



**EPS**

Escola Politècnica  
Superior

## Projecte/Treball Fi de Carrera

**Estudi:** Eng. Tècn. Agrícola Ind.Agràries i Aliment. Pla 99

**Títol:** Obtenció i caracterització físico-química de sèrum de sang porcina

**Document:** Memòria

**Alumne:** Ambròs Casals Sánchez

**Director/Tutor:** Dolors Parés Oliva

**Departament:** Eng. Química, Agrària i Tecn. Agroalimentària

**Àrea:** Tecnologia dels Aliments

**Convocatòria** (mes/any): Setembre 2011



**Universitat de Girona**

**Escola Politècnica Superior**

**Obtenció i caracterització físico-química  
de sèrum de sang porcina**

**Vist-i-plau directora**

**Dolors Parés Oliva**

TFC segons el que es disposa en els plans d'estudis d'Enginyeria Tècnica Agrícola especialitat Indústries Agràries i Alimentàries per a la Universitat de Girona.

Autor

Ambròs Casals Sánchez

## **AGRAÏMENTS**

M'agradaria donar les gràcies a la Dolors Parés, perquè si no fos per la seva PACIÈNCIA i dedicació, aquest treball no hagués estat possible.

Agraeixo sincerament l'oportunitat que m'ha donat al poder fer el treball dins de la línia de recerca del Departament on he passat molt bones estones i he après molt.

També em sento agraït a tot el Departament de Tecnologia dels Aliments en general, i sobretot a l'Anna Maria, que sempre que necessitava ajuda ella estava allà.

A la Laura Martínez, companya de carrera, per la seva ajuda i les converses en el laboratori que feien els dies llargs, més curts.

Als amics i coneguts que quan els hi explicava de que tractava el treball sempre em deien: “Què Asco!!!”, però després m'escoltaven encuriós i em donaven suport.

A la meua família, per la seva paciència i col·laboració, els que finalment ja no caldrà que em tornin a preguntar: Què tal el projecte?

# ÍNDIX

<b>PARAULES CLAU</b> .....	1
<b>RESUM</b> .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	4
1.1. El sector porcí.....	5
1.2. La sang porcina com a residu de la indústria càrnia.....	5
1.3. La sang porcina com a subproducte de la indústria càrnia.....	6
1.4. Marc legal.....	8
1.5. Estructura i composició de la sang.....	9
1.5.1. Fracció cel·lular.....	10
1.5.2. Fracció plasmàtica .....	10
1.6. Aprofitament de les proteïnes plasmàtiques a la indústria alimentària.....	12
1.7. Sistemes de fraccionament del plasma per a la obtenció de sèrum.....	15
1.8. Tecnologies de separació per membrana.....	17
1.8.1. Fonaments.....	17
1.8.2. Processos i aplicacions.....	21
1.8.2.1. Microfiltració (MF).....	22
1.8.2.2. Ultrafiltració (UF) i Diafiltració (DF).....	23
1.8.2.3. Nanofiltració (NF).....	23
1.8.2.4. Osmosi inversa (OI).....	24
1.8.3. Equips i materials.....	24
1.9. Antecedents del Treball.....	28
<b>2. OBJECTIUS</b> .....	29
<b>3. MATERIAL I MÈTODES</b> .....	31
3.1. Disseny experimental.....	32
3.2. Procedència del plasma de sang de porc.....	34
3.3. Obtenció del sèrum.....	34
3.4. Concentració del sèrum per ultrafiltració.....	36
3.5. Dessalat del sèrum concentrat per diafiltració.....	38
3.6. Atomització del Sèrum concentrat i dessalat.....	39

3.7. Determinacions analítiques.....	40
3.7.1. Extracte sec.....	40
3.7.2. Contingut en sals minerals (cendres).....	40
3.7.3. Contingut en proteïnes.....	41
3.7.4. Conductivitat.....	44
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....</b>	<b>45</b>
4.1. Proves prèvies.....	46
4.2. Obtenció de Sèrum concentrat amb la membrana de 10 kDa.....	47
4.2.1. Caracterització físico-química de la matèria primera: plasma i sèrum.....	47
4.2.2. Concentració del sèrum per ultrafiltració.....	49
4.2.2.1 Seguiment del procés.....	49
4.2.2.2 Característiques físico-químiques del sèrum concentrat i el permeat d'ultrafiltració.....	51
4.2.3. Dessalat del sèrum per diafiltració.....	52
4.2.3.1 Seguiment del procés.....	53
4.2.3.2 Característiques físico-químiques del sèrum dessalat i el permeat de la ultrafiltració.....	56
4.3. Obtenció de Sèrum concentrat amb la membrana de 30 kDa.....	58
4.3.1. Caracterització físico-química de la matèria primera: plasma i sèrum.....	58
4.3.2. Concentració del sèrum per ultrafiltració.....	59
4.3.2.1 Seguiment del procés.....	59
4.3.2.2 Característiques físico-químiques del sèrum concentrat i el permeat d'ultrafiltració.....	62
4.3.3. Dessalat del sèrum per diafiltració.....	63
4.3.3.1 Seguiment del procés.....	63
4.3.3.2 Característiques físico-químiques del sèrum dessalat i el permeat de la ultrafiltració.....	67
4.4. Característiques físico-química del sèrum deshidratat.....	69
<b>5. CONCLUSIONS.....</b>	<b>70</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>73</b>

## LLISTAT DE FIGURES

<b>Figura 1.1.</b> Representació de les molècules de les proteïnes plasmàtiques majoritàries.....	11
<b>Figura 1.2.</b> Diferència en el tipus de flux.....	19
<b>Figura 1.3.</b> Diferents processos de la tecnologia de separació per membrana .....	22
<b>Figura 1.4.</b> Mòdul de membrana en espiral.....	26
<b>Figura 3.1.</b> Disseny experimental del treball.....	33
<b>Figura 3.2.</b> Equip de fraccionament.....	35
<b>Figura 3.3.</b> Equip d'ultrafiltració MMS MMS Bench System SW18 (MMS AG Membrane Systems, Urdorf, Alemanya).....	36
<b>Figura 3.4.</b> Flux de la bomba regulat pel variador de freqüència.....	37
<b>Figura 3.5.</b> Equip d'atomització Büchi Mini Spray Dryer model B-191.....	40
<b>Figura 3.6.</b> Bloc digestor (Gerhart KB20, Alemanya).....	43
<b>Figura 3.7.</b> Destil·lador kjeldhal (Buchi K314, Alemanya).....	43
<b>Figura 4.1.</b> Volum de permeat recollit durant les tres repeticions del procés d'ultrafiltració de sèrum porcí amb una membrana de polietersulfona de pes molecular de tall de 10 kDa. (Volum inicial de mostra= 4L, FCV=2, 400 L/h PTM=2 bar).....	49
<b>Figura 4.2.</b> Evolució del flux de permeació durant les tres repeticions del procés d'ultrafiltració de sèrum porcí amb una membrana de polietersulfona de pes molecular de tall de 10 kDa. (Volum inicial de mostra= 4L, FCV=2, 400 L/h PTM=2 bar).....	50
<b>Figura 4.3.</b> Volum de permeat recollit durant les tres repeticions del procés de diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de polietersulfona de pes molecular de tall de 10 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, volum d'aigua diafiltració= 5L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2 bar).....	53
<b>Figura 4.4.</b> Evolució del flux de permeació en tres repeticions del procés de diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de polietersulfona de pes molecular de tall de 10 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, volum d'aigua diafiltració= 5L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2 bar).....	54

<b>Figura 4.5.</b> Reducció de la conductivitat de la mostra en funció del volum d'aigua afegit al tanc d'alimentació en tres repeticions del procés de diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de polietersulfona de pes molecular de tall de 10 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2 bar).....	55
<b>Figura 4.6.</b> Volum de permeat recollit durant les tres repeticions del procés de concentració de sèrum porcí amb una membrana poliacrilonitril modificat de pes molecular de tall de 30 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, volum d'aigua diafiltració= 5L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2 bar).....	60
<b>Figura 4.7.</b> Evolució del flux de permeació en tres repeticions del procés de concentració de sèrum porcí amb una membrana de poliacrilonitril modificat de pes molecular de tall de 30 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, volum d'aigua diafiltració= 5L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2bar).....	61
<b>Figura 4.8.</b> Volum de permeat recollit durant les tres repeticions del procés de diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de poliacrilonitril modificat de pes molecular de tall de 30 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, volum d'aigua diafiltració= 5L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2 bar).....	64
<b>Figura 4.9.</b> Evolució del flux de permeació en tres repeticions del procés de diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de poliacrilonitril modificat de pes molecular de tall de 30 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, volum d'aigua diafiltració= 5L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2 bar).....	65
<b>Figura 4.10.</b> Reducció de la conductivitat de la mostra en funció del Volum d'aigua afegit al tanc d'alimentació en tres repeticions del procés de diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de poliacrilonitril modificat de pes molecular de tall de 30 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2bar).....	66

## LLISTAT DE TAULES

<b>Taula 1.1.</b> Usos de la sang.....	7
<b>Taula 1.2.</b> Percentatges de composició de la sang.....	9
<b>Taula 1.3.</b> Propietats funcionals proteiques que participen en les característiques de diversos aliments.....	13
<b>Taula 1.4.</b> Aplicacions de les proteïnes plasmàtiques en diferents aliments segons les propietats funcionals.....	15
<b>Taula 1.5.</b> Mètodes utilitzats en la separació (o fraccionament ) de proteïnes plasmàtiques.....	16
<b>Taula 1.6.</b> Processos de separació de les membranes classificats segons la força impulsora.....	18
<b>Taula 1.7.</b> Avantatges i inconvenients de la separació per membranes.....	20
<b>Taula 1.8.</b> Característiques bàsiques dels diferents mòduls de membranes.....	25
<b>Taula 4.1.</b> Característiques físico-químiques del plasma i del sèrum per processar amb la membrana de 10 kDa (mitjana $\pm$ desviació estàndard, n=3).....	47
<b>Taula 4.2.</b> Característiques físico-químiques del retentat (sèrum concentrat) i el permeat obtinguts per ultrafiltració de sèrum porcí amb una membrana de polietersulfona de 10 kDa (FCV=2) (mitjana $\pm$ desviació estàndard, n=3).....	51
<b>Taula 4.3.</b> Característiques físico-químiques del retentat (sèrum dessalat) i el permeat obtinguts per diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de polietersulfona de 10 kDa (FCV=2) (mitjana $\pm$ desviació estàndard, n=3).....	57
<b>Taula 4.4.</b> Característiques físico-químiques del plasma i del sèrum per processar amb la membrana de 30 kDa (mitjana $\pm$ desviació estàndard, n=3 ).....	58
<b>Taula 4.5.</b> Característiques físico-químiques del retentat (sèrum concentrat) i el permeat obtinguts per ultrafiltració de sèrum porcí amb una membrana de poliacrilonitril modificat de 30 kDa (FCV=2) (mitjana $\pm$ desviació estàndard, n=3 ).....	62
<b>Taula 4.6.</b> Característiques físico-químiques del retentat (sèrum dessalat) i el permeat obtinguts per diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de poliacrilonitril modificat de 30 kDa (FCV=2) (mitjana $\pm$ desviació estàndard, n=3 ).....	67
<b>Taula 4.7.</b> Característiques físico-químiques de sèrum deshidratat (mitjana $\pm$ desviació estàndard, n=5).....	69



## **PARAULES CLAU**

Plasma de sang porcina

Fraccionament de proteïnes

*Salting out*

Sulfat amònic

Sèrum de sang porcina

Tecnologia de membranes

Ultrafiltració

Diafiltració

Concentració

Dessalat

## RESUM

L'objectiu general d'aquest treball va ser posar a punt la metodologia d'obtenció de concentrats de sèrum (plasma sense fibrinogen) a escala de planta pilot, per poder obtenir una quantitat suficient de producte que permetés fer proves d'aplicació del sèrum com a substitut d'ingredients funcionals en productes carnis cuits o altres matrius alimentàries.

Per assolir aquest objectiu es va obtenir plasma per centrifugació de sang porcina d'escorxador, es va precipitar el fibrinogen amb la tècnica *salting out* amb sulfat amònic i es va separar el sèrum, el qual es va concentrar i dessalar mitjançant un equip modular d'ultrafiltració tangencial amb membranes polimèriques espirals de 10 i 30 kDa.

El procés de fraccionament que es va aplicar va permetre una precipitació satisfactòria del fibrinogen, a partir de l'addició de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (sulfat amònic) fins a una concentració del 20 %. Després es va procedir a concentrar i eliminar l'excés de sals afegides durant el fraccionament, aplicant la tecnologia de separació per membranes.

L'eficàcia de les operacions de concentració i dessalat es va avaluar a partir de la caracterització físico-química de diferents mostres recollides durant el procés d'obtenció del sèrum concentrat i amb el seguiment de la taxa de permeació i de la cinètica d'eliminació de sals del sèrum. Es va determinar la conductivitat i es va analitzar el contingut en extracte sec, proteïna i cendres del plasma inicial, del sèrum obtingut per *salting out*, del sèrum i del permeat obtinguts després de l'etapa de concentració i del producte final després de la diafiltració (sèrum concentrat i dessalat).

Per tal de garantir la conservació del sèrum concentrat fins la seva utilització en proves d'aplicació, es va procedir a deshidratar-lo per atomització i també es va fer la caracterització físico-química del producte en pols.

El procés d'ultrafiltració (concentració) amb un Factor de Concentració Volumètric (FCV) de 2, tant amb la membrana de tall molecular de 10 com amb la de 30 kDa, va permetre eliminar part del contingut en sals, ja que la conductivitat del sèrum es va reduir entre un 13 i un 15%. Les pèrdues de proteïna en el permeat van ser inferiors al 0,17% i les característiques físico-químiques del producte obtingut van ser similars pels dos tipus de membrana (10 i 30 kDa).

El procés de diafiltració va permetre assolir un grau d'eliminació de sals satisfactori, amb una reducció de la conductivitat del sèrum d'aproximadament el 82%. Les pèrdues de proteïna en el permeat de diafiltració van ser relativament petites ( $\leq 15\%$ ), tot i que el grau de recuperació proteica va ser lleugerament superior amb la membrana de 10 kDa.

Durant el procés de concentració i dessalat es va determinar la taxa de permeació a partir del pes de permeat recollit, que es va mesurar en línia i es va anotar a intervals de temps regulars (aproximadament cada 2,5 min) i tenint en compte la superfície filtrant de les membranes ( $0,32 \text{ m}^2$ ). El temps total del procés d'ultra i diafiltració va ser més elevat amb la membrana de 30 kDa (2 hores i 18 minuts) que amb la de 10 kDa (2 hores i 45 minuts).

La tecnologia de separació per membranes va ser adequada per obtenir concentrats de sèrum i va permetre eliminar l'excés de sals afegides durant el fraccionament. El producte final deshidratat contenia quasi un 88% de proteïna, un 1,4% de cendres i una humitat residual al voltant del 6%.

En general podem dir que el procés que es va posar a punt va permetre produir la quantitat de sèrum concentrat necessària per fer proves d'aplicació com a substitut d'ingredients funcionals en productes carnis cuits o altres matrius alimentàries.

## **1. INTRODUCCIÓ**

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. El sector porcí

El sector porcí ocupa el primer lloc a nivell mundial en producció de carn. Àsia és el continent més important en quant a cens i producció. Segons dades de la F.A.O. (FAOSTAT, 2010), el 2008 un 39% de la producció mundial de carn és de porcí, el que correspon a més de 103 milions de tones de carn.

Centrant-nos en el continent Europeu, la producció de carn de porcí és del 20 % de la producció mundial. Alemanya i Espanya en són els països capdavanters. Finalment, a casa nostra, Catalunya lidera el sector porcí espanyol, ja que és la regió de l'Estat amb una producció més elevada, i en continu creixement. Així, veiem que l'any 2009 es van sacrificar més de 17 milions de caps i es van obtenir 1.338.063 tones de carn. Segons dades del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural (2009).

Un derivat important del sacrifici de porcí és la sang. La sang porcina pot ser considerada com un residu, de manera que el gran volum que es genera en els escorxadors representa un problema mediambiental que cal eliminar, o bé es pot considerar i tractar com a un subproducte revaloritzable, gràcies principalment al seu elevat contingut en proteïnes amb bones propietats nutricionals i funcionals.

## 1.2. La sang porcina com a residu de la indústria càrnia

L'any 2008 a l'estat espanyol es van realitzar més de 41 milions de sacrificis de porcs destinats al consum, el que representa unes 165.000 tones de sang (FAOSTAT, 2010).

La sang té un poder contaminant elevat degut a l'increment de càrrega orgànica que representa si no es tracta separatament dels efluent de l'escorxador. La demanda química d'oxigen (DQO) de la sang pot superar els 370.000 mg/L (Ockerman i Hansen, 1994) i la demanda biològica d'oxigen (DBO) és de l'ordre de 250.000 mg/l (Martín, 2001). Això fa que, abans del seu abocament, s'hagi de tractar per reduir el seu impacte medioambiental. A més a més, les elevades concentracions de nitrogen fan que, per

aconseguir un tractament correcte en una planta de depuració, siguin necessaris processos nitrificants-desnitrificants, que encareixen notablement aquest procés.

Una possible opció per a eliminar la càrrega orgànica de la sang és la seva incineració. Tanmateix, en incinerar-la es produeixen fortes olors que, especialment en les zones urbanes, s'han d'eliminar o reduir considerablement mitjançant un equip de condensació adequat (Veall, 1993).

Per tant, la sang derivada del sacrifici d'animals és un problema per diferents raons:

- Se'n genera un elevat volum
- Té un elevat poder contaminant
- El seu tractament suposa un elevat cost

Una de les possibles maneres de fer front a aquest problema consisteix en desenvolupar sistemes que permetin l'aprofitament i revaloració de la sang.

### **1.3. La sang porcina com a subproducte de la indústria càrnia**

La sang té característiques físiques i químiques que la fan apta per a molts usos industrials i, per tant, pot ser considerada com a un subproducte de les indústries càrnies. El fet de no aprofitar-la suposa, no només una despesa econòmica degut a la inversió que requereixen els processos d'eliminació i disminució del seu impacte contaminant, sinó també la pèrdua d'una font potencial d'ingressos.

La sang dels animals té moltes possibilitats d'aprofitament: aliments, pinsos, productes de laboratori, usos mèdics, productes industrials diversos, com a fertilitzant, etc. (Taula 1.1).

**Taula 1.1.** Usos de la sang. (Divakaran, 1980)

<b>Aliments</b>	Emulsionant, estabilitzant, clarificant, additiu de color, component nutricional.
<b>Pinsos</b>	Suplement de lisina, estabilitzador de vitamines, substitut de la llet, component nutricional.
<b>Fertilitzants</b>	Revestiment de llavors, estabilitzant del pH del sòl, components minerals
<b>Laboratori</b>	Medis de cultiu, anàlisi de tanins, carbó actiu, hemina agar sang, peptones, glicerofosfat, albúmines, globulines, esfingomielina, catalasa.
<b>Medicina</b>	Proves d'aglutinació, immunoglobulines, tècniques de fraccionament, factors de coagulació, sutures, fibrinogen, productes de fibrina, serotonina, plasminogen, additius de plasma.
<b>Indústria</b>	Adhesius, additius per resines, finalitzadors per couro i teixits, coadjuvants en insecticides polvoritzables, formigó porós, substitut de la clara d'ou, extintors d'incendis, fabricació de ceràmica i plàstic, formulacions base de plàstics i cosmètics.

La recollida de la sang implica un elevat consum energètic, però generalment resulten més cars els sistemes de depuració i l'energia utilitzada en depurar els efluents carregats de sang, així com el pagament dels canons d'abocament.

