



Universitat de Girona

CARACTERITZACIÓ I REVALORACIÓ DE LA FRACCIÓ PLASMÀTICA DE LA SANG DE PORC PROCEDENT D'ESCORXADORS INDUSTRIALS

DOLORS PARÉS i OLIVA

ISBN: 84-8458-109-8

Dipòsit legal: GI-1230-2001

<http://hdl.handle.net/10803/7773>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESI DOCTORAL

**CARACTERITZACIÓ I REVALORACIÓ DE LA
FRACCIÓ PLASMÀTICA DE LA SANG DE PORC
PROCEDENT D'ESCORXADORS INDUSTRIALS**

DOLORS PARÉS i OLIVA

1998

DOLORS
PARÉS
i OLIVA

TESI
DOCTORAL

1998

TESI DOCTORAL

**CARACTERITZACIÓ I REVALORACIÓ DE LA
FRACCIÓ PLASMÀTICA DE LA SANG DE PORC
PROCEDENT D'ESCORXADORS INDUSTRIALS**

DOLORS PARÉS i OLIVA

1998



Universitat de Girona

Departament d'Enginyeria Química Agrària i Tecnologia Agroalimentària
Institut de Tecnologia Agroalimentària

**CARACTERITZACIÓ I REVALORACIÓ DE LA
FRACCIÓ PLASMÀTICA DE LA SANG DE PORC
PROCEDENT D'ESCORXADORS INDUSTRIALS**

Memòria presentada per optar al grau de doctor en Biologia per la
Universitat de Girona, per

Dolors Parés i Oliva
Setembre 1998

Carmen Carretero Romay, Professora Titular de Tecnologia dels Aliments del Departament d' EQATA de la Universitat de Girona, i

Emili Montesinos Seguí, Catedràtic de Producció Vegetal del Departament d'EQATA i director de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària de la Universitat de Girona,

CERTIFIQUEN : que la llicenciada en Ciències Biològiques Dolors Parés i Oliva ha realitzat, sota la seva direcció, el treball titulat "Caracterització i revaloració de la fracció plasmàtica de la sang de porc procedent d'escorxadors industrials", que presenta per optar al grau de Doctor.

I per a què consti als efectes oportuns, signen la present a Girona, l'1 de Setembre de mil nou-cents noranta-vuit.

Dra. Carmen Carretero Romay

Dr. Emili Montesinos Seguí

AGRAÏMENTS

Un treball científic, per modest que sigui, mai és només fruit del seu autor o autora, sense que això signifiqui que la responsabilitat del text sigui compartida. Per això, crec que és bo deixar constància dels molts suports que he rebut en el decurs d'aquesta investigació i sense els quals el treball difícilment s'hagués pogut dur a bon terme.

En primer lloc vull expressar el meu agraïment als directors d'aquest treball, la Carmen Carretero i l'Emili Montesinos, un tàndem difícil de superar. Els dos han posat a la meua disposició els seus coneixements i la seva experiència. Els agraeixo especialment el seu suport, la seva dedicació, els suggeriments, les crítiques i les correccions del treball.

He d'agrair també moltíssimes coses (i segur que me'n deixo un munt) als companys de Tecnologia dels Aliments: l'Elena, la Moni, l'Anna M., l'Anna i la Carmen. Amb aquest EQUIP treballar, a més d'un plaer, és un "*blowing-and-making-bottles*". A l'Elena Saguer li vull agrair tot l'ajut en la feina de laboratori, en la discussió dels resultats i cadascuna de les hores, que són moltes, invertides en la part de redacció: l'*escanneig* i retoc de les figures i la minuciosa lectura-correcció del text. A la Mònica Toldrà i l'Anna M. Aymerich, la seva col·laboració i suport durant el temps que ha durat aquesta tesi i, sobretot, la seva contribució a l'ambient únic de T.A.. I a la Carmen que, a més de Directora (en majúscules), sigui una excel·lent companya de feina.

Agraeixo la col·laboració de totes les empreses que m'han facilitat l'accés a les seves instal·lacions i les mostres necessàries per dur a terme aquest estudi. Vull donar les gràcies especialment a Joan Lloret i a Ferran Ribas per haver-me ajudat en la poc agradable feina de recollir les mostres a l'escorxador.

No puc oblidar que l'Albert, la Dolors, en Kris, en Manel, en Sergi i l'Elisabet han contribuït també a la realització del treball, concretament en el mostreig, anàlisis i altres tasques de laboratori, posada a punt de les tècniques, etc. I tampoc oblidó l'ajut d'en Josep Pereda a l'hora de fer els muntatges que han calgut per dur a terme algunes parts de l'estudi. També ha estat molt positiva la col·laboració amb els companys del Departament d'Enginyeria Industrial de l'escola, en Joan Saurina i en Joan Josep Suñol.

El Dr. Buenaventura Guamis, director del Centre especial de Recerca – Planta Pilot de Tecnologia dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona, m'ha permès utilitzar les instal·lacions i equipaments del centre. Vull donar-li les gràcies a ell i a totes les persones del seu equip, i en particular agrair a en Josep Yuste la seva paciència i l'ajut en els tractaments d'alta pressió.

Vull agrair les aportacions dels Drs. José Antonio García Regueiro i Glòria Casademont, del Centre de Tecnologia de la Carn (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries) de Monells, en l'anàlisi de residus del plasma deshidratat; i la de la Dra. Planas, del laboratori d'hematologia de l'hospital Josep Trueta de Girona, en la realització d'algunes anàlisis de caracterització de la sang.

Amb els companys de P.V. (l'Anna, l'Esther, l'Isidre, la Cun, en Jesús, la Lusi, en Josep Lluís, en Pere i l'Emili) i els d'E.Q. (en Jaume, la Nuri, la M. Àngels, la Marta, la Fabiola i l'Helena) hem compartit laboratoris, despatxos i altres espais, ordinadors, impressores, aparells, reactius i material de laboratori, dinars, estones, problemes... és a dir, gairebé de tot. He d'agrair també la inestimable dedicació de la Carmen Dilmé i la Cristina Núñez en totes les tasques de suport administratiu i la disponibilitat d'en Joan de Gràcia per solucionar tota mena de problemes informàtics.

Finalment, agrair també el suport de la meua família i a l'Enric donar-li moltíssimes gràcies per TOT (que és molt).

El treball que es presenta en aquesta tesi s'ha realitzat en el marc dels projectes "Mejora de la calidad de la sangre de porcino obtenida en mataderos industriales" finançat per la CICYT (Ref. ALI96-0913) i "Aprofitament de subproductes de la indústria càrnia" finançat per la CIRIT (Ref. CeRTA TAG 95/98). S'ha rebut també un ajut del Programa Institucional d'Ajuts de Recerca "PIAR'93" de la Universitat de Girona.

ÍNDIX

CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ

1.1 Subproductes d'origen animal	3
1.2 La sang de porc dins el context industrial.....	5
1.2.1 Potencial contaminant de la sang de porc.....	5
1.2.2 Composició i aprofitaments actuals de les diferents fraccions de la sang.....	6
1.2.3 La sang: font de proteïnes	7
1.2.3.1 Valor nutricional	8
1.2.3.2 Propietats funcionals	9
1.2.4 Equipaments industrials per a la recollida de sang en escorxadors	13
1.3 El plasma: producte inestable	17
1.3.1 Sistemes de deshidratació	18
1.3.2 Sistemes d'higienització del plasma líquid	19
1.3.2.1 Bactofugació.....	19
1.3.2.2 Microfiltració	20
1.3.2.3 Alta pressió hidrostàtica (HP).....	22
1.4 Plantejament general del treball.....	23

CAPÍTOL 2. CARACTERITZACIÓ DE LA SANG HIGIÈNICA

2.1 OBJECTIUS	27
2.2 MATERIAL I MÈTODES	29
2.2.1 Procedència de les mostres	29
2.2.2 Disseny experimental	30
2.2.3 Presa de mostres	32

2.2.4 Mètodes analítics.....	33
2.2.4.1 Separació de les fraccions plasmàtica i cel·lular per centrifugació	33
2.2.4.2 Caracterització bioquímica de sang sencera, plasma i fracció cel·lular.....	33
2.2.4.3 Anàlisis microbiològiques	31
2.2.4.4 Determinació del nivell d'hemòlisi en mostres de sang.....	36
2.2.5 Tractament estadístic de les dades	37
2.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	38
2.3.1 Obtenció de les fraccions plasmàtica i cel·lular per centrifugació.....	38
2.3.2 Caracterització bioquímica de la sang i de les seves fraccions	38
2.3.2.1 Sang sencera	39
2.3.2.2 Fracció plasmàtica.....	39
2.3.2.3 Fracció cel·lular	42
2.3.3 Caracterització microbiològica.....	44
2.3.3.1 Bacteris aeròbics mesòfils.....	44
2.3.3.2 Bacteris aeròbics psicròtrofs	49
2.3.3.3 Enterobacteris	52
2.3.3.4 Clostridis sulfit-reductors	54
2.3.3.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	55
2.3.3.6 Fongs i llevats	57
2.3.3.7 Bacteris β -hemolítics.....	58
2.3.3.8 Bacteris proteolítics	59
2.3.3.9 Nivells globals de contaminació.....	60
2.3.3.10 Influència del sistema de dessagnat. Origen de la contaminació.....	62
2.3.4 Estudi de l'hemòlisi	70
2.3.4.1 Determinació per espectrofotometria.....	70
2.3.4.2 Quantificació	73
2.3.4.3 Evolució de l'hemòlisi en mostres conservades en refrigeració.....	76
2.3.4.3.1 Influència del tipus d'anticoagulant	78
2.3.4.3.2 Influència de la càrrega microbiana.....	79
2.3.4.4 Influència del sistema de dessagnat. Origen de l'hemòlisi.....	81
2.4 SÍNTESI	83

CAPÍTOL 3. DESHIDRATACIÓ DEL PLASMA PER ATOMITZACIÓ

3.1 OBJECTIUS	89
3.2 MATERIAL I MÈTODES	91
3.2.1 Procedència de les mostres	91
3.2.2 Deshidratació per atomització.....	91
3.2.2.1 Equip	91
3.2.2.2 Determinació de les condicions de procés	93
3.2.3 Caracterització del plasma atomitzat.....	94
3.2.3.1 Caracterització bioquímica	94
3.2.3.2 Anàlisis microbiològiques	96
3.2.3.3 Anàlisi calorimètrica (DSC).....	96
3.2.3.4 Propietats funcionals	98
3.2.3.4.1 Solubilitat	100
3.2.3.4.2 Capacitat escumant	100
3.2.3.4.3 Activitat emulsionant	101
3.2.3.4.4 Formació de gels per escalfament	101
3.2.4 Estabilitat del plasma deshidratat	103
3.2.5 Tractament estadístic de les dades	104
3.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ	105
3.3.1 Atomització	105
3.3.2 Caracterització del plasma atomitzat.....	109
3.3.2.1 Caracterització bioquímica	109
3.3.2.2 Anàlisis microbiològiques	112
3.3.2.3 Anàlisi calorimètrica (DSC).....	115
3.3.2.4 Propietats funcionals	121
3.3.2.4.1 Solubilitat	121
3.3.2.4.2 Capacitat escumant	123
3.3.2.4.3 Activitat emulsionant	125

3.3.2.4.4 Gelificació : formació de gels per escalfament	129
3.3.3 Estabilitat del plasma deshidratat	140
3.3.3.1 Humitat	141
3.3.3.2 Anàlisi calorimètrica (DSC)	143
3.3.3.3 Recomptes microbiològics	145
3.3.3.4 Propietats funcionals	147
3.3.3.4.1 Solubilitat	147
3.3.3.4.2 Capacitat escumant i estabilitat de l'escuma	151
3.3.3.4.3 Capacitat de gelificació: resistència a la penetració	153
3.4 SÍNTESI	156

CAPÍTOL 4. HIGIENITZACIÓ DEL PLASMA LÍQUID

4.1 OBJECTIUS	161
4.2 MATERIAL I MÈTODES	163
4.2.1 Procedència de les mostres	163
4.2.2 Bactofugació	163
4.2.2.1 Equip	163
4.2.2.2 Procés	164
4.2.3 Microfiltració tangencial	164
4.2.3.1 Equip	164
4.2.3.2 Procés	166
4.2.4 Alta pressió hidrostàtica (HP)	167
4.2.4.1 Equip	167
4.2.4.2 Procés	167
4.2.5 Determinacions analítiques	169
4.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ	171
4.3.1 Bactofugació	171
4.3.1.1 Procés discontinu	171
4.3.1.2 Procés en continu	173

4.3.2 Microfiltració	174
4.3.3 Alta Pressió Hidrostàtica (HP).....	178
4.3.3.1 Aplicació sobre sang sencera.....	178
4.3.3.2 Aplicació sobre la fracció plasmàtica.....	181
4.3.3.2.1 Anàlisi calorimètrica de les mostres pressuritzades	181
4.3.3.2.2 Reducció de la càrrega microbiana contaminant	187
4.3.3.2.3 Efecte del tractament sobre la funcionalitat del plasma.....	201
4.4 SÍNTESI.....	211
CONCLUSIONS.....	215
BIBLIOGRAFIA.....	221
ANNEXOS.....	237
ANNEX 1. Anàlisi estadística: caracterització microbiològica	239
1a. Bacteris aeròbics mesòfils	239
1b. Bacteris aeròbics psicròtrofs	239
1c. Enterobacteris	240
1d. Clostridis sulfit-reductors.....	240
1e. <i>Staphylococcus aureus</i>	240
1f. Fongs i llevats.....	241
1g. Bacteris hemolítics.....	241
1h. Bacteris proteolítics.....	242
ANNEX 2. Anàlisi estadística: origen de la contaminació i efecte del sistema de dessagnat sobre la contaminació.....	243
2a. Bacteris aeròbics mesòfils	243
2b. Bacteris aeròbics psicròtrofs	245
2c. Enterobacteris	247

2d. Clostridis sulfit-reductors	248
2e. <i>Staphylococcus aureus</i>	249
ANNEX 3. Anàlisi estadística: hemòlisi.....	250
3a. Efecte de l'escorxador i el període de mostreig sobre el nivell d'hemòlisi.....	250
3b. Estudi d'evolució de l'hemòlisi en mostres de sang refrigerades	250
3b1. Efecte de l'anticoagulant	252
3b2. Efecte de l'anticoagulant i la càrrega microbiana.....	252
3c. Efecte del sistema de dessagnat i l'origen de les mostres	253
ANNEX 4. Anàlisi estadística: determinació de les condicions de deshidratació	255
ANNEX 5. Anàlisi estadística: efecte del pH sobre els paràmetres calorimètrics del plasma.....	256
5a. Variació de l'entalpia de transició	256
5b. Temperatura de desnaturalització.....	256
ANNEX 6. Anàlisi estadística: efecte del pH sobre la capacitat de gelificació del plasma.....	257
6a. Capacitat de retenció d'aigua (CRA).....	257
6b. Resistència a la penetració.....	257
ANNEX 7. Anàlisi estadística: evolució durant l'emmagatzematge de la capacitat escumant i l'estabilitat de l'escuma	259
ANNEX 8. Anàlisi estadística: efecte de la pressurització sobre la capacitat escumant i l'estabilitat de l'escuma	260

LLISTAT DE FIGURES

CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ

Figura 1.1. Subproductes d'indústries càrnies	3
Figura 1.2. Il·lustració esquemàtica de la recollida, processament i utilització de sang bovina i porcina	11
Figura 1.3. Trocar utilitzat en sistemes tancats de recollida de sang higiènica.....	14
Figura 1.4. Sistema tancat de recollida higiènica de sang d'escorxador.....	16

CAPÍTOL 2. CARACTERITZACIÓ DE LA SANG HIGIÈNICA

Figura 2.1. Espectre d'absorció del sobrenedant d'un lisat d'eritròcits de porc.	37
Figura 2.2. Components lipídics de la fracció plasmàtica de sang de porc.	41
Figura 2.3. Recomptes de bacteris mesòfils per a cada escorxador i per a cada període.	45
Figura 2.4. Recomptes de bacteris psicròtrofs per a cada escorxador i per a cada període.	50
Figura 2.5. Recomptes d'enterobacteris per a cada escorxador.	53
Figura 2.6. Recomptes de clostridis sulfit-reductors per a cada escorxador.	55
Figura 2.7. Recomptes de <i>Staphylococcus aureus</i> per a cada escorxador.....	56
Figura 2.8. Recomptes de fongs i llevats per a cada escorxador.	57
Figura 2.9. Recomptes de bacteris hemolítics per a cada escorxador.	59
Figura 2.10. Recomptes de bacteris proteolítics per a cada escorxador.....	60
Figura 2.11. Contaminació microbiològica global de la sang	61
Figura 2.12. Recomptes de bacteris mesòfils dels mostrejos en dos escorxadors durant dos anys	64
Figura 2.13. Recomptes de bacteris psicròtrofs dels mostrejos en dos escorxadors durant dos anys en dos punts de mostreig.....	65

Figura 2.14. Recomptes d'enterobacteris dels mostrejos en dos escorxadors durant dos anys en dos punts de mostreig.	67
Figura 2.15. Recomptes de clostridis sulfít-reductors dels mostrejos en dos escorxadors durant dos anys en dos punts de mostreig.	68
Figura 2.16. Recomptes de <i>Staphylococcus aureus</i> dels mostrejos en dos escorxadors durant dos anys en dos punts de mostreig	69
Figura 2.17. Determinacions del grau d'hemòlisi per a cada escorxadador i per a cada període.....	72
Figura 2.18. Espectre d'absorció d'una solució de metahemoglobina de porc.	74
Figura 2.19. Recta de calibratge entre l'absorbància a 405 nm i la concentració de solucions de metahemoglobina de porc	75
Figura 2.20. Evolució de l'hemòlisi de sang mantinguda en refrigeració.....	77
Figura 2.21. Evolució de l'hemòlisi de les mostres mantingudes en refrigeració amb dos tipus d'anticoagulant,	79
Figura 2.22. Increment d'hemòlisi per cadascuna de les combinacions d'anticoagulant i nivell de contaminació.....	80
Figura 2.23. Hemòlisi per cadascun dels escorxadors segons la procedència de la mostra.	81

CAPÍTOL 3. DESHIDRATACIÓ DEL PLASMA PER ATOMITZACIÓ

Figura 3.1. Esquema de l'equip d'atomització.....	92
Figura 3.2. Isotermes de sorció del plasma deshidratat per atomització.....	94
Figura 3.3. Propietats funcionals de les proteïnes i les seves interrelacions.....	99
Figura 3.4. Humitat del plasma deshidratat a diferents temperatures.	106
Figura 3.5. Velocitats relatives de les reaccions químiques i bioquímiques de degradació dels aliments i del creixement microbiològic en funció de l' a_w	111
Figura 3.6. Recomptes de microorganismes en sang, plasma líquid i deshidratat	112
Figura 3.7. Corbes DSC de mostres de plasma de sang porcina a diferents velocitats d'escalfament.	117
Figura 3.8. Corbes DSC de mostres de plasma líquid i de plasma deshidratat.....	119
Figura 3.9. Solubilitat del plasma deshidratat a pH 7 i pH 4,5.....	122

Figura 3.10. Capacitat escumant i estabilitat de l'escuma del plasma líquid, deshidratat i clara d'ou deshidratada.	124
Figura 3.11. Activitat emulsionant del plasma líquid en funció del pH i la concentració de proteïna.	128
Figura 3.12. Activitat emulsionant del plasma deshidratat per atomització en funció del pH i la concentració de proteïna.	128
Figura 3.13. Capacitat de retenció d'aigua dels gels de plasma líquid i deshidratat i de clara d'ou deshidratada.	130
Figura 3.14. Micrografies de gels de plasma líquid a diferents pH.	133
Figura 3.15. Micrografies de gels de plasma deshidratat diferents pH.	135
Figura 3.16. Força de penetració dels gels de plasma de sang líquid i deshidratat i de la clara d'ou en funció del pH.	138
Figura 3.17. Evolució de la solubilitat proteica i l'estabilitat tèrmica del plasma deshidratat emmagatzemat a temperatura ambient.	140
Figura 3.18. Evolució durant sis mesos del contingut d'humitat de plasma deshidratat mantingut en diferents condicions d'emmagatzematge.	142
Figura 3.19. Evolució de l'entalpia de transició de plasma deshidratat mantingut en diferents condicions d'emmagatzematge.	143
Figura 3.20. Evolució de la temperatura de desnaturalització de les proteïnes de plasma deshidratat mantingut en diferents condicions d'emmagatzematge.	144
Figura 3.21. Evolució dels recomptes de bacteris aeròbics mesòfils en mostres de plasma deshidratat mantingut en diferents condicions d'emmagatzematge.	145
Figura 3.22. Evolució dels recomptes de bacteris aeròbics psicròtrofs en mostres de plasma deshidratat mantingut en diferents condicions d'emmagatzematge.	146
Figura 3.23. Evolució de la solubilitat del plasma deshidratat emmagatzemat a temperatura ambient.	148
Figura 3.24. Evolució de la solubilitat del plasma deshidratat emmagatzemat en refrigeració.	150
Figura 3.25. Evolució al llarg de sis mesos de la capacitat escumant i de l'estabilitat de l'escuma de plasma atomitzat mantingut a temperatura ambient.	152
Figura 3.26. Evolució al llarg de sis mesos de la capacitat escumant i de l'estabilitat	

de l'escuma de plasma atomitzat mantingut a temperatura de refrigeració..... 152

Figura 3.27. Evolució de la força de penetració en gels de solucions al 10 % de plasma atomitzat mantingut a temperatura ambient i en refrigeració. 154

Figura 3.28. Evolució del treball penetració en gels de solucions al 10 % de plasma atomitzat mantingut a temperatura ambient i en refrigeració. 154

CAPÍTOL 4. HIGIENITZACIÓ DEL PLASMA LÍQUID

Figura 4.1. Muntatge del sistema de microfiltració 166

Figura 4.2. Esquema d'un equip discontinu per a la pressurització d'aliments envasats (ACB, Gec Alsthom, França)..... 169

Figura 4.3. Percentatges de reducció de la càrrega microbiana contaminant del plasma aconseguits mitjançant la bactofugació (procés discontinu) en funció de la temperatura i el temps de centrifugació. 171

Figura 4.4. Recòmptes del nombre de viables del plasma abans i després dels processos de bactofugació (procés continu) i microfiltració. 176

Figura 4.5. Efecte de diferents temps de pressurització a 400 MPa en la concentració d'hemoglobina del plasma obtingut a partir de la sang tractada. 180

Figura 4.6. Efecte de diferents temps de pressurització a 350 MPa en la concentració d'hemoglobina del plasma obtingut a partir de la sang tractada. 180

Figura 4.7. Corbes DSC de mostres de plasma no tractat i de plasma tractat per alta pressió a 5°C i amb diferents combinacions de temps i pressió 184

Figura 4.8. Diagrama de fase pressió/temperatura de les proteïnes 186

Figura 4.9. Corbes de creixement dels microorganismes del plasma sotmès a un tractament a 450 MPa durant 15 minuts i a 5°C i el mateix plasma no pressuritzat 191

Figura 4.10. Corbes de creixement corresponents a les deu repeticions de plasma sense tractament i tractat a 450 MPa durant 15 minuts a 5, 25 i 40°C..... 195

Figura 4.11. Corbes de creixement dels microorganismes del plasma no tractat i del sotmès a tractaments de pressurització a 450 MPa durant 15 min a 5, 25 i 40°C. 199

Figura 4.12. Solubilitat a pH 7 i pH 4,5 del plasma en pols obtingut per atomització de plasma no tractat i del plasma pressuritzat a 450 MPa, 15 minuts a 5 i 40°C..... 201

Figura 4.13. Capacitat escumant i estabilitat de l'escuma del plasma líquid no tractat i plasma pressuritzat a 450 MPa durant 15 min a 40°C..... 203

Figura 4.14. Activitat emulsionant del plasma líquid no tractat i del plasma sotmès a pressurització a 450 MPa durant 15 min a temperatures de 5 i 40°C.....	205
Figura 4.15. Capacitat de retenció d'aigua (CRA) dels gels de plasma no tractat i del plasma pressuritzat a 450 MPa durant 15 min a 5 i 40°C.	206
Figura 4.16. Força i treball de penetració en gels de plasma no tractat i de plasma sotmès a tractaments de 450 MPa durant 15 min a 5 i 40°C	207
Figura 4.17. Micrografies de gels de plasma líquid sotmès a diferents tractaments de pressurització	209

LLISTAT DE TAULES

CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ

Taula 1.1. Algunes aplicacions de subproductes d'origen animal	4
Taula 1.2. Usos de la sang.....	7
Taula 1.3. Composició en aminoàcids essencials de les fraccions de sang bovina..	9

CAPÍTOL 2. CARACTERITZACIÓ DE LA SANG HIGIÈNICA

Taula 2.1. Característiques dels escorxadors	30
Taula 2.2. Components majoritaris de cada fracció.....	38
Taula 2.3. Recomptes de bacteris aeròbics mesòfils	47
Taula 2.4 Distribució de la càrrega microbiana contaminant en les diferents fraccions de la sang per efecte de la centrifugació	49
Taula 2.5. Recomptes de bacteris aeròbics psicròtrofs	51
Taula 2.6. Efecte de l'origen, l'escorxador i el període de mostreig sobre els recomptes de bacteris aeròbics mesòfils i psicròtrofs. Resultats de l' ANOVA.	63

Taula 2.7. Efecte de l'origen, l'escorxador i el període de mostreig sobre els recomptes d'enterobacteris, clostridis sulfit-reductors i <i>Staphylococcus aureus</i> . Resultats de l'ANOVA.....	66
Taula 2.8. ANOVA i separació de mitjanes del grau d'hemòlisi.....	73
Taula 2.9. Valors aproximats de concentració d'hemoglobina en plasma.....	76
Taula 2.10. Efecte de l'origen de les mostres i del període de mostreig sobre l'hemòlisi. Resultats de l'ANOVA.....	82

