteurizadas. Sin embargo, durante el seguimiento de estabilidad de fases del hidrolizado tratado térmicamente a alta temperatura (muestra 3D) no se observó evolución alguna (figura 52). Esta estructura de tipo gel observada a día 40 es la que evitó el movimiento de las partículas en la muestra y por eso, a nivel instrumental no se detectaron desestabilizaciones. A la vista de estos resultados se decidió cancelar el estudio de vida útil y no continuar con el seguimiento durante mas tiempo, ya que en esas condiciones no parecía viable el manejo de este producto a nivel industrial con las características fisicoquímicas que ya presentaba tras 40 días de seguimiento. Es importante destacar, sin embargo, que el intenso olor a huevo que se había observado en esta muestra había desaparecido casi por completo tras los 40 días de seguimiento.

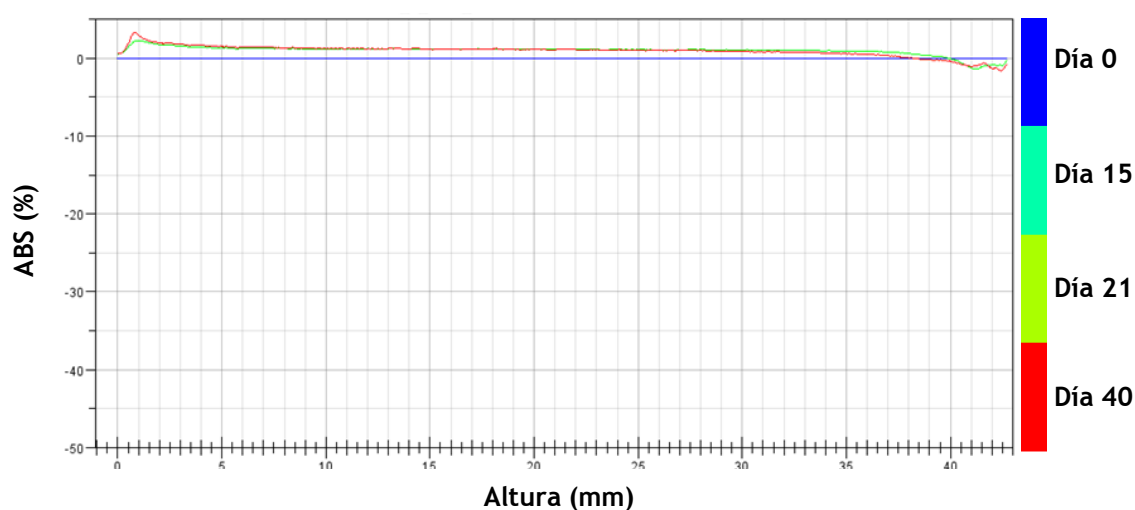


Figura 52. Perfil de backscattering - Hidrolizado tratado térmicamente a alta temperatura en un intercambiador tubular (muestra 3D)

Los resultados del análisis microbiológico a día 40 para la muestra 3D se presentan en la tabla 26. Como se puede observar, el hidrolizado cumplía con todos los requisitos legislativos a nivel microbiológico hasta el día 40 de seguimiento.

Tabla 26. Resultados del análisis microbiológico para la muestra 3D (día 40)

Día	Muestra	Mohos y levaduras (ufc/mL)	Recuento total de aerobios mesófilos (ufc/g)	Salmonella spp.	Enterobacterias (ufc/g)	Listeria monocytogenes
40	Muestra 3D	< 1	< 1	Ausencia en 25 g	< 1	Ausencia en 25 g

Con los resultados obtenidos a nivel visual y de estabilidad de fases a día 40, se decidió cancelar el seguimiento de vida útil de la muestra previsto hasta el día 150 a pesar de que, a nivel microbiológico, como era de esperar por el tipo de tratamiento aplicado, se encontraba en perfecto estado. A diferencia de la ligera estructuración sufrida en las muestras elaboradas en el intercambiador de placas (apartado 4.2.1), esta muestra (3D) a día 40 estaba prácticamente gelificada por completo y se consideró que no era viable su manejo a nivel industrial como posible ingrediente para la elaboración de otros productos derivados. No obstante, se continuará en un futuro en su desarrollo, estudiando cómo evitar esta gelificación para una mayor comodidad en la comercialización del hidrolizado.

#### 4.2.3. Intercambiador de placas – pasteurización

Se continuó con el escalado del proceso empleando otro equipamiento para la obtención del hidrolizado a nivel semiindustrial. Hasta ahora, en los resultados obtenidos se había empleado un intercambiador tubular, sin embargo, los intercambiadores de placas son habituales en las empresas dedicadas a la obtención de ovoproductos como es el caso de Granja Campomayor. Pensando en que la empresa pudiese emplear el equipamiento ya disponible en sus instalaciones para la elaboración y obtención del hidrolizado de clara de huevo a nivel industrial, se llevaron a cabo pruebas en un intercambiador de placas con un tratamiento térmico de pasteurización. En este caso, la variable de dilución se mantuvo en un 50 % ya que, como se adelantó en el apartado 4.1.7, es necesaria esta dilución para poder procesar térmicamente el hidrolizado sin que los agregados formados durante el tratamiento térmico provoquen la obturación de los mismos (Nawaz et al., 2021; Manassero et al., 2020; Singh et al., 2019;).

En este estudio, las muestras fueron elaboradas todas a un pH neutro de 7,0 y homogeneizadas en modo ascendente (antes del tratamiento térmico) ya que era esta la configuración disponible en las instalaciones de la empresa, aunque en los estudios realizados previamente en el intercambiador tubular con tratamiento térmico de pasteurización, se obtuvieron mejores resultados, especialmente a nivel sensorial, con la homogeneización en modo descendente. Se realizaron dos bloques de muestras a dos temperaturas diferentes de tratamiento térmico: 85 °C (muestras 4A - 8A) o 70 °C (muestras 9A - 11A). La primera temperatura se seleccionó para poder comparar las muestras obtenidas en el intercambiador tubular a esa misma temperatura (apartado 4.2.1) y, la segunda se seleccionó por ser una de las temperaturas de los programas utilizados a nivel industrial por la empresa. En el primer bloque de ensayos realizados a 85 °C se probaron diferentes presiones de homogeneización (150, 200 y 500 bares) en una única etapa y con un tiempo de mantenimiento de 24 segundos (muestras 4A, 5A y 6A). Para comparar el efecto de la presión de homogeneización en dos etapas en lugar de en una sola etapa, se preparó la muestra 7A con las mismas características que las anteriores salvo que fue sometida a una presión de homogeneización de 250 bares, pero en dos etapas (150+100 bares). Dentro de este grupo de muestras, se elaboró también una muestra con el objetivo de comparar el efecto de aumentar el tiempo de mantenimiento (pasando de 24 a 300 segundos) en el tamaño de partícula del producto final (muestra 8A), manteniendo la temperatura de tratamiento térmico (85 °C). En el segundo bloque de muestras, realizadas a

70 °C, se empleó un tiempo de mantenimiento de 300 segundos. Se elaboraron las muestras 9A y 10A con las mismas características y una presión de homogeneización de 150 y 250 bares en una única etapa, respectivamente. Para comparar el efecto de la homogeneización en dos etapas dentro de este bloque, se preparó la muestra 11A aplicando una presión de 150+100 bares. En la tabla 27 se resumen las muestras y tratamiento utilizados y las determinaciones analíticas realizadas en cada una de ellas.

**Tabla 27. Parámetros establecidos para el tratamiento térmico de los hidrolizados elaborados y determinaciones analíticas**

Equipamiento	Muestra	Dilución (%)	pH <sub>final</sub>	TT (°C)	H	Presión (bar)	Determinaciones analíticas
Intercambiador de placas  Pasteurización	Muestra 4A	50	7,0	85 (24s)	A	150	Tamaño de partícula Sensorial Viscosidad
	Muestra 5A	50	7,0	85 (24s)	A	250	
	Muestra 6A	50	7,0	85 (24s)	A	500	
	Muestra 7A	50	7,0	85 (24s)	A	150+100	
	Muestra 8A	50	7,0	85 (300s)	A	250	
	Muestra 9A	50	7,0	70 (300s)	A	150	
	Muestra 10A	50	7,0	70 (300s)	A	250	
	Muestra 11A	50	7,0	70 (300s)	A	150+100	

En la tabla 28 se muestran los resultados del análisis del tamaño de partícula de las diferentes muestras elaboradas.

Tabla 28. Resultados obtenidos del análisis de tamaño de partícula en micras ( $\mu\text{m}$ )

Muestra	D(4,3)	d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)
Muestra 4A	148,15	21,52	114,94	321,53
Muestra 5A	119,25	19,20	99,48	245,79
Muestra 6A	140,04	22,00	115,57	290,69
Muestra 7A	68,92	14,36	48,95	153,63
Muestra 8A	152,68	31,78	128,45	305,84
Muestra 9A	3,82	0,14	0,32	11,83
Muestra 10A	1,36	0,15	0,29	0,68
Muestra 11A	1,11	0,14	0,29	0,63

Se comprobó el efecto que tiene la presión de homogeneización en el tamaño de partícula del hidrolizado final (muestras 4A, 5A y 6A; 150, 250 y 500 bares, respectivamente) obteniéndose resultados muy similares cuando lo esperable hubiera sido una disminución del tamaño de partícula en las muestras a medida que la presión de homogeneización se aumentaba. Se comprobó también que la homogeneización en dos etapas (muestra 7A) ocasionó una disminución considerable del tamaño de partícula. En la figura 53 se muestra la representación gráfica de los resultados del tamaño de partícula para las muestras 5A y 7A, y se observa un desplazamiento de la curva hacia la izquierda en el caso de la muestra 7A. Estos resultados permiten confirmar que la homogeneización en dos etapas (muestra 7A) favorece la disminución del tamaño de partícula en el hidrolizado final.