Una de les vies d'aprofitament de la sang és el seu ús en alimentació humana. La sang és rica en proteïnes (18%) i, si prové d'animals sans i es processa en condicions higièniques, es pot utilitzar per obtenir hemoderivats aptes pel consum humà

Una de les etapes més crítiques per garantir la qualitat sanitària de la sang és el moment de la seva recollida durant el procés de degollat a l'escorxador. La sang d'animals sans inicialment és estèril, per tant, la contaminació microbiològica que conté quan es troba en el dipòsit d'emmagatzematge es deu al procés de recollida. En sistemes oberts, el dessagnat vertical és el mètode clàssic que permet recollir la sang que cau per gravetat dins una cuba de sagnat on es dosifica una solució anticoagulant (citrat trisòdic o polifosfat), mentre l'animal es va desplaçant penjat d'un sistema de transport per carrils. Per altra banda, també es pot utilitzar un sistema de dessagnat horitzontal amb l'animal ajagut damunt una cinta transportadora i una cuba de recepció amb doble pendent, de forma que la sang procedent de la zona on s'ha realitzat el tall, es pot separar de la resta

d'efluents de l'animal (aigua de rentat o excrements); la qual cosa permet recollir sang més higiènica que amb el mètode vertical. En ambdós casos, la sang amb anticoagulant recollida s'ha de refrigerar el més aviat possible per minimitzar les possibilitats de creixement microbiològic, i ha de ser bombejada cap als dipòsits d'emmagatzematge refrigerats, on es mantindrà fins al seu processament.

Com a alternativa a aquests sistemes de recollida, existeixen sistemes tancats per extreure higiènicament la sang dels animals, que consisteixen en utilitzar un ganivet de fulla balmada amb un disseny especial, connectat mitjançant un tub flexible a un tanc refrigerat, que evita que la sang es barregi amb substàncies estranyes. El ganivet sanitari té un dispositiu, que li permet afegir anticoagulant durant el procés de recollida, i sovint també té una bomba que proporciona una pressió negativa (succió) que permet accelerar el dessagnat.

Amb qualsevol dels dos mètodes de sagnat, generalment es recull la sang de diferents animals en un mateix recipient. Es podrà utilitzar per al consum humà, només després de que totes les canals dels animals hagin passat la inspecció veterinària satisfactòriament. Si algun dels animals no supera la fase d'inspecció el conjunt de la sang no és adequada per a ús alimentari (Ockerman i Hansen, 1994).

### **1.4. Marc legal**

Actualment, la utilització de la sang a Europa està legislada per dues normatives, la Directriu 77/99 CEE i el reglament 1774/2002 CEE. Per a la sang d'animals no remugants, la normativa actual estableix tres denominacions possibles segons el resultat de les inspeccions a què se sotmet l'animal:

- a) La sang que prové d'animals que no han superat la inspecció *ante mortem* es considera material de risc i, en conseqüència, és un residu que s'ha de destruir obligatòriament, perquè la normativa no en permet cap aprofitament posterior.
- b) La sang dels animals que superen la inspecció *ante mortem*, però que no superen o no se sotmeten a cap inspecció posterior al sacrifici, després de deixar-la coagular i assecar (s'ha de sotmetre a un tractament d'esterilització d'una durada



mínima de vint minuts a 133 °C i 3 bars de pressió) es transforma en “farina de sang”. Aquest producte està sotmès a diverses restriccions i, tot i poder ser destinada a alimentació animal, no pot ser utilitzada per nodrir animals de granja, ni es pot emprar com a fertilitzant de sòls on aquestes pasturin.

- c) La sang dels animals que superen tant el control *ante mortem* com el *post mortem* pot ser processada per obtenir “hemoderivats”, productes que es poden destinar a l’alimentació humana, a l’animal i a la indústria mèdica i farmacèutica.

## 1.5. Estructura i composició de la sang

La sang conté components sòlids (eritròcits, leucòcits i plaquetes) en suspensió en un medi líquid, el plasma sanguini. La sang sencera i aquestes dues fraccions, que es poden separar per centrifugació, presenten la composició que es mostra en la Taula 1.2.

El plasma és la fracció acel·lular de la sang, i està constituïda per aigua (majoritàriament), proteïnes, sals minerals, greixos... Entre aquestes proteïnes conté el fibrinogen. El sèrum és plasma sense fibrinogen, és a dir, plasma desfibrinat.

**Taula 1.2.** Percentatges de composició de la sang (Ranken, 1980)

Compost	Sang	Plasma (60%)	Fracció cel·lular (40%)
<b>Aigua</b>	80	90.8	60.8
<b>Sals minerals</b>	0.9	0.8	1.1
<b>Greixos</b>	0.2	0.1	0.4
<b>Proteïnes</b>	17	7.9	35.1
<b>Altres</b>	1.1	0.4	2.6

Les proteïnes de la sang constitueixen aproximadament el 10 % de les proteïnes totals dels animals (Ockerman i Hansen, 1994). L’elevat contingut en proteïna fa que sigui un producte interessant per enriquir alguns productes alimentaris, tant per la seva funcionalitat tecnològica, com pel seu valor nutricional.

### 1.5.1. Fracció cel·lular

Aquesta fracció constitueix un 40% de la sang i té una densitat entre 1.084 i 1.098 mg/mL (Ockerman i Hansen, 1994). Separada de la fracció plasmàtica conté entre un 28 i un 38% de proteïna. El 90% de les proteïnes es troben en forma d'hemoglobina, la qual és una proteïna tetramèrica de 68 kDa, transportadora d'oxigen que es localitza en l'interior dels eritròcits o glòbuls vermells i és la responsable del color vermell de la sang. Altres elements que componen la fracció cel·lular a part de l'hemoglobina i els eritròcits són els leucòcits i plaquetes.

### 1.5.2. Fracció plasmàtica

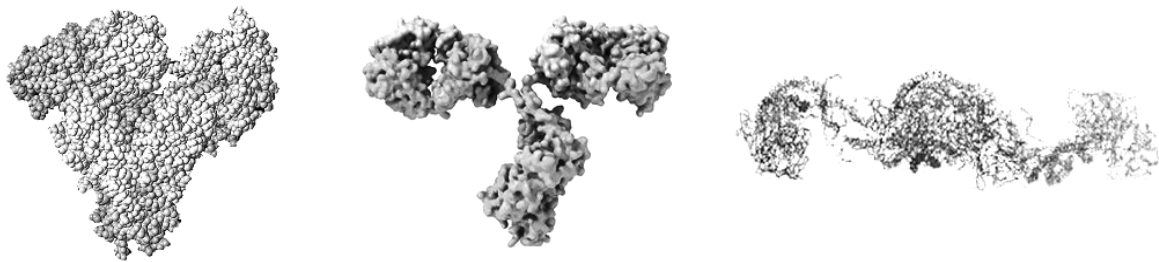
Aquesta fracció constitueix un 60% de la sang i té una densitat entre 1.019 i 1.029 mg/mL (Ockerman i Hansen, 1994). El plasma és un líquid amb un 6-8% de proteïnes d'elevat valor nutritiu que posseeixen capacitat emulsionant i capacitat de formació de gels per escalfament. Les proteïnes majoritàries són: l'albumina, les globulines i el fibrinogen (Figura 1.1).

La seroalbumina és la proteïna més abundant, ja que representa un 60% de la massa total de les proteïnes plasmàtiques. Està constituïda per una cadena peptídica única de 582 aminoàcids amb un pes molecular de 66 kDa. Aquesta cadena es polimeritza en medi àcid. Conté 17 enllaços S-S i un grup SH lliure. La funció biològica de la seroalbumina està lligada fonamentalment a la fixació i transport de petites molècules orgàniques endògenes o exògenes (hormones, àcids grassos, vitamines, medicaments tals com antibiòtics) o minerals (ions, metalls). La fixació es fa, generalment, per enllaços no covalents i freqüentment és reversible i no específica (Cheftel *et al.*, 1989).

Les globulines són un grup complex i heterogeni de glicoproteïnes que inclouen molts enzims, proteïnes transportadores i proteïnes amb funció immunològica, amb un ventall molt ampli d'estructures i pesos moleculars. Es separen fàcilment de les albumines per precipitació selectiva amb sulfat sòdic al 27%. Hi ha tres tipus de globulines:  $\alpha$ -globulines,  $\beta$ -globulines i  $\gamma$ -globulines. Dins de la  $\alpha$ -globulines podem trobar el grup de l' $\alpha$ 1-globulines, en el qual es distingeixen, la orosomucoide de 41 kDa, la  $\alpha$ 1-antitripsina de 54 kDa i la  $\alpha$ 1-fetoproteïna de 70 kDa. Dins el grup de l'  $\alpha$ 2-globulines

es troben, les haptoglobines,  $\alpha$ 2-macroglobulina de 850 kDa i la ceruleoplasmina de 150 kDa. Entre les  $\beta$ -globulines, la proteïna més important és la transferrina, amb un pes molecular de 80 kDa, i finalment dins de les  $\gamma$ -globulines hi trobem les immunoglobulines que tenen funció immunitària (Cheftel *et al.*, 1989).

El fibrinogen és una proteïna fibrosa, precursora de la fibrina, proteïna responsable de la coagulació sanguínia. És una gran molècula asimètrica, molt allargada (relació axial 20/1), constituïda per tres tipus de cadenes peptídiques ( $A\alpha$ ,  $B\beta$  i  $B\gamma$ ). Té una estructura quaternària formada per 6 cadenes unides per ponts disulfur (Alais i Linden, 1990). Està sota la forma de dímer amb pes molecular de 340 kDa (Cheftel *et al.*, 1989). És soluble en presència de sals i insoluble en aigua pura.



**Figura 1.1.** Representació de les molècules de les proteïnes plasmàtiques majoritàries. D'esquerra a dreta: albúmina, immunoglobulina G i fibrinogen (Dàvila, 2006)

## **1.6. Aprofitament de les proteïnes plasmàtiques en la indústria alimentària**

En la indústria alimentària, l'aprofitament de la sang o d'alguna de les seves fraccions, especialment el de les proteïnes plasmàtiques, es basa en les seves excel·lents propietats funcionals.

El terme “propietat funcional” que s'aplica als ingredients alimentaris, es defineix com tota propietat no nutricional que influeix en la utilitat d'un ingredient en un aliment (en especial, la textura), però també poden tenir un paper decisiu en el comportament físic dels aliments o dels ingredients alimentaris durant la preparació, transformació o emmagatzematge (Cheftel et al., 1989).

Les proteïnes presenten unes propietats funcionals que poden contribuir a les característiques desitjades d'un aliment. Les propietats funcionals que intervenen habitualment en cada aliment són diverses (Taula 1.3).

S'han fet molts estudis de funcionalitat de les proteïnes plasmàtiques (Tybor et al., 1975; De Vuono et al., 1979; Howell and Lawrie, 1984a; Howell and Lawrie, 1984b; King et al., 1989; O'Riordan et al., 1989; Raëker and Johnson, 1995; Oshodi and Ojokan, 1997; Parés et al., 1998a; Parés et al., 1998b; Duarte et al., 1999; Parés et al., 2000; Parés and Ledward, 2001; Silva and Silvestre, 2003; Ramos-Clamont et al., 2003).

Les proteïnes plasmàtiques es poden considerar bons ingredients funcionals, interessants per les propietats relacionades amb la seva capacitat de gelificació per calor i d'afavorir la formació i estabilització d'emulsions i escumes. Per exemple, el plasma es pot incorporar en productes carnis com a agent gelificant i espesseïdor, i en la indústria flequera pot servir com a substitut de derivats de l'ou, no només per raons econòmiques i funcionals (Howell, 1995), sinó també per eliminar ingredients potencialment al·lergènic d'algunes formulacions.

**Taula 1.3.** Propietats funcionals proteiques que participen en les característiques de diversos aliments (Cheftel et al., 1989)

<b>Aliment</b>	<b>Propietats funcionals</b>
<b>Begudes</b>	Solubilitat a pH diferents, estabilitat al calor, viscositat
<b>Potatges, salses</b>	Viscositat, emulsionant, retenció d'aigua
<b>Massa de forn</b>	Formació d'una matriu i d'una pel·lícula que tingui propietats de viscoelasticitat, cohesió, desnaturalització per la calor, gelificació.
<b>Productes de forn i de pastisseria (per ex., pa)</b>	Absorció d'aigua, emulsionant, escumant.
<b>Productes làctics (per exemple, formatge fos, gelats, postres)</b>	Emulsionant, retenció de matèria grassa, viscositat, escumant, gelificació, coagulació.
<b>Reemplaçants d'ou</b>	Escumant, gelificació
<b>Productes carnis (per ex., salsitxes)</b>	Emulsionant, gelificació, cohesió, absorció i retenció d'aigua i de matèria grassa.
<b>Productes similars a la carn (per ex., proteïnes vegetals extrusionades)</b>	Absorció i retenció d'aigua i de matèria grassa, insolubilitat, fermesa, masticabilitat, cohesió, desnaturalització per el calor.
<b>Recobrint alimentari</b>	Cohesió, adhesió
<b>Productes de confiteria i xocolateria (per ex., xocolata amb llet)</b>	Dispersabilitat, emulsionant.

El plasma sanguini a l'escalfar-se forma un gel i si es bull durant 15-20 minuts es solidifica, a l'igual que la clara d'ou. Quan s'utilitza en els embotits es redueix la retracció i augmenten els rendiments (aproximadament el 4-5%), la textura dels productes acabats es millora, degut a les propietats gelificants del plasma.

L'ús del plasma sanguini en productes de forn també és prometedor. El plasma sanguini té una gran capacitat escumant (similar a la de l'albumina d'ou) i d'inflament, per tant el plasma assecat per polvorització s'ha utilitzat amb èxit com a substitut de la clara d'ou.

El sèrum sanguini s'utilitza en el laboratori com a solució model per a valorar l'activitat dels enzims proteolítics, com a medi per a la propagació de virus, en la producció de vacunes víriques i com a medi bacteriològic (Ockerman i Hansen *et al.*, 1994).

També s'han realitzat estudis de potencials aplicacions de proteïnes plasmàtiques aïllades (Taula 1.4). Pel què fa a l'albumina, la proteïna més soluble, podria ser utilitzada com additiu texturitzat en l'elaboració de productes lactis com el iogurt, degut al seu efecte sobre la viscositat (Dàvila *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2009). El fibrinogen, amb la solubilitat més baixa que la resta de proteïnes plasmàtiques (Dàvila *et al.*, 2006), presenta una elevada capacitat emulsionant (Álvarez *et al.*, 2009) i es podria afegir com additiu en aliments amb alt contingut en greix, com ara galetes o productes carnis. També s'ha comprovat, per exemple, que l'ús d'albumina i globulines en la producció d'hamburgueses incrementa la seva acceptabilitat, olor i sabor (Pérez Gavilán *et al.*, 2007).

Les proteïnes del plasma, albumina i globulina, són també bons agents emulsionants. Quan es compara amb altres additius, la caseïna és millor agent emulsionant que el plasma sanguini, però el plasma sanguini és millor que la farina de soja i que les proteïnes càrnies (Cheftel *et al.*, 1989).

**Taula 1.4.** Aplicacions de les proteïnes plasmàtiques en diferents aliments segons les propietats funcionals (Álvarez et al., 2009)

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

### 1.7. Sistemes de fraccionament del plasma per a la obtenció de sèrum

El sèrum sanguini és equivalent al plasma però sense les proteïnes involucrades en la coagulació, entre les quals el fibrinogen és la majoritària. Per tant, a partir del plasma sanguini obtingut de la centrifugació de la sang de porcí, podem obtenir el sèrum separant el fibrinogen. Existeixen diferents tècniques que es poden utilitzar per al fraccionament de les proteïnes del plasma. A la Taula 1.5 es mostren les tècniques més utilitzades agrupades segons si la separació es basa en un principi físic, fisicoquímic o cromatogràfic. Les dues tècniques més usades són el mètode de Cohn (precipitació amb etanol) i el *salting out* (addició de sulfat amònic).

Aquestes tècniques hauran de tenir en compte aspectes com la puresa i la qualitat durant l'aïllament de les proteïnes per obtenir-les íntegres. Aquest interès per a la seva obtenció pot estar motivat per diversos factors, entre els quals es troben aspectes nutricionals, funcionals, organolèptics i econòmics (Díaz i Rendueles 1999).

**Taula 1.5.** Mètodes utilitzats en la separació (o fraccionament) de proteïnes plasmàtiques (adaptat de Burnof, 2007)

Principi	Tècnica	Descripció
Físic	<b>Crioprecipitació</b>	Es basa en el diferencial de solubilitat a baixes temperatures, que es situen entre 1 i 4 °C
	<b>Ultrafiltració</b>	Procés de fraccionament selectiu on la mida dels porus de les membranes determina el pas de les proteïnes en funció del seu pes molecular.
	<b>Microfiltració</b>	
Fisicoquímic	<b>Precipitació amb etanol</b>	També conegut com mètode de Cohn. És un dels mètodes més utilitzats. Consisteix en la precipitació de diferents proteïnes en funció del seu punt isoelèctric a base de: concentració d'etanol (10-40%), pH (7,4-4,5), força iònica i temperatura (-3/-6°C).  La precipitació de les proteïnes s'inicia per les menys solubles fins les més solubles. L'etanol, a més pot contribuir a l'eliminació de contaminants infecciosos, degut a la seva activitat bactericida i antivírica.
	<b>Precipitació amb sulfat</b>	Consisteix en l'addició de sulfat amònic (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per provocar una precipitació selectiva de les proteïnes en una solució en funció de les característiques de solubilitat diferencial en medis amb diferents concentracions de sal. També se l'anomena <i>salting out</i> .
Cromatogràfic	<b>Filtració en gel</b>	Aquest tipus de cromatografia separa les substàncies en funció del pes molecular.
	<b>Intercanvi iònic</b>	Es tracta d'una cromatografia on la separació es realitza en funció de la càrrega iònica.
	<b>Cromatografia d'afinitat</b>	És una cromatografia per adsorció on s'aconsegueix una separació gràcies a l'elevat grau d'especificitat en la interacció entre l'adsorbent i el compost a separar.



## 1.8. Tecnologies de separació per membrana

### 1.8.1. Fonaments

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

Una membrana es pot considerar que és una barrera o pel·lícula permeoselectiva entre dos medis fluids, que permet la transferència de determinats components d'un medi a l'altre a través d'ella i evita o restringeix el pas d'altres components (Raventós, 2003).

La permeabilitat selectiva està regida per la mida de la partícula, per l'afinitat química amb el material de la membrana i/o per la mobilitat dels components a través de la membrana (moviment difusiu o convectiu) (Raventós, 2003).

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

En els processos de membrana podem distingir:

- Aliment: És la solució que es vol tractar, el producte inicial del procés.
- Permeat: És el líquid que travessa la membrana, i està constituït pel solvent i alguns soluts que han travessat la membrana.
- Retentat: És la part de l'aliment que no travessa la membrana, i per tant, conté una part del solvent i una concentració incrementada de les substàncies que no poden travessa-la.

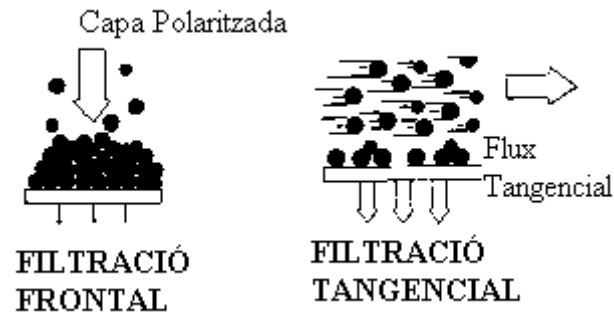
Depenent de quin sigui l'objectiu del procés ens pot interessar recuperar el permeat (per ex. en processos de purificació on es pretén eliminar impureses de baix pes molecular), el retentat (per ex. en processos de concentració), o bé les dues fraccions (per ex. en processos de fraccionament).

La força impulsora és la que ha de permetre separar els components de la solució forçant el seu pas a través de la membrana. Per tal que el procés es doni a una velocitat adequada, la força impulsora ha de ser superior a la mínima necessària (Raventós, 2003). La força impulsora varia en funció del tipus d'operació amb membranes, podent tractar-se d'una diferència de concentració, de pressió o de potencial elèctric (Rodríguez et al., 2002). En la Taula 1.6 es poden veure els diferents processos de separació per membrana segons la força impulsora.