CAPÍTOL 3. DESHIDRATACIÓ DEL PLASMA PER ATOMITZACIÓ

Taula 3.1. Paràmetres calorimètrics (DSC) de plasma líquid i plasma atomitzat	107
Taula 3.2. Components majoritaris del plasma deshidratat per atomització	109
Taula 3.3. Límit inferior d' a_w per al creixement i la producció de toxines d'alguns patògens d'aliments	114
Taula 3.4. Temperatures de desnaturalització (Td) i entalpia de transició (<i>DH</i>) determinats per DSC en plasma sotmès a diferents velocitats d'escalfament.....	116
Taula 3.5. Efecte del pH sobre els paràmetres calorimètrics (DSC) del plasma líquid i plasma deshidratat.....	120
Taula 3.6. Capacitat de retenció d'aigua de gels de plasma líquid, deshidratat i clara d'ou deshidratada.....	131
Taula 3.7. Força i treball de penetració en gels de plasma líquid i atomitzat	137

CAPÍTOL 4. HIGIENITZACIÓ DEL PLASMA LÍQUID

Taula 4.1. Propietats tèrmiques de plasma porcí pressuritzat	182
Taula 4.2. Propietats tèrmiques de plasma porcí tractat a 450 MPa 15 minuts	185
Taula 4.3. Àrees i increments d'absorbància de les corbes de creixement dels microorganismes de plasma sotmès a 450 MPa durant 15 minuts a 5°C.....	196
Taula 4.4. Àrees i increments d'absorbància de les corbes de creixement dels microorganismes de plasma sotmès a 450 MPa durant 15 minuts a 25°C.....	197
Taula 4.5. Àrees i increments d'absorbància de les corbes de creixement dels microorganismes de plasma sotmès a 450 MPa durant 15 minuts a 40°C.....	197

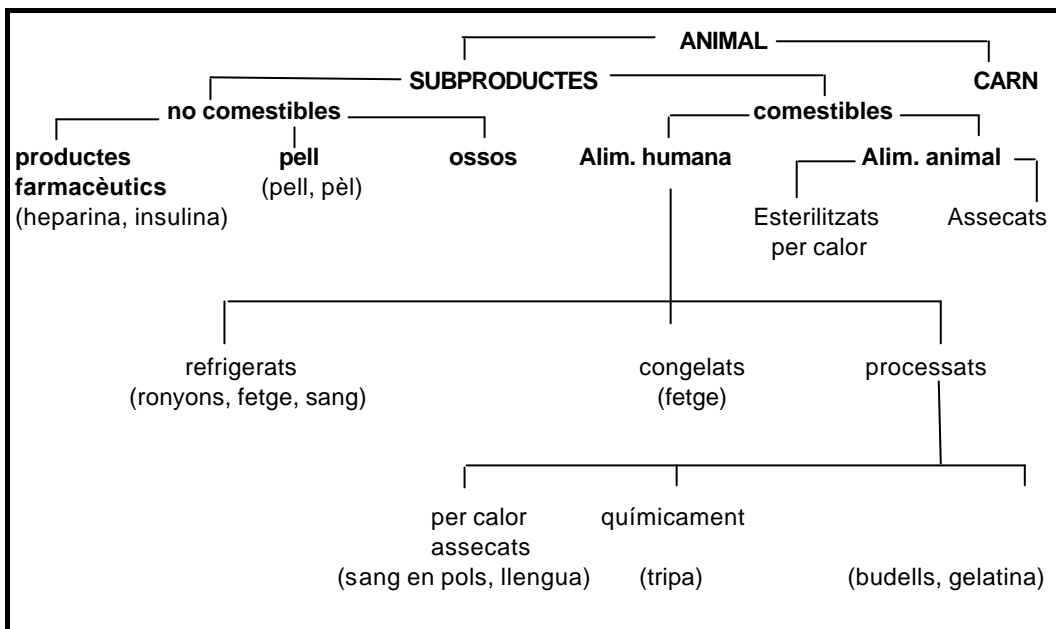
Taula 4.6. Reducció de la capacitat de creixement de les poblacions microbianes contaminants de plasma pressuritzat a 450 MPa durant 15 min en funció de la temperatura de tractament.	198
Taula 4.7. Velocitat de creixement i temps de generació de les poblacions microbianes contaminants de plasma supervivents a un tractament de pressurització a 450 MPa durant 15 min en funció de la temperatura de tractament.....	200

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Subproductes d'origen animal

Les indústries càrnies generen una quantitat important de subproductes, entenent com a tals "tots aquells amb valor econòmic potencial, excloent la canal, que es deriven incidentalment del sacrifici de l'animal" (Booren i Weiss, 1988), que tenen característiques físiques i químiques aptes per a usos industrials i que generalment estan infrautilitzats o no s'aprofiten. Aquest fet, tenint en compte que els subproductes, comestibles o no (Figura 1.1), representen una part important del pes viu de l'animal, suposa no només la pèrdua d'una font potencial d'ingressos, sinó també una despesa econòmica afegida degut a la inversió que requereixen els processos d'eliminació i/o disminució del seu impacte contaminant.

Figura 1.1. Subproductes d'indústries càrnies



Font: Swingler, 1982.

La composició de molts d'aquests subproductes (proteïnes, greix, sucres i sals minerals) fa que es puguin considerar una matèria primera excel·lent per a l'obtenció d'altres tipus de productes, sobretot per a la indústria alimentària i amb un mercat creixent en la indústria cosmètica i farmacèutica (Taula 1.1). En la majoria dels casos es tracta de substrats de valor nutritiu considerable i que, convenientment manipulats, no

haurien de suposar riscos ja que provenen de matèries d'ús alimentari i, per tant, podrien ser utilitzats per a l'alimentació humana. És lògic doncs, considerar l'animal com a una font no només de carn, sinó també d'aquests subproductes amb valor productiu o si més no valoritzables.

En la taula 1.1 es relacionen les diferents possibilitats d'aprofitament de subproductes d'origen animal. El seu processament amb l'objectiu d'obtenir productes amb valor afegit ajuda, per una banda, a rendibilitzar els processos de recuperació, i al mateix temps permet reciclar unes matèries que en alguns casos són altament contaminants. Tanmateix, però, encara no s'ha arribat a una solució pràctica per canalitzar la superproducció de molts d'aquests productes laterals que es deriven d'una activitat tan important a Catalunya com és el sacrifici del bestiar en els escorxadors industrials.

Taula 1.1. Algunes aplicacions de subproductes d'origen animal

(1)	Menuts per al consum humà.
(2)	Greixos comestibles per a la fabricació de margarines, dolços i xiclets.
(3)	Ossos, provinents del desossat mecànic per elaborar carns tendres, utilitzats en la fabricació de sopes, botons, mànecs de ganivets, farina d'ossos, diferents varietats de ceràmica o en el refinament del sucre.
(4)	Sang per al consum humà, per fabricar farina de sang, adhesius o fertilitzants.
(5)	Glicerol per a molts usos industrials (fabricació de nitroglicerina, bases de cremes, dissolvents, excipients per a medicaments, conservadors alimentaris, plastificants o humectants).
(6)	Intestins per a tripes d'embotits, cordes d'instruments musicals i lligaments quirúrgics.
(7)	Gelatina per a productes de confiteria i gelateria.
(8)	Renina per a la fabricació de formatge.
(9)	Substàncies terapèutiques (hormona adrenocorticotropa, albúmina, bilirrubina, epinefrina, insulina, extracte hepàtic, pepsina, pituïtrina, testosterona, tromboplastina, timocrescina i tiroxina)
(10)	Pinsos per a ramaderia.
(12)	Aliments compostos per a gossos i gats i pinsos per a aquaris.
(13)	Pells i cuiros.
(14)	Llana i extractes de lanolina.
(15)	Greixos no comestibles de múltiples usos industrials (fabricació de pneumàtics, lubricants, insecticides i germicides).
(16)	Pèls per a brotxes, catifes, aïllaments i equipaments esportius.
(17)	Plomes per a aïllaments, coixins, articles esportius i pinsos per a animals.
(18)	Cola per a fusteria.
(19)	Greix de taló, utilitzat com a lubricant en la indústria.
	Fertilitzants.

Adaptat a partir de: American Meat Institute, 1958; Levie (1976).

1.2 La sang de porc dins el context industrial

En aquest treball pretenem estudiar les possibilitats d'aprofitament de la sang de porc generada en els escorxadors industrials, dins la mateixa indústria alimentària destinada al consum humà. En aquest cas, es considerarà subproducte només si es recull de manera higiènica per elaborar-ne algun producte amb valor afegit. Malauradament, en la majoria d'escorxadors de l'estat no existeix un sistema de recollida higiènica. Segons el *Boletín Oficial del Estado* (BOE núm. 16, de 19 de gener de 1994: Reial decret 2224/1986, de 17 de desembre, sobre normes sanitàries d'eliminació i transformació d'animals morts i deixalles d'origen animal i protecció contra agents patògens en pinsos d'origen animal) i el Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya (DOGC núm. 705, de 25 de juny de 1986: Decret 173/1986, de 5 de juny, d'ordenació zoonosanitària de les indústries d'aprofitament de subproductes d'origen animal, decomissos i cadàvers animals), la sang generada durant el sacrifici del bestiar es considera un residu, no un subproducte.

El sector d'escorxadors a Catalunya té un pes important dins el conjunt d'Espanya, ja que representa un 25 % de la producció estatal (Mitjà, 1994). La principal carn consumida a Catalunya és la de porc, un 34 % comercialitzada en forma de carn fresca i un 66 % com a elaborats carnis. El nombre de porcs sacrificats a tot l'estat durant l'any 1997, aproximadament 28 milions segons la FAO (1998), ens dóna una idea de la magnitud de subproductes que es deriven d'aquesta activitat.

La quantitat de sang de porc produïda en un any en els escorxadors de l'estat espanyol és de l'ordre de les 106.000 tones i representa aproximadament un 64 % de la sang generada en el sacrifici del conjunt de bestiar (boví, oví, caprí i porcí) (Collado, 1995). A Catalunya existeix l'única empresa de tot l'estat especialitzada en la recollida i tractament de sang (APROCAT) que processa anualment 32.035 tones de sang d'escorxadors majoritàriament catalans.

1.2.1 Potencial contaminant de la sang de porc

El valor aproximat del cabal d'aigües residuals produït en un escorxadors varia entre 200 i 600 L/porc (Tritt i Schuchardt, 1992). La quantitat de matèria orgànica que porten aquests efluentes, expressada en termes de Demanda Química d'Oxigen (DQO), es troba entre 1.500 i 16.000 mg/L, i el contingut en Sòlids en Suspensió Totals (SST) entre 300 i 11.000 mg/L (Ruíz *et al.*, 1993). Els límits màxims establerts en el Reial Decret 849/1986 pel càlcul del cànon d'abocament per a instal·lacions dedicades al "sacrifici de bestiar" són de 500 mg/L per a la DQO i 300 mg/L pels SST. D'això es dedueix que el tractament dels efluentes d'escorxadors és imprescindible per reduir l'impacte provocat pel seu abocament.

En un estudi realitzat en un escorxador municipal de la província de La Coruña que no recupera subproductes, que inclou la caracterització per separat de tres efluentes -la línia de matança (sang i aigua de les sales de sacrifici i d'especejament), la línia de rumen (aigües de rentat dels estómacs), i una tercera línia que recull les aigües de les cambres frigorífiques, dels serveis higiènics i la secció de triperia- s'observa que l'aigua que porta un major contingut de matèria orgànica és la de la línia de sacrifici (Ruíz *et al.*, 1993).

Així doncs, un dels subproductes amb major poder contaminant -més de 10 kg de Demanda Biològica d'Oxigen (DBO₅) per tona d'animal (Mitjà, 1994), aproximadament 250.000 mg/L, i DQO total de 375.000 mg/L (Tritt i Schuchardt, 1992)- és la sang generada durant el sacrifici del bestiar, la qual pot arribar a suposar fins a un 5 % del pes viu de l'animal. Abocant la sang directament en l'efluent de l'escorxador s'incrementa el consum d'oxigen de l'ordre de deu vegades i es multiplica per tres la concentració de sòlids en suspensió (Ockerman i Hansen, 1994). Això fa que la seva recuperació sigui una de les mesures internes importants per reduir la càrrega orgànica en els efluentes dels escorxadors industrials i, òbviament, una activitat essencial per garantir el bon funcionament de les depuradores.

1.2.2 Composició i aprofitaments actuals de les diferents fraccions de la sang

La sang dels animals té moltes possibilitats d'utilització (Taula 1.2) en els aliments, en pinsos, en usos mèdics, com a producte industrial i com a fertilitzant. Nosaltres centrarem el nostre estudi en possibles aplicacions dins la mateixa indústria alimentària (Figura 1.2).

En productes carnis, per exemple, la incorporació de sang o alguna de les seves fraccions pot suposar un increment en el valor nutritiu gràcies a la qualitat de les proteïnes i la concentració de ferro hèmic; i es pot dur a terme sense perjudicar les qualitats sensorials del producte. El fet que la sang no sigui un producte aliè en productes carnis -tots contenen sang residual del procés de dessagnat de l'animal- fa que la seva utilització suposi només incrementar el contingut en una substància natural.

Taula 1.2. Usos de la sang

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

Font: Divakaran, 1980.

1.2.3 La sang: font de proteïnes

En l'efluent d'un escorxadador que procedeix de la línia de matança i, per tant, conté la sang dels animals sacrificats, aproximadament un 70 % de la càrrega orgànica correspon a proteïnes (Ruíz *et al.*, 1993). De fet, la sang conté un 18 % de proteïna, gairebé tanta com la carn magra. Així doncs, la composició de la sang fa que aquesta es pugui considerar no només com un producte altament contaminant que cal eliminar sinó també com a una font potencialment important de proteïna. Malgrat que durant força anys s'han invertit molts esforços en recerca i desenvolupament de noves fonts proteiques -producció de proteïna unicel·lular (SCP), extracció de proteïnes de llavors, fulles i altres teixits vegetals- potser no s'ha dedicat prou atenció a la recuperació de sang provinent d'animals sacrificats en escorxadors industrials.

Un animal boví proporciona uns 10-12 litres de sang. Per uns 500 kg de pes viu i un contingut de carn magra de 170 kg, la utilització de la sang representaria un increment en el rendiment de magre d'un 6-7 % en termes de proteïna (Wisner-Pedersen, 1979). A partir de porcs i xais s'obtenen 2,5 i 1,5 L de sang respectivament, la qual cosa representa increments similars en el rendiment de proteïna comestible de l'animal. Si tota la sang provinent dels més de 7 milions de porcs sacrificats a Catalunya el 1996 s'hagués utilitzat en alimentació, hauria representat un increment de més de 3000 tones de proteïna disponible per a la nutrició humana.

La sang es pot separar, per centrifugació, en dues fraccions: el plasma (amb una densitat de 1,019-1,029 i que representa un 60-70 %) i la fracció cel·lular (un 30-40 % amb densitat 1,084-1,098).

El **plasma** obtingut de la sang és un líquid amb 6-8 % de proteïna d'elevat valor nutritiu que posseeix capacitat emulsionant i capacitat de formació de gels per escalfament. S'utilitza bàsicament en la indústria càrnia com a enriquidor proteic. Conté també una sèrie de proteïnes (fibrinogen, globulines, albúmina, trombines, factors de creixement i lipoproteïnes) que, una vegada purificades, es poden utilitzar en altres mercats, com el de la indústria farmacèutica.

La **fracció cel·lular** separada del plasma conté un 28-38 % de proteïna, de la qual un 90 % es troba en forma d'hemoglobina. Es pot barrejar amb sang recollida en condicions poc higièniques per tal d'obtenir farina de sang de major qualitat. Per aconseguir un producte amb valor afegit a partir dels glòbuls rojos cal decolorar-los perquè l'addició d'una petita quantitat d'hemoglobina comporta problemes de coloracions i gustos estranys. Es poden utilitzar diferents tècniques per eliminar el grup hem de l'hemoglobina, per exemple la hidròlisi àcida o la hidròlisi enzimàtica. Aquesta última permet obtenir un producte de millor qualitat ja que no s'afecta els aminoàcids que es destrueixen per hidròlisi àcida (Wismer-Pedersen, 1988).

1.2.3.1 Valor nutricional

Si estudiem el valor nutricional de les proteïnes de la sang (Taula 1.3) veiem que la composició en aminoàcids de les diferents fraccions no està gaire ben equilibrada pel que fa al contingut d'aminoàcids essencials. La sang és rica en lisina, un aminoàcid deficitari en la majoria de proteïnes de cereals, però s'observa una deficiència clara en isoleucina i un contingut pobre en metionina. De tota manera això no suposaria un problema greu tenint en compte que no es contempla mai la sang com l'única aportació proteica d'un règim alimentici sinó que, en tot cas, se suggereix la seva utilització com a un complement en la dieta. Segons Young *et al.* (1973) l'índex d'eficàcia proteica (P.E.R.= augment de pes amb una ingesta proteica que es mesura generalment en un període comprès entre els 10 i els 28 dies) del plasma boví desmineralitzat i atomitzat (2,15) és superior al de la caseïna (1,9).

El valor nutricional de la sang no és degut únicament al seu contingut proteic sinó també al ferro hèmic de l'hemoglobina de la fracció cel·lular, que s'absorbeix a nivell intestinal entre dues i tres vegades millor que el ferro lliure (Reizenstein, 1980) i es considera la forma biològica millor utilitzable del ferro.

Taula 1.3. Composició en aminoàcids essencials (g/100 g proteïna) de les diferents fraccions proteiques de sang bovina. Comparació amb el model proposat per la FAO.

Aminoàcids essencials	Globina ^a	Plasma ^b	Sang sencera ^c	Combinació tipus (adult) ^d
Ile	0,2-0,3	1,0-3,4	0,4-0,9	1,8
Leu	13,2-13,8	9,2-10,1	12,4-13,6	2,5
Lys	9,8-10,5	6,5-9,2	9,2-9,7	2,2
Met (+ Cys) ^e	1,5-1,7	0,6-1,3	1,3-1,8	2,4
Phe (+ Tyr) ^f	7,6-8,0	5,1-5,7	7,0-8,0	2,5
Thre	3,8-4,1	2,6-7,1	4,7-5,2	1,3
Trp	1,3-2,0	0,6-1,0	1,4	0,7
Val	9,4-9,6	6,8-7,4	8,0-9,1	1,8

^{a,b,c} Segons Ockerman i Hansen (1994) ; ^d Segons FAO-OMS, 1973, Rapport 52-522 (17). ^e La Cys pot cobrir, com a màxim, 1/3 de la necessitat total d'aminoàcids ensofrats; ^f La Tyr pot cobrir, com a màxim, 1/3 de la necessitat total d'aminoàcids aromàtics.

L'hidrolitzat de glòbuls rojos (globina) es pot utilitzar en productes carnis (Caldironi i Ockerman, 1982) i en la fortificació de cereals degut al seu elevat contingut en lisina. Pot substituir fins a un 25 % de la carn en salses (Wismer-Pedersen, 1988) i fins a un 20 % de la clara d'ou en galetes (barreja de plasma i hidrolitzat d'eritròcits) (Bates *et al.*, 1974; citat per Wismer-Pedersen, 1988). També té aplicacions en l'àrea d'alimentació animal (formulacions antiestrès d'animals de granja, suplement per incrementar el valor nutritiu de les dietes, dietes especials per a animals malalts). El grup hem obtingut com a residu de la hidròlisi es pot utilitzar en productes farmacèutics per a persones anèmiques (Rodríguez, 1994).

1.2.3.2 Propietats funcionals

A més de l'elevat valor nutricional, les proteïnes de la sang tenen propietats funcionals potencialment útils en la formulació d'aliments (Tybor *et al.*, 1975; De Vuono *et al.*, 1979). En embotits que s'han de curar, la utilització del plasma com a additiu afavoreix el procés de fermentació, millorant les característiques organolèptiques del producte (López *et al.*, 1992).

El plasma sanguini en escalfar-se forma un gel associat a la desnaturalització de les molècules proteiques (Harper *et al.*, 1978; Howell i Lawrie, 1984; Cheftel *et al.*, 1989; Real del Sol i Martín, 1991). Un gel es pot descriure com un estadi intermig entre una solució i

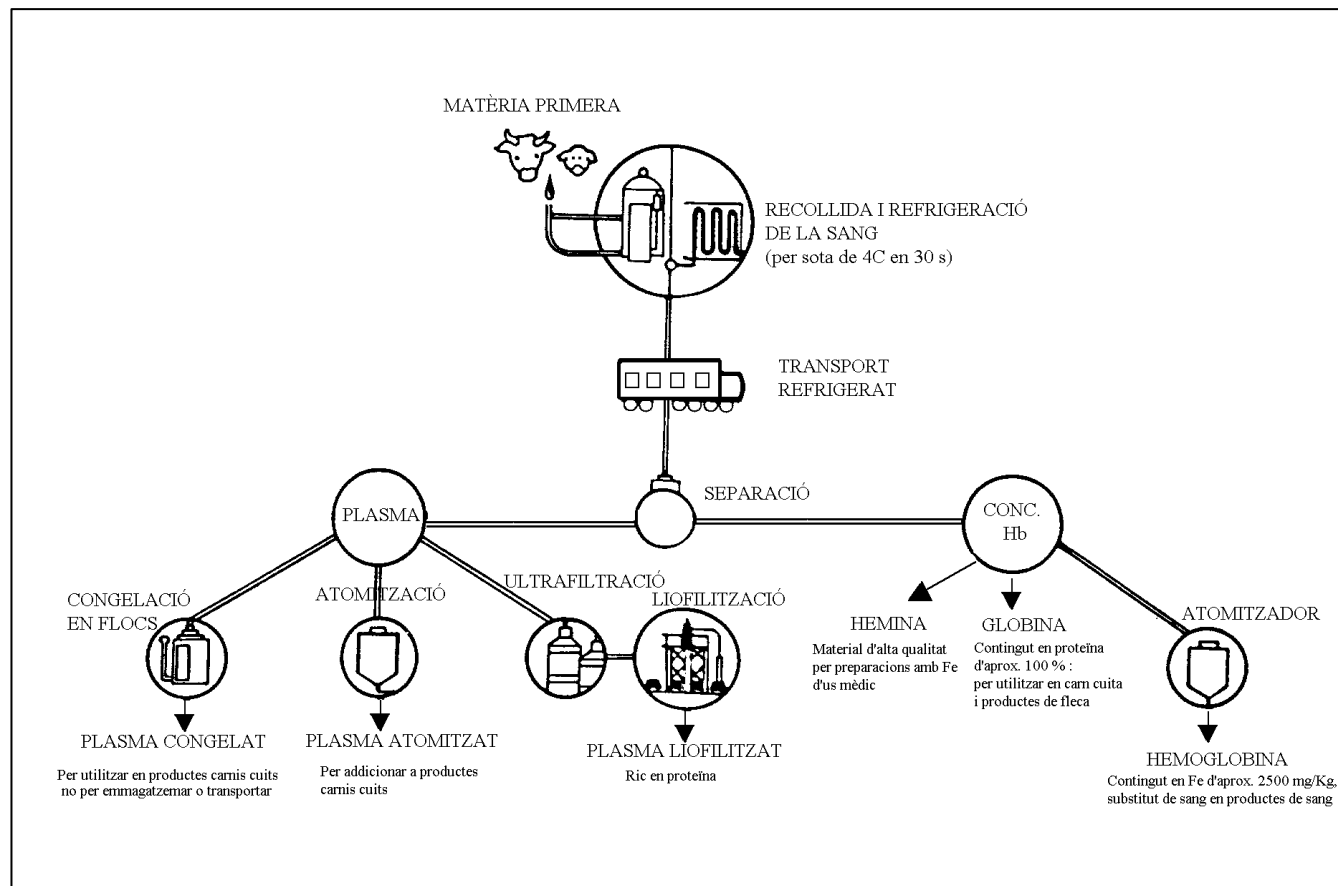
un precipitat amb el balanç just d'interaccions proteïna-proteïna i proteïna-solvent (Hermansson, 1978) per a què es formi una xarxa estructurada. La capacitat d'originar aquest tipus d'estructures és interessant en aliments degut a que els gels proporcionen textura, consistència i un medi que permet retenir aigua, nutrients i aromes.

L'albumina i la globina plasmàtiques són bons agents emulsionants (Tybor *et al.*, 1973 i 1975; Caldironi i Ockerman, 1982; Nakamura *et al.*, 1984), propietat útil en l'elaboració d'embotits, i tenen capacitat escumant i d'inflament (Tybor *et al.*, 1975; De Vuono *et al.*, 1979; Etheridge *et al.*, 1981; Real del Sol i Martín, 1991) que fa que puguin ser utilitzades com a substitut de la clara d'ou en la formulació de productes de pastisseria. Segons algun d'aquests autors (Tybor *et al.*, 1975; Raëker i Johnson, 1995), la capacitat escumant del plasma és equivalent a la de l'albumina d'ou, malgrat que l'escuma obtinguda a partir del plasma és menys estable.

La globina de la fracció cel·lular té una gran capacitat de retenció d'aigua i de formar escuma, a més de ser bon agent emulsionant i estabilitzant a pH 5 (Tybor *et al.*, 1975).

La incorporació directa en productes alimentaris sembla ser doncs una utilització racional de la sang.