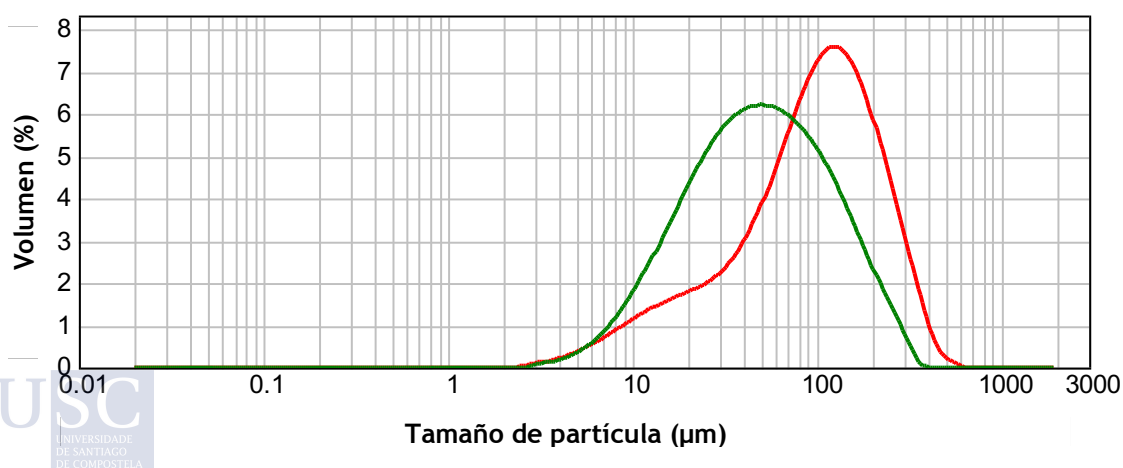


Figura 53. Distribución del tamaño de partícula de la muestra 5A (rojo) y muestra 7A (verde)

Cuando se compararon los resultados obtenidos aplicando diferentes temperaturas de tratamiento térmico, muestra 8A (85 °C) y muestra 10A (70 °C), se observó que a mayor temperatura de tratamiento se producía un aumento del tamaño de partícula en el producto final, resultado también confirmado en la gráfica de distribución (figura 54) debido probablemente a la formación de una mayor cantidad de agregados y/o de mayor dureza con mayor temperatura.

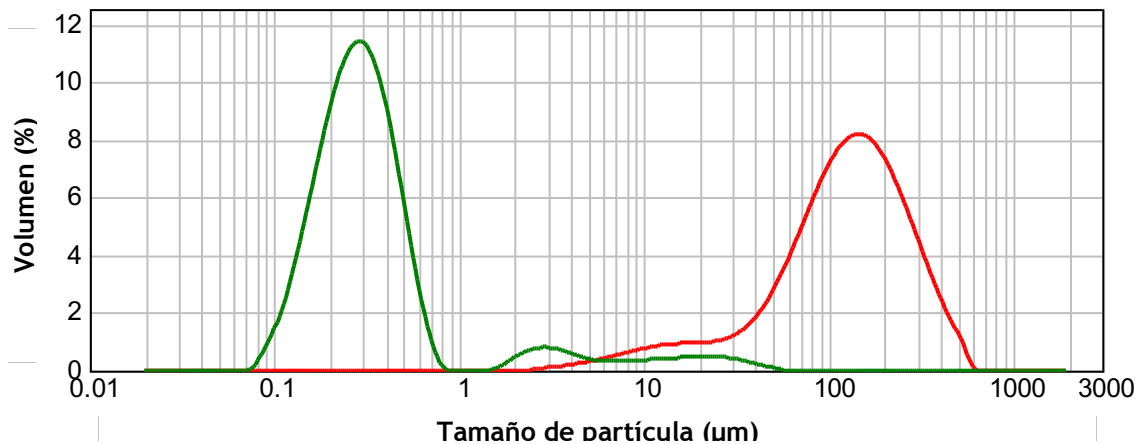


Figura 54. Distribución del tamaño de partícula - Muestra 8A (rojo), Muestra 10A (verde)

Al comparar el efecto de la presión de homogeneización en el segundo bloque de ensayos realizados a 70 °C, se observó también una disminución del tamaño de partícula en la muestra 10A realizada a más presión que en la muestra 9A (muestra 9A - 150 bares vs muestra 10A - 250 bares). Sin embargo, en cuanto a la homogeneización en una o en dos etapas (muestra 10A - 250 bar vs muestra 11A - 150+100 bares), a diferencia del caso anterior del primer bloque de experimentos realizados a 85 °C donde sí se observó una disminución clara del tamaño de partícula tras realizar la homogeneización en dos etapas, a 70 °C, esta disminución es poco relevante y se obtuvieron unos resultados muy similares independientemente de llevar a cabo la homogeneización en una o dos etapas.

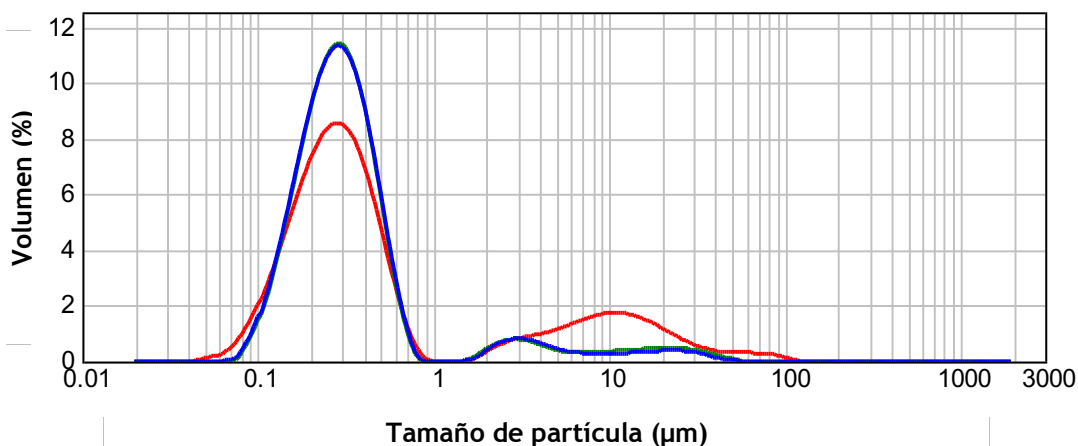


Figura 55. Distribución del tamaño de partícula - Muestra 10A (rojo) y Muestra 11A (azul)

Los resultados obtenidos tras realizar el análisis sensorial indicaron que las muestras 4A, 5A y 6A presentaban una elevada astringencia y arenosidad en boca muy similar entre ellas. Sin embargo, la muestra 7A que estaba elaborada con los mismos parámetros que la 5A pero con la presión de homogeneización en dos etapas (150+100 bares) en lugar de en una (250 bares) ya no presentaba estas características. Tiene sentido ya que, como se vio en los resultados del análisis de tamaño de partícula, el realizar la homogeneización en dos etapas el tamaño de partícula medio se ve disminuido y por lo tanto, la percepción en boca debería de mejorar, como es el caso. Estas mismas características (astringencia y arenosidad) fueron observadas en la muestra 8A elaborada a la misma temperatura de tratamiento que las anteriores (85 °C) pero con un tiempo de mantenimiento superior (300 segundos). En el resto de las muestras elaboradas con un tratamiento térmico de 70 °C durante 300 segundos (muestra 9A, 10A y 11A) no se apreció ni arenosidad ni astringencia independientemente de la presión de homogeneización aplicada o de si se realizó en una o en dos etapas.

En base a los resultados obtenidos del análisis de tamaño de partícula y la evaluación sensorial se seleccionaron las muestras 7A, 10A y 11A para realizar el análisis de viscosidad a través de la curva de flujo. En la tabla 29 se muestran los resultados del análisis de viscosidad para las muestras seleccionadas y su representación gráfica en la figura 56. Fue la muestra 11A elaborada a menor temperatura, 70 °C durante 300 segundos y homogeneizada a 250 bares en dos etapas la que presentó una viscosidad considerablemente más baja. Entre la muestra 7A y

10A no se apreciaron diferencias importantes, ni simulando condiciones de reposo ( $\eta_1$ ) ni en el momento de consumo ( $\eta_{90}$ ).