**Taula 1.6.** Processos de separació de les membranes classificats segons la força impulsora (Raventós, 2003)

Principi	Força impulsora	Operació
Elèctric	Gradient de potencial	Electrodiàlisi
Químic	Gradient de concentracions	Diàlisi/Pervaporació
De pressió	Gradient de pressió	Osmosi inversa Nanofiltració Ultrafiltració Microfiltració

En la Figura 1.2 es mostren els dos tipus de flux que es poden utilitzar en un procés de filtració. Podem bombejar la solució perpendicularment sobre la membrana filtrant o bé treballar amb un flux creuat, de manera que la solució flueixi sobre la membrana tangencialment. Amb el flux perpendicular és fàcil que es creï una capa concentrada de molècules retingudes a una banda de la membrana, les quals dificulten el pas d'altres components i acaben provocant la colmatació. En canvi, amb el flux tangencial es crea un efecte d'auto-neteja, ja que el propi flux circulat a alta velocitat redueix la deposició per arrossegament de part de les molècules o partícules que podrien colmatar la membrana.



**Figura 1.2.** Diferència en el tipus de flux

Font: <http://www.acsmedioambiente.com/equipos/ultrafiltracion.htm>

Alguns dels paràmetres de procés que tenen una influència més significativa en els resultats d'aplicació d'aquesta tecnologia són el factor de concentració i la taxa de permeació.

El factor de concentració (FC) és la relació del volum inicial del producte a concentrar i el volum final del producte concentrat que s'obté, quan finalitza el procés. En funció del factor de concentració que es pretengui assolir, caldrà treballar amb un sistema que permeti la recirculació del producte i el manteniment del procés fins que s'hagi extret el volum de permeat prefixat (Casp i Abril, 1998).

La taxa de permeació és el volum de permeat per unitat de superfície filtrant i per unitat de temps que es va obtenint al llarg del procés ( $L/m^2h$ ). Es pot mantenir constant durant tot el procés, sense necessitat de modificar paràmetres, com la pressió transmembrana o el cabal de recirculació, o pot anar disminuint al llarg del procés quan es donen fenòmens de polarització.

La pressió transmembrana és el diferencial de pressió entre el costat de l'alimentació i el del permeat en una membrana. En incrementar la pressió transmembrana s'incrementa el flux de permeat, però també influeix en l'increment de les deposicions sobre la membrana, que fa que a llarg termini, el flux disminueixi (Raventós, 2003).

La polarització per concentració és una conseqüència directa de la permeabilitat selectiva de les membranes. Té lloc quan les molècules de solut del cabal d'alimentació no poden passar a través de les membranes, queden retingudes i s'acumulen damunt la

superfície de la membrana, on es comença a formar una capa límit en la superfície filtrant per la banda de l'alimentació. Una de les conseqüències principals d'aquest fenomen és la reducció de la taxa de permeació. Per tant, s'observa una disminució en el permeat que s'obté i es disminueix així l'eficiència de tot el procés, ja que augmenta el temps de la filtració. Quan aquest fenomen és molt prolongat en el temps pot produir l'embrutiment o colmatació de la membrana (Torres et al., 1996; Vilardell, 2010).

A l'hora d'utilitzar la tecnologia de separació per membranes hi ha una sèrie d'avantatges i d'inconvenients. Es poden veure a la Taula 1.7.

**Taula 1.7.** Avantatges i inconvenients de la separació per membranes (Raventós, 2003)

Avantatges	Inconvenients
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No és necessari escalfar l'aliment (no hi ha pèrdua de productes termolàbils).</li> <li>• La concentració per membranes no exigeix un canvi de fase.</li> <li>• Té menys despeses de manteniment i mà d'obra que l'evaporació</li> <li>• Té poques exigències d'espai.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inversió inicial important.</li> <li>• Variacions de flux del producte que es vol filtrar.</li> <li>• Obstrucció de la membrana, que redueix el temps de funcionament efectiu entre dues sessions de neteja consecutives.</li> <li>• Concentració i desenvolupament de microorganismes, si el temps de permanència i la temperatura de treball són adequats.</li> </ul>

L'any 2002 Rodríguez i altres, distingeixen tres grups diferents d'operacions de separació amb membrana, segons l'objectiu que es vulgui assolir:

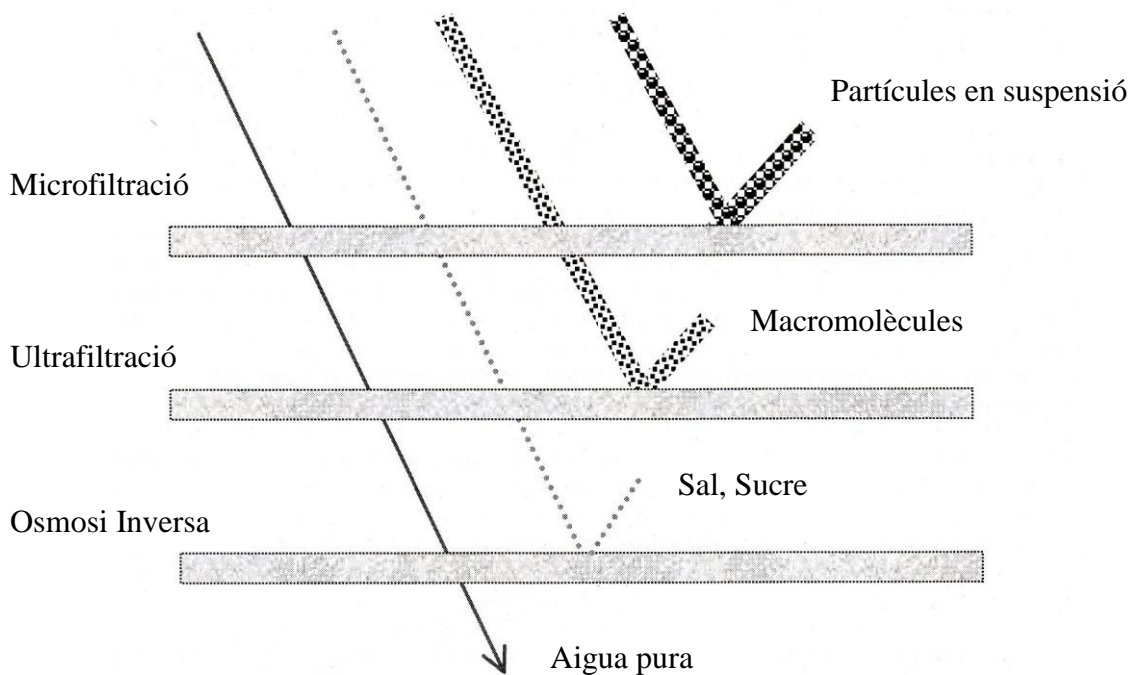
- Operacions de purificació o clarificació: La separació té com a objectiu la eliminació de components no desitjables, que habitualment son rebutjats i retinguts per la membrana. Per tant, el producte amb valor comercial sol ser la fase que travessa la membrana. Un exemple d'aquest tipus d'operació és la clarificació de vins i cerveses, la purificació de suc de fruites, la desmineralització i purificació d'aigua, etc.

- Operacions de fraccionament: Es separen determinats components presents en el medi. Interessen tant els retinguts per la membrana com els que la poden travessar. En aquest grup es troben operacions com les de fraccionament de proteïnes i enzims.
- Operacions de concentració de dissolucions: S'elimina part del dissolvent present en la dissolució fent-lo passar a través de la membrana. El producte d'interès en la separació és la dissolució concentrada, que queda retinguda per la membrana. En la indústria alimentaria s'utilitzen aquest tipus d'operacions per a concentrar dissolucions de diferents productes: suc de fruita, olis vegetals, enzims, llet, clara d'ou, cafè, extractes naturals, coto, àcid cítric, sucre, pasta de tomàquet, etc.

### **1.8.2. Processos i aplicacions**

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

En la Figura 1.3 es pot veure el que pot retenir i deixar passar a través de la membrana cada un d'aquests processos.



**Figura 1.3.** Diferents processos de la tecnologia de separació per membrana (Raventós, 2003).

### 1.8.2.1. Microfiltració (MF)

Consisteix en la separació de les partícules en suspensió en un líquid, principalment bacteris i llevats. Les membranes de MF es classifiquen pel diàmetre de les partícules més petites que queden retingudes i oscil·la entre 0,1 i 10  $\mu\text{m}$ . Les pressions de treball són més baixes que la resta de processos, entre 0,1 i 2 bar.

És una tècnica d'higienització, més que de concentració, perquè la composició del permeat és pràcticament la mateixa que la del líquid inicial, mentre que el retentat conté els microorganismes que contaminaven el producte tractat.

### 1.8.2.2. Ultrafiltració (UF) i Diafiltració (DF)

La UF en general serveix per a concentrar grans molècules i macromolècules de pes molecular d'entre 1 i 500 kDa, com les proteïnes i el midó. També s'utilitza com a pretractament per als sistemes de nanofiltració i osmosi inversa. La pressió de treball oscil·la entre 2 i 5 bars.

El factor d'embrutiment de la membrana durant l'ultrafiltració provoca un disminució del flux de permeació amb el temps. Aquest factor d'embrutiment o *fouling* és molt estudiat en aquest tipus de membranes i s'intenta evitar amb un pretractament de l'aliment i/o modificant les propietats fisicoquímiques de la membrana. Si s'aconsegueix reduir aquest embrutiment s'han d'aplicar menys productes químics per a la neteja, de manera que la vida útil d'aquestes membranes s'allarga.

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

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

### 1.8.2.3. Nanofiltració (NF)

En la NF s'aconsegueix la concentració de components orgànics per eliminació de ions monovalents (desmineralització). Es retenen molècules de solut amb un pes molecular d'entre 0,1 i 1 kDa. Les pressions d'operació oscil·len entre 5 i 20 bars. Una possible aplicació de la NF és la desmineralització de l'aigua.

#### **1.8.2.4. Osmosi inversa (OI)**

En la OI s'aconsegueix la concentració de solucions per eliminació d'aigua. Utilitza les membranes més fines (amb porus de diàmetre menor a 1nm), que permeten separar les molècules més petites. Les pressions de treball són elevades, entre 10 i 100 bar per superar la pressió osmòtica de les solucions de molècules de baix pes molecular.

L'aplicació principal de l'osmosi inversa és la dessalinització de l'aigua marina per a la seva potabilització, però cada cop és més utilitzada en la purificació d'aigua residual industrial o d'aigua superficial, per eliminar els contaminants orgànics o els residus químics.

#### **1.8.3. Equips i materials**

En la tecnologia de separació per membrana existeixen quatre tipus de mòduls comercials que es mostren a la taula 1.8, junt amb les seves característiques. Les diferències geomètriques de cada tipus en determinen aspectes importants, com els rendiments i els costos.

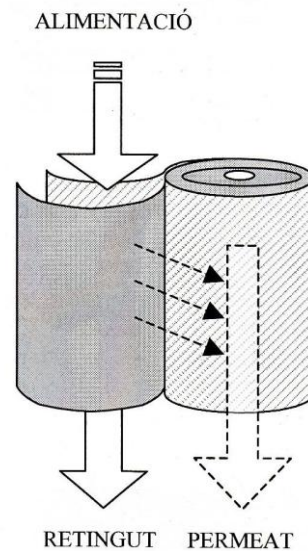


**Taula 1.8.** Característiques bàsiques dels diferents mòduls de membranes (Raventós, 2003)

Característiques	Tubular	Pla	En espiral	Fibres buides
Superfície de membrana (m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup> )	25-100	200-500	500-2000	1500-6000
Flux (m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> *dia)	0.3-1	0,3-1	0,3-1	0.004-0.1
Pèrdua de pressió (atm)	2-3 Turbulent	1-2 Laminar	1-2 Laminar	0.3 Laminar
Velocitat necessària (cm/s)	100-500	100-300	25-50	0,5
Pretractament	Filtre	Filtre	Coagulació i filtre 50 µm	Coagulació i filtre 50 µm
Facilitat de neteja	Bona	Poca	Poca	Nul·la, risc elevat d'embussament
Canvi de membranes	Fàcil	Fàcil	Difícil	Impossible
Cost	Elevat	Elevat	Baix	Baix
Aplicació	UF, diàlisi, MF (ceràmic) OI (polímers)	UF, OI, PV, cost energètic més baix del mateix volum de líquid retingut.	UF, OI, NF, les més aplicables	UF, OI, diàlisi, tractament d'aigua, sucs, llet, solucions de sucre, molt desenvolupades, poliamides asimètriques.

En un mòdul espiral les membranes en forma de làmina es col·loquen una sobre l'altra (de 4 a 10 làmines) i s'enrotllen sobre un eix central. Queda un cilindre que es col·loca a l'interior d'un tub o cartutx. La capa activa de la làmina s'orienta cap a l'exterior, de manera que el flux de permeat va en direcció de l'exterior cap a l'interior, i els soluts queden retinguts en aquesta superfície activa. Un cop el permeat passa la capa activa, una malla porosa entre les làmines és l'encarregada de conduir-lo cap a l'interior del tub o eix central. Entre les dues capes actives es col·loca una malla sintètica, que condueix l'aliment per tota la superfície de la membrana. Aquest conjunt o "sandvitx" és segellat

per tal de no barrejar el corrent de permeat amb els altres corrents. El corrent d'alimentació i el corrent de concentrat són axials en la direcció de l'eix central i paral·lels a la superfície de la membrana, per a poder disminuir el fenomen de polarització. En la Figura 1.4 es pot veure un esquema d'un mòdul en espiral.



**Figura 1.4.** Mòdul de membrana en espiral (Raventós, 2003)

Els materials que s'utilitzen en molts processos de membranes poden ser molt diferents, ja que tant el material com les configuracions ofereixen moltes possibilitats.

Es poden fabricar, amb polímers o amb compostos inorgànics, membranes sintètiques que poden ser utilitzades en un gran nombre de processos dins de la indústria.

Entre les membranes sintètiques podem distingir:

- Membranes polimèriques o orgàniques: estan fetes per una gran varietat de polímers. N'hi ha de dos tipus:

-Hidròfobes: politetrafluoroetilè (PTFE, tefló), polivinil de fluor (PVDF), polopropilè (PP), polietilè (PE), polisulfona (PSF) o polietersulfona (PES)

-Hidròfiles: estan fetes d'esters de cel·lulosa que són biodegradables, policarbonats (PC), o poliamides (PA).

- Membranes ceràmiques o inorgàniques: estan fetes de materials com l'alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), l'òxid de zirconi ( $\text{ZrO}_2$ ) o l'òxid de silici ( $\text{SiO}_2$ ).

Les membranes ceràmiques o inorgàniques són rígides i permeten un flux de 5 a 10 vegades més gran que les polimèriques. Resisteixen els productes químics i es poden netejar fàcilment sense malmetre'n la capa superficial. Toleren temperatures elevades i, per tant, es poden esterilitzar, a diferència de les polimèriques que tenen baixa resistència a les temperatures i al pH. Una altra diferència entre els dos tipus de membranes és que les ceràmiques tenen una llarga vida, fins a 10 anys, en canvi la vida útil de les polimèriques va des de 1 fins a 3 anys. Un inconvenient de les membranes ceràmiques és el seu elevat cost.

Es poden fer més classificacions de les membranes, per exemple, segons l'estructura de la membrana, que pot ser homogènia, asimètrica o composta; o bé segons la porositat de la membrana, on trobaríem tres tipus: membrana porosa, membrana microporosa i membrana no porosa.

## **1.9. Antecedents del treball**

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

El grup està treballant actualment en el projecte d'investigació "Utilització d'hemoderivats com a ingredients funcionals en la formulació d'aliments" (MEC-AGL2007-60917/ALI), que té com a un dels seus objectius el desenvolupament d'una tecnologia de separació de fraccions de les proteïnes del plasma aplicable a nivell industrial, per tal de poder estudiar l'eficàcia d'ingredients formulats a partir de mescles variables de proteïnes plasmàtiques o de proteïnes plasmàtiques amb proteïnes alimentàries d'altres orígens (soja, ou, llet, etc.)

En un treball previ (Vilardell, 2010), s'havia posat a punt la metodologia per a l'obtenció de concentrats de proteïnes plasmàtiques de sang de porc (sèrum, globulines i albúmina) a escala de laboratori.

L'objectiu que ens varem proposar en aquest treball va ser escalar el procés d'obtenció de concentrats de sèrum (plasma sense fibrinogen) per obtenir-ne la quantitat suficient per fer proves d'aplicació en aliments model.

## **2. OBJECTIUS**

## 2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball va ser posar a punt la metodologia d'obtenció de concentrats de sèrum (plasma sense fibrinogen) a escala de planta pilot.

Per tal d'assolir-lo ens vàrem plantejar els objectius específics següents:

1. Escalar el procés d'obtenció de sèrum a partir de plasma de sang porcina, fent precipitar el fibrinogen mitjançant la tècnica *salting out* amb sulfat amònic.
2. Posar a punt el mètode d'obtenció de sèrum concentrat i dessalat mitjançant un equip modular d'ultrafiltració tangencial amb membranes polimèriques espirals (10 i 30 kDa)
  - 2.1. Determinar les taxes de permeació durant les etapes de concentració i dessalat.
  - 2.2. Determinar l'eficàcia de l'etapa de concentració a partir de determinacions d'extracte sec, cendres i contingut en proteïna total del plasma inicial i del permeat, així com del sèrum abans i després del procés de concentració.
  - 2.3. Determinar l'eficàcia del procés de dessalat per diafiltració a partir del seguiment de la cinètica de reducció de sals mitjançant determinacions de conductivitat.
3. Fer la caracterització físico-química dels productes finals (sèrum concentrat i dessalat) obtinguts.

### **3. MATERIAL I MÈTODES**

### 3. MATERIAL I MÈTODES

#### 3.1. Disseny experimental

L'esquema de treball que s'ha seguit, per tal d'obtenir solucions de sèrum concentrat a partir de sang procedent del sacrifici de porcs en un escorxador industrial, es mostra en la Figura 3.1. El processament de la sang es realitzava en dues etapes. La primera consistia en la centrifugació per separar dues fraccions: fracció cel·lular i fracció plasmàtica (plasma). A partir del plasma, i després de precipitar el fibrinogen amb la tècnica *salting out*, s'obtenia el sèrum.