Figura 1.2. Il·lustració esquemàtica de la recollida, processament i utilització de sang bovina i porcina



Font: Gorvatov, V.M. (1988)

De tot l'exposat fins ara podem concloure que:

- 1.- la sang és un residu que cal recuperar per evitar problemes de contaminació ambiental i minimitzar els costos de la depuració dels efluent industrial,
- 2.- les seves característiques de composició, principalment el seu contingut proteic, converteixen la sang en una matèria potencialment aprofitable des del punt de vista nutricional o per les seves propietats funcionals.

Per tot això, l'estudi encaminat a obtenir productes amb valor afegit a partir de la sang, no només pot contribuir a solucionar un problema mediambiental sinó que ajudaria a rendibilitzar els processos de recuperació d'aquesta substància que suposa un dels problemes més importants que, tard o d'hora, hauran d'afrontar tots els escorxadors.

Si l'objectiu principal d'un estudi d'aquest tipus és només trobar un procés industrial econòmicament rendible, potser arribarem a la conclusió que no val la pena dedicar-hi massa esforços. Probablement el producte final que s'obtindrà, després de la recuperació i processament de la sang, no serà competitiu en relació a productes amb propietats funcionals i/o nutricionals similars provinents d'altres fonts. Sembla ser que aquest ha estat el factor determinant de què durant els darrers anys no s'hagi treballat en aquest tema (Lorient, 1995. Comunicació personal). Si enfoquem el tema des d'una altra perspectiva i considerem el problema mediambiental que comporta la generació d'aquest residu, no podem prescindir del fet que la reducció del seu potencial contaminant es pot assolir mitjançant activitats que generin un producte amb valor per ser utilitzat (reciclatge), malgrat que el balanç econòmic del procés no sigui del tot favorable. Els costos actuals de transformació d'aquest producte, utilitzat bàsicament per a l'obtenció de farina de sang per pinso, no s'amortitzen si tenim en compte que es genera un altre producte de difícil utilització (relació oferta/demanda de farina de sang descompensada) i, òbviament, no solucionen el problema que plantejava el producte abans de ser processat. La manera de tractar el gran volum de sang generada pels escorxadors segueix essent, però, un problema per solucionar, si més no en el nostre entorn, on no es prenen gaire precaucions durant el procés de recollida i probablement no es garanteix un producte apte per al consum humà.

Ens ha semblat interessant, doncs, reemprendre la recerca sobre possibilitats d'aplicació de noves tecnologies que permetin obtenir un producte "útil" a partir d'un subproducte contaminant, amb un plantejament global de reducció de costos mediambientals en una societat que no es pot permetre la generació indiscriminada de residus industrials sense sortida.

1.2.4 Equipaments industrials per a la recollida de sang en escorxadors

Per tal que l'aprofitament de les propietats nutricionals i funcionals de les proteïnes de la sang sigui rendible caldria que el producte que s'obtingui fos econòmicament competitiu en relació amb altres proteïnes, com les de soja, d'ou o de llet, utilitzades actualment en les formulacions de productes alimentaris. Una revaloració eficaç de la sang exigeix la utilització de sistemes de recollida higiènica que disminueixen els riscos de contaminació microbiològica però que també contribueixen a l'encariment del producte. El repte consisteix doncs en aconseguir que el cost total de la recollida de sang en condicions higièniques i el seu processament sigui prou baix per tal d'obtenir un producte, si no competitiu, sí el més econòmic possible.

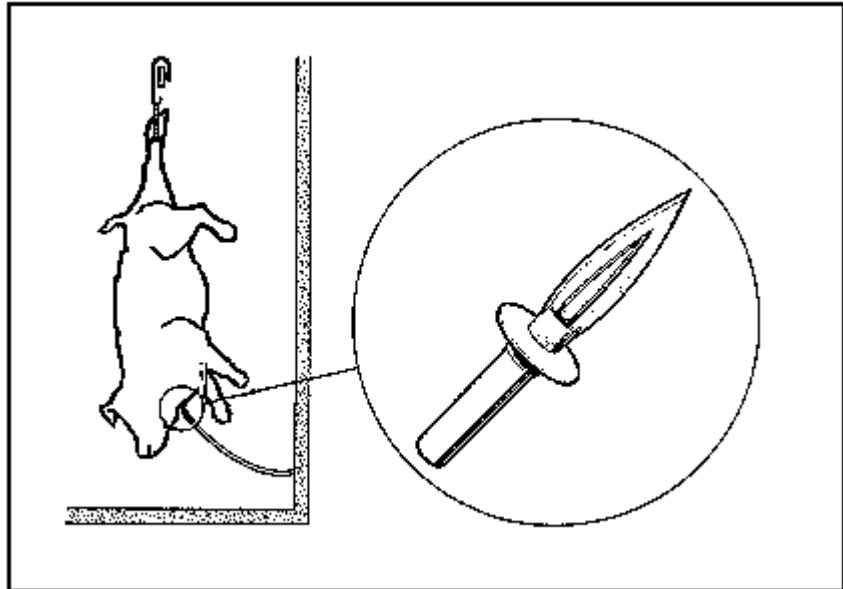
La sang que s'extreu d'animals sans és estèril i si es recull en condicions sanitàries pot utilitzar-se per al consum humà. Tanmateix, en funció del sistema de recollida utilitzat s'obtidran diferents qualitats de sang:

- a. **sang veterinària:** obtinguda a través d'un sacrifici normal. No es prenen precaucions en la seva extracció, i per tant no s'obté un producte de gran valor. Sovint està contaminada amb substàncies estranyes i amb una càrrega bacteriològica relativament important que pot assolir nivells de l'ordre de 10^6 ufc/mL. Generalment s'utilitza com a matèria primera per a l'elaboració de farina de sang, producte destinat a l'alimentació animal.
- b. **sang higiènica:** sang neta, exempta de qualsevol altre producte (aigua, excrements, etc.). S'extreu directament del torrent sanguini de l'animal, i permet obtenir productes d'un valor afegit superior.

L'obtenció de sang en bones condicions higièniques exigeix la utilització d'un trocar, o ganivet acanalat (Figura 1.3), enfonsat a la vena jugular de l'animal sacrificat i connectat, mitjançant un tub, a un tanc refrigerat, i que assegura que la sang no es barregi amb substàncies estranyes. El ganivet sanitari té un dispositiu que li permet afegir anticoagulant durant el procés de recollida. Es pot utilitzar també una bomba de buit que faciliti una certa pressió negativa (succió) amb la finalitat d'accelerar el dessagnat.

Tot i que en alguns països, com els Estats Units, és obligat utilitzar els trocar per recollir la sang de boví (únic tipus de sang aprovada per a ús alimentari als EEUU), aquest tipus d'instal·lació no es troba en cap dels escorxadors industrials als quals hem tingut accés, pel fet que, segons els responsables de les diferents indústries implicades, comporta una sèrie de problemes tècnics especialment importants en porcs: alentiment del dessagnat i, per tant, de la línia de sacrifici, augment de la probabilitat de malmetre l'espatlla de l'animal (degut a les dimensions del trocar), dessagnat deficient que redueix la vida mitjana de la carn fresca, etc.

Figura 1.3. Trocar utilitzat en sistemes tancats de recollida de sang higiènica



Una instal·lació d'aquest tipus (Figura 1.4), que permetria obtenir una sang amb una qualitat microbiològica i unes característiques físico-químiques aptes per a la seva utilització en alimentació humana, requereix una inversió que avui no és considerada econòmicament viable pel fet que l'aprofitament que es fa actualment de la sang recollida en els escorxadors de Catalunya no condueix a l'obtenció d'un producte amb valor afegit.

Com a alternativa es pot utilitzar un sistema obert que exigeix però que es prenguin una sèrie de precaucions durant el procés de recollida, com són (1) degollar l'animal sobre una plataforma de recepció que permeti recollir la sang efluent de manera natural, evitant però, que es barregi amb substàncies estranyes com l'aigua de rentat que regalima de l'animal, orins o productes de regurgitació; (2) dosificar algun tipus d'anticoagulant (citrat sòdic, polifosfat,...) mentre es va recollint la sang, de manera que s'impedeixi la coagulació, i (3) assegurar la refrigeració immediata de la sang recollida. Aquest és el mètode utilitzat pels escorxadors que estan realitzant recollida higiènica de sang dins l'àrea geogràfica que abarca el nostre estudi.

En qualsevol dels casos, es recomana també un emmagatzematge gairebé individualitzat de la sang fins al moment que l'examen sanitari no autoritzi la utilització de

la canal i conseqüentment la de la sang de l'animal sacrificat. Suposant que algun animal no superés la fase d'inspecció sanitària el conjunt de la sang s'hauria de rebutjar. Aquest procediment però, tampoc es practica en cap dels escorxadors amb els quals hem treballat, sinó que s'emmagatzema tota la sang provinent de la matança d'un dia dins el mateix dipòsit.

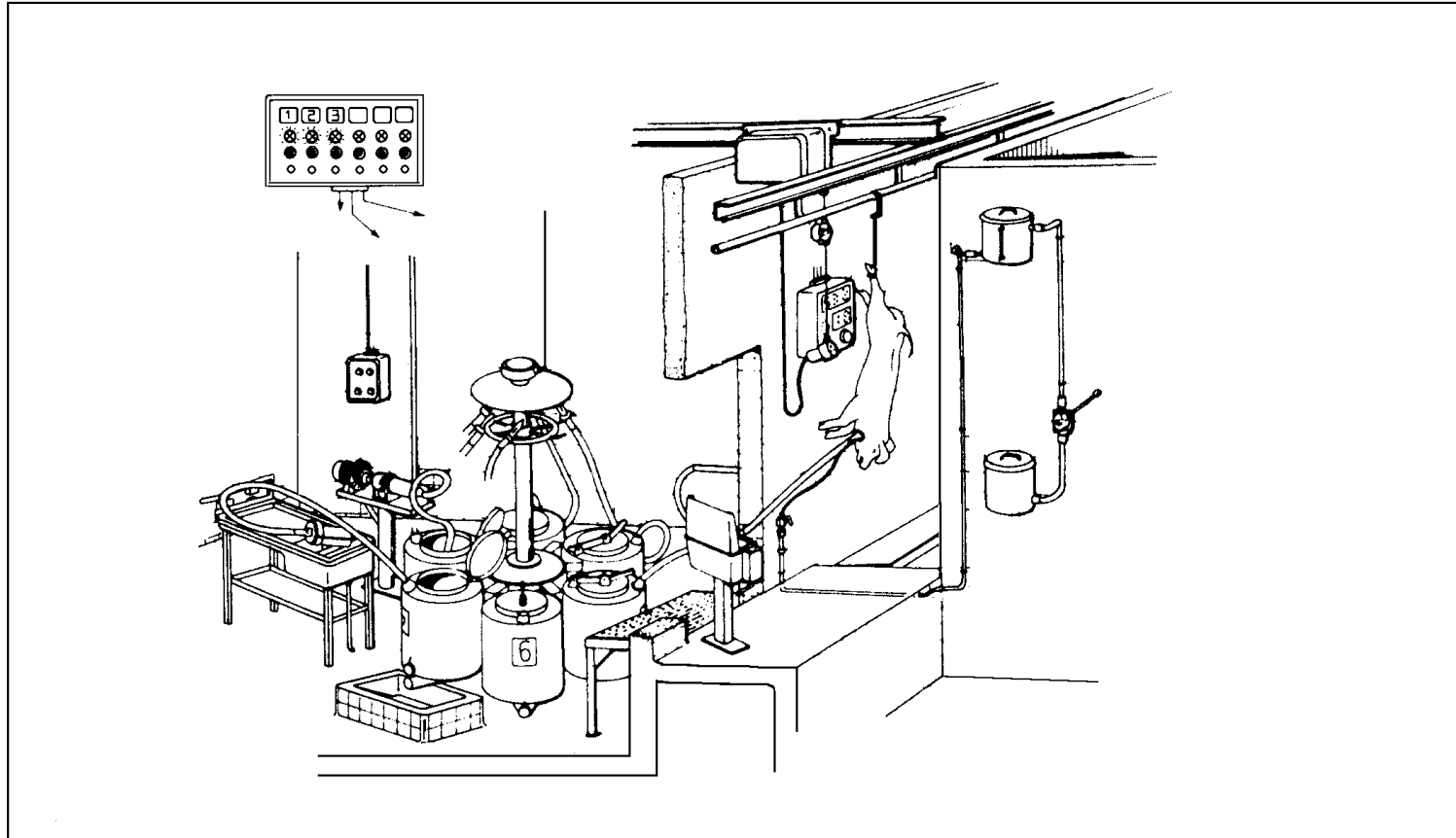
Els recomptes elevats de microorganismes contaminants en productes destinats a la indústria alimentària són preocupants a causa del risc de presència de patògens i del seu creixement durant l'emmagatzematge a temperatures elevades. Aquest és un dels principals problemes que planteja la utilització de qualsevol subproducte d'indústries càrnies, i per tant també de la sang. En aquest cas, a més a més, si són presents grans quantitats de microorganismes deteriorants poden provocar alteracions i introduir olors estranyes en els aliments que contindran la sang o els seus derivats.

En els òrgans i teixits de l'animal viu i sa només s'hi troben associats recomptes baixos de microorganismes; la contaminació s'adquireix majoritàriament durant el sacrifici, espediment, emmagatzematge o processament posterior.

Els microorganismes més preocupants són els originaris de l'intestí, especialment *Salmonella*, i en molt menor grau *Escherichia coli* enteropatogènica. Addicionalment, si hi ha una manipulació excessiva per treballadors de la indústria i la refrigeració és insuficient, es pot donar el creixement de *Staphylococcus aureus*, productor d'enterotoxines capaces de suportar tractaments tèrmics. De tota manera, i suposant que no hi fossin presents microorganismes patògens, la introducció de subproductes altament contaminats limita la vida mitjana dels aliments que els contenen, degut fonamentalment al creixement de la microbiota deteriorant normal adquirida durant el maneig i processament.

Deixant a part la contaminació microbiològica, l'addició de sang en un aliment o algun producte derivat del seu processament pot suposar problemes d'introducció de gustos, aromes i coloracions anòmales o desagradables. Sobretot en el cas que les condicions higièniques del procés de recollida no minimitzin la barreja de la sang amb productes estranys com excrements, orins, aigua que regalima de la pell molla de l'animal durant el dessagnat, etc. La hidròlisi de l'hemoglobina per tal d'eliminar el grup hem i decolorar-la comporta també la formació de pèptids amargants que perjudiquen les característiques organolèptiques dels aliments on s'incorpora l'hidrolitzat.

Figura 1.4. Sistema tancat de recollida higiènica de sang d'escorxador



Font : Nutridan Engineering Co., Wismer-Pedersen, J. (1979)

1.3 El plasma: producte inestable

El present treball s'ha centrat en l'estudi de les possibilitats d'aplicació d'una de les dues fraccions obtingudes a partir de la separació centrífuga de la sang: la fracció plasmàtica.

Com ja hem comentat anteriorment el plasma és un líquid que té un extracte sec de l'ordre del 10 %, i que posseeix, per tant, un percentatge molt elevat d'aigua (90%) que comporta problemes importants de manipulació i conservació.

La seva composició (bàsicament proteica) i els nivells de contaminació microbiana presents en la sang recollida als escorxadors fan que el plasma sigui un producte fàcilment deteriorable i amb una vida mitjana molt curta. La refrigeració, com a únic sistema de conservació, no és suficient per garantir l'estabilitat del plasma perquè bona part de la càrrega microbiana contaminant està constituïda per microorganismes psicròtrofs, capaços de créixer a temperatures baixes i dur a terme processos degradatius de les proteïnes plasmàtiques.

Els tractaments de conservació tradicionals aplicables per tal de reduir la possibilitat d'increment de càrrega contaminant o de deteriorament del plasma durant l'emmagatzematge són:

(1) l'addició de conservadors químics autoritzats per aliments: àcid ascòrbic o clorur sòdic, (Gorbatov, 1988) o antifúngics com els àcids sòrbic o propiònic (Ockerman i Hansen, 1994). Aquesta addició ha estat suggerida però per la sang sencera en cas que no pugui ésser processada immediatament per obtenir-ne les dues fraccions.

(2) la congelació, que inhibeix l'activitat microbiològica, redueix considerablement l'activitat enzimàtica i, per tant, disminueix el risc de deteriorament i creixement de patògens, sense, segons Brooks i Ratcliff (1959), afectar les propietats funcionals de les proteïnes plasmàtiques.

(3) la deshidratació, que obstaculitza qualsevol activitat microbiana o enzimàtica pel seu efecte sobre l'activitat d'aigua del producte.

Sembla que el tractament que presenta més avantatges és la deshidratació (Delaitre, 1983). L'eliminació de l'aigua permet reduir considerablement la massa i el volum del plasma i, en conseqüència, facilita la manipulació i contribueix a disminuir les despeses d'emmagatzematge i transport. Però, malauradament, eliminar l'aigua comporta també problemes, com poden ser els riscos d'alteració de les propietats funcionals i de la qualitat nutritiva i organolèptica del producte tractat, a més d'un considerable consum energètic.

1.3.1 Sistemes de deshidratació

L'eliminació de l'aigua es pot realitzar mitjançant procediments mecànics (concentració per centrifugació, filtració, òsmosi inversa) o tractaments tèrmics (concentració per evaporació, assecat per contacte directe, liofilització, atomització) (Mafart i Béliard, 1994a). Els primers no comporten cap canvi de fase de l'aigua i només permeten eliminar la fracció d'aigua no lligada, de manera que es produeix un baix consum energètic. L'inconvenient és que només s'elimina una part (màxim un 60%) de l'aigua lliure i la fase eliminada rarament consisteix en aigua pura, sinó que arrossega, en dispersió o solució, una part de l'extracte sec dels productes tractats. Aquests processos poden ser útils com a mètodes de pre-concentració del plasma per facilitar, millorar el rendiment i reduir els costos energètics dels tractaments tèrmics que permetran obtenir un producte sòlid deshidratat.

Dins els tractaments tèrmics, la concentració per evaporació és un procés que elimina l'aigua per ebullició i on el fluid calefactor és vapor que cedeix la seva calor latent al producte que s'ha d'evaporar. Es pot provocar l'evaporació de l'aigua del producte per contacte directe amb una superfície calenta (assecadors de tambor, de rodets o de plaques). En aquests sistemes la calor sensible i la calor latent necessària per l'evaporació s'aporten per conducció i, per tal d'aconseguir temps de dessecació raonables i una reducció suficient de la humitat, cal treballar a temperatures superiors a 100°C. Això fa que la temperatura del producte s'elevi excessivament cap al final del procés i, en general, s'afectin negativament les qualitats organolèptiques i nutritives del producte tractat, i més si és un producte termosensible.

La liofilització es basa en la sublimació del gel d'un producte congelat. L'aigua passa per diferents canvis d'estat durant el procés (líquid-sòlid i sòlid-vapor) i això fa que sigui un tractament amb un cost energètic molt elevat que requereix a més una inversió considerable en l'equipament i, per tant, poc utilitzat en la indústria agro-alimentària. Malgrat que tècnicament és un procés excel·lent, que manté les propietats organolèptiques característiques del producte, l'elevat cost fa que la seva aplicació en el tractament d'un subproducte sigui inviable.

L'evaporació de l'aigua es pot assolir també mitjançant la utilització d'aire calent que aporta la calor necessària principalment per convecció. Existeixen diferents sistemes basats en la calor aportada per aire calent: assecadors de túnel, de llit fluïditzat, rotatoris o atomitzadors. L'atomització és un procés d'assecat per arrossegament que consisteix en polvoritzar el producte en fines gotes que es posen en contacte amb un corrent d'aire calent que actua a la vegada de fluid calefactor i vehiculador. Es produeix una evaporació immediata que transforma les gotetes en partícules sòlides que se separen de l'aire mitjançant un cicló localitzat a la sortida de la cambra d'assecat. La qualitat del producte

tractat no es veu molt alterada degut a que la intensa evaporació protegeix el producte de l'efecte que tindria l'elevada temperatura de l'aire calent. També degut al curt temps de permanència del producte en contacte amb l'aire calent, entre 4 i 6 segons si s'utilitza un nebulitzador a pressió i fins a 30 segons si el nebulitzador és centrífug (Mafart i Béliard, 1994a). L'atomització és doncs una tècnica de deshidratació aplicable a productes líquids i termosensibles, com el plasma de sang (Tybor *et al.*, 1973; Delaitre, 1983; Martín *et al.*, 1995; Raeker i Johnson, 1995; Valladares *et al.*, 1995).

Les operacions de processament del plasma, com la deshidratació, poden tenir algun efecte sobre el nombre de microorganismes, però la qualitat microbiològica dels productes finals sempre tendirà a reflectir les condicions microbiològiques de la sang utilitzada per obtenir-los. Òbviament la presència de càrregues microbianes elevades pot afectar també les propietats organolèptiques i funcionals del producte. Per tot això, és recomanable partir d'una matèria primera amb una bona qualitat microbiològica abans de sotmetre-la al procés de conservació. Si no és possible introduir mesures que permetin recollir una sang de qualitat microbiològica acceptable al mateix escorxador, existeix la possibilitat de trobar alguna tècnica higienitzadora aplicable a la fracció plasmàtica que permeti reduir la contaminació del plasma líquid abans de la deshidratació.

1.3.2 Sistemes d'higienització del plasma líquid

1.3.2.1 Bactofugació

La bactofugació és un procés industrial posat a punt a partir dels estudis, realitzats a Bèlgica durant els anys 50 per Simonart, sobre les possibilitats d'utilitzar la força centrífuga per separar els microorganismes de la llet. Ha estat utilitzat a escala industrial en diferents aplicacions a la indústria lletera, per exemple per eliminar les espores de *Clostridium tirobutyricum*, bacteri responsable de l'inflament butíric de determinats formatges.

El principi del procés es basa en el fet que els microorganismes que posseeixen una densitat lleugerament superior a la de la llet són susceptibles de ser separats de la llet que els conté per sedimentació sota l'acció d'una força centrífuga. En la pràctica, aquesta operació es realitza en continu en aparells que permeten sotmetre el producte a una força centrífuga de l'ordre de 7.000 a 9.000 x g. L'eficàcia del tractament s'expressa en

percentatge de bacteris o espores eliminats mitjançant la centrifugació, i es calcula a partir de recomptes efectuats en el producte abans i després del tractament.

La bactofugació, en el cas de la llet, gairebé sempre s'efectua a temperatures compreses entre els 56-57°C i la temperatura de pasteurització (72-74°C), ja que l'increment de temperatura fa disminuir la densitat de la llet i afavoreix la separació. Per tant, la major part de dades publicades sobre els percentatges de reducció aconseguits amb aquest procés inclouen l'efecte acumulat dels dos tractaments: centrifugació i escalfament. Per temperatures de 55-57°C els valors obtinguts són molt variables i van des d'un 56 a un 97 % de reducció. A temperatures més elevades, 62-63°C, els percentatges poden ser d'un 80 a un 99 % (Bergere, 1987).

En el present treball pretenem estudiar les possibilitats d'aplicació de la bactofugació com a sistema d'higienització de la fracció plasmàtica de la sang, per tal d'obtenir plasma microbiològicament més estable abans de sotmetre'l al procés de deshidratació. La seva aplicació sobre sang sencera ha estat descartada d'entrada pel previsible efecte hemolític de la força centrífuga, que influiria negativament sobre la qualitat del plasma. Evidentment, en aquest cas no es pot combinar el procés de centrifugació amb el tractament tèrmic degut a la naturalesa termosensible del component majoritari de l'extracte sec del plasma -la fracció proteica-, que interessa mantenir inalterat. Una temperatura elevada provoca la desnaturalització i gelificació de les proteïnes plasmàtiques i impossibilita la deshidratació per atomització, alhora que probablement afecta també les seves propietats funcionals.

1.3.2.2 Microfiltració

Les aplicacions de tècniques de membrana dins les indústries agro-alimentàries 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).

L'òsmosi inversa i la ultrafiltració són dues tècniques de membrana que permeten l'eliminació de l'aigua dels líquids alimentaris (80-90%) sense deteriorar les propietats físiques, químiques, físico-químiques i nutricionals dels constituents del líquid alimentari sotmès a concentració. A diferència de les tècniques clàssiques de concentració per evaporació, els processos es poden realitzar a baixa temperatura i així s'eviten les degradacions tèrmiques dels constituents biològics. A més, no requereixen cap canvi de fase de l'aigua, l'aigua eliminada segueix estant en estat líquid i no es donen

degradacions mecàniques com les que poden produir la liofilització o la crioconcentració. La ultrafiltració ofereix, a més, la possibilitat de purificar el líquid alimentari al mateix temps que es realitza l'eliminació d'aigua. Si algun dels components es considera poc interessant o inútil en el producte que hom desitja obtenir, es podrà eliminar o, com a mínim, reduir la seva concentració en relació a altres considerats més interessants.

La ultrafiltració és un procés de separació de macromolècules en fase líquida, per permeació a través d'una membrana semipermeable, sota l'acció d'un gradient de pressió. La membrana d'ultrafiltració funciona com un sedàs molecular. Només la travessen l'aigua i les molècules que tenen un dimensió inferior al diàmetre dels porus de la membrana (mides de partícula des de 0,001 a 0,02 μm). Després del procés obtenim doncs dos líquids: el que passa a través de la membrana (*permeat* o ultrafiltrat) i el que no ha passat a través de la membrana (*retentat*). Pot ser una tècnica útil de pre-concentració del plasma líquid que ha de ser atomitzat ja que s'incrementa el rendiment i es redueix la despesa energètica del procés de deshidratació (Delaney, 1977; Tessier, 1980; Real del Sol i Martín, 1991; Vandanjon *et al.*, 1996). Amb aquesta finalitat es pot treballar, segons Vandanjon (1996), aplicant pressions d'1 a 2 bars, amb membranes amb un llindar de separació molecular de 10 a 20 kD i a una temperatura de 43°C per tal d'evitar la coagulació de les proteïnes.