Tabla 29. Resultados viscosidad - curva de flujo: muestra 7A, muestra 10A y muestra 11A

Muestra	Temperatura (°C)	$\eta_1$ (cP)	$\eta_{50}$ (cP)	$\eta_{90}$ (cP)
Muestra 7A	10	2236	198	147
Muestra 10A		3267	184	121
Muestra 11A		171	24	16

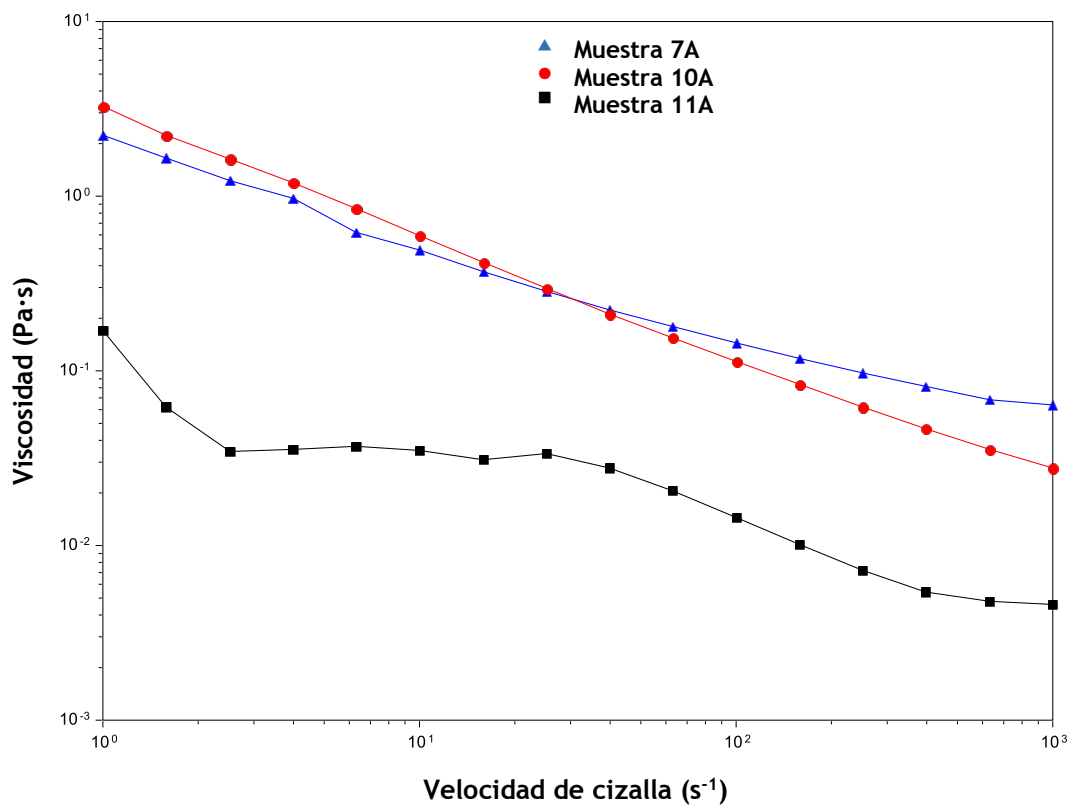


Figura 56. Viscosidad - curva de flujo a 10°C: muestra 7A, muestra 10A y muestra 11A

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos anteriormente, se decidió seleccionar la muestra 11A por sus mejores características organolépticas, menor tamaño de partícula y menor viscosidad para el seguimiento de vida útil. En la tabla 30 se indican las determinaciones

realizadas durante el seguimiento de vida útil de la muestra durante 40 días a temperatura de refrigeración (4 – 6 °C).

**Tabla 30. Hidrolizado seleccionado para su caracterización fisicoquímica y microbiológica durante el estudio de vida útil**

Equipamiento	Muestra	Dilución (%)	pH <sub>final</sub>	TT (°C)	H	Presión (bar)	Determinaciones analíticas
Intercambiador de placas Pasteurización	Muestra 11A	50	7,0	70 (300s)	A	150+100	Sensorial Estabilidad de fases Microbiología

Durante el seguimiento de vida útil realizado a nivel sensorial, se comprobó que la muestra seguía manteniendo las buenas características organolépticas observadas al inicio sin astringencia ni arenosidad, baja viscosidad en boca y sin olor a huevo “cocido”. A nivel visual, únicamente se aprecia una ligera clarificación en cuanto a desestabilización de la muestra al finalizar el estudio de vida útil.

Del seguimiento de estabilidad de fases a temperatura de refrigeración durante 40 días, se observó que existía una evolución en las fases del producto (clarificación y sedimentación) ya a partir del día 7 (figura 57). Con el paso del tiempo, se observó que estos fenómenos siguieron evolucionando, aunque, a nivel de intensidad, no se apreció una gran diferencia (el BS no aumentó). Por último, hay que comentar que la intensidad de la sedimentación a día 40 no alcanzó un valor suficiente para que fuera percibida a nivel visual. Por el contrario, la clarificación ya presentaba una cierta intensidad y era ligeramente perceptible a nivel visual (figura 58).

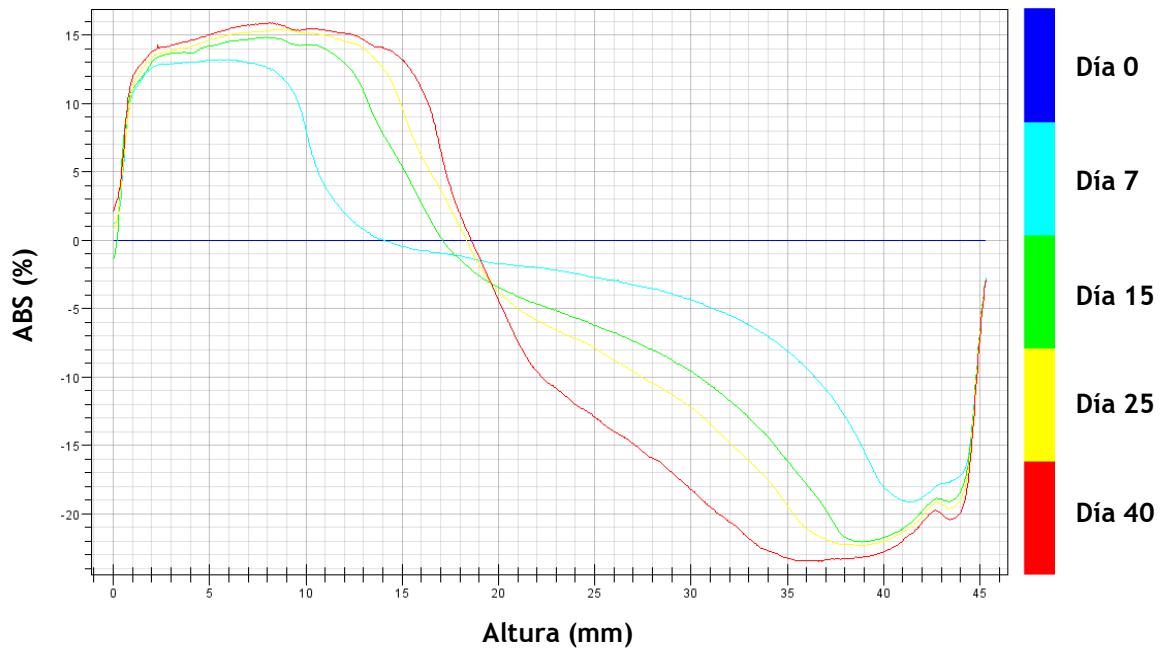


Figura 57. Hidrolizado tratado térmicamente a temperatura de pasteurización en un intercambiador de placas (muestra 11A)



Figura 58. Hidrolizado tratado térmicamente a temperatura de pasteurización en un intercambiador de placas (muestra 11A) tras 40 días almacenada en refrigeración



Por último, en la tabla 31 se muestran los resultados del seguimiento microbiológico realizado al hidrolizado elaborado a lo largo de su vida útil (40 días) con resultados negativos en cuanto a la presencia de los microorganismos analizados.

Tabla 31. Resultados del análisis microbiológico para la muestra 11A (día 30)

Día	Muestra	Mohos y levaduras (ufc/g)	Salmonella spp.	Enterobacterias (ufc/g)	Listeria monocytogenes
40	Muestra 11A	< 1	Ausencia en 25 g	< 1	Ausencia en 25 g

Los resultados obtenidos tras este ensayo han demostrado que el proceso de elaboración para la muestra 11A puede ser una buena alternativa para el escalado industrial en la fabricación del hidrolizado, con unos buenos resultados a nivel organoléptico, de estabilidad de fases y microbiológicos hasta los 40 días desde su fabricación. Parece que una disminución de la temperatura de tratamiento térmico y el aumento de la duración del mismo favorecen las propiedades fisicoquímicas del producto, ya que la sensibilidad de las proteínas presentes en la clara del huevo aumenta especialmente con temperaturas superiores a los 61 °C (Damodaran & Paraf, 1997).

#### 4.2.4. Segundo tratamiento térmico

Teniendo en cuenta que el objetivo final del hidrolizado de clara de huevo obtenido a nivel semiindustrial y, posteriormente a nivel industrial, puede ser su utilización como un ingrediente más en la elaboración de otros productos derivados (salsas, cremas, helados, yogures, etc.), se decidió realizar una serie de pruebas sobre uno de los hidrolizados que mejores características fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas presentó, muestra 1D, con el objetivo de verificar que el mismo era capaz de soportar las modificaciones a las que previsiblemente será sometido para la elaboración de esos productos derivados (como cambios de pH y un nuevo tratamiento térmico). Se seleccionó la muestra 1D y no la 11A por ser el caso “más desfavorable” en cuanto a viscosidad y tratamiento térmico previo. Partimos de la hipótesis de que si la muestra 1D era capaz de resistir un segundo tratamiento térmico, la muestra 11A también lo soportaría y podría mostrar, *a priori*, incluso mejores características. Teniendo en cuenta esta hipótesis, se llevó a cabo la preparación de las muestras indicadas en la tabla 32 donde se estudió el efecto de un tratamiento térmico de iguales características al que sufrió la muestra en el primer tratamiento (muestra 1D - 2TNP) simulando el proceso de elaboración de un producto con pH neutro pasteurizado (ej. batido de cacao) utilizando el hidrolizado correspondiente a la muestra 1D como ingrediente. Además con el objetivo de simular el proceso de elaboración de un producto de larga vida y conservado a temperatura ambiente (tipo

UHT), se llevó a cabo la preparación de la muestra 1D - 2TNA, con las mismas características que la muestra anterior solo que en vez de ser sometida un tratamiento de pasteurización fue sometida a un tratamiento térmico a temperatura ultra alta. Por último, se evaluó el efecto de un segundo tratamiento térmico de pasteurización idéntico al primero, pero con acidificación previa del hidrolizado a un pH de 4,2 (muestra 1D - 2TAP). Este último estudio nos daría una idea del comportamiento del hidrolizado para elaborar productos tipo yogur que tienen un pH ácido.