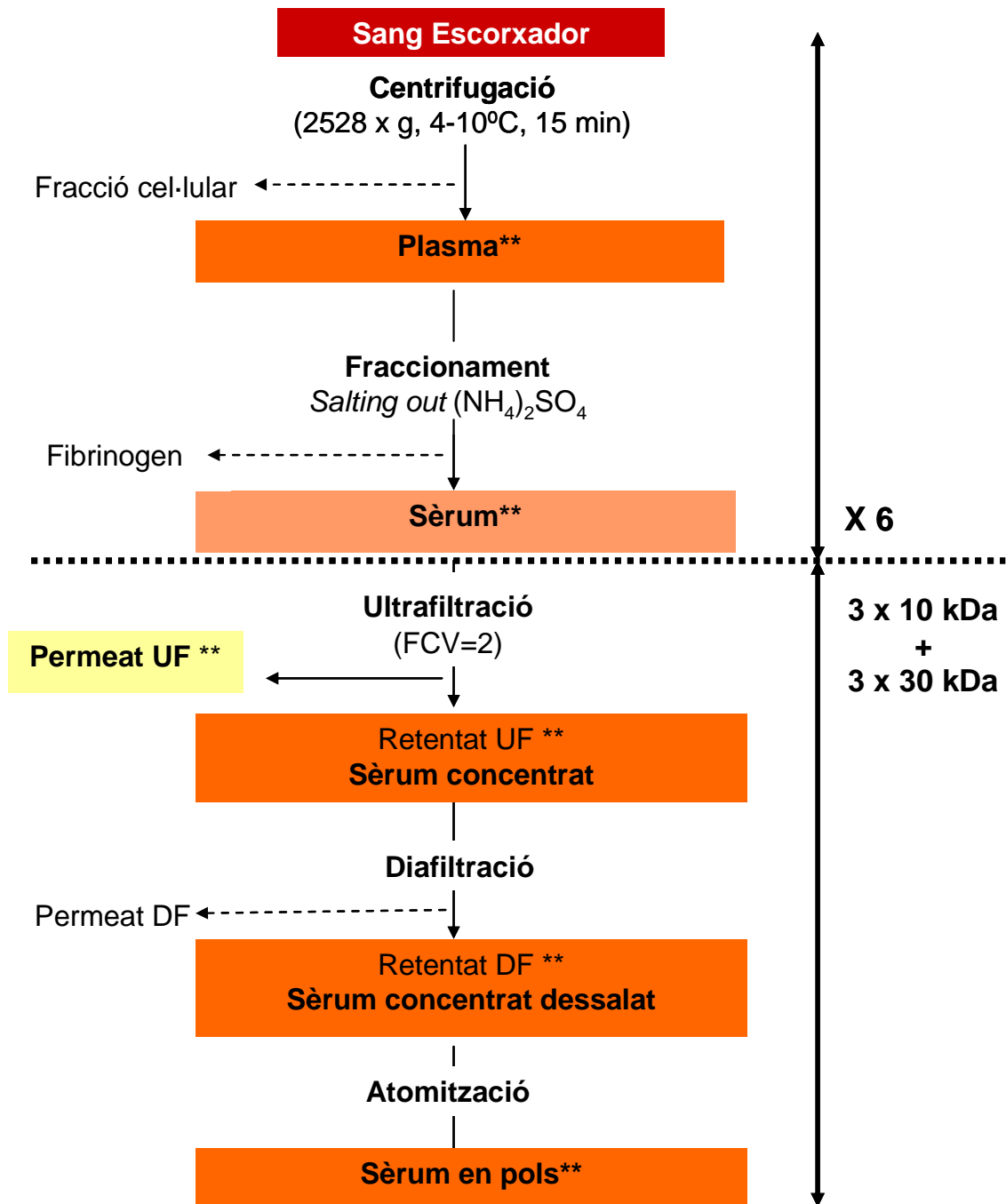
La segona etapa consistia en la utilització de la tecnologia de separació per membranes per tal de concentrar i dessalar el sèrum obtingut en el fraccionament. Els objectius d'aquesta etapa van ser la concentració per ultrafiltració de les proteïnes del sèrum, l'eliminació de l'excés de sals que contenia degut a la tècnica de fraccionament per *salting out* mitjançant diafiltració, i la caracterització físico-química del producte concentrat obtingut.

Durant els processos d'ultra i diafiltració es feia el seguiment de la taxa de permeació i de la cinètica d'eliminació de sals de la mostra de sèrum.

L'eficàcia de les operacions de concentració i dessalat es va avaluar a partir de la caracterització físico-química de diferents mostres recollides durant el procés d'obtenció del sèrum concentrat. Es va determinar la conductivitat i es va analitzar el contingut en humitat, proteïna i cendres del plasma inicial, del sèrum obtingut per *salting out*, del sèrum i del permeat obtinguts després de l'etapa de concentració i del producte final després de la diafiltració (sèrum concentrat i dessalat).

Per tal de garantir la conservació del sèrum concentrat fins la seva utilització en proves d'aplicació, es va procedir a deshidratar-lo per atomització i també es va fer la caracterització físico-química del producte en pols.





**\*\*Caracterització FQ:** conductivitat, proteïnes, extracte sec, cendres

**Figura 3.1.** Disseny experimental del treball

Tot el procés es va repetir sis vegades, amb sang recollida en sis setmanes diferents, de manera que cada setmana permetia el processament i caracterització de totes les mostres corresponents al mateix lot. Es va treballar amb dues membranes d'ultrafiltració de diferent pes molecular de tall, 10 i 30 kDa, i es van fer 3 repeticions del procés d'obtenció de sèrum concentrat amb cadascuna de les dues membranes.

### **3.2. Procedència del plasma de sang de porc**

Es va utilitzar sang de porc d'un escorxador industrial del Gironès, recollida en condicions higièniques. Cada dia de mostreig es recollien 10 L de sang que contenia anticoagulant (polifosfat sòdic) d'un dipòsit refrigerat. S'utilitzaven recipients estèrils de 5 L i es transportaven fins al laboratori en refrigeració.

Per a obtenir el plasma es centrifugava la sang en un equip Sorvall RC 5C Plus (DuPont Co., Newtown, Connecticut) a 4080 rpm durant 15 minuts i entre 4 i 10 °C, per a mantenir la mostra en refrigeració. Es decantava el sobrenedant per separar-lo de la fracció cel·lular i s'obtenien uns 5 L de plasma.

### **3.3 Obtenció del sèrum**

Per a obtenir el sèrum plasmàtic es va utilitzar la tècnica *salting out*, que consistia en afegir al plasma una solució saturada de sulfat amònic  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fins a la concentració necessària per provocar la precipitació del fibrinogen, que en treballs anteriors s'havia determinat del 20% de saturació (Vilardell, 2010).

La solució precipitant es preparava dissolent a temperatura ambient 767 g de sulfat amònic en 1 L de tampó TRIS/EDTA 10 mM. Es mantenia en refrigeració de manera que l'excés de sulfat amònic precipitava en forma de cristalls i es garantia la saturació. La solució tampó es preparava dissolent 1,223 g de TRIS i 3,76 g de EDTA en 1 L d'aigua destil·lada, s'ajustava a pH 7,4 i es conservava a temperatura ambient.

El procés de fraccionament es realitzava en fred i en agitació continua per minimitzar les possibilitats de desnaturalització proteica. Es va utilitzar un reactor encamisat pel qual es feia circular aigua freda procedent d'un bany d'aigua i gel amb una resistència

que permetia mantenir la temperatura a 0-1°C. S'utilitzava un rotor d'agitació i una pala que girava a 62 rpm (Heldolph RZH 2021) que permetia l'homogeneïtzació del sulfat amònic addicionat en el plasma (Figura 3.2).

Es partia de 4 L de plasma en el tanc de doble camisa i s'addicionava gota a gota 1 L de sulfat amònic saturat utilitzant 4 buretes simultàniament.

S'aconseguia així la concentració de sulfat amònic que provocava la precipitació del fibrinogen. Després d'un període de 15 minuts de repòs es centrifugava (Sorvall RC 5C Plus, DuPont Co., Newtown, Connecticut) a 10.000 g durant 15 minuts, es decantava el sobrenedant i s'obtenien uns 5 L de sèrum.

Es reservava una fracció del sèrum obtingut per tal de fer les determinacions analítiques de conductivitat, extracte sec, contingut en proteïna i cendres. El fibrinogen que s'obtenia en el *pellet* de la centrifugació no s'utilitzava en aquest estudi però es congelava per a posteriors aplicacions.



**Figura 3.2.** Equip de fraccionament

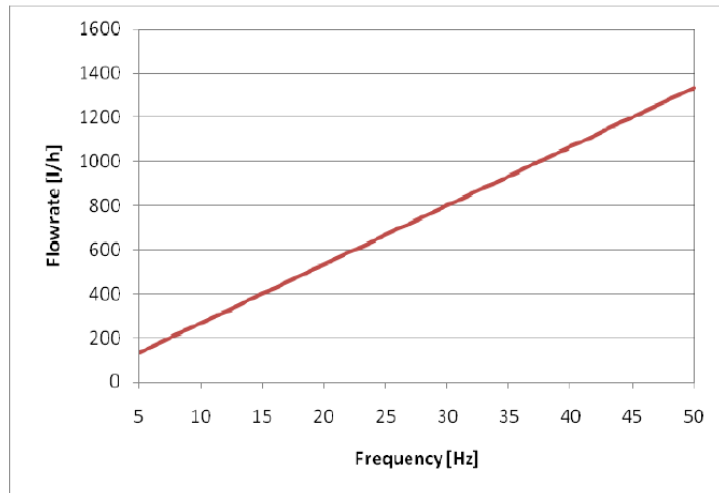
### 3.4. Concentració del sèrum per ultrafiltració

Per a obtenir el sèrum concentrat a partir del sèrum es va utilitzar un equip de filtració per membranes MMS Bench System SW18 (MMS AG Membrane Systems, Urdorf, Alemanya) (Figura 3.3). És un equip d'escala planta pilot que permet treballar amb fluxos de 300-1200 L/h i fins a 40 bar. El flux que proporciona una bomba centrífuga es regula a través d'un variador de freqüència segons el gràfic de la Figura 3.4.



1. Bomba
2. Vàlvula RV-2
3. Manòmetre d'entrada
4. Manòmetre de sortida
5. Tanc d'alimentació

**Figura 3.3.** Equip d'ultrafiltració MMS MMS Bench System SW18 (MMS AG Membrane Systems, Urdorf, Alemanya)



**Figura 3.4.** Flux de la bomba regulat pel variador de freqüència

L'equip consta d'un tanc d'alimentació que conté el producte que s'ha de filtrar, una bomba per fer circular el producte i proporcionar la pressió necessària, un receptacle on es col·loca el mòdul de filtració, dos manòmetres, un a l'entrada i un a la sortida del mòdul, que indiquen la pressió de procés i permeten fer el càlcul de la pressió transmembrana, una sonda de temperatura, que permet conèixer la temperatura del retentat i un fluxímetre a la sortida de permeat. A més disposa d'una sèrie de vàlvules que determinen el circuit del producte (recirculació o sortida de retentat) i la pressió operativa per a l'obtenció de permeat, i vàlvules de purga en diferents parts del sistema.

L'equip pot allotjar diferents tipus de mòduls de filtració: membranes espirals, tubulars o de fibra balmada i es pot utilitzar en processos de microfiltració (MF), ultrafiltració (UF), nanofiltració (NF) i osmosi inversa (OI).

En aquest estudi es va treballar amb dos mòduls de membrana espiral amb  $0,32 \text{ m}^2$  de superfície filtrant. Es van fer tres repeticions del procés de concentració amb una membrana de polietersulfona (PESU) amb un pes molecular de tall (*cut-off*) de 10 kDa (GE, PW1812C-34D) i tres repeticions amb una membrana de poliacrilonitril modificat amb un *cut-off* de 30 kDa (GE, MW1812C-34D).

Les membranes s'han de mantenir submergides en una solució conservant d'àcid cítric (1%) a pH 2-3 que conté un agent antimicrobià (0,3% bisulfit sòdic). Un cop instal·lada la membrana en el seu receptacle i abans de començar el procés d'ultrafiltració es feia circular aigua per eliminar la solució conservant i es procedia a mesurar el flux de

permeació amb aigua i unes condicions fixes de temperatura, pressió transmembrana i cabal de circulació. Aquest flux era el que s'utilitzava com a referència per a verificar l'eficàcia del procés de neteja de la membrana aplicat al finalitzar els tractaments. La recuperació del flux de permeació d'aigua destil·lada en les mateixes condicions d'operació inicials indicava que la neteja s'havia realitzat correctament.

Es partia de 4 L de sèrum que s'impulsaven des del tanc d'alimentació fins a la membrana amb un flux de 400 L/h amb la bomba regulada a 15 Hz. Per aconseguir la separació del sèrum en retentat i permeat es tancava la vàlvula RV-2 fins assolir una pressió de 2 bars a la sortida del mòdul de filtració, i s'anava recirculant el retentat cap al tanc d'alimentació. Es mantenia en marxa el sistema fins assolir un factor de concentració volumètric de 2 ( $FCV=2$ ), és a dir, s'obtenien 2 L de permeat i 2 L de retentat.

Durant el procés de concentració es determinava el flux de permeació a partir del pes de permeat recollit, que es mesurava en línia amb una balança (Scaltec SBA62, Heiligenstadt, Alemanya) i s'anotava a intervals de temps regulars (aproximadament cada 2,5 min). Amb la mateixa freqüència també es feia el seguiment de les variacions de temperatura del producte circulant.

Al finalitzar l'etapa de concentració es retirava una mostra de sèrum concentrat i del permeat obtingut, per fer les determinacions analítiques corresponents (conductivitat, extracte sec, proteïna i cendres), i es procedia a iniciar l'etapa d'eliminació de sals.

### **3.5. Dessalat del sèrum concentrat per diafiltració**

Per ajudar a l'eliminació de les sals s'anava addicionant aigua destil·lada al tanc d'alimentació que contenia el sèrum concentrat en alíquotes de 500 mL fins arribar a un volum de 5 L d'aigua afegida i la recuperació de 5 L de permeat.

En aquesta etapa es feia el seguiment del flux de permeació tal com s'ha descrit en l'apartat anterior, i a més s'anaven retirant periòdicament mostres del tanc per fer la determinació de conductivitat i obtenir la cinètica de reducció de sals del sèrum durant el procés de diafiltració.

El producte final d'aquesta etapa van ser 2 L de sèrum concentrat i dessalat dels quals es va separar una alíquota per tal de fer les determinacions analítiques pertinents.

Després de tota l'operació es realitzava una rutina de neteja per eliminar les restes de producte de l'interior del mòdul de filtració. La neteja consistia en recircular amb un flux de 40 L/h de manera seqüencial aigua, una solució de NaOH i una solució d'àcid cítric al 2%, a 40-45°C durant períodes de 10 min sense pressió i de 5 min amb una pressió de 5 bar. Un cop realitzada la neteja es verificava la recuperació del flux de permeació de la membrana amb aigua i en les mateixes condicions que a l'inici, es buidava el circuit i es retirava la membrana del receptacle. La membrana es mantenia submergida en la solució conservant fins a una nova utilització.

### **3.6. Atomització del Sèrum concentrat i dessalat**

Els 2 L de sèrum concentrat i dessalat es van deshidratar amb un atomitzador de laboratori Büchi Mini Spray Dryer model B-191 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suïssa) (Figura 3.5). L'equip consta d'una bomba peristàltica que impulsa el producte a deshidratar cap a una tovera a pressió, que actua com a nebulitzador i l'injecta dins la cambra de deshidratació. Un sistema de calefacció escalfa l'aire procedent d'un compressor a la temperatura programada i dins la cambra es produeix la transferència de calor des de l'aire calent fins les gotetes del producte nebulitzat provocant l'evaporació de l'aigua que contenen. L'aire comprimit que s'utilitza com a fluid calefactor també fa les funcions de vehiculador de les partícules deshidratades cap a un cicló separador. En el cicló les partícules, en forma de pols fina, es separen de l'aire humit i es recullen en un recipient col·lector situat a la part de sota del cicló. Per a la deshidratació del sèrum concentrat es va treballar amb una temperatura d'entrada de l'aire de 150°C, una temperatura màxima a la sortida 80°C, el flux d'alimentació del producte regulat a 500 mL/h, un cabal d'aspiració d'aire de 60 L/h i una pressió del flux d'aire per a la polvorització de 5 bar.



1. Sèrum a deshidratar
2. Cambra de deshidratació
3. Cicló separació
4. Sèrum deshidratat

**Figura 3.5.** Equip d'atomització Büchi Mini Spray Dryer model B-191

### **3.7. Determinacions analítiques**

#### **3.7.1. Extracte sec**

L'extracte sec es determinava per gravimetria a partir del contingut d'humitat de les mostres. Per a fer la determinació s'utilitzaven càpsules de vidre o de porcellana en les quals s'afegia 1 o 2 mL de mostra. Es determinava la pèrdua de pes després de dessecar-les a 105°C durant 24 h en una estufa (P-Selecta), utilitzant una balança de precisió (Sartorius Basic BA 2105, Goettingen, Alemanya). De cada mostra es feien com a mínim dues repeticions.

#### **3.7.2. Contingut en sals minerals (cendres)**

El contingut en sals minerals es determinava amb un mètode gravimètric a partir de la incineració de la mostra. S'afegien 1 o 2 mL de mostra en gresols de porcellana. Les mostres es pesaven en una balança de precisió després de dessecar-les en una estufa (P-



Selecta) a 105°C durant 24 h i d'incinerar-les a 550°C en una mufla (Naber industrieofenbau) durant 4 o 5 h. Es determinava el pes del residu d'incineració i s'expressava com a percentatge del pes inicial de mostra. Es feien dues repeticions analítiques de cada mostra.

### 3.7.3. Contingut en proteïnes

#### Mètode del Biuret

La determinació del percentatge de proteïna de les mostres que contenen solució precipitant de sulfat amònic (sèrum procedent del fraccionament, permeat de l'etapa de concentració i sèrum concentrat abans de la diafiltració) es va fer utilitzant la tècnica espectrofotomètrica del Biuret.

En el mètode Biuret s'utilitza el reactiu colorant Biuret, que conté sulfat de coure que, en condicions alcalines, es coordina amb els enllaços peptídics de la proteïna, formant un complex colorant-proteïna de color violeta, la intensitat del qual depèn de la concentració de proteïnes que contingui la mostra. El reactiu de Biuret es prepara dissolent 0,9 g de tartrat de sodi i potassi ( $\text{KNaC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 0,3 g de sulfat de coure ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) i 0,5 g de Iodur de potassi (KI) en 100 mL de NaOH 0,2N.

Es van preparar dues solucions mare de Seroalbúmina bovina (BSA) de concentració 10 mg/mL i 2 mg/mL. A partir d'aquestes es van fer les dilucions necessàries amb aigua destil·lada per obtenir patrons amb les següents concentracions: 0; 0,2; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 5; 7,5; 10 mg de proteïna /mL. Les mostres es van diluir amb aigua destil·lada fins aconseguir una concentració de proteïna entre 0,5 i 10 mg/mL. Les dilucions de les mostres van ser les següents: 1/10 i 1/50 pel sèrum i 1/25 i 1/50 pel sèrum concentrat. El permeat es va analitzar sense dilució prèvia.

Es va introduir 1 mL de cada mostra i de cada solució patró en tubs d'assaig i seguidament es van afegir 1,5 mL de colorant Biuret. Es van posar tots els tubs a incubar a 37°C durant 30 minuts, després es van refredar ràpidament i es va procedir a la lectura espectrofotomètrica a 550 nm amb un espectrofotòmetre de doble feix (6715 UV/VIS, Spectrophotometer Jenway, Staffordshire, UK). De cada mostra es van realitzar com a mínim dues determinacions.

### Mètode Kjeldhal

La determinació del contingut en proteïna de les mostres de plasma, de sèrum concentrat-dessalat i del sèrum en pols es va fer pel mètode Kjeldhal, que consisteix en determinar el contingut total en nitrogen de la mostra i relacionar-lo amb el contingut de proteïnes. La determinació del nitrogen total es fa mineralitzant la mostra amb una digestió a alta temperatura en àcid sulfúric i en presència de catalitzador de Seleni. S'aconsegueix així transformar el nitrogen dels compostos orgànics en nitrogen amoniacal. L'amoníac s'allibera per destil·lació en medi alcalí i es recull en una solució d'àcid bòric. Finalment es valora l'amoníac recollit utilitzant àcid clorhídric.

Es va posar 1 mL de cada mostra en tubs digestors Kjeldhal. En el cas del sèrum en pols van ser 0,1 g. Seguidament es van afegir 10 mL  $H_2SO_4$  96% i una pastilla de catalitzador de seleni. Les mostres es van digerir durant una hora a  $170^\circ C$  i dues hores a  $370^\circ C$  en un bloc digestor (Gerhart KB20, Alemanya) (Figura 3.6) fins que la mostra passava a un color transparent-verdós. Després s'afegia aigua destil·lada i es portaven a un destil·lador Kjeldhal (Buchi K314, Alemanya) (Figura 3.7). Abans de destil·lar s'alcalinitzava la mostra afegint hidròxid sòdic al 40%. L'amoníac destil·lat es recollia en un erlenmeyer que contenia 25 mL d'àcid bòric al 4% i unes gotes d'indicador mixt (blau de metilè/roig de metil). Es feia la valoració amb àcid clorhídric 0,1 N fins al viratge de la mostra de color verd a lila. El percentatge de nitrogen es convertia en percentatge de proteïna multiplicant per un factor de 6,25. Cada mostra es va analitzar per duplicat.