La microfiltració tangencial és una tècnica molt similar a la ultrafiltració. La diferència fonamental és, en principi, que la primera és una separació sòlid-líquid mentre que la ultrafiltració separa molècules dissoltes en un medi homogeni. Aquesta distinció però no és tan clara en el cas de determinats productes -com la llet o el mateix plasma- que contenen algunes molècules proteïques en suspensió i altres en dissolució.

El fonament de la microfiltració és el mateix que el de la ultrafiltració però s'utilitzen membranes amb un diàmetre de porus prou gran (des de 0,02 fins a 10 μm) per a permetre la separació dels microorganismes contaminants del producte i altres components (sòlids en suspensió, olis insolubles, etc.), de la resta de constituents. És, doncs, 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. Generalment requereix pressions inferiors a les utilitzades en ultrafiltració. Presenta els mateixos avantatges respecte als tractaments tèrmics i, per tant, pot ser una tècnica útil per tal de reduir la contaminació microbiana del plasma líquid sense alterar les seves propietats nutricionals i funcionals.

1.3.2.3 Alta pressió hidrostàtica (HP)

Malgrat que l'aplicació de l'alta pressió al processament d'aliments ja havia estat suggerida per Hite a final del segle passat (1899) i que aquesta tecnologia ha estat tradicionalment utilitzada per indústries que no estan relacionades amb l'alimentària (materials de construcció: ceràmiques, acer, etc.), publicacions recents demostren que existeix un interès creixent per a la seva utilització com a nova tecnologia de conservació d'aliments (Hayashi, 1989; Hoover *et al.*, 1989; Mallidis i Drizou, 1991; Cheftel, 1992; Hoover, 1993; Isaacs *et al.*, 1993; Knorr, 1993 i 1994; Lechowich, 1993; Zimmerman i Bergman, 1993; Carlez *et al.*, 1994; Felipe *et al.*, 1994; Gould, 1995; Bolder, 1997; Hölter *et al.*, 1997, etc.)

L'alta pressió hidrostàtica s'aplica a través d'un medi de transferència de pressió (freqüentment l'aigua) i pot ser efectiva a temperatura ambient. Els principals efectes de l'alta pressió són:

(1) Inactivació de microorganismes (Hoover *et al.*, 1989). La pressió afecta la morfologia cel·lular (cèl·lules allargades, separació de la paret cel·lular i la membrana citoplasmàtica, disminució del nombre de ribosomes, etc.). S'ha suggerit que el mecanisme d'inactivació està relacionat amb l'efecte de les altes pressions sobre la funcionalitat de les membranes cel·lulars, així com sobre funcions clau en el metabolisme cel·lular (per exemple, síntesi proteica en els ribosomes). En realitat, sembla que la pressió influencia molts processos cel·lulars i, probablement, el seu efecte letal o inhibidor del creixement dels microorganismes sigui degut a la combinació de tots ells, més que a la destrucció d'una funció específica.

(2) Modificació de biopolímers (Heremans, 1982). L'alta pressió actua sobre forces interactives no covalents que estableixen l'estructura de proteïnes i polisacàrids. Com a conseqüència pot induir la desnaturalització, agregació i formació de gels de proteïnes alimentàries i la gelatinització del midó.

(3) Activació o inactivació de l'activitat enzimàtica. Pot ser conseqüència de l'efecte de la pressió sobre l'estructura dels enzims o pot estar relacionat amb un canvi en la conformació de les proteïnes o polisacàrids que actuen com a substrats d'aquests enzims.

En comparació amb els tractaments tèrmics clàssics, l'alta pressió presenta un conjunt d'avantatges. D'acord amb la llei de Pascal, l'alta pressió actua isostàticament (de manera instantània i uniforme sobre tot el producte, independentment de la seva mida i geometria) i, per tant, els seus efectes no segueixen un gradient de concentració. L'alta pressió no trenca les unions covalents que estableixen les vitamines, *flavors* i colorants. En conseqüència, és una tecnologia que permet obtenir productes microbiològicament

estables, amb la consistència i estabilitat estructural adequades, lliures d'activitats enzimàtiques no desitjades i que mantenen les qualitats nutricionals o organolèptiques originals.

L'alta pressió s'està desenvolupant com a una tecnologia de conservació alternativa a l'aplicació de tractaments tèrmics i que pot ser útil pel processament de productes termosensibles. El nostre objectiu ha estat avaluar el seu potencial d'aplicació com a mètode d'higienització -reducció de la càrrega microbiana- del plasma líquid obtingut a partir de la sang d'escorxador i quantificar els efectes de la seva aplicació sobre l'estructura i la funcionalitat de les proteïnes plasmàtiques.

1.4 Plantejament general del treball

El treball que es presenta s'ha estructurat en tres capítols amb objectius particulars molt concrets que, en conjunt, haurien de permetre determinar les possibilitats d'aprofitament dins la mateixa indústria alimentària de la fracció plasmàtica de la sang de porc generada per escorxadors que utilitzen sistemes oberts de recollida higiènica. L'últim capítol (Capítol 5) reflecteix les conclusions que es deriven de l'estudi realitzat.

En el Capítol 2 s'analitza la composició de la sang higiènica que s'està recollint actualment i s'estudien les característiques tant físico-químiques com microbiològiques que determinen la seva qualitat. La caracterització s'ha realitzat amb sang recollida en diferents escorxadors industrials de les comarques de Girona i s'ha centrat principalment en l'estudi de la contaminació microbiològica i el nivell d'hemòlisi de la sang, ja que són els principals factors que condicionen la seva aptitud com a matèria primera per a l'elaboració de plasma utilitzable com a ingredient funcional d'aliments. S'ha fet un disseny experimental que ha permès alhora valorar l'efecte d'alguns factors sobre la qualitat de la sang: possibles diferències relacionades amb (1) la climatologia del període de l'any en el qual es fa la recollida, (2) característiques particulars dels escorxadors (grandària, sistemes de dessagnat, tipus, dosi i sistema de dosificació de l'anticoagulant, condicions de processament, maneig i emmagatzematge després de la recollida, etc.).

El Capítol 3 està centrat en la fracció plasmàtica de la sang que és, com hem assenyalat anteriorment, l'objecte del nostre estudi. S'ha utilitzat la deshidratació per atomització com a tecnologia de conservació del plasma i s'ha fet una caracterització del producte en pols resultant des del punt de vista de composició i de qualitat. En aquest cas, a més de la contaminació microbiològica que determina la qualitat higiènico-sanitària del producte, s'ha realitzat un estudi de les propietats funcionals que podrien fer del

plasma un producte útil en la formulació d'aliments (capacitat escumant, emulsionant, gelificant). S'ha fet especial incidència en (1) determinar l'efecte del procés tecnològic utilitzat per deshidratar el plasma sobre la funcionalitat del producte i (2) estudiar l'estabilitat del producte durant el període d'emmagatzematge.

En el Capítol 4, tenint en compte les conclusions derivades dels resultats dels capítols anteriors, s'han assajat tres possibles sistemes de reducció de la contaminació aplicables a la fracció plasmàtica com a pas previ a la deshidratació, per tal de millorar les característiques de qualitat microbiològica i les perspectives d'estabilitat del producte durant l'emmagatzematge. S'ha determinat l'eficàcia, i l'efecte sobre les propietats del plasma deshidratat, que poden tenir tractaments d'higienització basats en la centrifugació, la microfiltració i l'aplicació d'altres pressions.

2. CARACTERITZACIÓ DE LA SANG HIGIÈNICA

2.1 OBJECTIUS

El sistema de recollida higiènica de sang que utilitzen els escorxadors estudiats consisteix en el degollament sobre una pica de recepció on la sang efluent es barreja amb l'anticoagulant. La sang recollida és conduïda, generalment mitjançant un sistema de bombeig, cap a un dipòsit refrigerat a 4-5°C. En alguns casos, prèviament a l'emmagatzematge, pot ésser refredada amb un bescanviador de calor; en altres, s'emmagatzema directament en el tanc, on s'anirà refrigerant. Aquest sistema de recollida òbviament no garanteix l'obtenció d'una sang que compleixi les especificacions que implica la definició que hem donat de "sang higiènica" (apartat 1.2.4) perquè normalment es barreja amb substàncies estranyes: contaminants que incrementen la seva càrrega microbiana i líquids que provoquen hemòlisi dels eritròcits i, per tant, augmenten el contingut d'hemoglobina residual del plasma.

L'objectiu general d'aquest capítol consisteix bàsicament en determinar la qualitat de la sang recollida actualment en els escorxadors industrials de les comarques de Girona per conèixer les característiques de partida del subproducte objecte d'estudi. Considerarem com a paràmetres indicadors de qualitat la composició química, la càrrega microbiana i el contingut d'hemoglobina residual al plasma (que comporta problemes de coloracions fosques i gustos amargants quan s'utilitza en la formulació de productes carnis). Es pretén, a més, valorar l'efecte d'alguns factors sobre aquests paràmetres, concretament el període de mostreig, les particularitats dels escorxadors que han participat en l'estudi, i el punt de mostreig.

L'estudi consisteix doncs en:

1. Fer la caracterització bioquímica de la sang i de les dues fraccions obtingudes per centrifugació (plasmàtica i cel·lular). Els paràmetres que s'han determinat són: humitat, proteïna total, greix, sucres i sals minerals.
2. Determinar la qualitat microbiològica de la sang sencera i estudiar la influència d'alguns factors (època de l'any, característiques dels sistemes de recollida, processament i emmagatzematge de cada escorxador) sobre el nivell de contaminació de la sang recollida i l'origen de la contaminació. S'han determinat la càrrega total de bacteris aeròbics mesòfils, els bacteris psicròtrofs, enterobacteris, clostridis sulfitereductors, *Staphylococcus aureus*, fongs i llevats, bacteris proteolítics i bacteris β -hemolítics.
3. Determinar el contingut d'hemoglobina residual present a la fracció plasmàtica com a conseqüència de l'hemòlisi dels eritròcits. Estudiar alguns dels factors que condicionen tant el nivell d'hemòlisi com la seva evolució en sang emmagatzemada en

refrigeració: el maneig de la sang durant la recollida i transport cap el dipòsit d'emmagatzematge, el temps d'emmagatzematge, l'anticoagulant utilitzat (tipus, dosi i sistema de dosificació) i la càrrega microbiana.

2.2 MATERIAL I MÈTODES

2.2.1 Procedència de les mostres

Es va treballar amb mostres de sang provinent de 6 escorxadors industrials de les comarques de Girona (identificats com A, B, C, D, E i F) que prenen determinades precaucions higièniques en la recollida de la sang generada durant el sacrifici del bestiar i compleixen aquestes tres condicions:

1. recullen sang només de porc (no barrejada amb sang de cap altra espècie animal)
2. addicionen anticoagulant a la sang en el mateix sagnador (citrat sòdic o polifosfat)
3. conserven la sang en refrigeració

La mostra estudiada incloïa pràcticament la totalitat dels escorxadors de les comarques gironines que recullen sang higiènica i que, en conjunt, suposen un volum de sacrifici d'uns 13.000 porcs diaris.

Les particularitats de cadascun dels escorxadors que es va considerar que podien tenir alguna influència sobre la qualitat de la sang van ser (Taula 2.1):

1. Nombre de porcs sacrificats diàriament.
2. Dosi i tipus d'anticoagulant utilitzat: citrat sòdic o polifosfat.
3. Refrigeració de la sang mitjançant bescanviador de calor abans de l'emmagatzematge.
4. Posició de l'animal en el moment del dessagnat: vertical o horitzontal.
5. Temps màxim de residència de la mostra de sang dins el dipòsit refrigerat.

Taula 2.1. Característiques dels escorxadors

ESCORX.	nº porcs sacrificats/dia	Anticoagulant Dosi Tipus	Refrigeració prèvia emmagatzematge	Posició de l'animal	Hores refrigeració
A	3000	0,8 % CS ⁽¹⁾	SI	V ⁽³⁾	< 12
B	2500	0,4 % CS	SI	V	< 12
C	2500	0,4 % CS	SI	V	< 12
D	2500	0,8 % CS	SI	H ⁽⁴⁾	> 24
E	2000	1 % P ⁽²⁾	(*)	V	0
F	600	0,6 % CS	NO	V	v ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ CS: citrat sòdic ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$); ⁽²⁾ P: Polifosfat; ⁽³⁾ V: vertical (penjat); ⁽⁴⁾ H: horitzontal (estirat); ⁽⁵⁾ v: variable.

(*) Aquest escorxador processa la sang immediatament i no l'emmagatzema.

2.2.2 Disseny experimental

L'estudi de caracterització es va dur a terme al llarg de tres anys consecutius. Donada la possibilitat que les condicions climàtiques de les diferents estacions de l'any, principalment la temperatura, poguessin influir significativament en la qualitat de la sang recollida, es va fer un disseny experimental pel primer any que abastava un període de 6 mesos i que incloïa tres etapes de mostreig representatives de diferents condicions ambientals: tardor (mes de novembre), hivern (mes de febrer) i primavera (finals d'abril-principis de maig). Es van realitzar tres mostres de cadascun dels sis escorxadors i per a cadascuna de les tres etapes, els resultats dels quals es van considerar repeticions per a un mateix escorxador. Dins de cada període es van mostrejar en una mateixa setmana la totalitat dels escorxadors i el mostreig es va dur a terme al llarg de tres setmanes consecutives. D'aquesta manera es va disposar d'un total de 9 mostres per a cada escorxador (3 períodes x 3 setmanes consecutives).

Per a la caracterització físico-química es van utilitzar principalment mostres procedents d'un escorxador (10 mostres corresponents a 10 dies de setmanes diferents) i les mostres del primer període de mostreig de cadascun dels sis escorxadors estudiats durant el primer any. Per a la caracterització microbiològica es van realitzar recomptes de microorganismes aeròbics mesòfils i psicròtrofs de totes les mostres recollides durant el

primer any de mostreig i recomptes de grups específics de microorganismes (enterobacteris, clostridis sulfit-reductors, *Staphylococcus aureus*, fongs i llevats, bacteris proteolítics i bacteris β -hemolítics) en les mostres corresponents només a l'últim període d'aquest mateix any.

En totes les mostres es va determinar el nivell d'hemòlisi. Tanmateix, es van utilitzar només les mostres de l'últim període de mostreig del primer any (3 mostres per a cada escorxador) per l'estudi de l'evolució de l'hemòlisi durant l'emmagatzematge a temperatures de refrigeració.

Per tal d'avaluar l'efecte de la càrrega microbiana i del tipus d'anticoagulant en l'evolució de l'hemòlisi durant l'emmagatzematge es van prendre 5 alíquotes de 100 mL de dues mostres recollides directament de la sang efluent del porc durant el degollat (A amb citrat i B amb polifosfat) i es van inocular amb diferents volums de plasma provinent de sang recollida pel mateix escorxador amb el sistema habitual. Els volums de l'inòcul van ser: A1 i B1: control ; A2 i B2: 1 mL; A3 i B3: 2 mL; A4 i B4: 5 mL; A5 i B5: 10 mL. A continuació es va determinar el contingut en microorganismes aeròbics mesòfils i el grau d'hemòlisi en les dues mostres de sang poc contaminada (A i B) i del plasma utilitzat com a inòcul. Finalment es va estudiar l'evolució durant 4 dies del grau d'hemòlisi de les mostres inoculades mantingudes a temperatura de refrigeració (5°C).

Per confirmar les conclusions de l'estudi de qualitat microbiològica i nivells d'hemòlisi obtingudes durant aquest primer any d'estudi, es van seguir mostrejant dos dels sis escorxadors esmentats durant dos anys més. Es van realitzar recomptes de microorganismes (bacteris aeròbics mesòfils i psicròtrofs, enterobacteris, clostridis sulfit-reductors i *Staphylococcus aureus*) i les determinacions dels nivells d'hemoglobina en plasma en totes les mostres d'aquests dos darrers anys recollides dels dipòsits d'emmagatzematge.

Els dos escorxadors es van escollir com a representants dels dos sistemes d'atordiment i dessagnat que utilitzen els escorxadors industrials d'aquesta zona. El primer (A) utilitza un sistema d'atordiment mitjançant diòxid de carboni i dessagna l'animal en posició vertical (amb el porc penjat d'un sistema de transport monorail), i el segon (B) utilitza descàrregues elèctriques per a l'atordiment i l'operació de dessagnat es fa amb l'animal en posició horitzontal (estirat damunt una cinta transportadora). Durant 2 anys es va recollir sang en dos punts de mostreig, el mateix sagnador i el dipòsit d'emmagatzematge, per tal d'acotar el possible origen de la contaminació; i es va incloure un quart període de mostreig, corresponent a la temporada d'estiu, per tal de confirmar o descartar l'existència d'un efecte estacional sobre la qualitat del producte. Cal tenir present que les denominacions A i B dels escorxadors d'aquest estudi no es corresponen amb els escorxadors anomenats A i B en l'estudi de caracterització del primer any.

Es van realitzar també tres mostrejos de cada escorxador per a cadascun dels quatre períodes i durant els dos anys de l'estudi. Es van considerar repeticions les sis mostres de cada escorxador (3 setmanes x 2 anys) i per a cadascuna de les etapes de mostreig.

2.2.3 Presa de mostres

Totes les mostres que es van prendre dels tancs refrigerats d'emmagatzematge eren mostres de sang de conjunt (no d'un únic animal sinó de tots els animals sacrificats fins al moment del mostreig), barrejada amb l'anticoagulant i refrigerada a uns 4-5°C. Es van recollir sempre en recipients estèrils a partir de l'aixeta del dipòsit d'emmagatzematge i rebutjant el primer raig -que conté la sang retinguda en l'aixeta i, probablement, una contaminació microbiana més elevada que la resta.

Les mostres que es prenen en el sagnador eren de sang no refrigerada d'un nombre limitat d'animals i barrejada amb anticoagulant. Es recollien submergint el recipient estèril dins la cuba del sagnador.

Per l'estudi que pretenia determinar la influència de (1) la càrrega microbiana inicial de la sang i (2) el tipus d'anticoagulant utilitzat sobre l'evolució del grau d'hemòlisi de les mostres refrigerades, calien mostres poc hemolítiques i amb una càrrega microbiana baixa. En aquest cas es va treballar amb dues mostres recollides directament de la sang efluent del porc durant el degollat en el mateix sagnador. S'evitava així la contribució dels factors de processament (recollida, transport, refrigeració, emmagatzematge, etc.) sobre la contaminació i el grau d'hemòlisi. Les mostres, per tant, no van ser de sang de conjunt sinó d'un únic individu en cada cas. Es van recollir 1000 mL de sang de cada porc en recipients estèrils que contenien 20 mL d'anticoagulant: mostra A amb 0,5 % (p/v) de citrat sòdic tribàsic; i mostra B amb 0,5 % (p/v) de polifosfat.

El transport de les mostres es va fer dins de bosses aïllants i amb acumuladors tèrmics per mantenir la temperatura de refrigeració (aprox. 4°C) i, un cop al laboratori, van ser processades immediatament per tal d'obtenir, per centrifugació, les dues fraccions de la sang, la plasmàtica i la cel·lular. El temps transcorregut entre la presa de mostres i la centrifugació no va ser mai superior a 2 hores, durant les quals es va procurar no trencar la cadena de fred per no influir en les concentracions relatives de les diferents espècies de la microbiota contaminant.

2.2.4 Mètodes analítics

2.2.4.1 Separació de les fraccions plasmàtica i cel·lular per centrifugació

Es van centrifugar les mostres de sang durant 15 minuts a una velocitat de 4.080 rpm (2.520 x g) i a una temperatura de 45°C amb un equip de centrifugació Sorvall RC 5C Plus (DuPont Co., Newtown, Connecticut). La separació de les dues fraccions es va fer per decantació.

En algunes mostres es van realitzar anàlisis microbiològiques del plasma per avaluar el percentatge de reducció de càrrega microbiana per efecte de la centrifugació.

2.2.4.2 Caracterització bioquímica de sang sencera, plasma i fracció cel·lular

Humitat. Es va determinar el percentatge de pes perdut per dessecació de la mostra en estufa a $102 \pm 2^\circ\text{C}$ fins a pes constant (norma ISO R-1442).

Proteïna total. Es va determinar el contingut en nitrogen pel mètode Kjeldhal (norma ISO R.937; J.A.O.A.C. 65, 1339, 1982). El percentatge de nitrogen es convertia en percentatge de proteïna multiplicant per un factor de 6,25.

Greix. Es va realitzar l'extracció en continu del greix de la mostra prèviament hidrolitzada i dessecada, amb una mescla d'èter etílic / èter de petroli i en un extractor Soxhlet. Posteriorment es va procedir a la determinació del percentatge de greix en la mostra per gravimetria (norma ISO R1443). Es van caracteritzar també algunes de les fraccions lipídiques (colesterol i triglicèrids) utilitzant una tècnica clínica d'anàlisi automatitzada (anàlisis realitzades a l'hospital Josep Trueta de Girona).

Sucres. Es va determinar el contingut en glucosa del plasma utilitzant una tècnica enzimàtica basada en dues reaccions: la fosforil·lació de la glucosa per ATP, catalitzada per l'enzim hexoquinasa, i la reducció de la glucosa-6-fosfat en presència de glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa amb reducció paral·lela de NAD a NADH. L'augment en la concentració de NADH en el medi, determinada a partir de l'absorbància a 340 nm, és proporcional a la concentració de glucosa en la mostra.



El reactiu enzimàtic utilitzat va ser el *Cromatest* (*Laboratorios Knickerbocker, S.A.E.* Glucosa Barthelmai). L'absorbància es mesurava en un espectrofotòmetre de doble feix ultraviolat-visible, Shimatzu UV-160A (Shimatzu Corporation, Kyoto, Japó).

Sals minerals. Es va determinar la massa del residu d'incineració de les mostres a 550°C, prèvia dessecació a $102 \pm 2^\circ\text{C}$ (norma ISO R-936).

2.2.4.3 Anàlisis microbiològiques

Les dilucions decimals de les mostres necessàries per efectuar les sèries i els recomptes microbiològics es van fer amb tampó fosfat¹.

Recompte de bacteris aeròbics mesòfils. En van sembrar en medi Base Agar Sang². Es van incubar les plaques de Petri a 37°C durant 24 hores.

Recompte de bacteris aeròbics psicròtrofs. Es van sembrar en medi Base Agar Sang². Es van incubar les plaques de Petri en refrigeració a 5°C durant 7 dies.

Enterobacteris. Es van sembrar en Agar cristall Violeta Roig neutre Bilis Glucosa (VRBG)³. Es van incubar les plaques de Petri en estufa de cultiu a 37°C durant 24 hores.

Clostridis sulfit-reductors. Es van inocular tubs que contenien agar selectiu Sulfit-Polimixina-Sulfadiazina (SPS)⁴. Es van incubar els tubs en anaerobiosi a 37°C durant 48 hores.

1 :	Tampó fosfat : pH : 7,3	Na ₂ HPO ₄ 0,05 M 7,0980 g/L KH ₂ PO ₄ 0,02 M 2,7218 g/L
2 :	Base Agar Sang: pH : 7,3	Extracte de carn 10,0 g/L Peptona 10,0 g/L Clorur sòdic 5,0 g/L Agar-agar 15,0 g/L
3 :	Agar VRBG : pH : 7,4	Extracte de llevat 3,0 g/L Peptona 7,0 g/L Clorur de sodi 5,0 g/L Sals biliars 1,5 g/L D (+) Glucosa 10,0 g/L Roig neutre 0,03 g/L Cristall violeta 0,002 g/L Agar-agar 12,0 g/L
4 :	Agar SPS : pH : 7,0	Sulfit sòdic 0,5 g/L Sulfat de polimixina 0,01 g/L

Staphylococcus aureus. Es va sembrar en medi Baird Parker⁵ suplementat amb rovell d'ou i tel·lurit potàssic; les condicions d'incubació van ser de 37°C durant 48 hores. La confirmació de soques enteropatógeniques es va fer mitjançant la determinació de presència o absència de l'enzim termonucleasa (sembrar en estria sobre plaques d'Agar DNAsa⁶, incubació a 37°C durant 24 hores i revelat amb àcid clorhídric 1N).

Recompte de fongs i llevats. Es van sembrar en plaques Agar Sabouraud⁷ amb cloramfenicol. Es van incubar les plaques de Petri a 22-25°C durant 5 dies, fent un primer recompte al tercer dia d'incubació.

Bacteris b-hemolítics. Es van sembrar en medi Agar Sang (Base Agar Sang² amb un 7 % de sang de xai desfibrinada). Es van incubar les plaques de Petri en estufa de cultiu a 37°C durant 24-48 hores. Es van comptar les colònies envoltades d'un halo d'hemòlisi complet.

		Sulfadiacina sòdica	0,12 g/L
		Peptona de caseïna	15,0 g/L
		Extracte de llevat	10,0 g/L
		Citrat fèrric	0,5 g/L
		Tioglicolat sòdic	0,1 g/L
		Polisorbat 80	0,05 g/L
		Agar-agar	15,0 g/L
5 :	Agar Baird Parker : pH : 6,8	Triptona	10,0 g/L
		Extracte de carn	5,0 g/L
		Extracte de llevat	1,0 g/L
		Piruvat de sodi	10,0 g/L
		Glicina	12,0 g/L
		Clorur de liti	5,0 g/L
		Agar-agar	20,0 g/L
		Addició d'una emulsió estèril de rovell d'ou amb tel·lurit potàssic al 0,01 % (p/v)	
6 :	Agar DNasa : pH : 7,3	Triptona	20,0 g/L
		Àcid desoxirribonucleic	2,0 g/L
		Clorur sòdic	5,0 g/L
		Agar-agar	12,0 g/L
7 :	Agar Sabouraud : pH : 5,6	Peptona de caseïna	5,0 g/L
		Peptona de carn	5,0 g/L
		D (+) Glucosa	40,0 g/L
		Agar-agar	15,0 g/L
		Cloramfenicol	0,5 g/L

Bacteris proteolítics. Es van sembrar en Agar de Frazier⁸ i es van incubar les plaques de Petri a 37°C durant 24-48 hores. Es van comptar les colònies envoltades d'un halo de proteòlisi de la caseïna del medi.