**Tabla 32. Parámetros establecidos para el segundo tratamiento térmico de los hidrolizados de clara de huevo elaborados**

Equipamiento	Hidrolizado base de partida	Muestra	pH <sub>final</sub>	TT (°C)	H	Presión (bar)	Determinaciones analíticas
Intercambiador tubular	Muestra 1D	Muestra 1D - 2TNP	7,0	85 (10s)	D	150+50	Evaluación sensorial Tamaño de partícula
	Muestra 1D	Muestra 1D - 2TNA	7,0	140 (3s)	D	150+50	
	Muestra 1D	Muestra 1D- 2TAP	4,2	85 (10s)	D	150+50	

TT: tratamiento térmico; H: homogeneización; D: descendente; A: ascendente

En la evaluación sensorial realizada a las muestras obtenidas a partir de la muestra 1D sometida a un segundo tratamiento térmico se comprobó que el hidrolizado era capaz de soportarlo con las variables analizadas. Todas las muestras, tras 24 horas desde su elaboración, presentaron un buen aspecto visual, sin clarificación ni sedimentación y baja viscosidad (siendo la muestra 1D – 2TNP la menos viscosa) (figura 59). Respecto a la sensación en boca, ninguna de las muestras elaboradas presentó astringencia y/o arenosidad. No obstante, en la muestra elaborada a temperatura ultra alta (muestra 1D – 2TNA), se apreció de nuevo un ligero olor a huevo “cocido”, algo que ya fue detectado en el hidrolizado elaborado a temperatura ultra alta (muestra 3D) y que se relacionó con las altas temperaturas usadas en este tipo de tratamiento.



**Figura 59. Estado de las muestras elaboradas con un segundo tratamiento térmico sobre el hidrolizado correspondiente a la muestra 1D tras 24 horas**

Por último, en la tabla 33 se presentan los resultados del análisis del tamaño de partícula para las muestras elaboradas con un segundo tratamiento térmico y los resultados del tamaño de partícula del hidrolizado de partida (muestra 1D).

Como se puede observar, el tamaño de partícula de todas las muestras disminuyó tras el segundo tratamiento térmico. Aunque había la posibilidad de que el tamaño de partícula aumentase en el segundo tratamiento térmico por una nueva agregación de las partículas durante el mismo, parece que la homogeneización tiene mayor efecto disminuyendo el tamaño en todos los casos estudiados. No obstante, el menor tamaño de partícula se consigue en la muestra 1D - 2TNP, es decir con tratamiento térmico de pasteurización y sin acidificar, aunque podría considerarse la utilización de cualquiera de los tratamientos realizados como estrategia al segundo tratamiento térmico.

Tabla 33. Resultados obtenidos del análisis de tamaño de partícula en micras ( $\mu\text{m}$ )

Muestra	D(4,3)	d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)
Muestra 1D	18,63	2,85	10,63	27,35
Muestra 1D - 2TNP	3,635	0,124	2,097	8,681
Muestra 1D - 2TNA	8,450	2,077	4,181	10,580
Muestra 1D- 2TAP	7,436	1,714	3,885	9,978

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos parece probable que el hidrolizado de clara de huevo desarrollado a partir del protocolo de elaboración seguido para la preparación de las muestras 1D y 11A sean los más apropiados. No obstante, se considera necesario continuar con los trabajos para ver si es posible mejorar el proceso de elaboración evitando la gelificación del producto durante su vida útil con el objetivo de tener las máximas posibilidades en cuanto a equipamiento a la hora de poder fabricar el hidrolizado a nivel industrial pero, sobre todo, encaminados a obtener un hidrolizado de larga vida útil que pueda ser conservado a temperatura ambiente (UHT).

En base a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se proponen para la elaboración del hidrolizado de huevo a escala industrial los diagramas de flujo que se muestran en la figura 60 (elaborado en un intercambiador tubular) y en la figura 61 (elaborado en un intercambiador de placas).

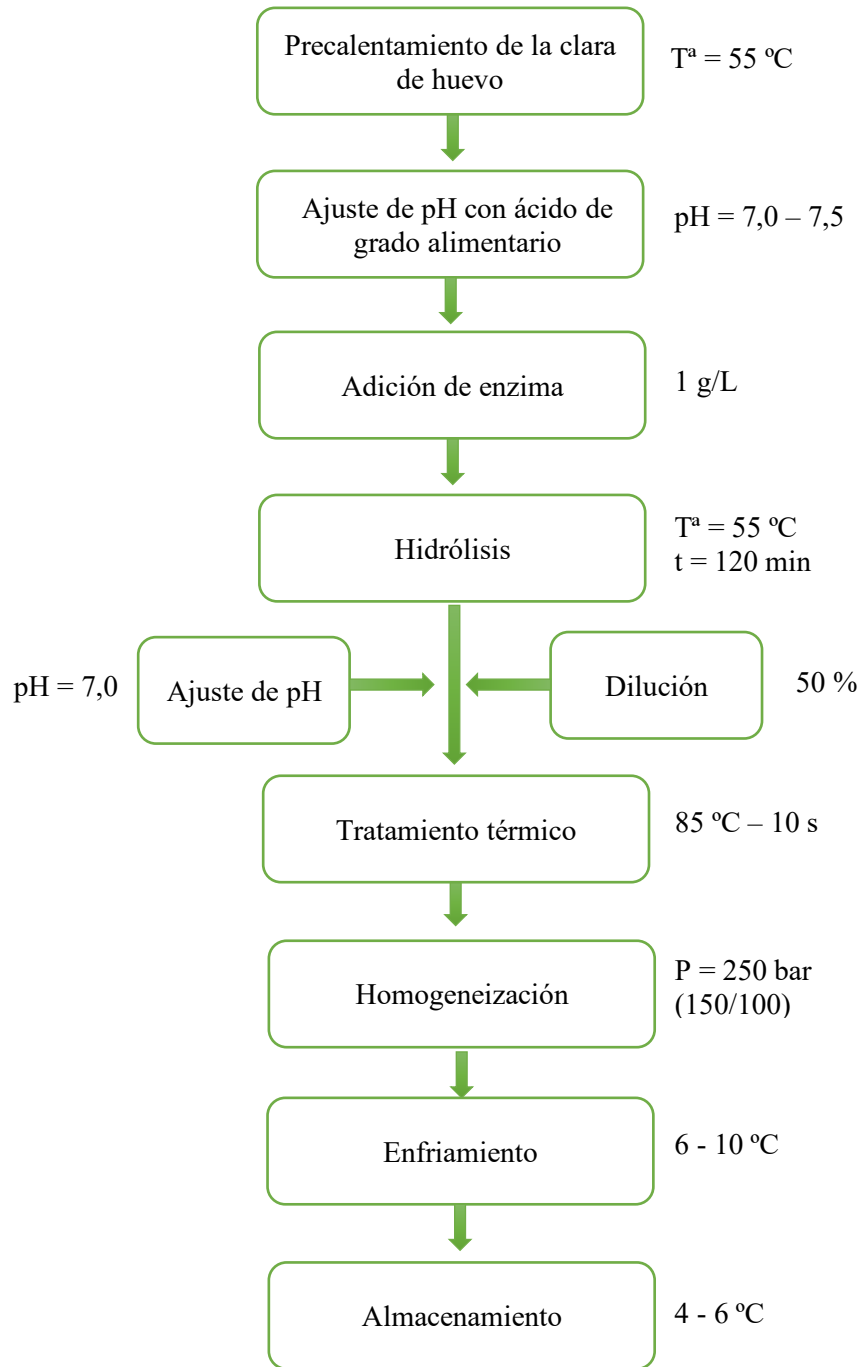


Figura 60. Diagrama de flujo para el escalado industrial del hidrolizado de clara de huevo en un intercambiador tubular