**Figura 3.6.** Bloc digestor (Gerhart KB20, Alemanya).



**Figura 3.7.** Destil·lador kjeldhal (Buchi K314, Alemanya)

#### **3.7.4. Conductivitat**

La conductivitat de les mostres es mesurava amb un conductímetre Crison GLP 31 (Crison Instruments SA, Barcelona, Espanya) amb patrons estàndard de calibratge de 14,13 mS/cm i 12,88 mS/cm. Ens permetia fer el seguiment de la reducció de sals que es produïa en l'etapa de diafiltració. Es realitzaven sempre 2 lectures de cada mostra.

## **4. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 4.1. Proves prèvies

Es van fer unes proves d'ultrafiltració amb plasma de sang porcina amb l'objectiu de familiaritzar-nos amb el funcionament de l'equip i establir les condicions de processament del sèrum. Com que el ventall de pesos moleculars de les proteïnes plasmàtiques és molt ampli es va decidir fer les proves amb la membrana de pes molecular de tall més restrictiu, és a dir, la de 10 kDa, inferior al de la majoria de proteïnes del plasma, per tal de minimitzar les pèrdues de proteïna durant el procés de filtració i retenir-les en el producte concentrat. En altres estudis de desmineralització per ultrafiltració de plasma sencer també es treballava amb membranes de 10 kDa (Del Hoyo *et al.*, 2007; Vilardell, 2010).

A partir dels resultats d'aquests experiments preliminars es van determinar les condicions de procés que s'utilitzarien per concentrar i dessalar el sèrum. Es va determinar que el volum mínim de mostra en l'interior del sistema de filtració havia de ser de 2 L, per tal de garantir que durant el procés no s'introdueix aire, cosa que limitaria la vida útil de la bomba i de la membrana i dificultaria l'estabilització de les condicions de procés. Donat que el factor de concentració volumètric (FCV) que es volia assolir era de 2, es va decidir treballar amb un volum inicial de mostra de 4L en cadascuna de les repeticions; així, en acabar la fase de concentració, en l'interior de l'equip hi hauria el volum mínim de mostra necessari pel seu correcte funcionament.

Els cabals de recirculació recomanats pel fabricant de l'equip, quan es treballa amb mòduls de membrana espirals, és de 350 a 400 L/h. Es va considerar adequat el flux de permeació obtingut treballant amb un cabal de recirculació de 400 L/h (15 Hz de freqüència) i una pressió transmembrana (PTM) de 2 bars. En aquestes condicions s'obtenia un flux entre 8 i 9 L/m<sup>2</sup>.h. Per tant, es va decidir avaluar el resultat del procés de concentració i dessalat de mostres de 4L de sèrum en aquestes condicions operatives.

Cadascuna de les repeticions es va fer en una setmana diferent, de manera que cada setmana s'anava a buscar sang a l'escorxador i es feia el processament i caracterització

de totes les mostres corresponents a un mateix lot. Es va treballar amb dues membranes d'ultrafiltració de diferent pes molecular de tall (cutt-off), 10 i 30 kDa, i es van fer 3 repeticions del procés d'obtenció de sèrum concentrat amb cadascuna de les dues membranes.

## 4.2. Obtenció de Sèrum concentrat amb la membrana de 10 kDa

### 4.2.1. Característiques físico-químiques de la matèria primera: plasma i sèrum

Es van determinar les característiques físico-químiques del plasma i del sèrum obtingut després de la precipitació per *salting out* del fibrinogen. Els resultats de la caracterització dels lots que s'havien de processar amb la membrana de polietersulfona de 10 kDa es presenten en la Taula 4.1.

**Taula 4.1.** Característiques físico-químiques del plasma i del sèrum per processar amb la membrana de 10 kDa (mitjana  $\pm$  desviació estàndard, n=3).

	<b>Conductivitat 25°C</b> (mS/cm)	<b>Extracte sec</b> (%)	<b>Cendres</b> (%)	<b>Proteïna</b> (%)
<b>Plasma</b>	14,47 $\pm$ 0,17	8,84 $\pm$ 0,48	1,40 $\pm$ 0,07	6,60 $\pm$ 0,43
<b>Sèrum</b>	106,23 $\pm$ 2,85	15,68 $\pm$ 0,38	1,24 $\pm$ 0,09	5,91 $\pm$ 0,39

Veiem que hi ha una gran diferència en els valors de conductivitat que presentaven les dues mostres. Ambdós valors, tant del plasma com del sèrum, són lleugerament inferiors, tot i que del mateix ordre, als obtinguts en un treball anterior (Vilardell, 2010) realitzat amb sang recollida en un altre escorxador. El plasma té una conductivitat del voltant de 14,57 mS/cm, que ve donada per les pròpies sals que conté el plasma de forma natural i per l'anticoagulant (polifosfat sòdic) que s'afegeix durant el procés de recollida de la sang en l'escorxador. Tenint en compte que és plasma provinent de sang recollida en tres setmanes diferents, no consecutives i amb un interval d'aproximadament 2 mesos entre la primera i la tercera, la desviació estàndard tan baixa del valor de conductivitat indica força homogeneïtat de la matèria primera subministrada per l'escorxador pel què fa a aquesta característica. Per altra banda, la

conductivitat tan elevada del sèrum, més de 7 vegades superior a la del plasma, és deguda a la presència del sulfat amònic addicionat durant el procés de fraccionament. Aquest elevat contingut en sals és el que justifica la necessitat de dessalar la mostra abans de plantejar la seva utilització com a ingredient alimentari. L'objectiu de la fase de diafiltració, que es comenta més endavant, va ser precisament eliminar aquest excés de sals i recuperar un valor de conductivitat pròxim al que presentava el plasma abans del fraccionament.

En comparar el percentatge d'extracte sec de les dues mostres veiem que el del plasma, que és de l'ordre del 8,84%, és bastant més baix que el del sèrum, que és de l'ordre del 15,68%. El motiu d'aquesta diferència és també l'increment d'extracte sec que suposa l'addició de sulfat amònic.

Podem observar que la suma del percentatge de cendres i de proteïna del plasma és aproximadament del mateix ordre que el contingut en extracte sec. En treballs anteriors s'havien obtingut resultats similars on el greix, que en aquest treball no s'ha analitzat, era el tercer component de l'extracte sec, però molt minoritari, ja que es trobava en concentracions inferiors al 0,3% (Ranken, 1980; Parés, 1998). Si ens fixem en el sèrum, en canvi, observem que la suma de les cendres i la proteïna no coincideix amb el total de l'extracte sec. Això és degut a que el sulfat amònic  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  afegit durant el *salting out* es volatiliza durant la calcinació de la mostra. En les mostres de sèrum, per tant, la diferència entre l'extracte sec i la suma de cendres i proteïna correspon al percentatge en pes de sulfat amònic perdut per volatilització. Degut a aquest fet, i igual que en treballs anteriors (Vilardell, 2010), es va decidir que per avaluar l'eficàcia del procés de dessalat no es podia utilitzar el contingut en cendres i el seguiment de la reducció de sals es va fer a partir de les mesures de conductivitat.

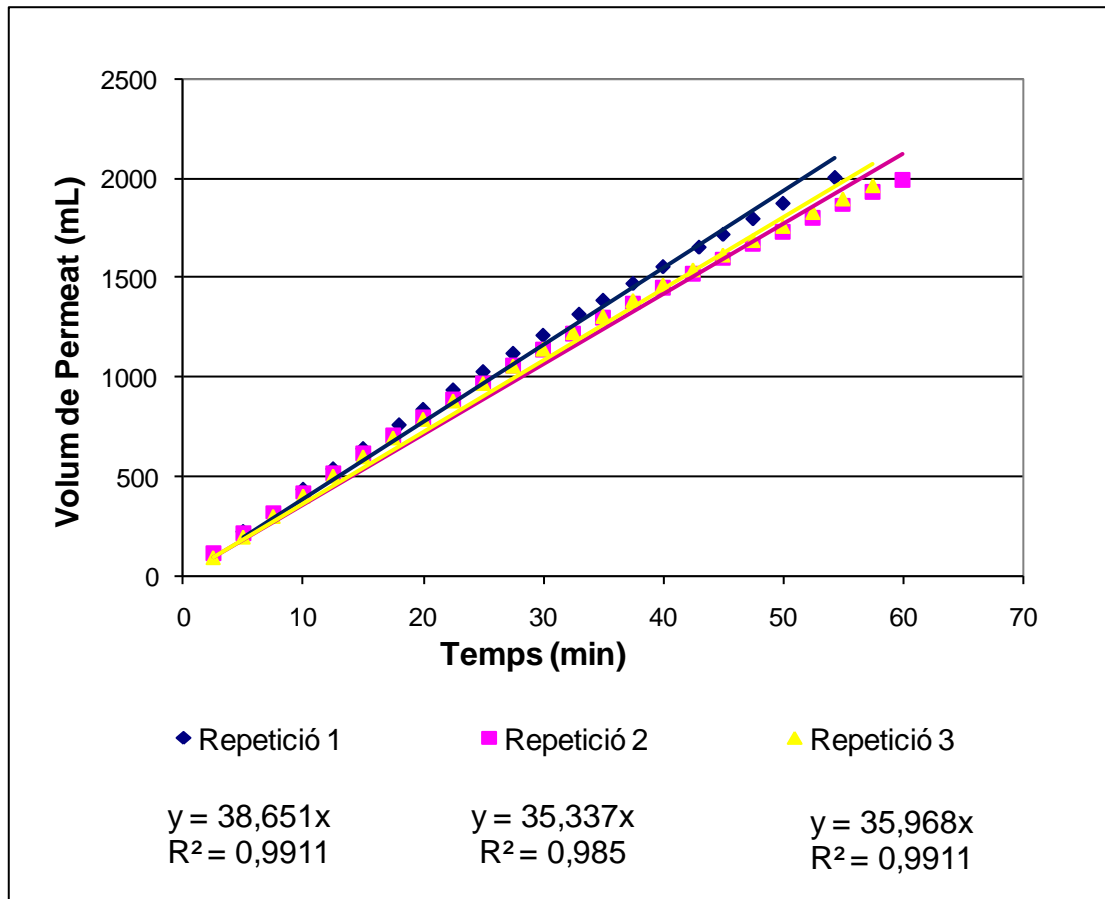
Si comparem els percentatges de proteïna i de cendres de les dues mostres, podem veure que en el sèrum són lleugerament menors que en el plasma. Això és degut tant a la precipitació i separació del fibrinogen, com a l'efecte de dilució que suposa l'etapa de *salting out*.



## 4.2.2. Concentració del sèrum per ultrafiltració

### 4.2.2.1. Seguiment del procés

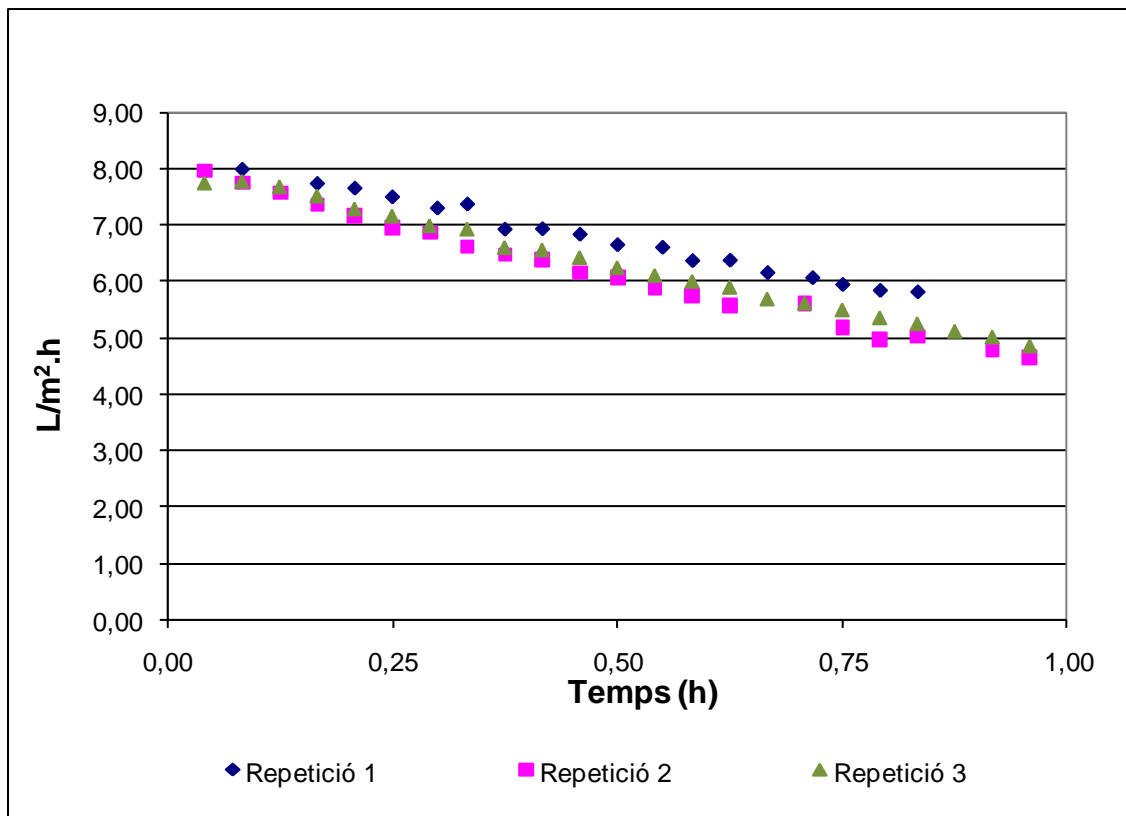
En la Figura 4.1 es mostra el volum de permeat recuperat durant la fase de concentració del sèrum de les tres repeticions realitzades amb la membrana de 10 kDa. Podem observar, que per assolir el factor de concentració volumètric desitjat en les nostres condicions de treball, es va requerir d'un temps aproximat d'entre 50 i 60 minuts. Es va partir de mostres refrigerades amb una temperatura inicial d'entre 11 i 14°C i es va monitoritzar la temperatura del producte circulant durant l'etapa de concentració, que en les tres repeticions va experimentar un increment de 7-8°C.



**Figura 4.1.** Volum de permeat recollit durant les tres repeticions del procés d'ultrafiltració de sèrum porcí amb una membrana de polietersulfona de pes molecular de tall de 10 kDa. (Volum inicial de mostra= 4L, FCV=2, 400 L/h PTM=2 bar).

En el gràfic es presenten també les equacions obtingudes a partir dels ajustaments per regressió lineal de les dades de permeació. La pèrdua de linealitat de les dades representades en aquest gràfic indicarien una disminució del flux de permeació i advertiria que s'estava produint una acumulació important de macromolècules damunt la superfície filtrant, que podria conduir a la colmatació de la membrana. S'observa que, en les tres repeticions, les dades s'ajusten prou bé a un comportament lineal i que el flux de permeació mitjà varia entre 35,3 i 38,6 mL/min. Les dues darreres mostres tenen un pendent molt similar, tot i que una mica inferior al que es va obtenir durant el processament del primer lot.

En la Figura 4.2 es mostra l'evolució del flux de permeació del procés de concentració de sèrum en cadascuna de les tres repeticions, que s'ha calculat per cada interval de temps a partir del pes de permeat recollit i tenint en compte els 0,32 m<sup>2</sup> de superfície filtrant de la membrana.



**Figura 4.2.** Evolució del flux de permeació durant les tres repeticions del procés d'ultrafiltració de sèrum porcí amb una membrana de polietersulfona de pes molecular de tall de 10 kDa. (Volum inicial de mostra= 4L, FCV=2, 400 L/h PTM=2 bar).

Podem observar que realment sí que es produeix una reducció gradual del flux de permeació al llarg del procés de concentració del sèrum. El flux inicial era d'aproximadament 8 L/m<sup>2</sup>.h en les 3 repeticions i va disminuint fins arribar aproximadament a valors entre 5 i 6 L/m<sup>2</sup>.h. Aquesta disminució del flux és deguda a l'increment de la concentració de macromolècules en el retentat a mesura que anem retirant el permeat, que suposa un embrutiment progressiu de la membrana degut a fenòmens de polarització per concentració, que es donen quan les molècules de solut del cabal d'alimentació, que no poden passar a través de la membrana, queden retingudes i comencen a acumular-se en la seva superfície. Aquest fenomen depèn de la naturalesa de la membrana i de l'aliment i de les interaccions entre ambdós. Els soluts retinguts a la superfície de la membrana formen una capa addicional que incrementa la resistència al pas del flux i redueix la permeabilitat (Raventós, 2003).

Com ja s'ha dit, l'increment de temperatura durant el procés d'ultrafiltració va ser d'entre 7 i 8°C. En futurs treballs potser seria interessant avaluar l'efecte de la temperatura, per a comprovar si ajuda a frenar la disminució en la taxa de permeació.

#### 4.2.2.2. Característiques físico-químiques del sèrum concentrat i el permeat d'ultrafiltració

Es van determinar les característiques físico-químiques del sèrum concentrat i del permeat obtinguts després de la fase de concentració. A la taula 4.2 es poden veure els resultats de les 3 repeticions.

**Taula 4.2.** Característiques físico-químiques del retentat (sèrum concentrat) i el permeat obtinguts per ultrafiltració de sèrum porcí amb una membrana de polietersulfona de 10 kDa (FCV=2) (mitjana ± desviació estàndard, n=3).

	<b>Conductivitat 25°C (mS/cm)</b>	<b>Extracte sec (%)</b>	<b>Cendres (%)</b>	<b>Proteïna (%)</b>
<b>Sèrum concentrat</b>	89,53 ± 1,92	17,73 ± 0,43	1,09 ± 0,07	9,88 ± 0,22
<b>Permeat</b>	104,52 ± 2,29	9,70 ± 0,09	1,22 ± 0,09	0,19 ± 0,02

Observant els resultats de conductivitat obtinguts veiem que el retentat, tot i ser un producte concentrat, presenta una conductivitat de l'ordre del 15,7% més baixa que la del sèrum inicial, mentre que la conductivitat del permeat és pràcticament del mateix ordre que la que tenia inicialment el sèrum. Això, juntament amb els valors elevats d'extracte sec del permeat, indica que aquesta etapa d'ultrafiltració ja va permetre eliminar part de les sals, sobretot sulfat amònic, que contenia la mostra.

Com que la resta de sals, a més del sulfat amònic, també poden travessar els porus de la membrana, veiem que el percentatge de cendres és superior en el permeat (1,22%) que en el sèrum concentrat (1,09%).