2.2.4.4 Determinació del nivell d'hemòlisi en mostres de sang

L'estudi del grau d'hemòlisi de les mostres de sang es va realitzar mitjançant una tècnica espectrofotomètrica. A partir del sobrenedant d'un lisat d'eritròcits de sang de porc, compostat bàsicament d'hemoglobina, es va realitzar l'espectre d'absorció entre 200 i 800 nm, en front d'aigua destil·lada (Figura 2.1). Es va utilitzar un espectrofotòmetre de doble feix ultraviolat-visible Shimatzu UV-160A (Shimatzu Corporation, Kyoto, Japó). El pic de màxima absorció va correspondre a una longitud d'ona de 414 nm. Per avaluar el grau d'hemòlisi de cadascuna de les mostres de sang es va utilitzar doncs l'absorbància a 414 nm del plasma obtingut per centrifugació a partir d'una dilució 1:5 amb aigua destil·lada. Es va considerar aquest valor com a indicador de la quantitat d'hemoglobina present en el plasma provinent de la lisi dels eritròcits de la mostra.

Es va fer una corba de calibratge amb concentracions conegudes d'un patró d'hemoglobina de porc SIGMA H4131 (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri) per tal de quantificar la concentració d'hemoglobina en cadascuna de les mostres de plasma analitzades.

8 :	Agar de Frazier :	Extracte de carn	3,0 g/L	
	pH : 7,0	Peptona		5,0 g/L
		Clorur sòdic	5,0 g/L	
		Caseïna		2,5 g/L
		Clorur càlcic	0,05 g/L	
		Hidròxid càlcic	0,015 g/L	
		Agar-agar	14,0 g/L	

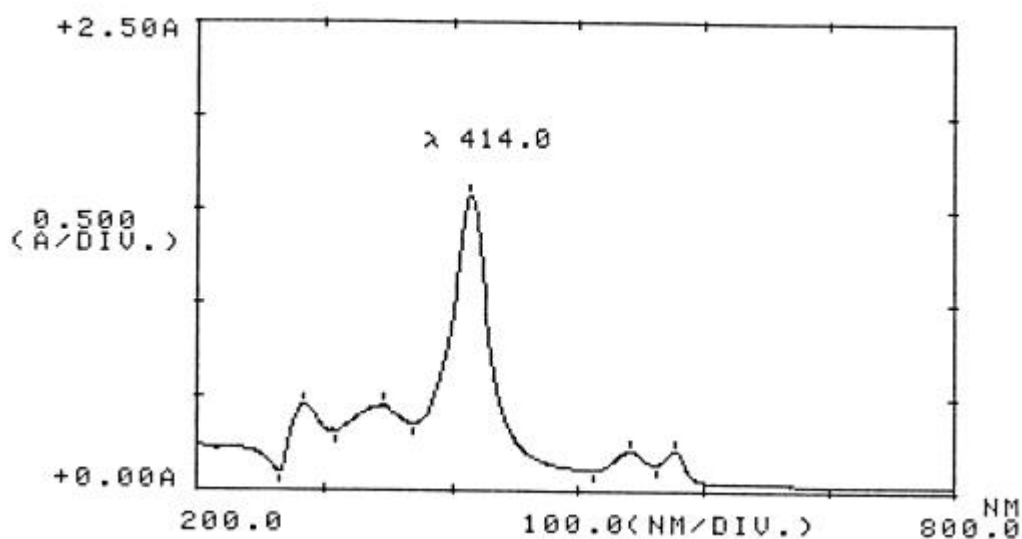


Figura 2.1. Espectre d'absorció del sobrenedant d'un lisat d'eritròcits de porc.

2.2.5 Tractament estadístic de les dades

L'anàlisi estadística dels resultats s'ha fet mitjançant els paquets d'aplicacions JMP i SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

S'ha utilitzat el test de Saphiro-Wilk per comprovar la normalitat de les distribucions de les dades i el test de Bartlett per comprovar l'homogeneïtat de variàncies.

Per les anàlisis de variància (ANOVA) s'ha utilitzat el procediment GLM (General Linear Models) i s'han considerat significatius els valors de probabilitat inferiors a 0,05.

Els estudis de separació de mitjanes s'han fet amb el test Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (REGWQ) i el test de Tukey-Kramer, en ambdós casos amb un nivell de significació de 0,05.

Per a les anàlisis de regressió lineal s'ha utilitzat el procediment REG.

2.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

2.3.1 Obtenció de les fraccions plasmàtica i cel·lular per centrifugació

Segons Ranken (1980) els percentatges corresponents a cadascuna de les fraccions de la sang oscil·len entre el 35 i 45 % per la fracció cel·lular, i entre el 55-65 % pel plasma. En el present estudi, la mitjana del percentatge (en pes) corresponent a cadascuna de les dues fraccions obtingudes per centrifugació de les mostres de sang ha estat: 57,25 % per la fracció plasmàtica i 42,75 % per la fracció cel·lular, aquests resultats per tant es troben dins els intervals publicats per Ranken.

El nombre de mostres estudiades per obtenir els percentatges de cada fracció ha estat de 26, la desviació típica de la mostra és 8,55 i l'interval de confiança (95%) per l'estimació feta de la mitjana és de $\pm 3,29$.

2.3.2 Caracterització bioquímica de la sang i de les seves fraccions

Es va fer la caracterització bioquímica tant de la sang sencera com de les dues fraccions separades per centrifugació. Els resultats obtinguts es mostren en la taula 2.2, on s'indiquen les mitjanes de cadascun dels paràmetres analitzats amb el corresponent interval de confiança (95%).

Taula 2.2. Components majoritaris de cada fracció

	<i>Sang sencera</i>	<i>Fracció plasmàtica</i>	<i>Fracció cel·lular</i>
Humitat (% en pes)	79,21 \pm 0,91	90,83 \pm 0,10	61,49 \pm 0,82
Extracte sec:			
Proteïna (% en pes)	19,48 \pm 0,72	6,72 \pm 0,15	37,20 \pm 0,82
Greix (% en pes)	0,28 \pm 0,06	0,27 \pm 0,10	0,26 \pm 0,12
Glucosa (mg/100 mL)	nd	157,18 \pm 15,37	nd
Cendres (% en pes) ^(*)	nd	1,71 \pm 0,33	nd

Mitjanes \pm interval de confiança (95%). (nd: no determinat). ^(*) Inclou el percentatge de sals minerals afegit amb l'anticoagulant.

2.3.2.1 Sang sencera

Els resultats pel que fa a la composició bioquímica de la sang sencera de porc coincideixen amb els descrits per altres autors (Ranken, 1980).

En relació al contingut d'aigua de les mostres analitzades, s'observa que l'interval de valors obtinguts (76,9-81,5 %) és força més ample que el descrit en la bibliografia, un 80,8 % segons Ranken (1980) o un 80-82 % segons Ockerman i Hansen (1994). La humitat de les nostres mostres ha estat sovint lleugerament inferior a aquests valors, malgrat que la mitjana de totes les determinacions (79,21%) no s'allunya significativament dels valors descrits en la bibliografia. L'explicació resideix probablement en el fet que algunes mostres han estat preses de la part inferior dels dipòsits d'emmagatzematge. Dins els dipòsits, després d'un període de repòs, es produeix una estratificació de la sang de manera que tendeix a sedimentar la fracció cel·lular i, per tant, les mostres presenten un contingut d'aigua una mica inferior al que correspondria a una barreja més homogènia del conjunt.

Suposem que el mateix fet explicaria les petites diferències pel que fa a percentatge de proteïna, en aquest cas amb els nostres resultats situats en l'interval 17,75-21,21 % i amb una mitjana de 19,48 % i, per tant, superiors als trobats en la bibliografia consultada, 17 % segons Ranken (1980) i entre 13 i 15 % segons Ockerman i Hansen (1994).

2.3.2.2 Fracció plasmàtica

El plasma és una dissolució aquosa rica en proteïnes que, en la sang sencera, conté els eritròcits en suspensió. Segons els resultats, les proporcions dels components majoritaris d'aquesta fracció -aigua i proteïnes (73% de l'extracte sec)- són força constants. La variabilitat que s'ha obtingut en les determinacions del contingut en aigua han estat només de 0,3 %, i en les de concentració proteica de l'ordre del 5 %, prou baixes considerant que les mostres són de procedències diferents.

L'elevat contingut d'aigua, junt amb el fet que es tracta d'un medi ric en nutrients i, com veurem en els resultats de la caracterització microbiològica, altament contaminat, contribueix a que el producte sigui molt susceptible d'alteració. Això suposa un problema important i que, evidentment, cal tenir en compte si el que es pretén és trobar alguna aplicació industrial viable al plasma sanguini.

Les proteïnes principals que es troben en el plasma són: la seroalbúmina, que representa un 60 % de la massa total de les proteïnes plasmàtiques, les globulines (glicoproteïnes α , β i γ) i el fibrinogen, precursor de la fibrina, proteïna responsable de la coagulació sanguínia. Precisament el plasma es diferencia del sèrum sanguini, que s'obté quan la sang es coagula, en el fet que aquest últim no conté fibrinogen. S'hi pot trobar

també una quantitat més o menys important d'hemoglobina provinent d'alguns eritròcits que, per diversos motius que es comentaran més endavant, s'han lissat alliberant el seu contingut citoplasmàtic.

Són precisament l'elevada concentració i les característiques de les proteïnes plasmàtiques, principalment les de la proteïna majoritària (seroalbúmina), les que fan que es tracti d'un producte potencialment interessant, tant per les seves propietats nutricionals com funcionals, ja comentades en els corresponents apartats de la introducció (1.2.3.1 i 1.2.3.2)

Pel que fa referència a les determinacions del contingut en greix de les mostres, pensem que la variabilitat que s'ha trobat es pot atribuir més a la tècnica analítica utilitzada que no pas a variacions reals del contingut en greix del plasma. De tota manera es pot afirmar que, en qualsevol cas, la concentració de greix en les mostres analitzades és sempre inferior a l'1 %, valor que coincideix amb els que apareixen en les taules de composició bioquímica de sang citades per diferents autors: 0,1 % segons Ranken (1980) i entre 0,1-1 % segons Ockerman i Hansen (1994). Altres autors (Lynn Knipe, 1988) asseguren que aquest contingut en greix, encara que és relativament baix, pot ser suficient per a què sorgeixin problemes d'enranciment oxidatiu en plasma deshidratat, promogut per la presència de ferro provinent de la lisi dels eritròcits i, per tant, més greus quant més hemolítica sigui la sang a partir de la qual s'ha obtingut el plasma (vegeu apartat 2.3.4).

Es va determinar la composició d'aquesta fracció lipídica analitzant el contingut en colesterol i en triglicèrids en 24 mostres corresponents a dos escorxadors diferents.

Els resultats obtinguts varen ser de 83,1 mg /100 mL de colesterol i 54,8 mg/100mL de triglicèrids (Figura 2.2). Si comparem els valors de concentració d'aquestes fraccions lipídiques amb les de l'ou, utilitzat sovint com a ingredient funcional en aliments, veiem que el contingut en colesterol del plasma (0,08%) és molt inferior al de l'ou sencer (0,5%). La diferència pel que fa a la concentració de triglicèrids és encara superior, ja que aquesta fracció lipídica representa el 9,7% de la composició del rovell, és a dir, prop del 3% en l'ou sencer, mentre que en el cas del plasma seria només del 0,05%.

La fracció lipídica més important del plasma correspondrà per tant a fosfolípids i, tenint en compte que els àcids grassos dels fosfolípids de la sang són majoritàriament poliinsaturats, la composició del greix, malgrat ser un component minoritari, contribuirà al valor dietètic del producte.

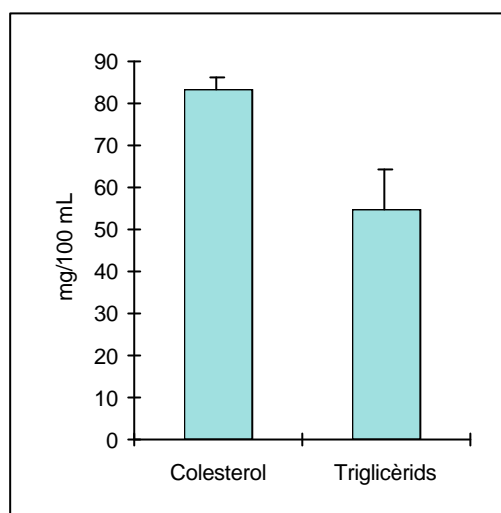


Figura 2.2. Components lipídics de la fracció plasmàtica de sang de porc. Mitjana i interval de confiança (95%).

La concentració de glucosa en el plasma també ha resultat ser força variable, però sempre amb valors de l'ordre de 0,1 o 0,2 %. Per les dades obtingudes en les anàlisis la variabilitat no sembla atribuïble a diferències entre els escorxadors estudiats; més aviat pot dependre de diferències fisiològiques entre els animals sacrificats els diferents dies de mostreig. Els valors normals de glucosa en sang pels porcs vius varien entre 3,7 i 6,4 mmol/L, equivalents a concentracions entre 66 i 115 mg/100 mL; per tant, els continguts en glucosa determinats són relativament elevats. Per tal de confirmar-los es van fer analitzar, amb una tècnica enzimàtica automatitzada emprada en les anàlisis clíniques, 12 mostres corresponents a dos escorxadors diferents (anàlisis realitzades a l'hospital Josep Trueta de Girona). Es van fer unes proves preliminars amb sang de porc que contenia EDTA i citrat sòdic com a anticoagulant que van permetre comprovar que aquest últim, que és l'utilitzat pels escorxadors, no interferia en les determinacions enzimàtiques. Els resultats de les anàlisis, 132 ± 22 mg/100 mL, ens van permetre corroborar l'ordre de magnitud dels valors obtinguts inicialment. Aquesta elevada concentració de glucosa en sang es podria explicar probablement com una conseqüència de la situació d'estrès que viu l'animal en els moments previs al sacrifici (Heinze i Mitchell, 1989) o, segons informacions obtingudes a partir de persones relacionades amb el sector, a l'incompliment de les hores de dejuni prèvies al sacrifici de l'animal.

Pel que fa al plasma com a possible ingredient alimentari, aquests continguts en glucosa probablement no són prou alts per comportar problemes apreciables de reaccions

d'enfosquiment no enzimàtic (reaccions de Maillard) en cas d'aplicar un tractament tèrmic durant el processament posterior d'aquest producte.

Pel que fa referència al contingut en cendres o sals minerals, determinades també només en el plasma, veiem que el marge de variació és significativament important. Cal tenir en compte però que bona part del contingut en cendres depèn de la concentració d'anticoagulant afegit a la sang durant el procés de recollida i que aquest és un dels factors diferencials entre els escorxadors estudiats. La presència o absència i la concentració d'alguns ions són importants pel seu efecte sobre propietats funcionals de les proteïnes, com per exemple la capacitat de formació de gels per escalfament (Delaitre, 1983; Chen *et al.*, 1994) o la solubilitat (Delaitre, 1983); així com sobre el rendiment d'alguns processos d'obtenció de concentrats proteics a partir del plasma, com la ultrafiltració o la deshidratació per atomització (Delaney, 1977; Real del Sol y Martín, 1991; Martín *et al.*, 1995).

2.3.2.3 Fracció cel·lular

La composició d'aquesta fracció, segons els resultats de la caracterització bioquímica, coincideix força amb la proposada per altres autors. L'interval de concentració proteica de les nostres mostres (35,4-39,0 %) és més estret que el citat per Ockerman i Hansen (1994), 28-38 %, i la mitjana dels nostres valors (37,2 %) està lleugerament per sobre el valor suggerit per Ranken (1980), 35,1 %.

L'elevada concentració de proteïnes és una característica d'aquesta fracció, de fet els principals constituents de la fracció sedimentada durant la centrifugació de la sang, els eritròcits de porc, són cèl·lules amb forma de disc bicòncav, petits (d'uns 5,3 - 6,2 µm de diàmetre), sense nucli ni altres orgànuls citoplasmàtics i que contenen quantitats importants d'hemoglobina, de l'ordre d'un 96,5 % en pes sobre extracte sec. L'hemoglobina conté un 94 % de globina i el 6 % restant correspon al grup hem amb un 9 % de ferro. La funció principal d'aquesta proteïna és la unió amb l'oxigen que ha de ser transportat, a través de la sang, des dels pulmons fins a la resta de teixits de l'animal. La lisi dels eritròcits, provocada per causes diverses (apartat 2.3.4), comporta l'alliberament de l'hemoglobina a la solució i, per tant, la presència d'aquesta proteïna en el plasma que s'obté per centrifugació.

Degut al color intens del grup hem només una petita quantitat d'hemoglobina afegida en qualsevol producte alimentari suposa un enfosquiment en molts casos no desitjable. Per això aquesta fracció es destina majoritàriament a l'alimentació animal, els problemes de coloració que comporta la seva addició acostumen a ser la raó principal per a què no sigui utilitzada en aliments destinats al consum humà.

Existeixen varis tractaments possibles de la fracció cel·lular per eliminar el grup responsable del color -extracció amb solvents orgànics, hidròlisi química o enzimàtica, destrucció oxidativa (Wismer-Pedersen, 1988)- i que permeten obtenir un producte interessant des del punt de vista nutricional i amb algunes propietats funcionals aprofitables. La producció d'hidrolitzats proteics amb la finalitat d'eliminar el grup hem comporta però alguns problemes. D'una banda l'aparició de gustos amargants i olors indesitjables (Dreper *et al.*, 1981 i Olsen, 1983; citats per Wismer-Pedersen, 1988), i de l'altra l'encariment que suposen les etapes de processament implicades en la preparació del producte final.

El component lipídic d'aquesta fracció presenta també una variabilitat molt gran que, igual que en el cas de les anàlisis del plasma, podem atribuir en bona part a la tècnica analítica. En qualsevol cas, el resultat de les nostres anàlisis, 0,26 %, s'apropa més al 0,4 % proposat per Ranken (1980) que a l'1 % d'Ockerman i Hansen (1994).

2.3.3 Caracterització microbiològica

S'ha comentat anteriorment que el sistema de recollida higiènica de la sang de porc que duen a terme els escorxadors estudiats no sembla ser l'òptim per assegurar una bona qualitat microbiològica del producte. El resultat del present estudi deixa palès que la contaminació microbiana de la sang recollida és considerablement elevada, tant pel que fa a la càrrega contaminant general (bacteris aeròbics mesòfils i psicròtrofs) com pel que fa a la presència de grups indesitjables perquè suposen un risc potencial per la salut (*Staphylococcus aureus*, enterobacteriàcies) o perquè poden causar alteracions de les característiques organolèptiques i/o degradar algun dels components bàsics dels aliments, amb la consegüent disminució o pèrdua de valor nutritiu (bacteris proteolítics, hemolítics, clostridis sulfit-reductors, fongs i llevats, etc.).

2.3.3.1 Bacteris aeròbics mesòfils

Els bacteris aeròbics mesòfils són microorganismes capaços de desenvolupar-se en presència d'oxigen a una temperatura entre 30 i 37°C. El recompte d'aquests microorganismes, utilitzat com a indicador de càrrega microbiana general, ens pot orientar sobre la longevitat, la seguretat potencial i les condicions higièniques d'obtenció del producte analitzat, en aquest cas la sang de porc.

Els resultats dels recomptes de microorganismes aeròbics mesòfils, obtinguts fent la mitjana dels logaritmes de les tres determinacions per a cada període i per a cadascun dels escorxadors, es mostren en la figura 2.3. Es pot observar que els valors oscil·len entre càrregues de l'ordre de 10^5 a 10^6 ufc/mL, que coincideixen amb els obtinguts per Ockerman i Hansen (1994) quan no es segueixen mesures higièniques estrictes durant el procés de sacrifici. Evidentment, l'elevat nombre de microorganismes seria atribuïble a les condicions del sistema de recollida, sistema obert exposat a múltiples fonts de contaminació. Els valors que se citen a la bibliografia sobre càrrega contaminant de sang de porc obtinguda amb sistemes tancats, oscil·len entre 2×10^3 i 3×10^3 ufc/mL segons Nilsson (1975) o, fins i tot, poden ser inferiors a 2×10^3 ufc/mL segons Ockerman i Hansen (1994). Aquests valors serien del mateix ordre dels que s'han trobat per sang efluent recollida directament abans de caure al sagnador i, per tant, sense l'efecte contaminant del sistema de processament.

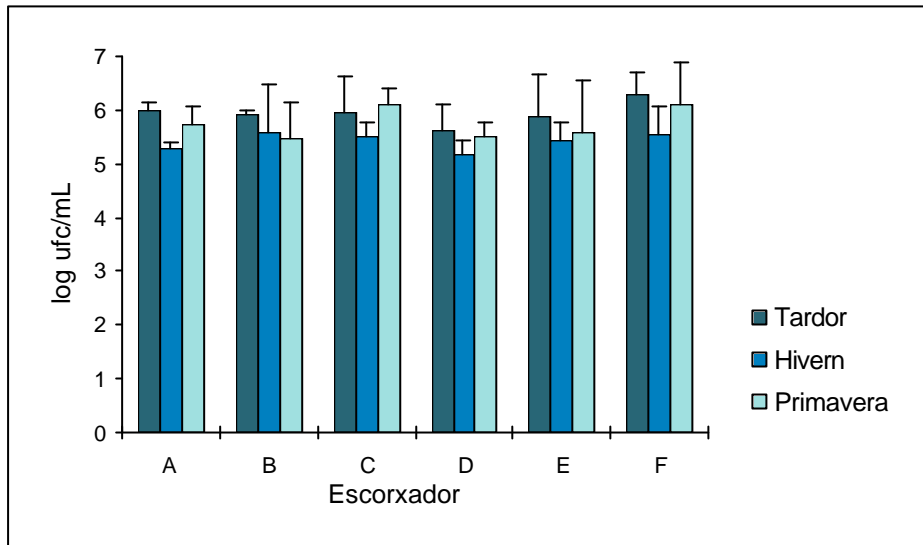


Figura 2.3. Recòmptes de bacteris mesòfils (log ufc/mL) per a cada escorxador i per a cada període. Mitjana i interval de confiança (95%).

Les possibles fonts de contaminació microbiana a les quals està exposada la sang en un sistema obert i en el mateix moment del degollat de l'animal inclouen:

- El ganivet utilitzat, que pot contenir 10^4 - 10^6 ufc/cm² (Gerrard i Mallion, 1977) i pot estar contaminat amb espores (Jensen, 1954).
- La pell dels porcs, que, abans de ser rentada, pot contenir 10^5 - 10^9 microorganismes aeròbics i 10^3 - 10^9 anaeròbics en 13 cm² de la regió on s'inserta el ganivet (Jensen i Hess, 1941).

La transferència de microorganismes des de la pell de l'animal fins a la canal es dona principalment a través del ganivet i les mans del treballador. La població adquirida per les mans d'un treballador després de manipular aproximadament uns 100 cm² de pell assoleix valors de l'ordre de 2×10^6 microorganismes i, de la roba d'un treballador que hagi escorxat 100 canals en un període de 6 h, es poden obtenir recomptes de l'ordre de 3×10^7 organismes/cm² (Swingler, 1982).

Evidentment s'han d'adoptar mesures estrictes d'higiene, com són el rentat de l'animal abans del degollat -per eliminar possibles restes de sòl, excrements i brutícia adherida al pèl, mesura suggerida per Roberts (1980) (citada per Swingler, 1982)- o l'esterilització del ganivet i rentat de les mans del treballador després de cadascun dels animals designats. Tot i aquestes precaucions, però, aquests factors poden seguir suposant una font important de contaminació.

- Els orins, excrements, regurgitacions del contingut estomacal i aigua de rentat que regalima de la pell de l'animal, i que cauen en la mateixa pica de recepció de la sang, també són fonts importants de substàncies estranyes i de contaminació microbiològica de la sang.

- Els microorganismes de l'aire de les sales de sacrifici i la contaminació present en les superfícies de l'equipament que entren en contacte amb la sang (conduccions, vàlvules, tancs d'emmagatzematge) són també fonts de contaminació que cal tenir en compte.

Els recomptes totals de mostres de sang fresca, utilitzada per Erickson i Von Bockelmann (1975) per a ultrafiltració, es movien entre $1,7 \times 10^3$ i $1,0 \times 10^7$ ufc/mL i depenien del temps d'emmagatzematge en refrigeració abans del processament. Per tant, els valors finals de contaminació de la sang venen determinats no només per la càrrega contaminant inicial, procedent d'alguna de les fonts esmentades, sinó també pel temps que duri el període d'emmagatzematge.

Els resultats de l'ANOVA per determinar l'efecte de l'escorxador i del període de mostreig sobre la contaminació per bacteris mesòfils (annex 1a) han permès determinar que les diferències entre escorxadors no són significatives ($P > 0,05$) però sí ho són les diferències entre períodes ($P < 0,05$).

S'ha fet una separació de mitjanes dins de cada escorxador per estudiar la incidència del període de mostreig en cadascun per separat i una dins de cada període. S'ha utilitzat el mètode de REGW amb un nivell de significació de 0,05. Els resultats dels valors F i de probabilitat per a cadascun dels casos s'expressa en la taula 2.3, així com els resultats de la separació de mitjanes.