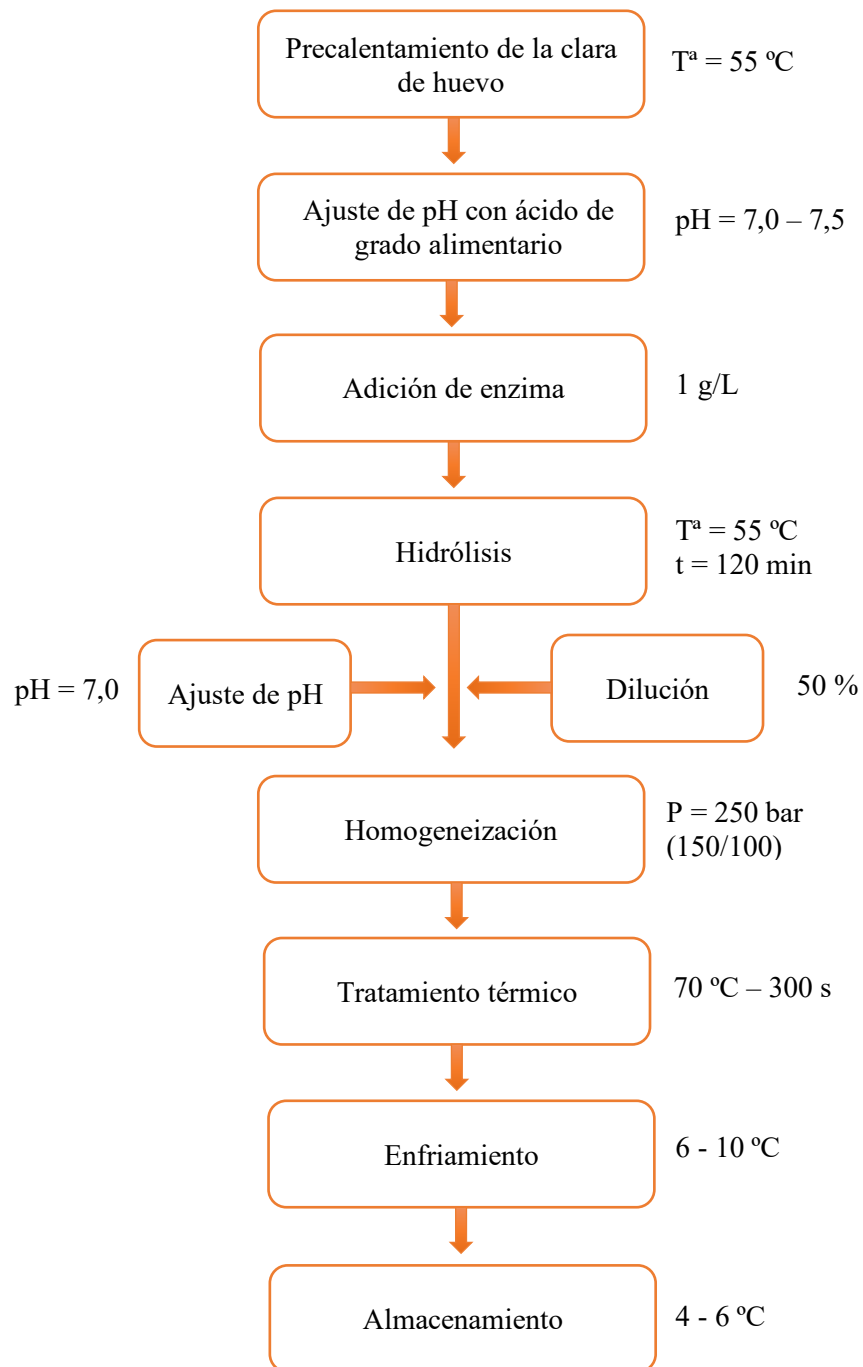


Figura 61. Diagrama de flujo para el escalado industrial del hidrolizado de clara de huevo en un intercambiador de placas

## **CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados de esta Tesis Doctoral nos han llevado a las siguientes conclusiones:

- Para conseguir un correcto protocolo de elaboración de escalado semiindustrial del hidrolizado de clara de huevo fue necesario rediseñar el protocolo de elaboración a escala laboratorio como se indica:
  - Incorporar una etapa de precalentamiento a la misma temperatura fijada para la hidrólisis de 55 °C.
  - Eliminar la agitación durante la hidrólisis y realizar la elaboración en reposo para minimizar la desestabilización proteica de la ovostransferina.
  - Modificar el ácido empleado en la patente por uno de uso más común en la industria alimentaria: ácido tartárico.
  - Se establece un pH para llevar a cabo la hidrólisis en el rango óptimo de actuación de la enzima entre 7,0 y 7,5 en lugar de 5,5 como se describe en la patente.
  - Reducir la dosis de enzima de 2 a 1 g/L, ya que no afecta al producto final y reduce los costes de fabricación.
  - El tiempo de hidrólisis se mantiene en 120 minutos como indica la patente.
  - Necesidad de incorporar una etapa de dilución del hidrolizado con agua osmotizada en un 50 % para que el producto sea procesable a nivel industrial debido a la formación de agregados durante la etapa de inactivación enzimática y tratamiento térmico del producto.
- Inclusión de una etapa de homogeneización ascendente o descendente para mejorar las características fisicoquímicas y organolépticas del producto final.

Los mejores resultados se obtuvieron con la homogeneización descendente (posterior al tratamiento térmico).

- Es posible la elaboración del hidrolizado de clara de huevo a escala semiindustrial tanto en un intercambiador de placas como en un intercambiador tubular. El hidrolizado de clara de huevo resiste temperaturas de pasteurización y de tipo UHT. En general, la homogeneización en modo descendente favorece las características finales del producto. Además, se validó que es posible reproducir las condiciones de tratamiento térmico de pasteurización y homogeneización en modo ascendente, que se encuentran disponibles en la empresa Granja Campomayor, para la elaboración del hidrolizado de clara de huevo con resultados muy satisfactorios a nivel de propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales.
- Excepto en las muestras obtenidas en el intercambiador de placas, se observa de forma general una tendencia a la gelificación en todos los hidrolizados elaborados a lo largo de su vida útil, pero todas las muestras se consideran viables a nivel industrial a pesar de esta característica, menos el hidrolizado de clara de huevo elaborado a temperatura ultra alta en el intercambiador tubular.
- El hidrolizado elaborado en un intercambiador tubular a pH neutro es capaz de resistir un segundo tratamiento térmico (tanto de pasteurización como de temperatura ultra alta), simulando su utilización como ingrediente en la elaboración de otros productos finales derivados (batidos o bebibles). También se verificó que es posible acidificar el hidrolizado de clara de huevo antes de someterlo a un segundo tratamiento térmico de pasteurización para la elaboración de productos finales derivados que tienen pH ácido (yogures o salsas).

Los trabajos planteados en esta Tesis Doctoral han servido de base para el desarrollo y escalado del hidrolizado de clara de huevo y, durante estos meses de análisis de datos y escritura, se ha continuado con la optimización de los diferentes procesos, y la empresa Granja Campomayor ha conseguido elaborar a nivel industrial, en diferentes instalaciones, un hidrolizado de clara de huevo listo para su comercialización. También se ha conseguido validar su utilización como ingrediente para la elaboración de productos similares a yogures y batidos

que, de igual forma, estarán disponibles muy pronto en el mercado. Se continúa en la actualidad con los trabajos para poder optimizar el hidrolizado tratado térmicamente a temperatura ultra alta (UHT), que fue el que presentó más problemas en cuanto a gelificación y olor a huevo cocido. No obstante, con el objetivo de disponer de un ingrediente de fácil manejo a nivel logístico y evitar la refrigeración del mismo, se ha abierto una nueva línea de investigación con el objetivo de secar el hidrolizado de clara de huevo para utilizarlo como un ingrediente en polvo mediante tecnología de secado por atomización. Este producto todavía se encuentra en las fases iniciales de su desarrollo.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 6. BIBLIOGRAFÍA


Adler-Nissen, J. & Olsen, H.S. (1979). The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. En: Functionality and protein structure. vol. 92. *Functionality and protein structure* (pp. 125–146). American Chemical Society.

Amiot, J., Germain, L., Turgeon, S., Lemay, M., Ory-Salam, C., & Auger, F.A. (2004). Peptides from milk protein hydrolysates to improve the growth of human keratinocytes in culture. *International Dairy Journal*, 14 (7), 619–626.

Andres, C. (1985). Acidulants. Flavor, preserve, texturize and leaven foods. *Food Processing*, 46 (5), 52-54.

Arnold, M.H.M. (1975). *Acidulants for foods and beverages*. London: Food Trade Press.

Asociación Española de Industrias de Ovoproductos (INOVO). (2011). *Caracterización comercial de ovoproductos líquidos y cocidos*. Madrid: Inovo.

 Baláž, M. (2014). Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science. *Acta biomaterialia*, 10 (9), 3827-3843.

Barbiroli, A., Marengo, M., Fessas, D., Ragg, E., Renzetti, S., Bonomi, F., et al. (2017). Stabilization of beta-lactoglobulin by polyols and sugars against temperature-induced denaturation involves diverse and specific structural regions of the protein. *Food Chemistry*, 234 (1), 155-162.

Barroeta Lajusticia, A.C. (2001). Formación del huevo. En: Instituto de estudios del huevo. *Lecciones sobre el huevo* (pp. 45- 54.). Madrid: Instituto de estudios del huevo.

Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA) (2021). (Consultada el 14 de enero de 2021 a las 17:25). Datos disponibles en: <https://www.bedca.net/bdpub/index.php>

Benedé, S & Molina, E. (2020). Chicken Egg Proteins and Derived Peptides with Antioxidant Properties. *Foods*, 9, 735-751.

Benítez, R., Ibarz, A. & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42 (2), 227-236.

Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., et al. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*, 118, 559 – 565.

Brenntag Food & Nutrition (2021). (Consultada el 21 de febrero de 2021 a las 10:05). Recuperado de: <https://food-nutrition.brenntag.com/global/es/product-range/food-safety-shelf-life/acidulants/>

Brown-Esters, O., Mc Namara, P., & Savaiano, D. (2012). Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. *International Dairy Journal*, 22 (2), 98-103.

Brul, S. & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50 (1-2), 1-17.

Carrillo, W., Gómez-Ruiz, J.A., Miralles, B., Ramos, M., Barrio, D. & Recio, I. (2016). Identification of antioxidant peptides of hen egg-white lysozyme and evaluation of inhibition of lipid peroxidation and cytotoxicity in the zebrafish model. *European Food Research and Technology*, 242 (10), 1777-1785.

Castañón, L.A., Hidalgo Castro, E.M., del Río Navarro, B.E. & Sienna Monge, J.J. (2005). Alergia a la proteína de la leche de vaca. *Revista Alergia México*, 52 (5), 206-212.

Chang, O.K., Ha, G.E., Han, G.S., Seol, K.H., Kim, H.W., Jeong, S.G. et al. (2013). Novel antioxidant peptide derived from the ultrafiltrate of ovomucin hydrolysate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61 (30), 7294-7300.

Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D. (1989). Los principales sistemas proteicos alimenticios. En: Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D. *Proteínas alimentarias: Bioquímica, Propiedades funcionales, Valor nutritivo, Modificaciones químicas* (pp. 167-177). Zaragoza: Acibria.

Chen, C. & Chi, Y.J. (2012a). Antioxidant, ACE inhibitory activities and functional properties of egg white protein hydrolysate. *Journal of Food Biochemistry*, 36, 383-394.



Chen, C., Chi, Y.J., Zhao, M.Y. & Xu, W. (2012b). Influence and degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. *Food Science and Biotechnology*, 21, 27-34.

Costell, E., Tárrega, A. & Bayarri, S. (2010). Food acceptance: the role of consumer perception and attitudes. *Chemosensory Perception*, 3 (1), 42-50.

Cui, Q., Sun, Y., Cheng, J. & Guo, M. (2022). Effect of two-step enzymatic hydrolysis on the antioxidant properties and proteomics of hydrolysates of milk protein concentrate. *Food Chemistry*, 366, 130711-130720.

Daher, D., Deracinois, B., Courcoux, P., Baniel, A., Chollet, S., Froidevaux, R. et al. (2021). Sensopeptidomic kinetic approach combined with decision trees and random forests to study the bitterness during enzymatic hydrolysis kinetics of micellar caseins. *Foods*, 10, 1312- 1327.

Damodaran, S. & Paraf, A. *Food proteins and their applications*. Marcel Dekker, Inc. New York (1997).

Damrongsakkul, S., Ratanathampan, K., Komolpis, K. & Tanthapanichakoon, W. (2008). Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14 (2), 202–206.

Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B. & López-Fandiño, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67 (9), 1939-1944.

Departamento Gestión y Transferencia Tecnológica para el Desarrollo Local, Gerencia de Tecnología y Gestión & Laboratorio Tecnológico del Uruguay. (2015). *Guía para el desarrollo de producto alimenticios*. (1ª ed.) Montevideo: LATU.


Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A.M., et al. (2011) Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124 (4), 1296-307.

Diels, A.M.J., Callewaert, L., Wuytack, E.Y., Masschalck, B. & Michels, C.W. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenization is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. *International Journal of Food Microbiology*, 101 (3), 281-291.

Dziezak, J.D. (1990). Acidulants: ingredients that do more than meet the acid test. *Food Technology*, 44 (1), 76 – 83.

Eckert E., Zambrowicz A., Pokora M., Polanowski A., Chrzanowska J., Szoltysik M., et al. (2013). Biologically active peptides derived from egg proteins. *World's Poultry Science Journal*, 69 (2), 375-386.

FAO (Food and Agriculture Organization) (2020). Producción y productos avícolas. (Consultado el 25 de noviembre del 2020 a las 16:15). Datos disponibles en: <http://www.fao.org/poultry-production-products/production/poultry-species/chickens/es/>

 FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Databases) (2021). Datos, ganadería primaria, visualizar datos. (Consultada el 18 de octubre del 2021 a las 14:00). Datos disponibles en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL/visualize>

Ferragut, V., Hernandez-Herrero, M., Veciana-Nogues, M. T., Borrás-Suarez, M., González-Linares, J., Vidal-Carou, M. C., & Guamis, B. (2015). Ultra-high-pressure homogenization (UHPH) system for producing high-quality vegetable-based beverages: Physicochemical, microbiological, nutritional and toxicological characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (5), 953–961.

Floury, J., Bellestre, J., Legrand, J. & Desrumaux, A. (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*, 59 (4), 843-853.

Foegeding, E.A & Davis, J.P. (2011). Food protein functionality: a comprehensive approach. *Food Hydrocolloids*, 25 (8), 1853-1864.

Foegeding, E.A., Luck, P.J. & Davis, J.P. (2006). Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids*, 20 (2-3), 284-292.

Franco, D., Munekata, P.E.S., Agregán, R., Bermúdez, R., López-Pedrouso, M., Pateiro, M., et al. (2020). Application of pulsed electric fields for obtaining antioxidant extracts from fish residues. *Antioxidants*, 9 (2), 90.

Fujita, H., Usui, H., Kurahashi, K. & Yoshikawa, M. (1995). Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B<sub>1</sub> agonist peptide derived from ovalbumin. *Peptides*, 16 (5), 785- 790.

Gaillac, R. & Marbach, S. (2021). The carbon footprint of meat and dairy proteins: A practical perspective to guide low carbon footprint dietary choices. *Journal of Cleaner Production*, 321, 128766- 128788.

Garcés-Rimón, M., López-Expósito, I., López-Fandiño, R. & Miguel, M. (2016b). Egg white hydrolysates with in vitro biological multiactivities to control complications associated with the metabolic syndrome. *European Food Research and Technology*, 242 (1), 61-69.

Garcés-Rimón, M., Sandoval, M., Molina, E., López-Fandiño, R., & Miguel, M. (2016a). Egg protein hydrolysates: New culinary textures. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 3, 17–22.

Gardner, W.H. (1972). Acidulants in food processing. In Furia, T.E. (ed), *Handbook of Food Additives* (pp. 225-270). Cleveland: CRC Press.

Grootaert, C., Jacobs, G., Matthijs, B., Pitart, J., Baggerman, G., Possemiers, S., et al. (2017). Quantification of egg ovalbumin hydrolysate-derived anti-hypertensive peptides in an in vitro model combining luminal digestion with intestinal Caco-2 cell transport. *Food Research International*, 99 (1), 531-541.

Guérin-Dubiard, C., Pasco, M., Hietanen, A., Quiros del Bosque, A., Nau, F. & Croguennec, T. (2005). Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1090 (1-2), 58-67.

Guerzoni, M.E., Vannini, L., Chaves Lopez, C., Lanciotti, R., Suzzi, G. & Gianotti, A. (1999). Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat cheeses. *Journal of Dairy Science*, 82 (5), 851-862.

Hayes, M.G. & Kelly, A.L. (2003a). High pressure homogenization of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*, 70 (3), 297-305.

Hayes, M.G. & Kelly, A.L. (2003b). High pressure homogenization of raw whole bovine milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. *Journal of Dairy Research*, 70 (3), 307-313.

Hayes, M.G., Fox, P.F. & Kelly, A.L. (2005). Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, 72 (1), 25-33.

Holten, C.H., Müller, A. & Rehbinder, D. (1971). *Lactic acid. Properties and chemistry of lactic acid and derivatives*. Dinamarca: Verlag Chemil.

Huang, W., Majumder, K. & Wu, J. (2010a). Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chemistry*, 123 (3), 635-641.

Huang, X., Zhou, Y., Ma, M., Cai, Z. & Li, T. (2010b). Chemiluminescence evaluation of antioxidant activity and prevention of DNA damage effect of peptides isolated from soluble eggshell membrane protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (23), 12137-12142.

Instituto de estudios del huevo. (2009). *El gran libro del huevo*. (1ª ed.) Madrid: Everest.

International Organization for Standardization (ISO). (2010). Análisis sensorial. Guía general para el diseño de salas de cata. (UNE-EN ISO 8589:2010).

International Organization for Standardization (ISO). (2002). Leche. Determinación del contenido de nitrógeno. Parte 1: Método Kjeldahl. (UNE-EN ISO 8968-1:2002).

International Organization for Standardization (ISO). (2004). Milk and milk products — Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds — Colony-count technique at 25 degrees C.

International Organization for Standardization (ISO). (2014). Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 1: Recuento de colonias a 30 °C mediante la técnica de siembra en profundidad (UNE-EN ISO 4833-1:2014).

International Organization for Standardization (ISO). (2018a). Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de Enterobacteriaceae. Parte 1: Detección de Enterobacteriaceae (UNE-EN ISO 21528-1:2018).

International Organization for Standardization (ISO). (2018b). Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria* spp. Parte 1: Método de detección. (UNE-EN ISO 11290-1:2018).

Iwaniak A., Darewicz M. & Minkiewicz P. (2018). Peptides derived from foods as supportive diet components in the prevention of metabolic syndrome. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17 (1), 63- 81.

Jain, S. & Anal, A.K. (2017). Production and characterization of functional properties of protein hydrolysates from egg shell membranes by lactic acid bacteria fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 54 (5), 1062-1072.

Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121 (1), 178–184.

Je, J.Y., Qian, Z.J., Byun, H.G., & Kim, S.K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42, 840–846.


Jensen, G.S., Lenninger, M.R., Beaman, J.L., Taylor, R. & Benson, K.F. (2015). Support of joint function, range of motion, and physical activity levels by consumption of a water-soluble egg membrane hydrolysate. *Journal of Medicinal Food*, 18 (9), 1042-1048.

Jia, H., Hanate, M., Aw, W., Itoh, H., Saito, K., Kobayashi, S. et al. (2017) Eggshell membrane powder ameliorates intestinal inflammation by facilitating the restitution of epithelial injury and alleviating microbial dysbiosis. *Scientific Report*, 7, 43993.

Kim, H.S., Lee, J.H., Moon, S.H., Ahn, D.U. & Paik, H.D. (2020). Ovalbumin hydrolysates inhibit nitric oxide production in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. *Food Science of Animal Resources*, 40, 274-285.

Kim, S.Y., Je, J.Y. & Kim, S.K. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 31–38.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow strip trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102 (4), 1317-1327.

Korzhev, R.P., Ponomarev, A.N., Mel'nikova, E.I. & Bogdanova, E.V. (2017). The influence of the beta-lactoglobulin hydrolysate on the starter cultures activity in the production of low-allergenic fermented beverages. *Dairy Industry*, 2, 44-46.