Si fem el balanç de massa observem que, en el retentat i el permeat en conjunt es va recuperar un 87,5% de l'extracte sec que presentava el sèrum abans de la ultrafiltració. Aquest mateix càlcul relatiu al contingut de proteïna ens dóna una recuperació del 85,2%. L'explicació d'aquest fet pot estar relacionada amb la fracció de l'extracte sec retinguda en la capa de polarització de la membrana però també, i sobretot, amb el volum d'aigua present dins el sistema de filtració a l'inici del procés, que representa una lleugera dilució del producte a processar. Per aquest motiu, malgrat que el factor de concentració volumètric era 2, el factor de concentració de la fracció proteica va ser només de 1,67%,

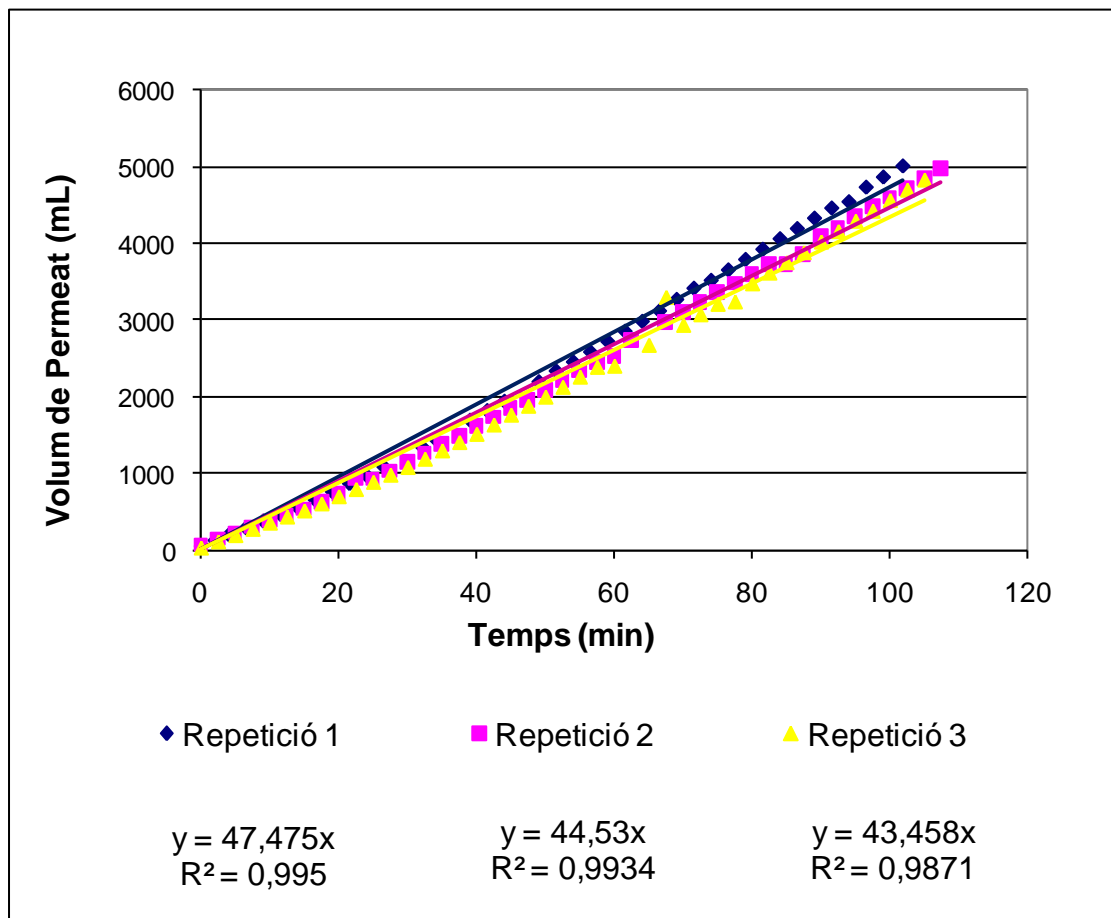
Per altra banda, podem observar que les pèrdues de proteïna en el permeat (0,19%), corresponents a les proteïnes sèriques de baix pes molecular que travessen la membrana, van ser relativament petites.

### **4.2.3. Dessalat del sèrum per diafiltració**

El procés de diafiltració consisteix en diluir el concentrat amb aigua i continuar la separació fins que s'aconsegueix el grau d'eliminació de soluts desitjat. Una vegada concentrat el sèrum es va procedir a diafiltrar afegint aigua destil·lada al producte del tanc d'alimentació i retirant un volum equivalent de permeat.

#### 4.2.3.1. Seguiment del procés

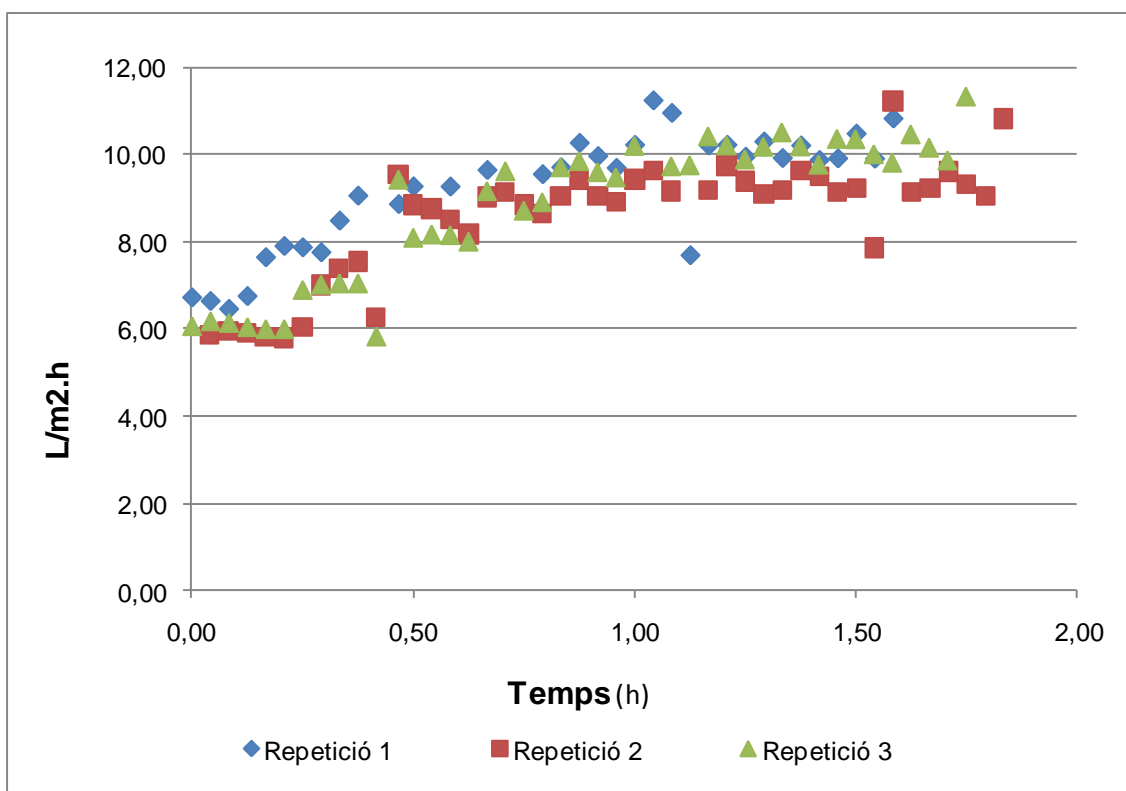
En la Figura 4.3 es mostra el volum de permeat recollit en l'etapa de diafiltració de les tres repeticions realitzades amb la membrana de 10 kDa per a dessalar el sèrum. Podem observar que en les nostres condicions de treball es va requerir d'un temps aproximat d'entre 100 i 110 minuts per completar la diafiltració. Les mostres a l'inici d'aquesta fase es trobaven a 19-21°C i en les tres repeticions va experimentar un increment de 1-2°C.



**Figura 4.3.** Volum de permeat recollit durant les tres repeticions del procés de diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de polietersulfona de pes molecular de tall de 10 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, volum d'aigua diafiltració= 5L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2 bar).

Observant el gràfic de la Figura 4.3 podem comprovar que el flux mitjà de permeació durant aquesta etapa va ser de l'ordre de 43,46-47,48 mL/min, més elevat que durant la concentració degut a l'efecte de dilució que representa l'addició d'aigua a la mostra i l'arrossegament de sals cap al flux de permeat.

En la Figura 4.4 es mostra l'evolució del flux de permeació del procés de diafiltració de sèrum en cadascuna de les tres repeticions, que s'ha calculat tenint en compte la superfície filtrant de la membrana ( $0,32 \text{ m}^2$ ).

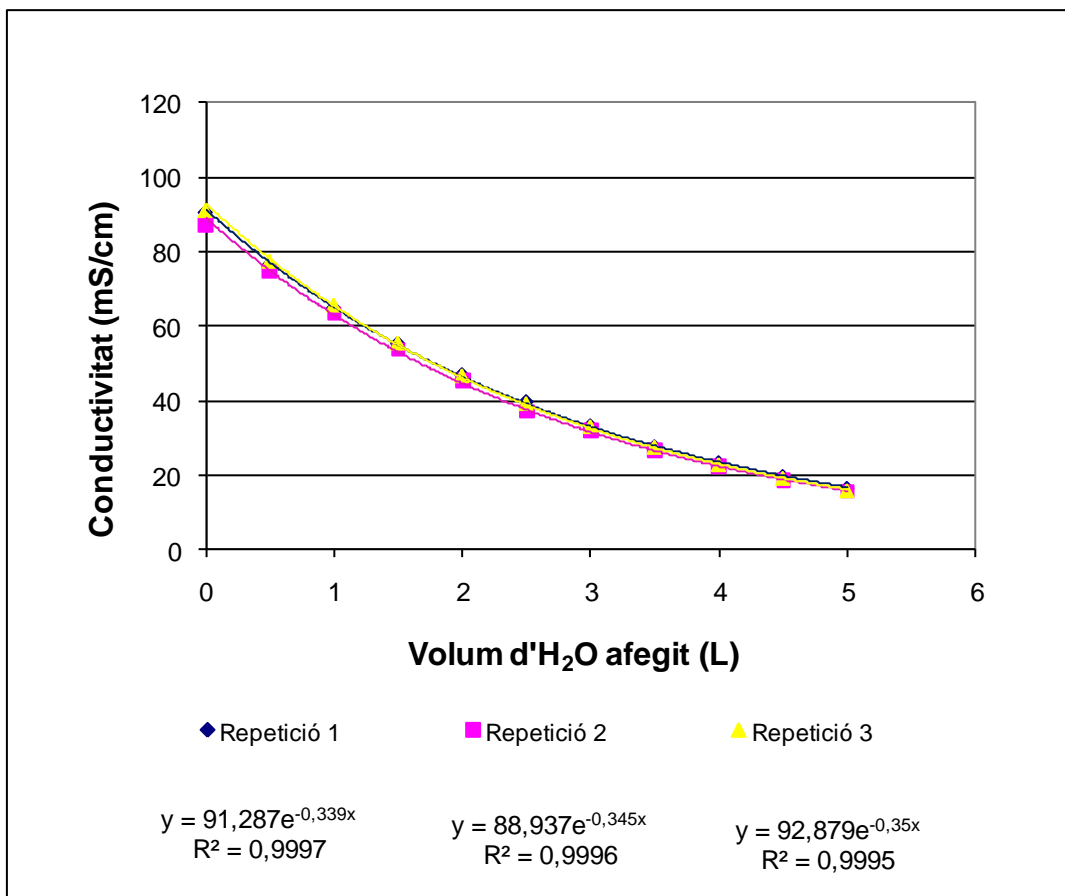


**Figura 4.4.** Evolució del flux de permeació en tres repeticions del procés de diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de polietersulfona de pes molecular de tall de 10 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, volum d'aigua diafiltració= 5L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2 bar).

En la Figura 4.4 podem observar que la taxa de permeació durant la diafiltració s'incrementava des de  $6 \text{ L/m}^2\cdot\text{h}$  fins a uns  $10-11 \text{ L/m}^2\cdot\text{h}$ , i que tendia a augmentar dibuixant una línia ondulada, petites pujades i baixades que coincideixen amb les 10 addicions d'alíquotes de 500 mL d'aigua destil·lada al dipòsit d'alimentació. El flux de

permeació al final de l'etapa va ser superior fins i tot al de l'inici del procés de concentració pel fet que el producte que s'estava filtrant presentava un extracte sec força inferior al del sèrum abans de la concentració ja que l'aigua afegida probablement ajudava a reduir la capa de polarització de la membrana que s'havia format durant l'etapa de concentració.

En la Figura 4.5 es representa la cinètica de reducció de conductivitat del sèrum durant el procés de diafiltració a mesura que s'anava afegint aigua al tanc d'alimentació.



**Figura 4.5.** Reducció de la conductivitat de la mostra en funció del volum d'aigua afegit al tanc d'alimentació en tres repeticions del procés de diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de polietersulfona de pes molecular de tall de 10 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2 bar).

En un treball anterior, on s'havia utilitzat la tecnologia de membranes per dessalar el sèrum, s'havia determinat que el volum d'aigua a afegir durant la diafiltració per assolir una reducció suficient de conductivitat era, com a mínim, el doble del volum inicial de mostra a dessalar. En aquestes condicions s'arribava a una reducció de conductivitat del

77,83% (Vilardell, 2010). En el present treball es va fer un seguiment del dessalat mesurant la conductivitat de la mostra del tanc d'alimentació cada 500 mL d'aigua afegida i de permeat retirat. Després d'afegir 4L d'aigua, el volum equivalent al doble dels 2L de sèrum que s'havien de dessalar, es va arribar a una reducció de conductivitat similar a la del treball esmentat (78,49%). Tanmateix, per tal d'obtenir un valor de conductivitat més proper al que presentava el plasma inicial es va decidir prosseguir la diafiltració afegint 1L més d'aigua (en dues alíquotes de 500 mL). És a dir, que finalment el volum d'aigua de diafiltració va ser 2,5 vegades el volum de mostra inicial i es va obtenir una reducció de conductivitat del 84,9%.

A l'inici de la diafiltració (just després de la concentració) es partia de mostres amb una conductivitat de  $89,53 \pm 1,92$  mS/cm. Al final del procés, és a dir, després d'afegir 5L d'aigua destil·lada i retirar el volum equivalent de permeat, la conductivitat del sèrum va ser de  $16,02 \pm 0,50$  mS/cm. Com veiem en el gràfic (Figura 4.5) la reducció de sals en les mostres durant el procés de diafiltració segueix una cinètica exponencial, de manera que la reducció de conductivitat assolida amb cada fracció d'aigua afegida és menor que l'anterior. Segons les equacions que defineixen les funcions exponencials que hem obtingut per ajustament de les dades de conductivitat, per assolir el valor del plasma inicial ( $14,47 \pm 0,17$  mS/cm) caldria haver treballat amb un volum d'aigua de diafiltració de  $5612,6 \pm 657$  mL.

#### **4.2.3.2. Característiques físico-químiques del sèrum dessalat i el permeat de la diafiltració**

Es van determinar les característiques físico-químiques de les diferents mostres del sèrum (retentat) obtingut en la fase de diafiltració (Taula 4.3). En la tercera i última repetició, es va decidir determinar també les característiques físico-químiques del permeat.

Les dades de conductivitat permeten comprovar que l'aigua de diafiltració va arrossegar de manera efectiva bona part de les sals que hi havia en la mostra de sèrum després de la concentració. El percentatge de reducció de sals aconseguit en aquesta etapa va ser d'aproximadament un 82%, i conjuntament en les dues etapes -concentració i diafiltració- va ser d'un  $84,92 \pm 0,22\%$ . Tot i que el valor de conductivitat en el



producte final era lleugerament superior al del plasma inicial, es va considerar que s'havia assolit l'objectiu del procés de diafiltració, tenint en compte que es tractava d'un producte concentrat i que el contingut en cendres era, fins i tot, inferior al del plasma.

**Taula 4.3.** Característiques físico-químiques del retentat (sèrum dessalat) i el permeat obtinguts per diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de polietersulfona de 10 kDa (FCV=2) (mitjana  $\pm$  desviació estàndard, n=3 )

	<b>Conductivitat 25°C (mS/cm)</b>	<b>Extracte sec (%)</b>	<b>Cendres (%)</b>	<b>Proteïna (%)</b>
<b>Sèrum dessalat</b>	16,02 $\pm$ 0,50	9,85 $\pm$ 0,44	0,11 $\pm$ 0,07	9,33 $\pm$ 0,41
<b>Permeat</b>	54,1	4,18	0,45	0,15

L'eliminació eficaç del sulfat amònic utilitzat com a agent precipitant es pot comprovar en el fet que, en el producte final, l'extracte sec coincideix pràcticament amb la suma dels percentatges de cendres i proteïna, mentre que en el permeat s'observa una diferència important, deguda precisament al sulfat amònic retirat del producte.

Fent el balanç de proteïna d'aquesta etapa observem que, a diferència del què passava durant la concentració, obteníem una molt bona recuperació (98,2%) i que les pèrdues en el permeat (0,15%), seguien essent relativament petites. En altres treballs (Vilardell, 2010) s'havien considerat acceptables percentatges de proteïna en el permeat inferiors al 0,20%. El fet que la diafiltració es fes de manera consecutiva a la concentració, és a dir, sense buidar i esbandir l'equip, va fer que no es produís el fenomen de dilució amb l'aigua de neteja que s'havia observat en la fase de concentració i que, en conjunt, l'etapa de dessalat no afectés de manera important el factor de concentració proteic.

### 4.3. Obtenció de Sèrum concentrat amb la membrana de 30 kDa

Després de realitzar les 3 repeticions del procés amb la membrana de pes molecular de tall de 10 kDa, es van realitzar 3 produccions de sèrum amb la membrana de 30 kDa. Es volia comprovar si a l'utilitzar una membrana amb una mida de porus més gran s'aconseguia un flux de permeació superior i es podia escurçar el temps de processament i el volum d'aigua de diafiltració sense incrementar les pèrdues de proteïna.

#### 4.3.1. Característiques físico-químiques de la matèria primera: plasma i sèrum

Igual que en l'apartat anterior es van determinar les característiques físico-químiques del plasma i del sèrum obtingut després de la precipitació per *salting out* del fibrinogen. Els resultats de la caracterització dels lots que s'havien de processar amb la membrana de poliacrilonitril modificat de 30 kDa es presenten en la taula 4.5.

**Taula 4.4.** Característiques físico-químiques del plasma i del sèrum per processar amb la membrana de 30 kDa (mitjana  $\pm$  desviació estàndard, n=3 )

	<b>Conductivitat 25°C</b> (mS/cm)	<b>Extracte sec</b> (%)	<b>Cendres</b> (%)	<b>Proteïna</b> (%)
<b>Plasma</b>	14,67 $\pm$ 0,37	8,53 $\pm$ 0,04	1,39 $\pm$ 0,05	6,44 $\pm$ 0,03
<b>Sèrum</b>	110,2 $\pm$ 0,87	15,52 $\pm$ 0,05	1,21 $\pm$ 0,07	5,63 $\pm$ 0,06

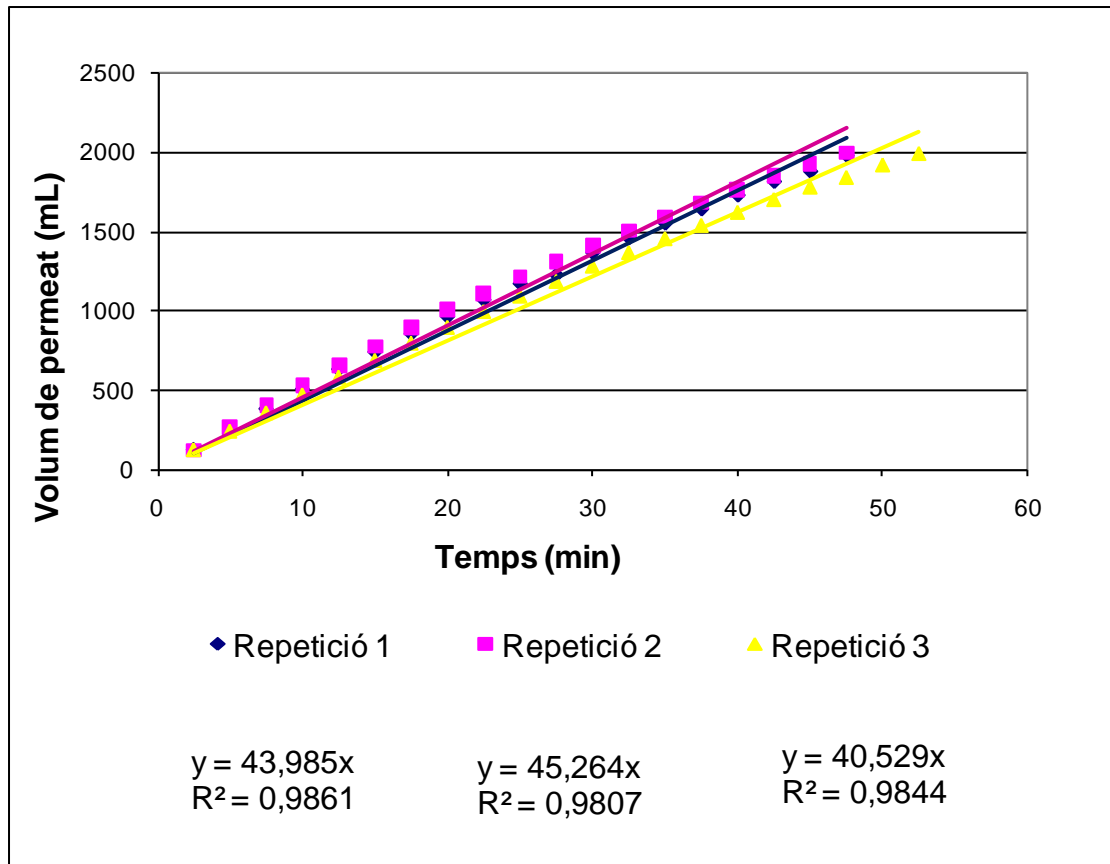
Tal com s'esperava, els resultats de caracterització són pràcticament idèntics als obtinguts amb la matèria primera utilitzada en el procés anterior. El sulfat amònic afegit durant l'etapa de fraccionament va suposar un increment del valor de conductivitat de l'ordre de 7,5 vegades, respecte al que presentava la mostra de plasma inicial. De la mateixa manera s'observa un increment d'extracte sec i una concentració inferior de cendres i proteïna, en tots els casos del mateix ordre que en el procés anterior. Aquestes dades confirmen tant l'homogeneïtat de la matèria primera com la del procés de precipitació del fibrinogen i obtenció del sèrum per *salting out*.