Segons els resultats d'aquests tests no es poden fer grups de mitjanes entre escorxadors per cada període ja que les diferències entre ells, pel que fa als nivells de contaminació per bacteris aeròbics mesòfils, no són estadísticament significatives. *A priori*, abans de fer el present estudi, es pensava que algunes de les particularitats en el sistema de recollida d'alguns dels escorxadors, per exemple el fet de dessagnar en horitzontal, que permet evitar la barreja amb líquids i substàncies estranyes procedents del mateix animal (escorxador D) o el fet de processar immediatament la sang enlloc d'emmagatzemar-la en refrigeració (escorxador E), podia significar una millora en la qualitat microbiològica de la sang, en comparació amb la d'altres escorxadors on no es duïen a terme aquestes activitats. Malgrat que les mitjanes dels recomptes de mesòfils per aquests dos escorxadors han estat les més baixes, l'anàlisi estadística de les dades ens indica que les diferències, respecte a la resta d'escorxadors estudiats, no són significatives. Per tant les esmentades pràctiques no impliquen cap millora substancial en la qualitat microbiològica de la sang recollida (almenys pel que fa a càrrega total). Basant-nos només en aquests resultats es podria dir, doncs, que no és recomanable la inversió que

suposaria la introducció d'aquestes modificacions en el sistema de recollida com a única mesura per millorar la qualitat microbiològica del producte obtingut.

Taula 2.3. Recòmptes de bacteris aeròbics mesòfils (log ufc/mL)

Escorx.	Tardor	Hivern	Primavera	mitjana ± i.c. Prob >F
A	6,00 ± 0,15 A a	5,27 ± 0,14 B a	5,72 ± 0,34 A a	5,66 ± 0,24 a 0,0133 F : 9,66
B	5,92 ± 0,08 A a	5,60 ± 0,88 A a	5,48 ± 0,66 A a	5,69 ± 0,34 a 0,6552 F : 0,37
C	5,96 ± 0,68 A a	5,52 ± 0,24 A a	6,10 ± 0,31 A a	5,86 ± 0,28 a 0,2474 F : 1,78
D	5,61 ± 0,51 A a	5,17 ± 0,26 A a	5,50 ± 0,25 A a	5,43 ± 0,22 a 0,2883 F : 1,54
E	5,88 ± 0,79 A a	5,45 ± 0,31 A a	5,59 ± 0,95 A a	5,61 ± 0,38 a 0,7590 F : 0,29
F	6,31 ± 0,40 A a	5,55 ± 0,52 A a	6,12 ± 0,78 A a	5,99 ± 0,37 a 0,2537 F : 1,74
mitj.± i.c. F Prob > F	5,95 ± 0,11 A 0,97 0,4783	5,43 ± 0,10 B 0,51 0,7628	5,77 ± 0,14 A 0,86 0,5390	

Mitjana ± interval de confiança (95%) de cada escorxador per a cada període de mostreig. Les lletres darrera els valors indiquen els grups de mitjanes obtinguts a partir del test REGW : les lletres majúscules diferents indiquen diferències significatives entre mitjanes dels diferents períodes, i les lletres minúscules diferències significatives entre mitjanes d'escorxadors.

Els resultats dels tests de separació de mitjanes indiquen que la mitjana del recompte de mesòfils del segon període (hivern) és significativament més baixa que la dels períodes 1 (tardor) i 3 (primavera), considerats globalment, i que dins de cada escorxador les diferències entre períodes només són significatives en el cas de l'escorxador A. Malgrat que, teòricament, les sales de sacrifici i espejament dels escorxadors han d'estar refrigerades i, per tant, les fluctuacions de la temperatura exterior al llarg de l'any no haurien de ser importants, les diferències obtingudes entre els diferents períodes de

mostreig indiquen que existeix certa influència de la temperatura de l'ambient en els nivells de càrrega contaminant de la sang. En cadascun dels escorxadors per separat, en general, s'obtenen recomptes més baixos durant el període d'hivern, tot i que l'anàlisi estadística només considera significatives les diferències entre períodes en l'escorxador A, que sembla que seria el que patiria més l'efecte de les fluctuacions en la temperatura ambiental de les diferents èpoques de l'any.

Influència de la centrifugació sobre la càrrega microbiana

Durant el tercer període de mostreig es van fer recomptes generals de bacteris aeròbics del plasma per tal de veure com es distribueix la càrrega microbiana entre les dues fraccions que s'obtenen per centrifugació de la sang. Els resultats es mostren a la taula 2.4 en forma de mitjana (com a mínim de 5 determinacions) dels percentatges de càrrega en cadascuna de les fraccions obtinguts per a cadascun dels escorxadors.

S'ha obtingut una variabilitat molt alta en els nivells de càrrega contaminant del plasma. La mitjana del contingut en bacteris aeròbics mesòfils i psicròtrofs de la majoria d'escorxadors es troba entre el 10 % i el 30 % de la càrrega contaminant de la sang sencera. Únicament en l'escorxador C hem obtingut uns valors més alts, de l'ordre del 50 % de mitjana, i amb una variabilitat encara més alta. Segons Ockerman i Hansen (1994), aproximadament el 20-25 % dels bacteris queden en el plasma i el 75-80 % restant en la fracció dels eritròcits. Per això, si la contaminació inicial de la sang és baixa, és a dir si es recull en condicions higièniques, preferiblement mitjançant un sistema tancat, el plasma pot tenir una contaminació molt reduïda, d'aproximadament 100 microorganismes per mL. En el nostre cas, on partim de mostres de sang altament contaminades, els recomptes que s'obtenen en les mostres de plasma segueixen essent considerablement elevats, ja que una reducció del 90 % només suposa la disminució en un ordre de magnitud. Els recomptes d'aerobis mesòfils en plasma són doncs de l'ordre de 10^4 - 10^5 ufc/mL, una contaminació encara prou alta per indicar un elevat potencial de deteriorament del producte.

Taula 2.4 Distribució de la càrrega microbiana contaminant en les diferents fraccions de la sang per efecte de la centrifugació (%)

<i>ESCORXADOR</i>	<i>PLASMA</i>	<i>FRACCIÓ CEL·LULAR</i>
-------------------	---------------	------------------------------

A	23,05	76,95
B	10,86	89,14
C	43,52	56,48
D	22,79	77,21
E	12,18	87,82
F	22,78	77,22

2.3.3.2 Bacteris aeròbics psicròtrofs

Els microorganismes psicròtrofs són aquells capaços de créixer amb relativa rapidesa a temperatures de refrigeració; inclouen, per tant, els psicròfils, amb temperatures òptimes de creixement inferiors a 20°C, però també molts microorganismes amb temperatura òptima entre 25-30°C. Dins aquest grup es troben amb freqüència representants dels gèneres *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, també algunes espècies de *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Arthrobacter* i alguns fongs i llevats (Speck, 1984).

En estudis realitzats per Erickson i Von Bockelmann (1975) la microbiota contaminant de les mostres de sang analitzades estava dominada per pseudomonadàcies, tant si es tractava de mostres amb contaminació total elevada com baixa. En el present estudi s'ha analitzat només la càrrega que representen els bacteris psicròtrofs en general, sense caracteritzar els gèneres particulars que componen aquest grup.

El nivell de contaminació per aquests microorganismes és especialment important en productes que requereixen ser conservats a temperatures de refrigeració ja que pot orientar-nos sobre el període de temps que es pot mantenir el producte emmagatzemat sense patir alteracions importants. La seva presència, especialment recomptes elevats, indica un alt potencial de deteriorament durant períodes d'emmagatzematge llargs.

Els resultats dels recomptes de microorganismes aeròbics psicròtrofs, obtinguts fent la mitjana dels logaritmes de les tres determinacions per a cada període i per a cadascun dels escorxadors, es mostra en la figura següent:

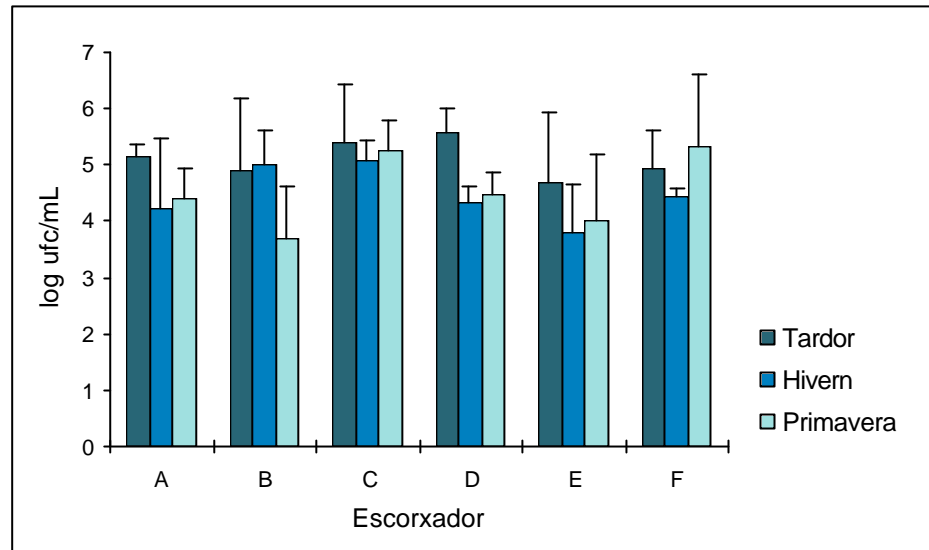


Figura 2.4. Recomptes de bacteris psicròtrofs (log ufc/mL) per a cada escorxador i per a cada període. Mitjana i interval de confiança (95%).

Els recomptes de psicròtrofs en tots els escorxadors i per a tots els períodes de mostreig han estat molt elevats (10^4 - 10^5 ufc/mL), només d'un o dos ordres de magnitud inferiors als recomptes de microorganismes aeròbics mesòfils.

Segons Ockerman i Hansen (1994), quan la sang es recull higiènicament i s'emmagatzema a 2°C, els recomptes inferiors a 2000 ufc/mL s'han de mantenir constants durant varis dies. En la majoria dels casos la sang es pot emmagatzemar 4 dies a 2°C abans que el nombre de bacteris comenci a augmentar significativament. Però si no es segueixen mesures higièniques estrictes, els mateixos autors parlen de contaminacions inicials elevades ($2,5 \times 10^5$ ufc/mL) i que poden augmentar ràpidament durant l'emmagatzematge.

L'ANOVA per determinar l'efecte de l'escorxador i del període de mostreig sobre la contaminació per bacteris psicròtrofs (annex 1b), igual que en el cas de bacteris mesòfils, ha donat diferències significatives ($P < 0,05$) només entre les mostres corresponents a diferents períodes.

S'ha fet una anàlisi de la variància dins de cada escorxador per estudiar la incidència del període de mostreig en cadascun per separat i una dins de cada període. S'ha fet també un test de separació de mitjanes REGW amb un nivell de significació de 0,05. Els resultats dels valors F i de probabilitat per a cadascun dels casos s'expressa en la taula 2.5, així com els resultats de la separació de mitjanes

Taula 2.5. Recomptes de bacteris aeròbics psicròtrofs (log ufc/mL)

Escorx.	Tardor	Hivern	Primavera	mitjana \pm i.c.	Prob >F
A	5,16 \pm 0,20 A a	4,24 \pm 1,22 A a	4,41 \pm 0,54 A a	4,60 \pm 0,48 ab F: 1,54	0,2893
B	4,92 \pm 1,26 A a	5,02 \pm 0,59 A a	3,70 \pm 0,93 A a	4,65 \pm 0,64 ab F: 1,72	0,2699
C	5,40 \pm 1,03 A a	5,08 \pm 0,34 A a	5,24 \pm 0,56 A a	5,24 \pm 0,36 a F: 0,20	0,8257
D	5,57 \pm 0,42 A a	4,32 \pm 0,29 B a	4,46 \pm 0,42 B a	4,79 \pm 0,43 ab F: 12,38	0,0074
E	4,68 \pm 1,26 A a	3,79 \pm 0,86 A a	4,00 \pm 0,96 A a	4,11 \pm 0,58 b F: 0,73	0,5386
F	4,92 \pm 0,70 A a	4,43 \pm 0,17 A a	5,32 \pm 1,30 A a	4,89 \pm 0,50 ab F: 1,05	0,4060
mitj. \pm i.c.	5,13 \pm 0,33 A	4,48 \pm 0,32 B	4,61 \pm 0,41 B		
F	0,54	2,01	2,11		
Prob > F	0,7455	0,1496	0,1468		

Mitjana \pm interval de confiança (95%) de cada escorxador per a cada període de mostreig. Les lletres darrera els valors indiquen els grups de mitjanes obtinguts a partir del test REGW: les lletres majúscules diferents indiquen diferències significatives entre mitjanes dels diferents períodes, i les lletres minúscules diferències significatives entre mitjanes d'escorxadors.

Els resultats dels tests de separació de mitjanes indiquen que la mitjana del recompte de psicròtrofs del període 1 (tardor) és significativament més alta que la dels períodes 2 (hivern) i 3 (primavera), i que dins de cada escorxador les diferències entre períodes només són significatives en el cas de l'escorxador D. Observant els resultats de la taula 2.5 es veu que, amb l'única excepció de l'escorxador B, els recomptes de microorganismes psicròtrofs són inferiors també pel segon període de mostreig que pels períodes 1 i 3, fet que, tot i no ser significatiu, estaria relacionat amb les diferències entre períodes trobades en els recomptes de microorganismes mesòfils.

El fet que l'ANOVA consideri significatives les diferències entre períodes malgrat que l'únic escorxador on s'obté una separació clara de mitjanes sigui l'escorxador D pot ser degut a què les diferències entre els tres períodes dins aquest escorxador tenen prou pes perquè el model global les consideri significatives.

Pel que fa a diferències entre escorxadors, i malgrat que l'anàlisi de la variància no consideri significatives les diferències entre ells, el test de REGW separa la mitjana de l'escorxador C, que presenta el recompte de psicròtrofs més elevat, i la de l'escorxador E, que és el que té la mitjana més baixa. La resta d'escorxadors no difereix significativament de cap dels 2 anteriors.

En aquest cas sembla que el temps d'emmagatzematge ha de tenir un efecte important sobre els recomptes perquè la contaminació inicial és molt alta i les temperatures de refrigeració afavoreixen selectivament el creixement d'aquest grup de microorganismes. Aquest fet queda reflectit en la comparació entre els recomptes de l'escorxador E, que processa la sang immediatament després de la recollida i les mostres del qual corresponen a sang fresca no refrigerada, amb els de la resta d'escorxadors, dels quals hem analitzat mostres mantingudes en refrigeració durant algunes hores.

2.3.3.3 Enterobacteris

La família *Enterobacteriaceae* està integrada per petits bacils gram-negatius, aeròbics i anaeròbics facultatius, no esporulats, fermentadors de glucosa i altres carbohidrats. Alguns gèneres són hostes habituals de l'intestí de l'home i dels animals. Són importants en Microbiologia alimentària perquè inclouen gèneres i espècies patògenes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* enteropatògena), bacteris modificadors dels caràcters organolèptics dels aliments (proteolítics, gasogènics, acidogènics, etc.) i gèneres utilitzats com a indicadors de contaminació fecal d'aigua i aliments (enterobacteriàcies lactosa positives o coliforms).

Gunstone (1980) va trobar, analitzant sang de vedella al Canadà, que la sang fresca contenia invariablement *Proteus* i *E. coli*. En el present estudi, igual que en el cas dels bacteris psicròtrofs, no s'ha fet la caracterització dels gèneres que componen aquest grup, sinó un recompte general d'enterobacteris per avaluar globalment quina és la seva participació en la contaminació del producte estudiat.

Els recomptes d'enterobacteris obtinguts en les nostres anàlisis, representats en la figura següent, han estat de l'ordre de 10^3 - 10^4 ufc/mL.

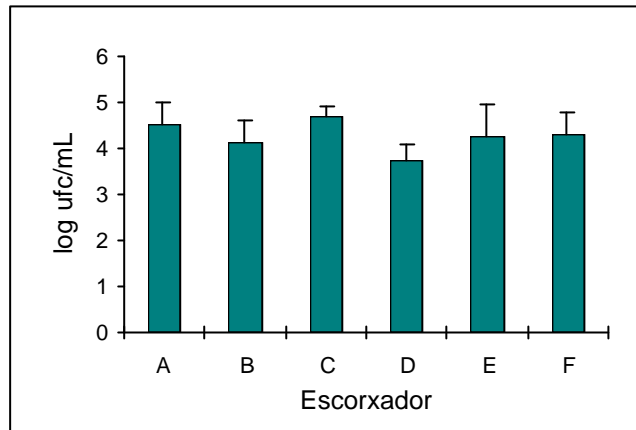


Figura 2.5. Recomptes d'enterobacteris (log ufc/mL) per a cada escorxador. Mitjana i interval de confiança (95%).

En l'estudi de Erickson i Von Bockelmann (1975) la càrrega de coliforms presents en les mostres de sang fresca varia entre $1,7 \times 10^2$ i $8,0 \times 10^4$ ufc/mL, les enterobacteriàcies suposen un 0,5 % de la càrrega contaminant total en mostres amb recomptes totals elevats i un 5 % si els recomptes totals són baixos. D'aquest estudi es dedueix també que mentre la sang es manté a temperatures de refrigeració la microbiota predominant pertany a les pseudomonadàcies i el nombre de coliforms fins i tot pot disminuir, i que un augment de temperatura durant el processament suposa increments importants tant en els recomptes totals com en els de coliforms. En el nostre estudi la contaminació per enterobacteriàcies suposaria aproximadament un 1 % del recompte general de microorganismes aeròbics mesòfils.

Malgrat que l'anàlisi de la variància (annex 1c) no consideri significatives les diferències entre els recomptes d'enterobacteris dels sis escorxadors, veiem que els resultats més baixos són els corresponents a l'escorxador D (Figura 2.5). Això podria atribuir-se al sistema de dessagnat de l'animal en posició horitzontal que, teòricament, evita que els excrements i part del contingut estomacal que pot regurgitar l'animal durant el sacrifici es barregin amb la sang. Per tant, tot i no representar una mesura important pel que fa a càrrega contaminant general, aquest sistema sembla ser útil per disminuir la contaminació d'origen fecal o entèric.

2.3.3.4 Clostridis sulfit-reductors

Són bacils gram-positius esporogènics anaeròbics del gènere *Clostridium*. Les seves espores són més resistents que les cèl·lules vegetatives a un ampli ventall de factors que limiten la supervivència o el creixement d'altres microorganismes, com ara bacteriòfags,

bacteriocines o antibiòtics, radiacions, temperatures extremes, etc. Dins aquest grup s'inclouen espècies β -hemolítiques i algunes espècies proteolítiques o putrefactives (*Clostridium sporogenes*, *C.putrefasciens*, *C.botulinum*, etc.) que provoquen l'aparició de productes indesitjables en aliments (sulfurs, mercaptans, amoni, amines, etc.) a partir de la descomposició anaeròbica de proteïnes, pèptids o aminoàcids. S'hi troben també espècies sacarolítiques acidogèniques (*C.perfringens*, *C.butyricum*, *C.pasteurianum*, etc.) i algunes especialment importants en Microbiologia alimentària degut a la significació, des del punt de vista sanitari, de les seves toxines (*C.botulinum*, *C.perfringens*).

C.perfringens s'aïlla freqüentment del sòl, aigües i contingut intestinal de l'home i els animals i s'utilitza, junt amb els coliforms, com a microorganisme indicador de contaminació fecal.

C.botulinum es troba àmpliament distribuït al sòl, en concentracions baixes, però també es pot aïllar de sediments d'aigües dolces i marines. És responsable del botulisme, una intoxicació d'origen alimentari, potser la més greu, provocada per la ingestió d'aliments que contenen neurotoxines sintetitzades per aquest microorganisme.

Els ordres de magnitud dels nostres recomptes presenten una variabilitat molt alta, entre <10 - 10^4 ufc/mL. Gunstone (1980) va trobar, analitzant sang de boví al Canadà, que la sang fresca mai contenia *Clostridium* o *Salmonella*. Suposem que en el seu cas es tractava de sang recollida en millors condicions higièniques que la que forma part del nostre estudi, tot i que aquest grup de microorganismes és l'únic on varies mostres d'alguns escorxadors han donat negatives, és a dir, recomptes inferiors a 10 ufc/mL.

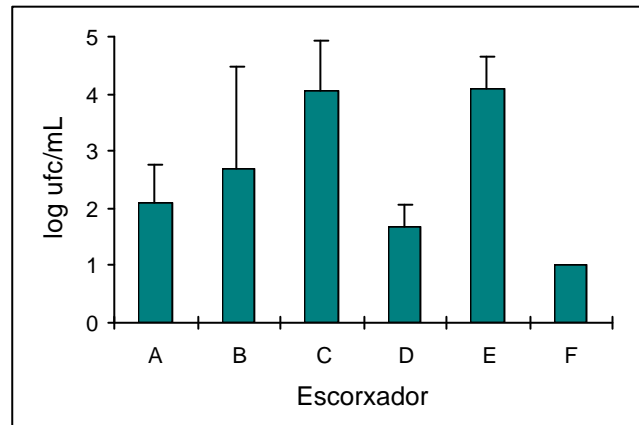


Figura 2.6. Recomptes de clostridis sulfit-reductors (log ufc/mL) per a cada escorxador. Mitjana i interval de confiança (95%).

La distribució dels resultats dels recomptes d'aquest grup no s'ajusta a una distribució normal i, per tant, no s'ha realitzat l'anàlisi de la variància com amb els altres grups de microorganismes. Tanmateix, el gràfic on estan representades les mitjanes dels recomptes per cada escorxador (Figura 2.6) és prou il·lustratiu i mostra que els recomptes més baixos corresponen als escorxadors D i F. L'explicació, pel cas de l'escorxador D, podria ser la mateixa que en els recomptes d'enterobacteris. El fet de dessagnar el porc en posició horitzontal podria comportar menys probabilitat de contaminació fecal, suposant que l'origen, almenys d'una part dels clostridis trobats, sigui el tracte intestinal de l'animal sacrificat. De tota manera, aquest recompte es pot utilitzar també com a indicador de condicions higièniques generals durant el procés de dessagnat, recollida i emmagatzematge de la sang. Probablement les manipulacions higièniques durant tot el procés siguin més fàcils de mantenir en un escorxador més petit com l'escorxador F, que sacrifica diàriament un nombre força més baix de porcs (entre 3 i 6 vegades menys que els altres escorxadors estudiats).

2.3.3.5 *Staphylococcus aureus*

Els estafilococs són cocs gram-positius amb metabolisme respiratori i fermentatiu, les poblacions naturals dels quals estan principalment associades a les glàndules de la pell i membranes mucoses d'animals de sang calenta. Algunes espècies són patògenes oportunistes de l'home i els animals. Els estafilococs són els bacteris no esporulats més resistents a la dessecació, toleren valors baixos d'activitat d'aigua.

Staphylococcus aureus és sovint responsable d'intoxicacions alimentàries produïdes per ingestió de les enterotoxines termoresistents que produeix en aliments contaminats. Sintetitza també exotoxines amb activitat hemolítica, capaces de lisar els eritròcits de sang de diferents espècies. Moltes soques són productores de coagulases (coagulen el plasma sanguini) i una desoxirribonucleasa termoresistent capaç de digerir l'ADN extracel·lularment.

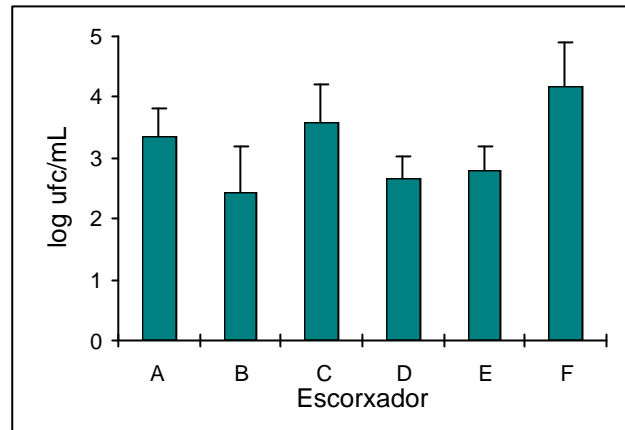


Figura 2.7. Recomptes de *Staphylococcus aureus* (log ufc/mL) per a cada escorxador. Mitjana i interval de confiança (95%).

Tot i que Gunstone (1980), analitzant sang de boví, trobava *Staphylococcus aureus* només ocasionalment i la majoria no eren coagulasa positius. Els nostres recomptes han estat importants, doncs es troben entre valors de 10^2 i 10^4 ufc/mL (Figura 2.7) i la majoria de soques aïllades i investigades (un 81 %) han resultat ser DNAsa positives. Existeix una elevada correlació entre soques coagulasa i DNAsa positives i les productores d'enterotoxines i, per tant, la seva presència en quantitats tan elevades en un producte que pretén utilitzar-se com a matèria primera per a l'elaboració d'aliments destinats al consum humà és del tot indesitjable. A més, com ja hem comentat, les toxines estafilocòciques són resistents als tractaments tèrmics i, en conseqüència, qualsevol tractament d'aquest tipus al qual es sotmeti el plasma sanguini o el producte on ha estat incorporat no ens garanteix la seguretat de l'aliment.

Els resultats de l'ANOVA (annex 1e) indiquen que es poden considerar significatives les diferències entre els sis escorxadors estudiats pel que fa a contaminació per *S.aureus*. El test de separació de mitjanes diferencia tres grups, considerant significativament més alta la mitjana de l'escorxador F (més temps dins el marge de temperatures adequades pel desenvolupament de *Staphylococcus*) i més baixes les dels escorxadors E (processament immediat de la sang), D (dessagnat del porc en posició horitzontal i potser menys líquid de rentat barrejat amb la sang que pot arrossegar microorganismes de la pell) i B.