Kosobe, K. (1967). Organic acids. *Kanzume Gijutsu (Canning Technology)*, 8, 292-301.

Lahl, W.J. & Braun, S.D. (1994). Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technology*, 48, 68–71.

Lambert, R.J. & Stratford, M. (1999). Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, 86 (1), 157-164.

Lee, D.E., Juang, T.H., Jo, Y.N., Yun, S.S. & Han, K.S. (2019). Enzymatic hydrolysis of egg white protein exerts a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Science of Animal Resources*, 39 (6), 980-987.

Lee, H.S & O'Mahony, M. (2005). Sensory evaluation and marketing: measurement of a consumer concept. *Food Quality and Preference*, 16 (3), 227-235.

Lee, M., Kovacs-Nolan, J., Archbold, T., Fan, M.Z., Juneja, L.R., Okubo, T. et al. (2009). Therapeutic potential of hen egg White peptides for the treatment of intestinal inflammation. *Journal of Functional Foods*, 1 (2), 161-169.

Li-Chan, E., Powrie, W. D., & Nakai, S. (1995). The chemistry of eggs and egg products. En: W. J. Stadelman & O. J. Cotterill. *Egg science and Technology* (pp. 105-175). New York: Food Products Press.

Li, Y., Li, J., Lin, S.J., Yang, Z.S. & Jin, H.X. (2019). Preparation of antioxidant peptide by microwave- assisted hydrolysis of collagen and its protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage of RAW264.7 cells. *Marine Drugs*, 17 (11), 642.

Liao, W., Jahandideh, F., Fan, H., Son, M. & Wu, J. (2018). Egg protein-derived bioactive peptides: Preparation, efficacy and absorption. *Advances in Food and Nutrition Research*, 85, 1-58.

Liu, C., Guo, Y., Cheng, Y. & Qian, H. (2019). An investigation on the production and stability of chickpea bean sprout beverage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43 (10), 14143- 14149.

Liu, J., Jin, Y., Lin, S., Jones, G. S. & Chen, F. (2015). Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 175, 258–266.

Liu, J., Yu, Z., Zhao, W., Lin, S., Wang, E. & Zhang, Y., et al. (2010). Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 122 (4), 1159-1163.

Liu, Y.F., Oey, I., Bremer, P., Carne, A. & Silcock, P. (2018). Bioactive peptides derived from egg proteins: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (15), 2508-2530.

Lu, C., Wang, G., Li, Y. & Zhang, L. (2013). Effects of homogenisation pressures on physicochemical changes in different layers of ultra-high temperature whole milk. *Dairy Technology*, 66 (3), 325-332.

Lucas, M.I.C. (2010). *Un huevo en mi laboratorio*. (1ª ed.). Madrid: Bubok Publishing S.L.



MacFie, H. (2007). *Consumer-led food product development*. (1ª ed.). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

Majumder, K., Liang, G., Chen, Y., Guan, L., Davidge, S.T. & Wu, J. (2015). Egg ovotransferrin-derived ACE inhibitory peptide IRW increases ACE2 but decreases proinflammatory genes expression in mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59, 1735–1744.

Manassero, C.A., Añón, M.C. & Speroni, F. (2020). Development of a high protein beverage based on amaranth. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75, 599–607.

Manso, M.A., Miguel, M., Even, J., Hernández, R., Aleixandre, A. & López-Fandiño, R. (2008). Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 109 (2), 361-367.

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2021a). Informe del consumo de alimentación en España 2019. (Consultada el 18 de octubre del 2021 a las 13:00). Datos disponibles en: <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/panel-de-consumo-alimentario/resumen-anual-de-la-alimentacion/>

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2021b). Informe del consumo de alimentación en España 2020. (Consultada el 18 de octubre del 2021 a las 13:00). Datos disponibles en: <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/default.aspx>

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2021c). Estadística de lana, miel y huevos para el consumo humano. (Consultada el 18 de octubre del 2021 a las 13:00). Datos disponibles en: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/lana-miel-huevos-consumo-humano/default.aspx>

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2021d). Avicultura de puesta, importancia económica (Consultada el 18 de octubre del 2021 a las 13:30). Datos disponibles en: <https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/plataforma-de-conocimiento-para-el-medio-rural-y-pesquero/observatorio-de-tecnologias-probadas/sistemas-prodnut-animal/aves-puesta.aspx>

Marcet Manrique, Ismael. (2014). *Hidrólisis, separación y aprovechamiento de proteína de yema de huevo*. (Tesis doctoral inédita). Departamento de ingeniería química y tecnología del medio ambiente. Universidad de Oviedo.

Maria, S.D., Ferrari, G., & Maresca, P. (2017). Effect of high hydrostatic pressure on the enzymatic hydrolysis of bovine serum albumin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97 (10), 3151–3158.

Matoba, N., Usui, H., Fujita, H. & Yoshikawa, M. (1999). A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Letters*, 452 (3), 181-184.

Meinlschmidt, P., Sussmann, D., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2016). Enzymatic treatment of soy protein isolates: Effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 4 (1), 11–23.

Mekonnen, M.M. & Hoekstra, A.J. (2012). A global assessment of the water footprint of farm animal products. *Ecosystems*, 15, 401-415.



Mel'nikova, E.I., Ponomareva, N.V., & Bogdanova, E.V. (2017). Artificial neural networks for the assessment of quality indices of low-allergy fermented milk drinks. *Food Processing: Techniques and Technology*, 44 (1), 152-158.


Memarpoor-Yazdi, M.; Asoodeh, A.; Chamani, J. (2012). A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 4, 278–286.

Mendis, E., Rajapakse, N. & Kim, S.K. (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (3), 581-587.

Meza-Espinoza, L., Sáyago-Ayerdi, S.G., García-Magaña, M.L., Tovar-Pérez, E.G., Yahia, E.M., Vallejo-Cordoba, B. et al. (2018). Antioxidant capacity of egg, milk and soy protein hydrolysates and biopeptides produced by *Bromelia penguin* and *Bromelia karatas*-derived proteases. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 30, 122–130.

Miguel, M., Garcés-Rimón, M., López-Alonso, R. & Sandoval, M. (2015). Composiciones alimentarias saludables que presentan texturas de gel o espuma y que comprenden ovoproductos hidrolizados. (Internacional: WO/2015/092098). Organización mundial de la propiedad intelectual: Oficina internacional. <https://patentimages.storage.googleapis.com/39/7a/78/b591725d449fa5/WO2015092098A1.pdf>

Miguel, M., Manso, M.A., Martín-Álvarez, P.J., Aleixandre, A. y López-Fandiño, R. (2007c). Antiotensin-converting enzyme activity in plasma and tissues of spontaneously hypertensive rats after the short- and long-term intake of hydrolysed egg white. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51 (5), 555-563.

 Miguel, M. & Aleixandre, A. (2006). Antihypertensive peptides derived from egg proteins. *The Journal of Nutrition*, 136 (6), 1457-1460.

Miguel, M., Alvarez, Y., López-Fandiño, R., Alonso, M.J. & Salaices, M. (2007a). Vasodilator effects of peptides derived from egg white proteins. *Regulatory Peptides*, 140 (3), 131-135.

Miguel, M., López-Fandiño, R., Ramos, M. & Aleixandre, A. (2006). Long-term intake of egg white hydrolysate attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 78 (25), 2960-2966.

Miguel, M., Manso, M., Aleixandre, A., Alonso, M.J., Salaices, M. & López-Fandiño, R. (2007b). Vascular effects, angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, and antihypertensive properties of peptides derived from egg White. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (26), 10615-10621.

Miguel, M., Recio, I., Gómez-Ruiz, J.A., Ramos, M. & López-Fandiño, R. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67 (9), 1914-1920.

Mills, S., Ross, R P., Hill, C., Fitzgerald, G.F. & Stanton, C. (2011). Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *International Dairy Journal*, 21 (6), 377–401

Miranda, J.M., Anton, X., Redondo-Valbuena, C., Roca-Saavedra, P., Rodriguez, J.A., Lamas, A., et al. (2015). Egg and egg-derived foods: effects on human health and use as functional foods. *Nutrients*, 7, 706–729.

Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N. & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47 (4), 171-182.



Moon, S.H., Lee, J.H., Kim, J.H., Paik, H.D. & Ahn, D.U. (2017). In vitro cytotoxic and ACE-inhibitory activities of promod 278P hydrolysate of ovotransferrin from chicken egg white. *Poultry Science*, 96, 1982-1987.

Moughan P.J., Rutherford S.M., Montoya C.A. & Dave L.A. (2014). Food-derived bioactive peptides – a new paradigm. *Nutrition Research Reviews*, 27 (1), 16-20.

Moure, A., Dominguez, H. & Parajo, J.C. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochemistry*, 41, 447–456.

Navidghasemizad, S., Acero-Lopez, A., Curtis, J., Temelli, F., & Wu, J. (2014). Destabilization of Egg Yolk Emulsion After IgY Removal Through Enzymatic Treatments. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91 (11), 1857–1866.

Nawaz, M.A.; Singh, T.K.; Stockmann, R.; Jegasothy, H. & Buckow, R. (2021). Quality attributes of ultra-high temperature-treated model beverages prepared with faba bean protein concentrates. *Foods*, 10 (6), 1244-1260.

Nimalaratne, C., Bandara, N. & Wu, J. (2015). Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. *Food Chemistry*, 188 (1), 467-472.

O'Sullivan, D., Nongonierma, A.B. & FitzGerald, R.J. (2017). Bitterness in sodium caseinate hydrolysates: Role of enzyme preparation and degree of hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97 (13), 4652–4655.