## 4.3.2. Concentració del Sèrum per ultrafiltració

### 4.3.2.1. Seguiment del Procés

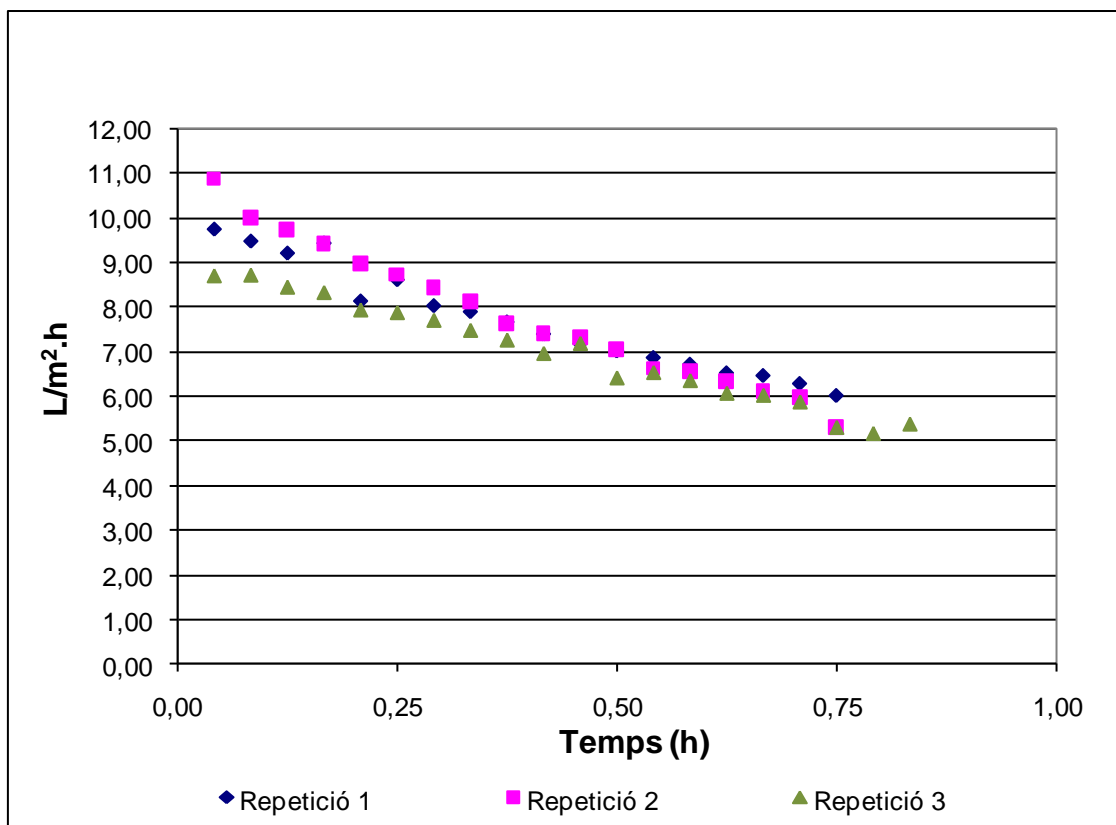
En la Figura 4.6 es mostra el volum de permeat recuperat durant la fase de concentració del sèrum de les tres repeticions realitzades amb la membrana de 30 kDa. Podem observar que per assolir el factor de concentració volumètric desitjat en les nostres condicions de treball es va requerir d'un temps aproximat d'entre 45 i 55 minuts, per tant, es va reduir entre un 8 i un 10% el temps necessari per completar aquesta etapa pel fet de treballar amb una membrana de pes molecular de tall més alt. Es va partir de mostres refrigerades amb una temperatura inicial d'entre 14 i 15°C i es va monitoritzar la temperatura del producte circulant durant l'etapa de concentració, que en les tres repeticions va experimentar un increment de 6-7°C, un grau menys que en el procés amb la membrana de 10 kDa. Una explicació d'aquesta petita diferència en l'increment de temperatura, podria estar relacionada amb la durada més curta del procés, tanmateix caldria tenir més dades per poder confirmar aquesta hipòtesi.

En el gràfic de la Figura 4.6 es presenten també les equacions obtingudes a partir dels ajustaments per regressió lineal de les dades de permeació. S'observa que, en les tres repeticions, les dades s'ajusten prou bé a un comportament lineal i que el flux de permeació mitjà varia entre 40,53 i 45,26 mL/min. També podem observar que el flux de permeació mitjà és més elevat amb la membrana de 30 kDa que amb la de 10 kDa (35,3-38,6 mL/min). Aquesta diferència en el flux de permeació és la que permet escurçar el temps de procés.



**Figura 4.6.** Volum de permeat recollit durant les tres repeticions del procés de concentració de sèrum porcí amb una membrana poliacrilonitril modificat de pes molecular de tall de 30 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, volum d'aigua diafiltració= 5L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2 bar).

En la Figura 4.7 es mostra l'evolució del flux de permeació del procés de concentració de sèrum en cadascuna de les tres repeticions, que s'ha calculat per cada interval de temps a partir del pes de permeat recollit i tenint en compte els  $0,32 \text{ m}^2$  de superfície filtrant de la membrana.



**Figura 4.7.** Evolució del flux de permeació en tres repeticions del procés de concentració de sèrum porcí amb una membrana de poliacrilonitril modificat de pes molecular de tall de 30 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, volum d'aigua diafiltració= 5L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2 bar).

Podem observar que el flux de permeació inicial és superior al de la membrana de 10 kDa, que era de 8 L/m<sup>2</sup>.h. Això és degut a que la mida dels porus de la membrana de 30 kDa és superior. També observem una variabilitat important en el flux inicial de les 3 repeticions, ja que varia entre 9 i 11 L/m<sup>2</sup>.h. Això, segurament és degut a que la membrana de 30 kDa no s'havia utilitzat mai, a diferència de la de 10 kDa que s'havia utilitzat per les proves prèvies de posada en funcionament de l'equip. Generalment les característiques de permeabilitat de les membranes s'estabilitzen després d'un temps d'utilització i per tant, en les primeres utilitzacions es pot observar una variabilitat més alta.

Igual que amb la membrana de 10 kDa, veiem que es produeix una reducció gradual del flux de permeació al llarg del procés de concentració del sèrum, i que va disminuint fins arribar aproximadament a valors entre 5 i 6 L/m<sup>2</sup>.h. La taxa de permeació final és molt similar en les dues membranes, ja que amb la membrana de 10 kDa també va ser de l'ordre de 5 i 6 L/m<sup>2</sup>.h. El motiu pel qual en aquesta membrana s'obté una reducció de

flux més important pot estar relacionat amb el material de la membrana. Tot i que en ambdós processos s'han utilitzat membranes polimèriques orgàniques, la de 10 kDa era de polietersulfona i la de 30 kDa de poliacrilonitril. Està descrit que el fenomen de polarització i embrutiment, entre d'altres coses, depèn de la naturalesa de la membrana, ja que es poden establir interaccions específiques entre els components del producte i grups reactius de la superfície filtrant (Mulder, 1996). Per productes proteics és important tenir en compte que les proteïnes s'absorbeixen més fortament sobre membranes amb superfícies hidrofòbiques i costen més d'eliminar que de superfícies hidrofíliques. El poliacrilonitril és menys hidrofílic que la polietersulfona (Herrero-Medina, 2010) i això podria explicar la major tendència a embrutir-se de la membrana de 30 kDa.

#### 4.3.2.2. Característiques físico-químiques del sèrum concentrat i el permeat d'ultrafiltració

Es van determinar les característiques físico-químiques del sèrum concentrat i del permeat obtinguts després de la fase de concentració. A la taula 4.6 es poden veure els resultats de les 3 repeticions.

**Taula 4.5.** Característiques físico-químiques del retentat (sèrum concentrat) i el permeat obtinguts per ultrafiltració de sèrum porcí amb una membrana de poliacrilonitril modificat de 30 kDa (FCV=2) (mitjana  $\pm$  desviació estàndard, n=3).

	<b>Conductivitat 25°C (mS/cm)</b>	<b>Extracte sec (%)</b>	<b>Cendres (%)</b>	<b>Proteïna (%)</b>
<b>Sèrum concentrat</b>	95,92 $\pm$ 8,74	17,51 $\pm$ 0,19	1,09 $\pm$ 0,08	9,28 $\pm$ 0,60
<b>Permeat</b>	107,00 $\pm$ 2,29	9,93 $\pm$ 0,29	1,21 $\pm$ 0,09	0,17 $\pm$ 0,05

El retentat presenta una conductivitat de l'ordre del 12.95% més baixa que la del sèrum inicial. Aquesta reducció és una mica inferior a la que s'havia obtingut amb la membrana de 10 kDa. Podem observar que amb les dues membranes la conductivitat del permeat és pràcticament del mateix ordre que la que tenia inicialment el sèrum i que per tant, durant la concentració ja s'ha eliminat una part de les sals..

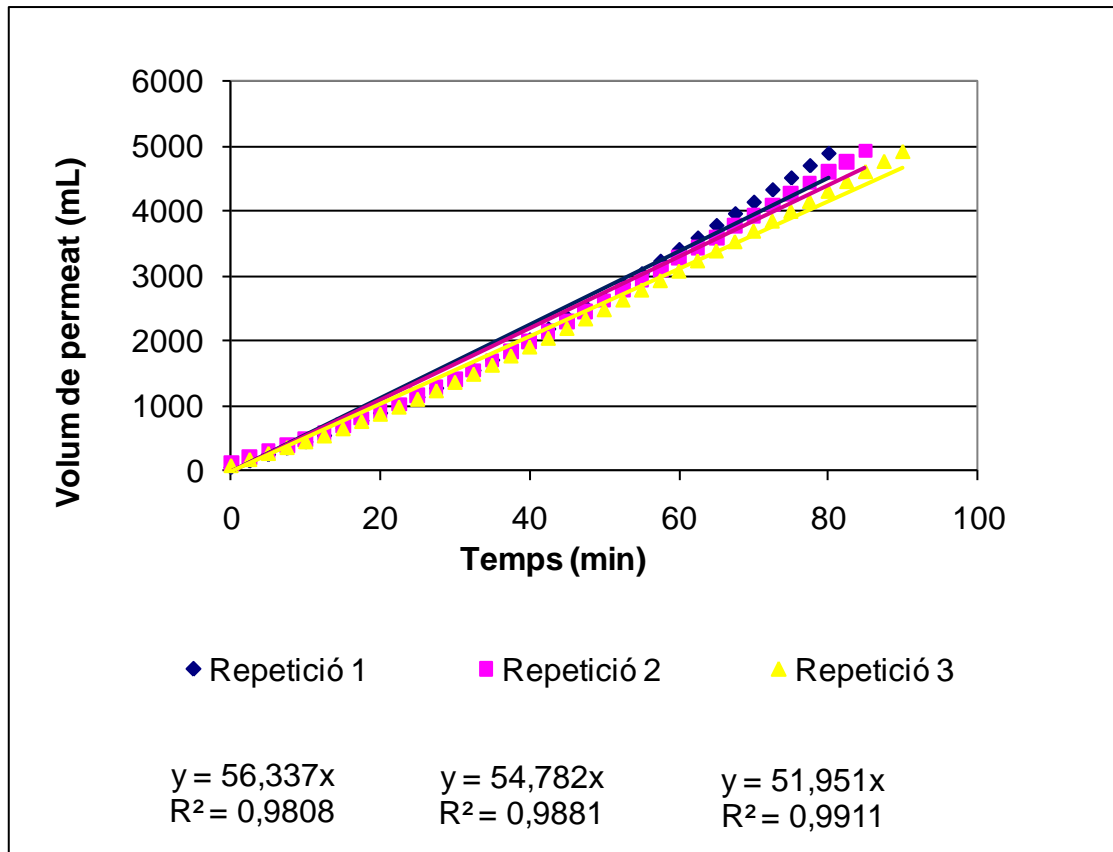
El balanç de massa ens permet veure que, en el retentat i el permeat en conjunt, varem recuperar un 88,20% de l'extracte sec i un 83,9% de la proteïna que contenia el sèrum abans de la ultrafiltració. En ambdós casos són valors molt similars als obtinguts amb la membrana de 10 kDa. L'efecte de dilució amb aigua retinguda dins el sistema de filtració va fer que, malgrat treballar amb un factor de concentració volumètric de 2, el factor de concentració de la fracció proteica fos només de 1,65%, pràcticament idèntic a l'obtingut amb la membrana de 10 kDa.

De la mateixa manera que en el procés anterior observem que les pèrdues de proteïna en el permeat són molt baixes.

### **4.3.3. Dessalat del sèrum per diafiltració**

#### **4.3.3.1. Seguiment del procés**

En la Figura 4.8 es mostra el volum de permeat recollit en l'etapa de diafiltració de les tres repeticions realitzades amb la membrana de 30 kDa per a dessalar el sèrum. Podem observar que en les nostres condicions de treball es va requerir d'un temps aproximat d'entre 80 i 100 minuts per completar la diafiltració, entre un 10 i un 20% menys que en el procés amb la membrana de 10 kDa. Les mostres a l'inici d'aquesta fase es trobaven a 20-22 °C i en les tres repeticions va experimentar un increment de 2-2,5°C.

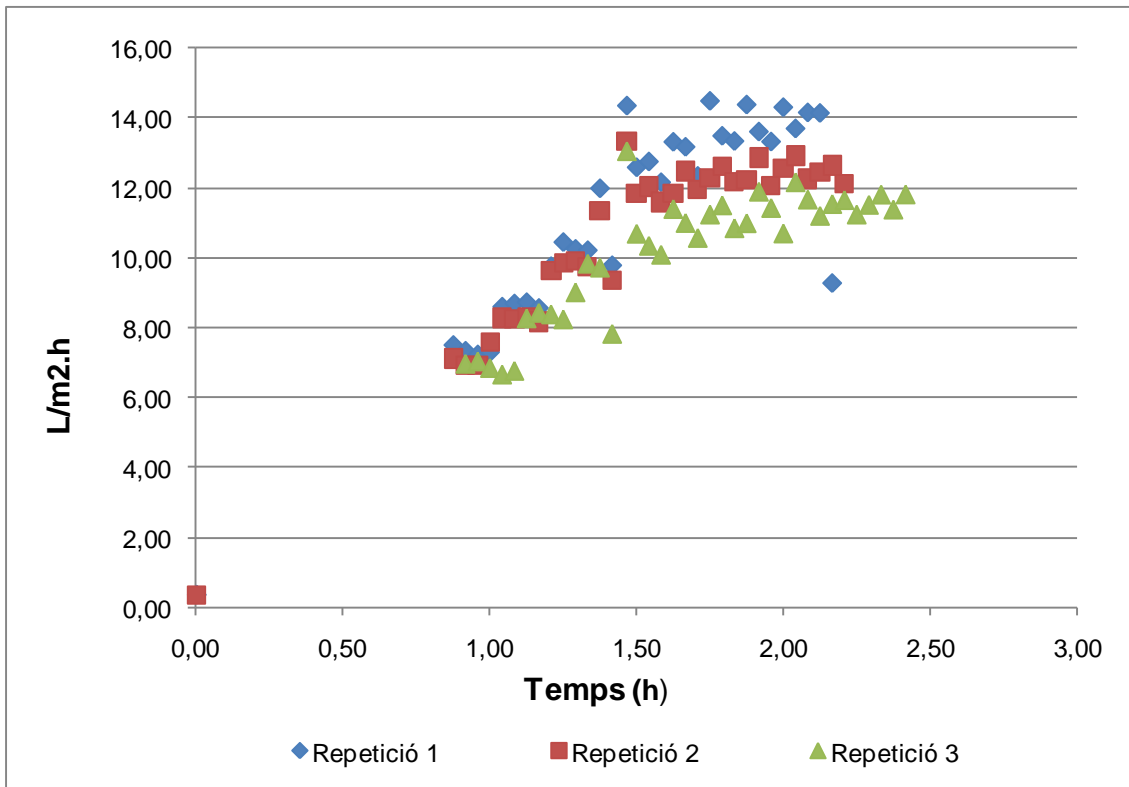


**Figura 4.8.** Volum de permeat recollit durant les tres repeticions del procés de diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de poliacrilonitril modificat de pes molecular de tall de 30 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, volum d'aigua diafiltració= 5L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2 bar).

El flux mitjà de permeació durant aquesta etapa va ser de l'ordre de 51,9-56,4 mL/min, més elevat que durant la concentració, degut a l'efecte de dilució que representa l'addició d'aigua, i més elevat que el procés de diafiltració amb la membrana de 10 kDa degut a que la mida dels porus de la membrana és més gran.

En la Figura 4.9 es mostra l'evolució del flux de permeació del procés de diafiltració de sèrum en cadascuna de les tres repeticions amb la membrana de 30 kDa, que s'ha calculat tenint en compte la superfície filtrant de la membrana ( $0,32 \text{ m}^2$ ).