2.3.3.6 Fongs i llevats

Els fongs són microorganismes eucariotes aeròbics heteròtrofs. Els fongs filamentosos són multicel·lulars i amb una estructura vegetativa composta per un conjunt

d'hifes que formen el miceli. Els llevats són fongs que es presenten en forma unicel·lular. Creixen bé a temperatura ambient i alguns són capaços de créixer també a temperatures de refrigeració (*Geotrichum*, *Botrytis*, *Penicillium*, etc.). Poden ser responsables d'alteracions en aliments produint modificacions de les seves característiques físiques i qualitats organolèptiques. Les espores fúngiques són fàcilment dispersades a través de l'ambient, de manera que l'aire de les sales de processament d'aliments pot ser una important font de contaminació. Un dels principals riscos de la contaminació fúngica en aliments és l'alliberament de metabolits tòxics (micotoxines) per exemple pels gèneres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, etc.

Els recomptes d'aquest grup de microorganismes en les mostres analitzades han estat de l'ordre de 10^2 - 10^3 ufc/mL, tal com es reflecteix en la figura següent. Aquesta contaminació prové probablement de la pròpia pell de l'animal o de l'aire de la sala de sacrifici de l'escorxador.

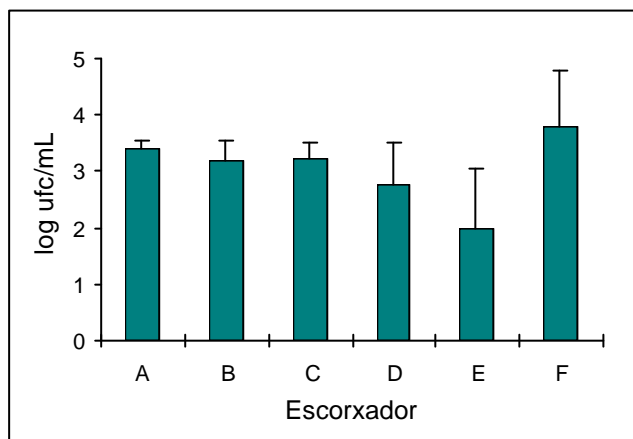


Figura 2.8. Recòmptes de fongs i llevats (log ufc/mL) per a cada escorxador. Mitjana i interval de confiança (95%).

Els resultats de l'ANOVA (annex 1f) indiquen que no es poden considerar significatives les diferències entre els sis escorxadors estudiats pel que fa a contaminació per fongs i llevats. Malgrat això s'observa que la mitjana de l'escorxador E és significativament més baixa que la dels altres encara que l'interval de variació dels valors és molt ample. Els recomptes més baixos en aquest escorxador es podrien explicar pel fet que és l'únic on el processament de la sang és immediat i, per tant, s'evita l'efecte d'increment de càrrega contaminant que suposa el període de temps que generalment transcorre entre la recollida i el processament.

Els recomptes més alts s'han obtingut en l'escorxador F, probablement perquè en no tenir bescanviador de calor, la sang es manté més temps que la de la resta a temperatures òptimes pel creixement d'aquest tipus de microorganismes.

2.3.3.7 Bacteris β -hemolítics

Els bacteris hemolítics són un grup heterogeni de microorganismes capaços de sintetitzar exotoxines que provoquen la lisi dels eritròcits de sang de diferents espècies animals, en el nostre cas, sang d'origen porcí. Tot i que no són objecte d'investigació habitual en les determinacions de qualitat microbiològica de productes alimentaris s'ha considerat interessant la seva quantificació en les mostres estudiades per la seva possible participació en l'increment del grau d'hemòlisi de mostres emmagatzemades durant períodes més o menys llargs en espera de ser processades.

Els recomptes per aquest grup de microorganismes obtinguts en el present estudi han estat de l'ordre de 10^4 - 10^5 ufc/mL (Figura 2.9).

Les mostres de sang fresca utilitzades per Erickson i Von Bockelmann (1975) en processos d'ultrafiltració contenien entre 5×10^2 i $3,5 \times 10^4$ de bacteris β -hemolítics/mL. En sang amb un recompte total elevat només el 5 % de la microbiota corresponia a espècies β -hemolítiques, mentre que en sang amb recomptes baixos aquests grups de microorganismes assolien proporcions més elevades en relació a la càrrega total; un 10 % eren β -hemolítics. En el nostre cas, i tenint en compte que els recomptes totals són de l'ordre de 10^5 a 10^6 ufc/mL, la proporció que suposen els bacteris β -hemolítics és d'aproximadament un 10 %. Aquesta proporció és prou elevada per fer pensar que qualsevol endarreriment en la separació de les fraccions de la sang suposarà un increment en el grau d'hemòlisi causat per l'activitat d'aquest grup de microorganismes i, per tant, la consegüent pèrdua de qualitat del plasma que se n'obtingui.

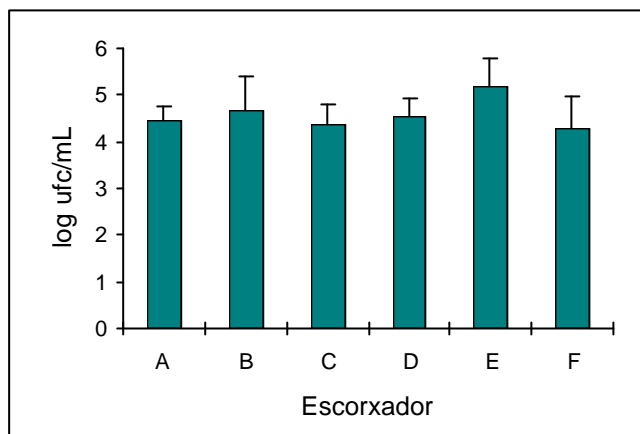


Figura 2.9. Recomptes de bacteris hemolítics (log ufc/mL) per a cada escorxador. Mitjana i interval de confiança (95%).

Els resultats de l'ANOVA (annex 1g) indiquen que no es poden considerar significatives les diferències entre els sis escorxadors estudiats pel que fa a contaminació per bacteris hemolítics. Totes les mitjanes obtingudes són aproximadament del mateix ordre i, per tant, no sembla que les particularitats dels sistemes de recollida dels escorxadors estudiats tinguin cap influència sobre el nombre d'aquest tipus de microorganismes.

2.3.3.8 Bacteris proteolítics

Els bacteris proteolítics són un grup heterogeni de microorganismes capaços de produir proteases extracel·lulars actives. Alguns dels bacteris psicròtrofs més comuns són fortament proteolítics i provoquen canvis indesitjables, particularment quan assolixen nivells de població elevats, després de llargs períodes de conservació dels productes en refrigeració. És freqüent trobar espècies proteolítiques en gèneres com *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Proteus* (Frazier i Westhoff, 1988). Algunes proteases sintetitzades per aquests microorganismes són enzims termoestables, que poden mantenir la seva activitat després d'un tractament tèrmic del producte que els contenia i, per tant, poden seguir degradant substrats proteics fins i tot quan ja no hi és present el microorganisme productor.

Molts dels bacteris que componen la microbiota contaminant de la sang analitzada en el nostre treball presenten activitat proteolítica, doncs s'han obtingut recomptes de l'ordre de 10^4 - 10^5 ufc/mL (Figura 2.10), que suposen un 10 % dels valors del recompte general de bacteris mesòfils aeròbics.

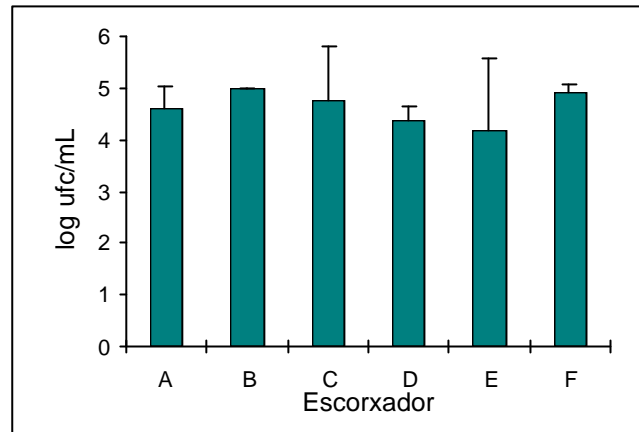


Figura 2.10. Recòmptes de bacteris proteolítics (log ufc/mL) per a cada escorxador. Mitjana i interval de confiança (95%).

En aquest cas també l'escorxador E, que processa la sang immediatament, és el que ha donat recomptes de bacteris proteolítics més baixos, tot i que no significativament diferents dels de la resta d'escorxadors. Els resultats de l'ANOVA (annex 1h) indiquen que no es poden considerar significatives les diferències entre els sis escorxadors estudiats pel que fa a contaminació per bacteris proteolítics.

2.3.3.9 Nivells globals de contaminació

La sang recollida en tots els escorxadors presenta una càrrega microbiana molt elevada, tant de microorganismes indicadors de contaminació general com dels diferents grups específics de microorganismes investigats. La presència d'aquests elevats nivells de contaminació microbiològica i de grups de microorganismes amb activitat deteriorant i/o potencialment patògens fa que la qualitat d'aquesta sang no es pugui considerar adequada com a matèria primera de productes destinats a alimentació humana.

En la figura 2.11 es representen els valors mitjans globals dels recomptes obtinguts per cada tipus o grup de microorganismes investigat.

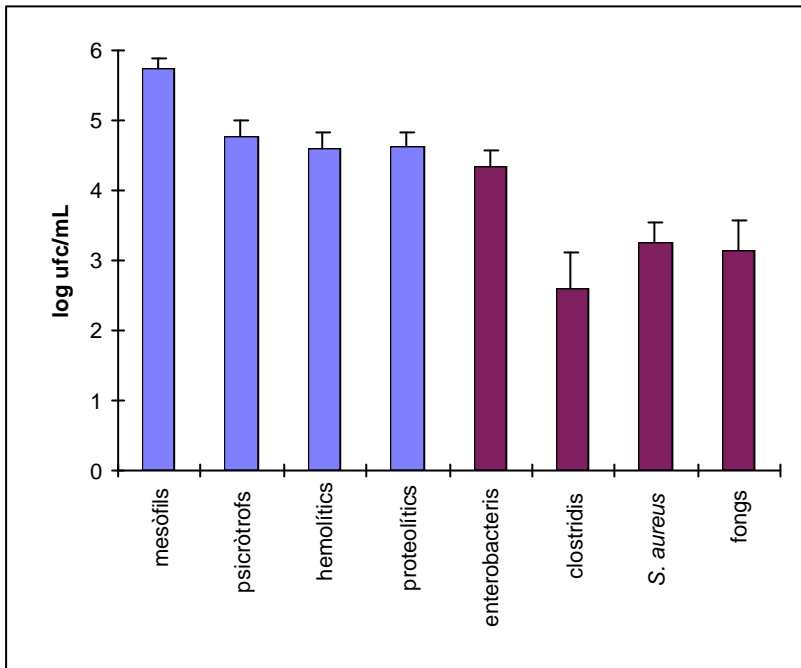


Figura 2.11. Contaminació microbiològica global de la sang (log ufc/mL). Mitjana i interval de confiança (95%).

Cap dels escorxadors sembla utilitzar un sistema prou eficaç per assegurar sang amb una qualitat microbiològica acceptable. Les petites modificacions en els sistemes de recollida i emmagatzematge d'alguns escorxadors no impliquen cap millora substancial en la càrrega contaminant de la sang, tot i que els recomptes més baixos d'alguns grups específics de microorganismes (psicròtrofs, fongs i llevats, *S.aureus* i bacteris proteolítics) en l'escorxador E ens porten a pensar que el processament immediat de la sang recollida és una de les mesures que pot tenir alguna incidència en la qualitat microbiològica del producte.

De la mateixa manera, s'ha observat que en diverses ocasions (mesòfils, psicròtrofs, fongs i llevats, *S.aureus*, bacteris proteolítics) els recomptes més elevats de microorganismes han correspost a l'escorxador F, que no disposa d'un sistema de refrigeració ràpid com a pas previ a l'emmagatzematge. Aquest fet ens confirma que, en cas de no poder-la processar immediatament, és preferible que la refrigeració de la sang es faci el més ràpidament possible.

L'escorxador D, tot i no presentar nivells de contaminació significativament més baixos que la resta d'escorxadors estudiats, ha estat el que ha donat alguns dels recomptes mitjans més baixos en gairebé tots els grups (mesòfils, fongs i llevats, enterobacteris,

clostridis, *S.aureus* i proteolítics). Cal tenir en compte que aquest era l'únic escorxador del qual totes les mostres analitzades tenien un temps de residència dins el dipòsit refrigerat superior a 24 hores i, per tant, la contribució als recomptes elevats que representa el creixement durant l'emmagatzematge té més pes que en altres escorxadors. El sistema de dessagnat amb l'animal estirat, en posició horitzontal, practicat per aquest escorxador, sembla, doncs, que pot tenir algun efecte sobre la reducció de la contaminació global, i la d'origen fecal en particular. Amb aquests resultats podríem concloure, però, que l'efecte positiu d'aquesta mesura no és significatiu si no va acompanyada d'una ràpida utilització i/o processament de la sang recollida.

2.3.3.10 Influència del sistema de dessagnat. Origen de la contaminació

Per tal de confirmar l'encert dels resultats que es derivaven d'aquest estudi es va plantejar repetir els mostrejos per fer anàlisis microbiològiques en dos escorxadors (identificats com a A i B) durant els dos anys següents, incorporant un quart període de mostreig, corresponent a l'estiu, amb l'objectiu de cobrir les característiques climatològiques particulars de totes les estacions de l'any. Cal tenir present que els escorxadors A i B d'aquest estudi no coincideixen amb els que s'havien anomenat A i B en l'estudi de caracterització.

Es va afegir també un segon punt de mostreig -el sagnador- amb la finalitat de comprovar si l'elevada càrrega contaminant de la sang dels dipòsits era deguda a deficientes condicions higièniques del mateix procés de dessagnat o al tractament posterior de la sang recollida (contaminació durant el transport fins al dipòsit o condicions d'emmagatzematge inadequades que afavoreixen el creixement de la microbiota contaminant).

En la taula 2.6 es mostra el resultat de l'anàlisi de la variància (annex 2a i 2b) pels recomptes de microorganismes aeròbics mesòfils i psicròtrofs que permet determinar quin dels factors estudiats afecta significativament els nivells de càrrega contaminant de la sang. Segons aquesta anàlisi existeixen diferències significatives entre els recomptes d'aerobis mesòfils efectuats en diferents èpoques de l'any. L'anàlisi per separat de les dades de contaminació mesòfila de cadascun dels escorxadors (annex 2a) confirma l'existència de diferències significatives entre períodes, observades en el model global, només en el cas de l'escorxador A, mentre que en l'escorxador B, tot i que la tendència seria la mateixa, l'anàlisi estadística no considera prou significatives les diferències entre períodes. L'estudi per separat de les mostres procedents dels dos punts de mostreig confirma en ambdós casos les diferències entre recomptes de microorganismes aeròbics mesòfils segons el període de l'any.

Taula 2.6. Efecte de l'origen, l'escorxador i el període de mostreig sobre els recomptes de bacteris aeròbics mesòfils i psicròtrofs. Resultats de l'ANOVA.

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	Mesòfils		Psicròtrofs	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Escorxador	1	0,22	0,6417	0,80	0,3739
Origen	1	2,34	0,1295	10,4	0,0018
Període	3	4,22	0,0078	4,63	0,0048
Esc. * Origen	1	0,01	0,9311	1,19	0,3173
Origen * Període	3	1,16	0,3281	1,25	0,2662
Esc. * Període	3	2,03	0,1160	0,26	0,8552
Esc.* Orig.* Per.	3	0,44	0,7239	0,93	0,4307

En la figura 2.12 es presenta el resultat del test de separació de mitjanes amb totes les dades i considerant només l'efecte dels diferents períodes de mostreig. L'anàlisi separa dos grups de mitjanes -les corresponents a l'hivern ($5,64 \pm 0,20$ log ufc/mL), significativament més baixes que les de l'estiu ($6,12 \pm 0,18$ log ufc/mL) i la tardor ($6,07 \pm 0,28$ log ufc/mL)- i no considera la mitjana dels recomptes de primavera ($5,78 \pm 0,26$ log ufc/mL) diferent de cap de les mitjanes dels altres períodes.

Aquest resultat serveix per verificar les conclusions de l'estudi de caracterització microbiològica on participaven els sis escorxadors, ja que també s'havien obtingut nivells de contaminació mesòfila inferiors durant el mostreig corresponent al període d'hivern.

El fet que no s'obtinguin diferències degudes a l'origen de les mostres ens indica que la contaminació microbiològica més important es dona ja a nivell de sagnador, durant la primera etapa del procés de recollida, i que, per tant, seria en aquest punt on caldria millorar d'entrada les condicions higièniques. Les recomanacions que caldria fer serien doncs extremer les precaucions pel que fa a desinfecció del ganivet i de la pica receptora, netejar la pell de l'animal prèviament al sacrifici i minimitzar la caiguda al sagnador de substàncies alienes a la pròpia sang.

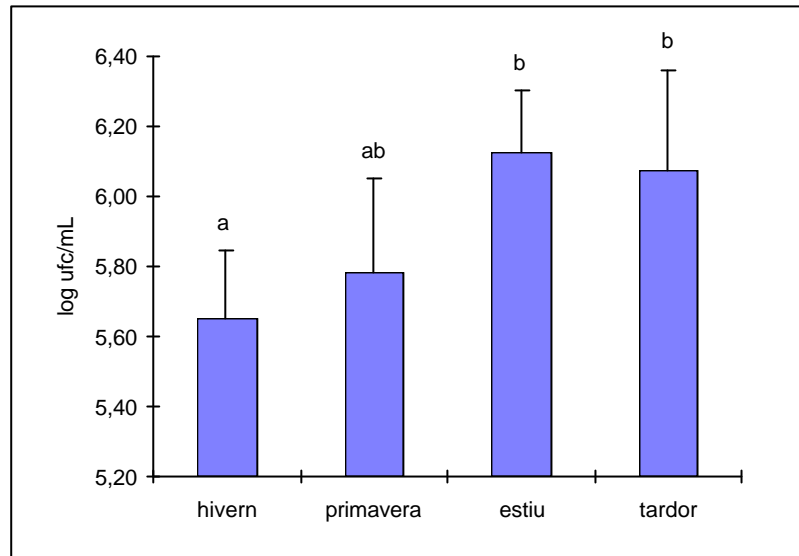


Figura 2.12. Recòmptes de bacteris mesòfils (log ufc/mL) per cadascun dels períodes. Mitjanes \pm intervals de confiança (95%) dels mostrejos de dos anys en dos escorxadors. Les lletres minúscules indiquen el resultat del test de separació de mitjanes (Tukey-Kramer $\alpha=0,05$).

Tampoc s'han observat diferències importants entre els dos escorxadors en els recòmptes d'aerobis mesòfils i, per tant, podem confirmar que el canvi a un sistema horitzontal (escorxador B), tal com havíem pronosticat, no és suficient per reduir els riscos de contaminació general.

Pel que fa als recòmptes de microorganismes aeròbics psicròtrofs l'anàlisi estadística (annex 2b) mostra que en aquest cas és significatiu l'efecte tant del període de mostreig com de l'origen de les mostres (sagnador o dipòsit). Els recòmptes de microorganismes psicròtrofs són sempre, per a tots els períodes, inferiors en les mostres recollides en el sagnador, tot i que les diferències només són significatives en el cas de l'escorxador A. Probablement les diferències entre les mostres del sagnador i del dipòsit siguin degudes al fet que, en partir de valors més baixos, el creixement en el dipòsit -afavorit per les condicions de refrigeració- d'aquest grup de microorganismes es fa apreciable i per tant, relativament més important que el del conjunt de microorganismes mesòfils.

En la figura 2.13 es presenta el resultat del test de separació de mitjanes considerant l'efecte dels diferents períodes de mostreig sobre mostres de procedència diferent. L'anàlisi per separat de les mostres de diferent origen indica que les diferències entre els períodes de mostreig són més importants en les mostres recollides en el sagnador ($P < 0,05$) que en les del dipòsit. Malgrat això, el test de separació de mitjanes de les

dades en conjunt distingeix dos grups que coincideixen amb els que s'havien obtingut en el cas dels microorganismes mesòfils: recomptes més baixos a l'hivern ($4,68 \pm 0,23$ log ufc/mL) i més elevats a l'estiu ($5,22 \pm 0,21$ log ufc/mL) i la tardor ($5,20 \pm 0,36$ log ufc/mL), mentre que els de primavera ($4,95 \pm 0,21$ log ufc/mL) no difereixen significativament de cap dels altres grups.

En aquest cas, doncs, també s'aprecia l'efecte estacional sobre els microorganismes psicròtrofs que s'havia observat en l'estudi anterior (recomptes més baixos a l'hivern) i, a més, coincideix amb la influència que tenia el període de mostreig sobre la microbiota mesòfila, tot i que pels psicròtrofs es fa més evident en les mostres recollides en el sagnador. Això és lògic si tenim en compte que la majoria de microorganismes mesòfils que componen la microbiota contaminant són probablement psicròtrofs i si considerem que el creixement d'aquest grup de microorganismes en el dipòsit tendeix a homogeneïtzar els recomptes.

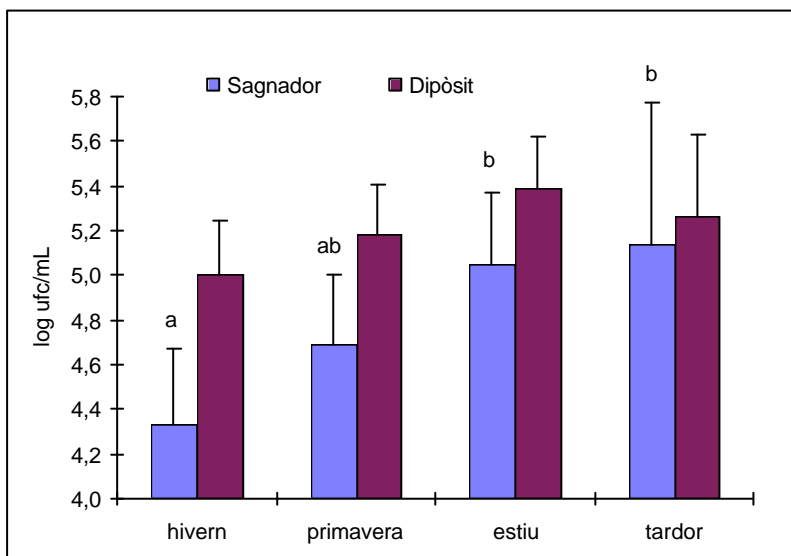


Figura 2.13. Recomptes de bacteris psicròtrofs (log ufc/mL) per cadascun dels períodes i dels dos punts de mostreig. Mitjanes \pm intervals de confiança (95%) dels mostrejos de dos anys en dos escorxadors. Les lletres minúscules indiquen el resultat del test de separació de mitjanes (Tukey-Kramer $\alpha=0,05$).

En la taula 2.7 es mostra el resultat de l'anàlisi de la variància pels recomptes de microorganismes d'origen fecal (enterobacteris i clostridis sulfit-reductors) i *Staphylococcus aureus*.

Taula 2.7. Efecte de l'origen, l'escorxador i el període de mostreig sobre els recomptes d'enterobacteris, clostridis sulfit-reductors i *Staphylococcus aureus*. Resultats de l'ANOVA.

Font de variació	g.l.	Enterobacteris		Clostridis s.r.		<i>S. aureus</i>	
		F	P	F	P	F	P
Escorxador	1	7,57	0,0073	6,99	0,0098	1,62	0,2068
Origen	1	5,42	0,0222	1,19	0,2785	1,70	0,1961
Període	3	5,52	0,0016	3,32	0,0235	2,43	0,0708
Esc. * Origen	1	2,53	0,0623	0,20	0,8940	0,19	0,9043
Origen * Període	3	2,05	0,1562	4,36	0,0398	0,33	0,5667
Esc. * Període	3	4,57	0,0051	1,37	0,2584	1,15	0,3336
Esc.* Orig.* Per.	3	1,11	0,3511	0,12	0,9475	0,40	0,7502

De l'anàlisi dels resultats obtenim que totes les fonts de variació considerades tenen un efecte significatiu sobre els resultats dels recomptes d'enterobacteris i, per tant, que hi ha diferències entre els dos escorxadors -l'escorxador A presenta una mitjana dels recomptes més elevada ($4,64 \pm 0,19$) que l'escorxador B ($4,23 \pm 0,25$)-, entre mostres de diferent procedència -les recollides al sagnador donen una mitjana inferior ($4,27 \pm 0,26$) que les del dipòsit ($4,60 \pm 0,18$)- i entre períodes de mostreig -la contaminació per enterobacteris de les mostres recollides a l'hivern té una mitjana significativament més baixa ($4,02 \pm 0,28$) que les de la resta de períodes ($4,6 \pm 0,34$; $4,64 \pm 0,27$ i $4,61 \pm 0,33$)-. S'observa també un efecte significatiu de la interacció escorxador i període que indica que l'efecte estacional és diferent en cadascun dels escorxadors. L'estudi per separat dels resultats de cada escorxador indica que és l'escorxador B el que té un pes específic més important sobre el model global, ja que és en l'únic on les diferències entre períodes comentades són clares ($P < 0,05$).

L'anàlisi estadística indica també que les diferències en el recompte d'enterobacteris entre els dos escorxadors són només significatives en les mostres del sagnador, fet que queda reflectit en la figura 2.14. De la mateixa manera es veu que l'efecte estacional és molt significatiu en les mostres del sagnador i no ho és en les del dipòsit.