Palop, A. & Martínez, A. (2006). 18. pH-assisted thermal processing. In Sun, D. Thermal food processing: new technologies and quality issues (pp. 567-587). CRC Press, Florida.

Pan, Y., Li, X.M., Meng, R., & Zhang, B. (2020). Exploration of the stabilization mechanism and curcumin bioaccessibility of emulsions stabilized by whey protein hydrolysates after succinylation and glycation in different orders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68 (2), 623–632.

Pap, N., Hamberg, L., Pihlava, J., Hellström, J., Mattila, P., Euroola, M. et al., (2020). Impact of enzymatic hydrolysis on the nutrients, phytochemicals and sensory properties of oil hemp seed cake (*Cannabis sativa* L. FINOLA variety). *Food Chemistry*, 320, 126530.

Paquin, P. (1999). Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *International Dairy Journal*, 9 (3-6), 329-335.

Park, S., Choi, K.S., Lee, D., Kim, D., Lim, K.T., Lee, K.H., et al., (2016). Eggshell membrane: Review and impact on engineering. *Biosystems Engineering*, 151, 446-463.

Pedersen, B. (1994). Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Technology*, 48 (10), 96-98.

Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1306–1314.



Plat, J., Severins, N., Morrison, S. & Mensink R.P. (2017). Effects of NWT-03, an egg-protein hydrolysate, on blood pressure in normotensive, high-normotensive and mild-hypertensive men and women: a dose-finding study. *British Journal of Nutrition*, 117 (7), 942-950.

Ponomarev, A.N., Melnikova, E.I., Bogdanova, E.V. & Kharitonov, D.V. (2017). Impact of betalactoglobulin hydrolysate on structural and mechanical properties of allergenic potency-restricted yogurt. *Foods and Raw Materials*, 5 (1), 41-50.

Punidades, P., & McKellar, R. C. (1999). Selected physical properties of liquid egg products at pasteurization temperatures. *Journal of Food Processing and Preservation*, 23 (2), 153-169.

Raksakulthai, R. & Haard, NF. (2003). Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43 (4), 401-445.

Ramsey, J.A. & Swartzel, K.R. (1984). Effect of ultra high temperature processing and storage conditions on rates of sedimentation and fat separation of aseptically packaged milk. *Food Science*, 49 (1), 257-262.

Rao, S., Ju, T., Sun, J., Su, Y., Xu, R. & Yan, Y. (2012b). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysate of hen egg white lysozyme. *Food Research International*, 46 (1), 127-134

Rao, S., Sun, J., Liu, Y., Zeng, H., Su, Y. & Yang, Y. (2012a). ACE inhibitory peptides and antioxidant peptides derived from in vitro digestion hydrolysate of hen egg white lysozyme. *Food Chemistry*, 135 (3), 1245-1252.

Rathnapala, E.C.N., Ahn, D.U., & Abeyrathne, E.D.N.S. (2021). Enzymatic Hydrolysis of Ovotransferrin and the Functional Properties of Its Hydrolysates. *Food Science of Animal Resources*, 41 (4), 608.

Reglamento (UE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n° 1924/2006 y (CE) n° 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) n° 608/2004 de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L n° 304, 22 de octubre de 2011.

Ruff, K.J., Winkler, A., Jackson, R.W., DeVore, D.P. & Ritz, B.W. (2009). Eggshell membrane in the treatment of pain and stiffness from osteoarthritis of the knee: a randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Clin Rheumatol*, 28 (8), 907-914.

Saha, B.C. & Hayashi, K. (2001). Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnology Advances*, 19 (5), 355–370.

Santana, A., Melo, A., Tavares, T. & Ferreira, I.M.P.L.V.O. (2016). Biological activities of peptide concentrates obtained from hydrolysed eggshell membrane byproduct by optimisation with response surface methodology. *Food & Function*, 7 (11), 4597-4604.

Shen, S., Chahal, B., Majumder, K., You, S. & Wu, J. (2010). Identification of novel antioxidative peptides derived from a thermolytic hydrolysate of ovotransferrin by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (13), 7664-7672.

Silveira Coelho, M., de Araujo Aquino, S., Machado Latorres, J., & de las Mercedes Salas-Mellado, M. (2019). In vitro and in vivo antioxidant capacity of chia protein hydrolysates and peptides. *Food Hydrocolloids*, 91, 19–25.

Singh, J., Prakash, S., Bhandari, B. & Bansal, N. (2019). Ultra high temperature (UHT) stability of casein-whey protein mixtures at high protein content: Heat induced protein interactions. *Food Research International*, 116, 103-113.

Slattery, H., Fitzgerald, R.J. (1998). Functional properties and bitterness of sodium caseinate hydrolysates prepared with a bacillus proteinase. *Journal of Food Science*, 63 (3), 418–422.

Stratford, M. & Anslow, P.A. (1998). Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic “weak acid preservative”. *Letters in Applied Microbiology*, 27 (4), 203-206.

Strixner, T., & Kulozik, U. (2011). Egg proteins. In *Handbook of food proteins* (pp. 150-209). Woodhead publishing.

Sun, X.D. (2011). Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. *International Journal of Food Science & Technology*, 46 (12), 2447–2459.

Tavano. O.L (2013). Protein hydrolysis using proteases: an important tool for biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-10.

Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J.P. & Cheftel, J.C. (2003). High-pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13 (6), 427-439.

Totosaus, A., Montejano, J.G., Salazar, J.A. & Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science and Technology*. 37 (6), 589–601.

Uluko, H., Liu, L., Lv, J.P., & Zhang, S.W. (2016). Functional characteristics of milk protein concentrates and their modification. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 (7), 1193–1208.

Vachon, J.F., Kheadr, E.E., Giasson, J., Paquin, P. & Fliss, I. (2002). Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection*, 65 (2), 345-352.

Vénica, C.I., Perotti, M.C., Wolf, I.V., Bergamini, C.V. & Zalazar, C.A. (2011). Intolerancia a la lactosa. Productos modificados. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 65, 50-57.

Vente-Spreuwenberg, M.A.M., Verdonk, J.M.A.J., Verstegen, M.W.A. & Beynen, A.C. (2003). Villus height and gut development in weaned piglets receiving diets containing either glucose, lactose or starch. *British Journal of Nutrition*, 90 (5), 907-13.

Vizcardo Gutierrez, D.L., Zavala Gonzales, J.C. (2016) Bioactive peptides: little giants in health. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 29 (4), 150-155

Vuong, T.T., Rønning, S.B., Suso, H.P., Schmidt, R., Prydz, K., Lundström, M. et al. (2017) The extracellular matrix of eggshell displays anti-inflammatory activities through NF- B in LPS-triggered human immune cells. *Journal of Inflammation Research*, 10, 83-96.

Wang, G. & Wang, T. (2009). Effects of yolk contamination, shearing, and heating on foaming properties of fresh egg white. *Journal of Food Science*, 74 (2), C147-C156.



Wang, J. S., Zhao, M. M., Zhao, Q. Z., & Jiang, Y. M. (2007). Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chemistry*, 101, 1658–1663.

Xu, M., Shanguan, X., Wang, W. & Chen, J. (2007). Antioxidative activity of hen egg ovalbumin hydrolysates. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16, 178-182

You, S. & Wu, J. (2011). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of egg protein hydrolysates produced with gastrointestinal and nongastrointestinal enzymes. *Journal of Food Science*, 76 (6), C801-C807.


You, S.J., Udenigwe, C.C., Aluko, R.E., & Wu, J. (2010). Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Food Research International*, 43, 848–855.

Yu, Z., Liu, B., Zhao, W., Yin, Y., Liu, J. & Chen F. (2012a). Primary and secondary structure of novel ACE-inhibitory peptides from egg white protein. *Food Chemistry*, 133 (2) 315-322.

Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Liu, J. & Chen, F. (2012b). Anti-diabetic activity peptides from albumin against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase. *Food Chemistry*, 135 (3), 2078-2085.

Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Wang F., Yu, Y., Liu, B. et al. (2011a). Characterization of ACE-inhibitory peptide associated with antioxidant and anticoagulation properties. *Journal of Food Science*, 76 (8), C1149-C1155.

Yu, Z., Zhao, W., Liu, J., Lu, J. & Chen, F. (2011b). QIGLF, a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from egg white protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91 (5), 921-926.

 Yüceer, M. (2020a). Evaluation of physicochemical properties on meringue prepared from phospholipase A 2 enzyme-hydrolyzed liquid egg albumen. *European Food Research and Technology*, 246 (9), 1847-1856.

Yuceer, M. (2020b). Structural and rheological characterization of liquid egg white modified with phospholipase A2 enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44 (6), 14450.

Zhang, Q., Tong, X., Sui, X., Wang, Z., Qi, B., Li, Y., et al. (2018). Antioxidant activity and protective effects of alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Food Research International*, 111, 256–264.

Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41, 1296–1302.



El objetivo de la presente Tesis Doctoral ha consistido en el desarrollo, a escala semiindustrial, de un hidrolizado de clara de huevo para que pueda ser utilizado posteriormente como un ingrediente base para la elaboración de nuevos productos alimentarios similares a otros de origen lácteo, como yogures, helados, postres, salsas o untables. Los resultados demostraron que fue posible la elaboración del hidrolizado a escala semiindustrial tanto en un intercambiador de placas como tubular, con temperaturas de pasteurización y de tipo UHT. La homogeneización en modo descendente favoreció las características tecnológicas y organolépticas del hidrolizado final. En el estudio de vida útil se observó que el hidrolizado cumplía la legislación a nivel microbiológico, sin embargo, mostró cierta tendencia a la gelificación.