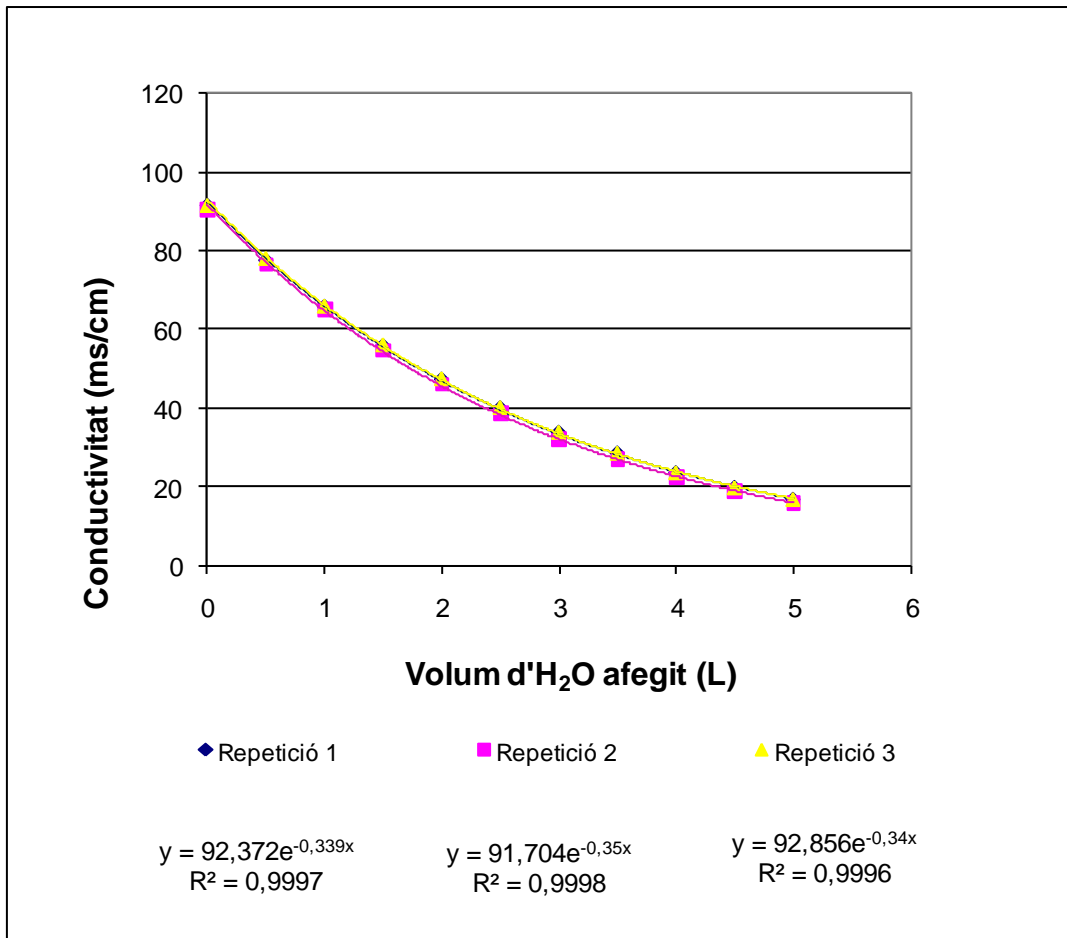




**Figura 4.9.** Evolució del flux de permeació en tres repeticions del procés de diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de poliacrilonitril modificat de pes molecular de tall de 30 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, volum d'aigua diafiltració= 5L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2 bar).

En la Figura 4.9 podem observar que la taxa de permeació durant la diafiltració s'incrementava des de 6-7 L/m<sup>2</sup>.h fins a uns 12-14 L/m<sup>2</sup>.h de forma escalonada, amb petits augments i disminucions de flux, que coincidien amb les addicions d'aigua destil·lada al dipòsit d'alimentació.

En la Figura 4.10 es representa la cinètica de reducció de conductivitat del sèrum durant el procés de diafiltració a mesura que s'anava afegint aigua al tanc d'alimentació.



**Figura 4.10.** Reducció de la conductivitat de la mostra en funció del volum d'aigua afegit al tanc d'alimentació en tres repeticions del procés de diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de poliacrilonitril modificat de pes molecular de tall de 30 kDa. (Volum inicial de mostra= 2L, cabal recirculació= 400 L/h, PTM=2 bar).

Igual que amb la membrana de 10 kDa en el procés de diafiltració es va afegir un volum d'aigua 2,5 vegades el volum de mostra inicial. La reducció de la conductivitat va ser de l'ordre del 84,98%, pràcticament igual que amb la membrana 10 kDa.

A l'inici de la diafiltració (just després de la concentració) es partia de mostres amb una conductivitat de  $95,92 \pm 8,74$  mS/cm. Després d'afegir 5L d'aigua destil·lada i retirar el volum equivalent de permeat, la conductivitat del sèrum va ser de  $16,55 \pm 0,50$  mS/cm. Es va obtenir una reducció exponencial del contingut en sals de la mostra. Segons les equacions que hem obtingut per ajustament de les dades de conductivitat a una funció exponencial, per assolir el valor del plasma inicial ( $14,67 \pm 0,37$  mS/cm) caldria haver treballat amb un volum d'aigua de diafiltració de  $5372,37 \pm 177,60$  mL, uns 250 mL menys que amb la membrana de 10 kDa.

El temps total del procés d'ultra i diafiltració va ser amb la membrana de 30 kDa de 2 hores i 18 minuts i amb la membrana de 10 kDa de 2 hores i 45 minuts. Per tant, el temps total de processament es reduïa uns 30 min en utilitzar la membrana amb un pes molecular de tall més alt.

#### 4.3.3.2. Característiques físico-químiques del sèrum dessalat i el permeat de la diafiltració

Es van determinar les característiques físico-químiques de les diferents mostres del sèrum (retentat) obtingut en la fase de diafiltració (Taula 4.7). En la tercera i última repetició, igual que es va fer amb la membrana de 10 kDa, es va decidir determinar també les característiques físico-químiques del permeat.

**Taula 4.6.** Característiques físico-químiques del retentat (sèrum dessalat) i el permeat obtinguts per diafiltració de sèrum porcí amb una membrana de poliacrilonitril modificat de 30 kDa (FCV=2) (mitjana  $\pm$  desviació estàndard, n=3 ).

	<b>Conductivitat 25°C (mS/cm)</b>	<b>Extracte sec (%)</b>	<b>Cendres (%)</b>	<b>Proteïna (%)</b>
<b>Sèrum dessalat</b>	<b>16,55 <math>\pm</math> 0,50</b>	<b>8,99 <math>\pm</math> 0,53</b>	<b>0,07 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>8,50 <math>\pm</math> 0,42</b>
<b>Permeat</b>	<b>41,3</b>	<b>3,06</b>	<b>0,28</b>	<b>0,11</b>

Les dades de conductivitat permeten comprovar que l'aigua de diafiltració va arrossegar de manera efectiva les sals que hi havia en la mostra de sèrum després de la concentració. El percentatge de reducció de sals aconseguit en aquesta etapa va ser d'aproximadament un 81,83%, pràcticament igual que el valor obtingut amb la membrana de 10 kDa (82%). El percentatge de reducció conjuntament en les dues etapes -concentració i diafiltració- va ser, com ja hem dit a l'apartat anterior d'un 84,98% per la membrana de 30 kDa i d'un 84,92% per la de 10 kDa. Amb la membrana de 30 kDa veiem també que el valor de la conductivitat en el producte final va ser lleugerament superior al del plasma inicial, però es va considerar acceptable.

Fent el balanç de proteïna d'aquesta etapa veiem que s'obtenia una recuperació del 94,56%, inferior al percentatge de recuperació del procés amb la membrana de 10 kDa,

que va ser del 98,2%. Aquesta menor recuperació podria estar relacionada amb una major absorció de molècules de proteïna a la superfície de la membrana de poliacrilonitril, i això coincidiria també amb la reducció més elevada de flux que s'havia observat a l'etapa de concentració.

Un dels inconvenients de la diafiltració és l'elevat consum d'aigua que representa (Lipnizki et al., 2002; Vilardell, 2010). Amb la membrana de 30 kDa es va assolir una eficàcia de concentració i dessalat equivalent a la de la membrana de 10 kDa i hem obtingut productes finals amb característiques físico-químiques pràcticament idèntiques, però hem reduït el temps de processament i hem calculat que caldria un volum inferior d'aigua de diafiltració per assolir valors de conductivitat similars als del plasma inicial. Encara que els guanys (estalvi de temps i aigua) en les nostres condicions semblen petits, cal tenir en compte que només hem processat un volum de 4 litres de sèrum en cada lot i que, l'estalvi podria resultar realment important en processos industrials on es tractés un volum gran de producte.

#### 4.4. Característiques físico-químiques del sèrum deshidratat

Es va procedir a deshidratar per atomització les mostres de sèrum dessalat i a determinar la composició del producte en pols. Els resultats de la caracterització es presenten en la taula 4.8.

**Taula 4.7.** Característiques físico-químiques de sèrum deshidratat (mitjana  $\pm$  desviació estàndard, n=5)

	<b>Humitat (%)</b>	<b>Cendres (%)</b>	<b>Proteïna (%)</b>
<b>Sèrum en pols</b>	<b>5,91<math>\pm</math>1,71</b>	<b>1,37<math>\pm</math>0,17</b>	<b>87,87<math>\pm</math>5,35</b>

Es va obtenir una variabilitat elevada en la composició de les mostres deshidratades degut a problemes en el funcionament del sistema d'atomització. Aquests problemes no ens van permetre deshidratar la mostra corresponent a l'últim lot de producció i es va procedir al seu emmagatzematge en congelació. Tanmateix, l'atomització es pot considerar un bon mètode de conservació a llarg termini del sèrum concentrat. La composició mitjana del producte deshidratat es va considerar adequada per a un ingredient proteic funcional i ens va permetre plantejar la seva incorporació en la formulació de matrius alimentàries.

Una vegada determinades les condicions de procés adequades per a l'obtenció del sèrum concentrat es pot procedir a la producció de la quantitat necessària per fer les proves d'aplicació. Inicialment s'estudiarà la possibilitat d'utilitzar-lo com a substitut d'ingredients que incrementen la capacitat de retenció d'aigua i actuen com a agents emulsionants i/o texturitzants en productes carnis cuits, per exemple salsitxes tipus frankfurt i patés de fetge de porc.

## **5. CONCLUSIONS**

## 5. CONCLUSIONS

- 1) S'ha escalat satisfactòriament el procés de fraccionament del plasma de sang porcina per *salting out* (20%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) per precipitar i separar el fibrinogen i obtenir un volum mínim de 5 L de sèrum en cada lot de producció. La conductivitat del sèrum obtingut en l'etapa de fraccionament ha resultat ser 7-7,5 vegades superior a la del plasma inicial.
- 2) S'ha posat a punt la tecnologia de concentració i dessalat de sèrum mitjançant un equip de separació per membranes de planta pilot amb dos mòduls de membrana espiral: polietersulfona (10 kDa) i poliacrilonitril modificat (30 kDa). Les condicions de procés han estat: cabal recirculació de 400 L/h, pressió transmembrana de 2 bar, factor de concentració volumètric de 2 i volum d'aigua de diafiltració igual a 2,5 vegades el volum de mostra a processar.
- 3) En l'etapa de concentració, i en les condicions de procés utilitzades en aquest treball, s'han obtingut fluxos mitjans de permeació de 36,7 i de 43,3 mL/min amb les membranes de 10 i 30 kDa, respectivament. Les taxes de permeació obtingudes al final del procés han estat 5-6 L/m<sup>2</sup>.h, independentment de la membrana utilitzada, tot i que la reducció ha estat més important en la membrana de poliacrilonitril.
- 4) L'etapa de concentració ha permès eliminar part del contingut en sals, ja que s'ha reduït entre un 13 i un 15% la conductivitat del sèrum, i assolir un factor de concentració proteic de 1,6, que correspon a un contingut del 9-10% de proteïna. Les pèrdues de proteïna en el permeat han estat inferiors al 0,17% i les característiques del producte obtingut han estat similars pels dos tipus de procés (10 i 30 kDa).
- 5) En els dos processos, 10 i 30 kDa, la diafiltració consistent en l'addició d'un volum d'aigua de 2,5 vegades el volum de la mostra a processar, ha permès obtenir un grau d'eliminació de sals satisfactori, amb una reducció de la conductivitat del sèrum concentrat d'aproximadament el 82%. En ambdós casos s'ha obtingut sèrum dessalat amb un contingut en cendres inferior al del plasma inicial. Les pèrdues de proteïna en el permeat de diafiltració han estat relativament petites ( $\leq 15\%$ ), tot i que

el grau de recuperació proteica ha estat lleugerament superior amb la membrana de polietersulfona.

- 6) Les taxes de permeació han anat augmentant durant l'etapa de diafiltració i al final s'ha obtingut una taxa fins i tot superior a la que hi havia a l'inici del procés de concentració.
- 7) La utilització d'una membrana de pes molecular de tall més alt (30 kDa) ha representat un estalvi d'uns 27 min de temps de processament respecte el que requeria la membrana de 10 kDa, en total unes 2,75 h. Aquest estalvi es podria considerar significatiu si es pogués extrapolar a un procés industrial de més llarga durada, ja que s'ha reduït un 16% el temps de processament.
- 8) La tecnologia de separació per membranes ha estat adequada per obtenir concentrats de sèrum i ha permès eliminar l'excés de sals afegides durant el fraccionament. El producte final deshidratat conté quasi un 88% de proteïna, un 1,4% de cendres i una humitat residual al voltant del 6%. En general podem dir que, el procés que s'ha posat a punt, permet produir la quantitat de sèrum concentrat necessària per fer proves d'aplicació com a substitut d'ingredients funcionals en productes carnis cuits o altres matrius alimentàries.



## **6. BIBLIOGRAFIA**

## 6. BIBLIOGRAFIA

Alais, C.; Linden, G. 1990. Manual de bioquímica de Alimentos. Editorial Mansson S.A. (Barcelona) España.

Álvarez, C.; Bances, M.; Rendueles, M. i Díaz, M. 2009. Functional properties of isolated porcine blood proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 807-814.

Burnouf, T. 2007. Modern Plasma Fractionation. *Transfusion Medicine Reviews*, 21 (2): 101-117.

Casp, A.; Abril, J. 1999. Procesos de Conservación de Alimentos. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España.

Cheftel J.C. ; Cuq J.L. ; Lorient, D. 1989. Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.

Dàvila, E. 2006. Studies on plasma protein interactions in heat-induced gels by differential scanning calorimetry and FT-Raman spectroscopy [revista en línia] Accessible a: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X06001846> [consulta 05/5/2011].

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

Del Hoyo, P.; Moure, Rendueles, M.; Díaz, M. 2006. Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration. *Meat Science*, 76: 402-410.

De Vuono M.; Penteado C.; Lalojo F.M.; Pereira Dos Santos N. 1979. Functional and nutritional properties of isolated bovine blood proteins. *J. Sci. Food Agric.*, 30, 809-815.

Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural. 2009. *Enquesta anual de sacrifici d'escorxadors* [en línia]. Accessible a: [http://www20.gencat.cat/docs/DAR/DE\\_Departament/DE02\\_Estadistiques\\_observatoris](http://www20.gencat.cat/docs/DAR/DE_Departament/DE02_Estadistiques_observatoris)

/02 Estructura i produccio/02 Estadistiques ramaderes/07 Enquesta sacrifici escorxadors/Arxius estatics/2009 Enquesta sacrifici anual\_Cat.pdf [consulta 25/04/2011].

Díaz, M. i Rendueles, M. 1999. Proteínas procedentes de subproductos de industrias alimentarias: métodos extracción y propiedades funcionales. Alimentación, equipos y tecnología, 9: 111-118.

Divakaran, S. 1980. Animal blood. National information Center for Leather and Allied industries, Series-2. Madras, India.

Duarte, R.T.; Simoes, M.C.C. and Sgarbieri, V.C. 1999. Bovine blood components: fractionation, composition, and nutritive value. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 231-236.

FAOSTAT. 2010. Cambios en la producción porcina en Europa [revista en línea]. Accessible a: [http://www.produccionbovina.com.ar/produccion\\_porcina/00-X\\_congreso/15-cambios.pdf](http://www.produccionbovina.com.ar/produccion_porcina/00-X_congreso/15-cambios.pdf) [consulta 10/5/2011].

Herrero-Medina, A. 2010. Desarrollo de membranas poliméricas con propiedades *antifouling*. Trabajo final de carrera de Ingeniería Técnica Industrial: Mecánica. Departamento de Ciencia e Ingeniería de Materiales e Ingeniería Química. Universidad Carlos III. Madrid.

Howell, N. K. 1995. Synergism and interactions in mixed food protein systems. In S. E. Harding, S. E. Hill, & J. Mitchell (Eds.), *Biopolymer mixtures* (pp. 231–270). Nottingham: University of Nottingham Press.

Howell, N.K. and Lawrie, R.A. 1984a. Functional aspects of blood plasma proteins. II. Gelling properties. *Journal of Food Technology*, 19, 289-295.

Howell, N.K. and Lawrie, R.A. 1984b. Functional aspects of blood plasma proteins. III. Interaction with other proteins and stabilizers. *Journal of Food Technology*, 19, 297-313.

King, J.; Depablo, S. and Deoca, F.M. 1989. Evaluation of gelation and solubility of bovine plasmaprotein isolates. *Journal of Food Science*, 54, 1381-1382.

Lipnizki, F.; Boelsmand, J.; Madsen F. Concepts of industrial-scale diafiltration systems. ScienceDirect [revista en línia] 2002; [consulta 04/5/2011]. Accessible a: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916402003090>.

Martín Bejarano, S. Coord. 2001. Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos, Ed. Martín & Macias, Plasencia.

Maubois, J.L. 1974. Application of Membrane Ultrafiltration to Preparation of Various Types of Cheese. [consulta 04/5/2011].

Accessible a: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030275846728>.

Mulder, M. 1996. Basic Principles of Membrane Technology. Kluwer Academic Pub.

Ockerman H.W.; Hansen C.L. 1994. Industrialización de subproductos de origen animal. Editorial Acribia S.A.. Zaragoza.

O'Riordan, D.; Kinsella, J.E.; Mulvihill, D.M. and Morrissey, P.A. 1989. Gelation of plasma-proteins. Food Chemistry, 33, 203-214.

Oshodi, A.A. and Ojokan, E.O. 1997. Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate. *Food Chemistry*, 59, 333-338.

Parés, D. 1998. Caracterització i revaloració de la fracció plasmàtica de la sang de porc procedent d'escorxadors industrials. Tesi doctoral Departament d'Enginyeria Química Agrària i Tecnologia Agroalimentària, Universitat de Girona. [en línia]. Accessible a: <http://hdl.handle.net/10803/7773> [consulta 05/5/2011].

Parés, D.; Saguer, E.; Saurina, J.; Suñol, J.J. and Carretero, C. 1998a. Functional properties of heat induced gels from liquid and spray dried porcine blood plasma as influenced by pH. *Journal of Food Science*, 63, 958-961.

Parés, D.; Saguer, E.; Saurina, J.; Suñol, J.J.; Toldrà, M. and Carretero, C. 1998b. DSC study of the effects of high pressure and spray-drying treatment on porcine plasma. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 52, 837-844.

Parés, D.; Sagner, E.; Toldrà, M., Carretero, C. 2000. Effect of high pressure processing at different temperatures on protein functionality of porcine blood plasma. *Journal of Food Science*, 65 (3), 486-490.

Parés, D, Ledward, D.A. 2001. Emulsifying and gelling properties of porcine blood plasma as influenced by high pressure processing. *Food Chemistry*, 74 (2), 139-145.

Pérez-Gavilán, P.; Macedo, L.; Aldana, L. Un proceso para aprovechar las proteínas de la sangre de los rastros. *Tecnología [revista en línea]* 2007; [consulta 29/4/2011]. Accessible a: <http://www.alfa-editores.com/carnilac/Febrero%20-%20Marzo%202007/subproductos.pdf>

Raëker, M.O. and Johnson, L.A. 1995. Thermal and functional properties of bovine blood plasma and egg white proteins. *Journal of Food Science*, 60, 685-690, 706.

Ramos-Clamont, G.; Fernandez-Michel, S.; Carrillo-Vargas, L.; Martinez-Calderon, E. and Vazquez-Moreno, L. 2003. Functional properties of protein fractions isolated from porcine blood. *Journal of Food Science*, 68, 1196-1200.

Ranken, M.D. 1980. Application of blood proteins, A: Grant, R.A. (Ed). *Applied protein chemistry*. Applied Science Publishers. London. 169-180

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

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

Silva, V.D.M. and Silvestre, M.P.C. 2003. Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 36, 709-718.

Torres, M.R., Ramos, A.J. i Soriano, E. 1996b. Ultrafiltración de disoluciones proteicas: causas del descenso del flujo. *Alimentación, equipos y tecnología*, 10: 97-103.

Tybor, P.T, Dill, C.W, Landmann, W.A. 1975. Functional properties of proteins isolated from bovine by a continuous pilot process. *J. Food Sci.*, 40, 155-159.

Veall, F. 1993. Estructura y funcionamiento de mataderos en países en desarrollo. Estudio FAO. Producción y sanidad animal, 97. pp 42-45.

Vilardell, N. 2010. Desenvolupament d'una metodologia per a l'obtenció de concentrats de proteïnes plasmàtiques de sang de porc. Projecte Final de Carrera. Departament d'Enginyeria Química Agrària i Tecnologia Agroalimentària, Universitat de Girona.

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