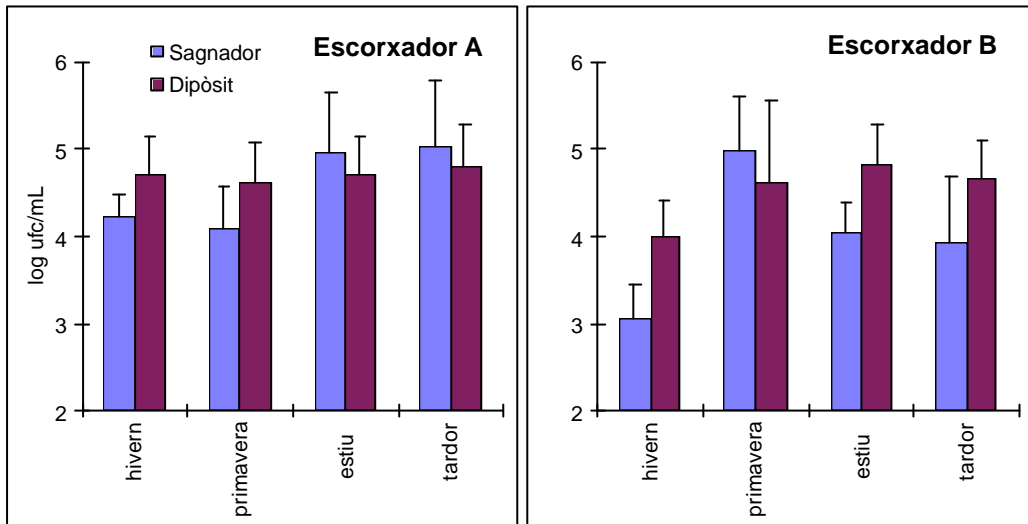


Figura 2.14. Recòmptes d'enterobacteris (log ufc/mL) per cadascun dels períodes i dels dos punts de mostreig. Mitjanes \pm intervals de confiança (95%) dels mostrejos de dos anys en cadascun dels escorxadors.

Si comparem aquests resultats amb els que havíem obtingut en el treball de caracterització comentat anteriorment podem comprovar que, una altra vegada, els recomptes d'enterobacteriàcies són inferiors en l'escorxador que utilitza un sistema de dessagnat amb l'animal estirat, malgrat que les diferències entre ambdós escorxadors no resulten estadísticament significatives en les mostres recollides en els dipòsits d'emmagatzematge. Probablement, com en el cas de la microbiota psicròtrofa, sigui degut a què el creixement durant el transport i emmagatzematge emmascara l'efecte sobre la contaminació fecal que podria tenir el mètode de dessagnat, que sembla evident si considerem només les mostres recollides del sagnador.

En referència a l'estudi dels recomptes de clostridis cal dir, en primer lloc, que s'ha fet l'anàlisi de la variància tot i no haver obtingut una distribució normal de les dades i havent comprovat que les variàncies no són homogènies. Els resultats de l'estudi estadístic s'han d'interpretar, per tant, tenint en compte aquestes limitacions. Això pot ser degut en part a la gran variabilitat en els recomptes d'aquest grup de bacteris i al fet que en varies mostres no s'ha detectat la seva presència. Malgrat els resultats de significació de les

diferents fonts de variació aportats pel model global (Taula 2.7), que considera important l'efecte de l'escorxador i del període de mostreig, l'anàlisi per separat de cada escorxador no considera significatives les diferències entre períodes. Pel que fa a l'anàlisi de les mostres del sagnador independentment de les del dipòsit s'arriba a concloure que per aquestes últimes no s'observen diferències entre escorxadors, mentre que per les mostres del sagnador l'escorxador B dona recomptes significativament inferiors a l'escorxador A.

Aquesta diferència en els nivells de contaminació per clostridis es podria correlacionar amb els resultats obtinguts en el cas dels enterobacteris, ja que ambdós grups pertanyen a una microbiota d'origen fecal.

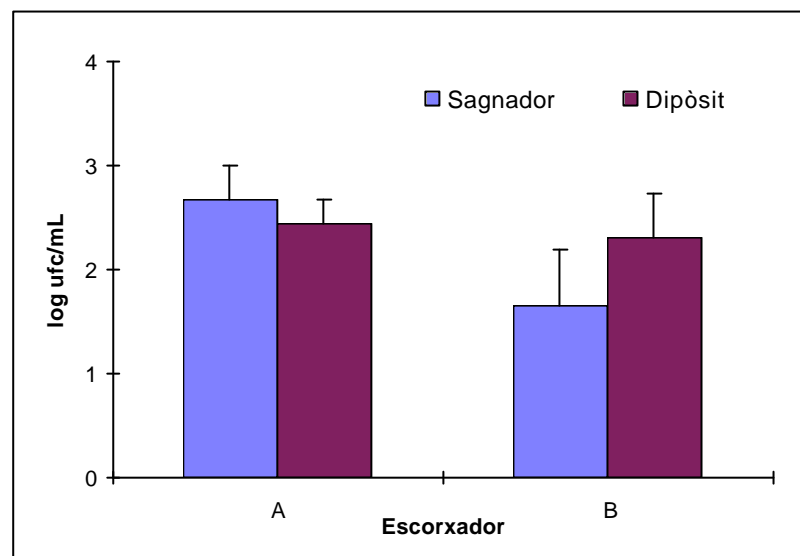


Figura 2.15. Recòmptes de clostridis sulfít-reductors (log ufc/mL) per cadascun dels escorxadors i dels dos punts de mostreig. Mitjanes \pm intervals de confiança (95%) dels mostrejos de tots els períodes durant dos anys.

Sembla doncs que el sistema de dessagnat amb l'animal en posició horitzontal redueix la contaminació fecal però que la disminució no és suficient per garantir una sang amb nivells acceptables de contaminació.

L'estudi estadístic dels resultats dels recomptes de *Staphylococcus aureus* (Taula 2.7) no ha donat un efecte significatiu en cap de les possibles fonts de variació, indicant així que les diferències entre els dos escorxadors estudiats no es poden considerar

significatives i que els recomptes no varien en funció del període de mostreig ni de la procedència de les mostres analitzades.

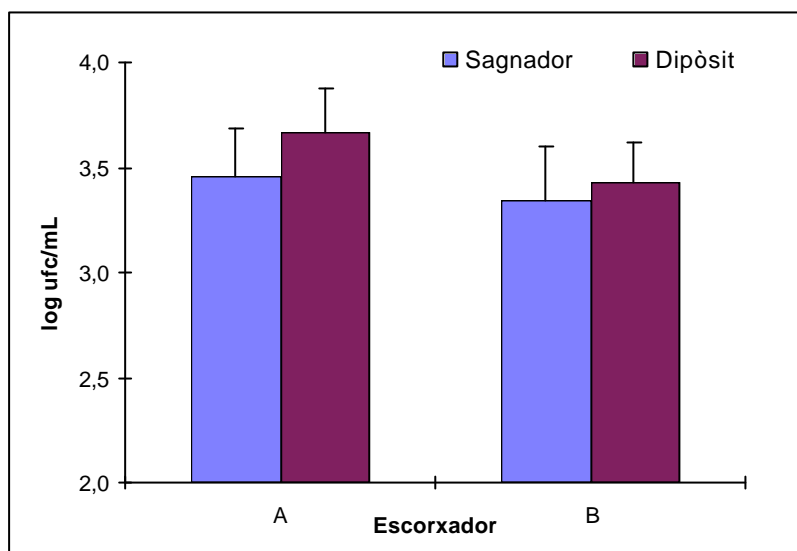


Figura 2.16. Recòmptes de *Staphylococcus aureus* per cadascun dels escorxadors i dels dos punts de mostreig. Mitjanes \pm intervals de confiança (95%) dels mostrejos dels quatre períodes durant dos anys.

Malgrat això, s'observa també que els recomptes de l'escorxador B han estat gairebé sempre inferiors als de l'escorxador A, amb mitjanes de $3,39 \pm 0,16$ log ufc/mL en el primer cas i de $3,57 \pm 0,15$ log ufc/mL, en el segon (Figura 2.16). Potser aquesta diferència, observada també en el primer estudi, es podria atribuir a que el sistema de dessagnat en posició horitzontal redueix la contaminació per microorganismes procedents de la pell de l'animal (com poden ser els estafilococs) perquè dificulta que el líquid de rentat que regalima de l'animal es barregi amb la sang.

2.3.4 Estudi de l'hemòlisi

2.3.4.1 Determinació per espectrofotometria

S'ha comentat en la caracterització bioquímica (apartat 2.3.2.3) que el component principal de la fracció cel·lular, obtinguda a partir de la centrifugació de la sang sencera, és l'hemoglobina, una proteïna que conté ferro i que proporciona el color vermell característic de la sang. Una coloració vermella del plasma indica que les membranes que envolten els glòbuls vermells s'han trencat i els eritròcits han alliberat a la solució el seu contingut proteic; aquest fet és el que s'anomena hemòlisi.

L'hemòlisi es produeix en solucions hipotòniques, amb una pressió osmòtica inferior a la de la sang, que donen lloc a un augment de la turgència de les cèl·lules per absorció d'aigua i finalment provoquen la lisi o trencament de la membrana. Es pot produir també per contacte de la sang amb dissolvents orgànics que afecten els components de naturalesa lipídica de la membrana cel·lular. Canvis grans o sobtats de temperatura, processos de congelació o danys físics a la membrana provocats durant el tractament mecànic de la sang, també poden causar l'hemòlisi dels eritròcits (Filstrup, 1980).

No interessa que el plasma que s'obté a partir de la sang recollida presenti concentracions elevades d'hemoglobina, per una part, pels problemes que comporta de coloracions no desitjades en el producte i, per una altra, per prevenir processos de desenvolupament de ranciesa oxidativa dels greixos, ja que el ferro de l'hemoglobina actua com a catalitzador d'aquest tipus de reaccions. Segons Lynn Knipe (1988) l'hemoglobina en combinació amb el contingut relativament alt de greix en el plasma pot provocar gustos i aromes anòmals.

Per tant, per obtenir plasma net després de la centrifugació s'han de tenir en compte una sèrie de factors, que inclouen:

(1) Procurar no barrejar la sang amb cap solució hipotònica, per exemple evitant la caiguda dins el sagnador d'aigua que pot regalimar de la pell de l'animal després de rentar-lo, prenent precaucions especials durant l'addició de l'anticoagulant i assegurant que els dipòsits de recollida i les conduccions estiguin completament secs, sense restes d'aigua de les operacions de neteja.

(2) Evitar un tractament mecànic massa brusc que provoqui el trencament dels eritròcits. Amb un acurat tractament de la sang en els conductes, unions i vàlvules es pot minimitzar l'hemòlisi. Per exemple, es pot evitar la utilització de bombes centrífugues, que poden causar danys innecessaris als eritròcits, i procurar que la sang flueixi cap al

recipient de recollida sense provocar esquitxos, preferentment rrelliscant per la paret del dipòsit.

L'estudi comparatiu del nivell d'hemòlisi s'ha fet, tal com s'indica en l'apartat de material i mètodes (2.2.4.4), a partir de les lectures d'absorbància a 414 nm de les mostres de plasma obtingudes per centrifugació de la sang. S'havia determinat prèviament l'espectre d'absorció del sobrenedant d'un lisat d'eritròcits de sang de porc (provocant un xoc osmòtic amb l'addició d'aigua destil·lada a la fracció cel·lular separada per centrifugació) per conèixer la longitud d'ona corresponent al pic de màxima absorció de l'hemoglobina de les mostres, que va ser a 414 nm. El grup hem presenta les dues bandes d'absorció en el camp visible característiques de tots els pigments d'estructura tetrapirròlica, una amb un màxim entre 550 i 660 nm, anomenada *banda Q*, i amb longitud d'ona variable en funció de l'estat del grup hem (unit o no a una molècula d'oxigen, amb el ferro en forma oxidada o reduïda, etc.). I una altra amb un màxim d'absorció cap als 430 nm, que s'anomena *banda B o de Soret*, molt més intensa. Aquesta última és la que correspondria a la banda utilitzada en aquest estudi, amb un pic a 414 nm en les mostres, i a 405 nm en el patró de metahemoglobina utilitzat per fer la quantificació. És una zona de l'espectre que permet apreciar amb gran sensibilitat el poder colorant de l'hemoglobina, i que per tant, ha estat útil per comparar el nivell d'hemoglobina residual present en el plasma com a conseqüència de l'hemòlisi dels eritròcits.

Els resultats de les determinacions del grau d'hemòlisi, obtinguts fent les mitjanes de les tres determinacions per a cada període i per a cadascun dels escorxadors, es mostra en la figura 2.17.

En l'anàlisi de la variància de les dades transformades en logaritmes (annex 3a) no s'han obtingut diferències significatives entre períodes però sí entre els escorxadors. S'ha fet també una separació de mitjanes dins de cada escorxador per estudiar la incidència del període de mostreig en cadascun per separat i una dins de cada període. S'ha utilitzat el test de REGW amb un nivell de significació de 0,05. Els resultats dels valors *F* i de probabilitat per a cadascun dels casos s'expressa en la taula 2.8, així com la separació de mitjanes.

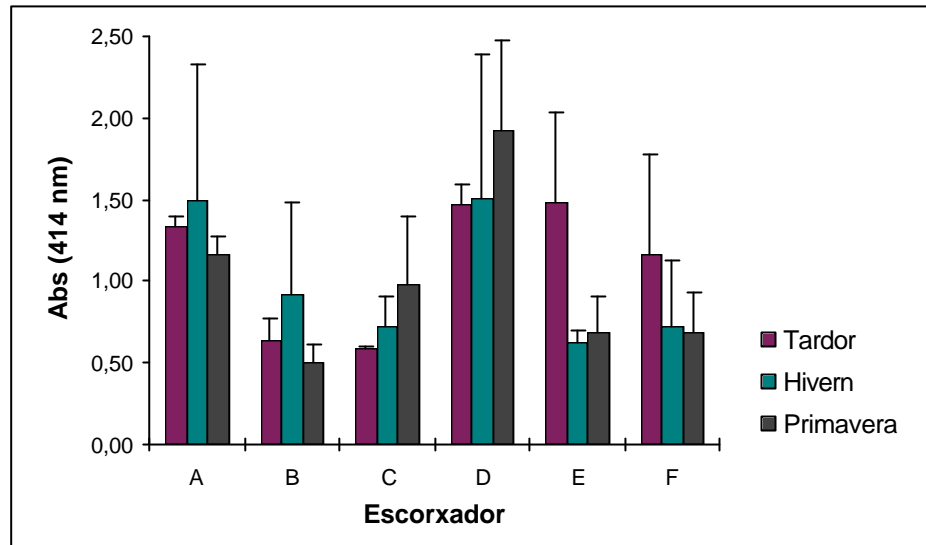


Figura 2.17. Determinacions del grau d'hemòlisi (Abs a 414 nm) per a cada escorxador i per a cada període. Mitjana i interval de confiança (95%).

Els resultats del test de separació de mitjanes indica que les diferències entre la mitjana del grau d'hemòlisi de les mostres dels diferents escorxadors són significatives. S'obtenen dos grups de mitjanes i els escorxadors A i D són els que presenten nivells més alts d'hemòlisi, fet que comentarem en l'apartat de quantificació. No són significatives, en canvi, les diferències entre els tres períodes de mostreig considerats globalment. L'anàlisi separada per a cada escorxador indica que només en l'escorxador E es pot separar la mitjana del primer període de mostreig, més alta, de les dels períodes d'hivern i primavera, les quals no difereixen significativament entre elles.

En aquest escorxador, durant el primer període, l'addició de l'anticoagulant es feia de manera discontinua (amb una cadència de 100 animals sacrificats). S'afegia tot el volum de solució necessària per a uns 300 litres de sang i s'assegurava la mescla amb la que anava caient a la pica de recepció mitjançant barreja mecànica. Evidentment aquest sistema provocava més hemòlisi per trencament dels eritròcits que durant el segon i tercer períodes, quan ja s'havia canviat el sistema de dosificació i s'utilitzava, igual que en la resta d'escorxadors, una dosificació més continuada i per aspersion, sense necessitat de barrejar mecànicament el conjunt. Aquests resultats confirmarien el fet que entre els factors importants que determinen el grau d'hemòlisi destaquen tant el tractament mecànic al qual està sotmesa la sang durant el procés de recollida, com les diferències de pressió osmòtica provocades en aquest cas per l'addició d'un volum molt gran de solució anticoagulant. El sistema d'addició per aspersion, que permet assolir els mateixos

nivells de concentració final d'anticoagulant afegint petits volums de solució de manera contínua és, doncs, el sistema de dosificació més adequat.

Taula 2.8. ANOVA i separació de mitjanes del grau d'hemòlisi (Abs a 414 nm)

Escorx.	Tardor	Hivern	Primavera	mitjana \pm i.c.	Prob >F
A	1,34 \pm 0,06 A a	1,50 \pm 0,83 A a	1,16 \pm 0,12 A ab	1,34 \pm 0,26 a F: 0,4068	0,6828
B	0,63 \pm 0,13 A b	0,92 \pm 0,56 A a	0,50 \pm 0,11 A c	0,71 \pm 0,23 b F: 1,2851	0,3545
C	0,59 \pm 0,02 A b	0,72 \pm 0,19 A a	0,98 \pm 0,42 A abc	0,76 \pm 0,17 b F: 2,0270	0,2125
D	1,47 \pm 0,11 A a	1,51 \pm 0,88 A a	1,93 \pm 0,55 A a	1,64 \pm 0,33 a F: 0,7724	0,5029
E	1,49 \pm 0,54 A a	0,63 \pm 0,07 B a	0,69 \pm 0,22 B bc	0,66 \pm 0,29 b F: 9,3227	0,0206
F	1,16 \pm 0,61 A ab	0,73 \pm 0,40 A a	0,69 \pm 0,25 A bc	0,86 \pm 0,27 b F: 1,3167	0,3357
mitj. \pm i.c.	1,09 \pm 0,12 A	1,00 \pm 0,15 A	1,02 \pm 0,15 A		
F	9,1271	2,4608	7,3296		
Prob > F	0,0012	0,0934	0,0030		

Mitjana \pm interval de confiança (95%) per a cada escorxadador i per a cada període de mostreig. Les lletres darrera els valors indiquen els grups de mitjanes obtinguts a partir del test REGW: les lletres majúscules diferents indiquen diferències significatives entre mitjanes dels diferents períodes i, les lletres minúscules diferències significatives entre mitjanes d'escorxadadors.

2.3.4.2 Quantificació

Es va fer l'espectre d'absorció (Figura 2.18) des de 200 fins a 800 nm d'una solució del patró de metahemoglobina de porc en aigua destil·lada per determinar la longitud d'ona corresponent al pic de màxima absorbància que utilitzaríem per realitzar la recta patró, que va resultar de 405 nm. La quantificació aproximada de la concentració d'hemoglobina en plasma que representaven els valors d'absorbància llegits es va fer a partir d'una recta

de calibratge (Figura 2.19) amb concentracions conegudes d'aquest mateix patró de metahemoglobina. La corba de calibratge obtinguda va ser:

$$y = 0,0066 x + 0,0555 \text{ (R}^2: 0,995\text{)}.$$

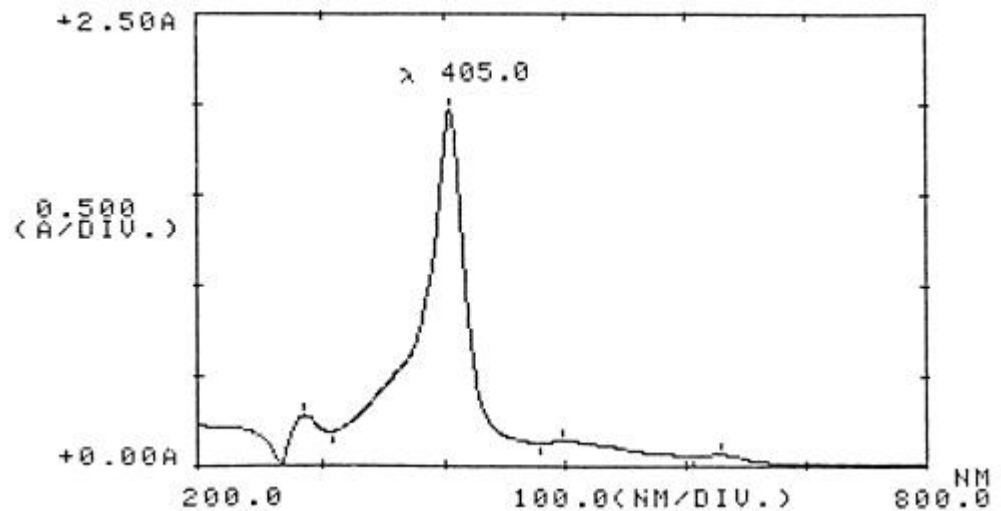


Figura 2.18. Espectre d'absorció d'una solució de metahemoglobina de porc.

Es va utilitzar la mitjana del valor d'absorbància a 414 nm de 4 mostres de sang obtingudes directament del torrent sanguini de l'animal, per tant poc hemolític, com a valor basal aproximat d'absorbància a 414 nm d'altres molècules plasmàtiques diferents de l'hemoglobina. Es va restar aquest valor d'absorbància no atribuïble a presència d'hemoglobina i, per tant, independent del grau d'hemòlisi de la sang, als valors d'absorbància obtinguts per les diferents mostres analitzades. El valor mig d'absorbància del plasma no hemolític a 414 nm obtingut va ser 0,322.

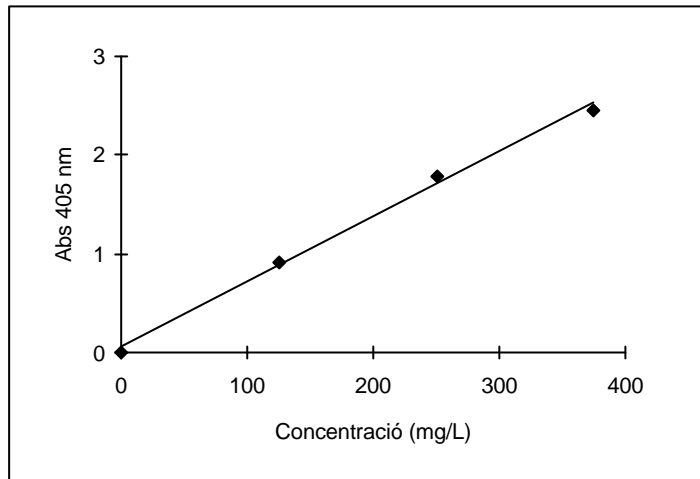


Figura 2.19. Recta de calibratge entre l'absorbància a 405 nm i la concentració de solucions de metahemoglobina de porc. $y = 0,0066 x + 0,0555$ ($R^2 : 0,995$).

La lectura de concentració es va fer utilitzant la recta de calibratge de la figura 2.19, malgrat que el patró utilitzat és metahemoglobina, és a dir, d'hemoglobina amb el ferro del grup hemo oxidat (Fe^{3+}) i s'observa un efecte hipsocrom de desplaçament del pic d'absorbància màxima des dels 414 nm, que obteníem en les mostres amb el ferro del grup hemo en forma reduïda (Fe^{2+}), fins als 405 nm del patró. No es va poder avaluar l'efecte sobre el nivell d'absorbància que suposava aquest desplaçament i, per tant, els valors de la quantificació no es poden considerar com a valors reals sinó una aproximació al contingut d'hemoglobina en el plasma de les mostres analitzades. L'efecte hipsocrom acostuma a anar acompanyat d'una disminució en l'absorbància i, per tant, suposem que els valors de concentració que donem són una aproximació per excés del contingut real d'hemoglobina en les mostres de plasma analitzades.

Els valors aproximats de concentració obtinguts per a cada escorxadador van ser els que es mostren en la taula 2.9.

Existeixen diferències entre mostres procedents de diferents escorxadors: les mitjanes dels escorxadors A i D (que en l'anàlisi quantitativa van arribar a donar concentracions de l'ordre de 1500 mg/L i valors mínims del mateix ordre que els màxims de B i C) són significativament més altes que les dels escorxadors B, C (que mai havien donat valors de concentració superiors a 800 mg/L i la majoria de les mostres fins i tot molt per sota) i de E i F (amb valors que, com a màxim i només en dues ocasions, van arribar als 1000 mg/L).

Taula 2.9. Valors aproximats de concentració d'hemoglobina en plasma

<i>Escorxador</i>	<i>interval de concentració d'hemoglobina (mg/L)</i>		
	Tardor	Hivern	Primavera
A	682-761	470-1491	514-667
B	92-254	110-831	51-134
C	147-160	159-398	147-687
D	746-897	467-1535	776-1492
E	629-1050	139-222	78-361
F	230-1036	104-572	85-415

Coincideix que els escorxadors que presenten un nivell més alt d'hemòlisi són també els dos que afegien el volum més alt de solució de citrat sòdic com a anticoagulant (una concentració final del 0,8 %). Tots els escorxadors partien d'una solució anticoagulant amb la mateixa concentració, per tant els que arriben a una concentració final en sang més alta són els que addicionaven un volum de solució més elevat. És possible que l'addició d'anticoagulant sigui doncs una de les causes de l'alt grau d'hemòlisi, tenint en compte que potser la formulació de la solució no sigui la més adequada per assegurar la isotonicitat amb el contingut citoplasmàtic dels eritròcits.

2.3.4.3 Evolució de l'hemòlisi en mostres conservades en refrigeració

De l'estudi sobre l'efecte que pot tenir el període d'emmagatzematge a temperatures de refrigeració en el progrés de l'hemòlisi de les mostres de sang es dedueix, en primer lloc, que es dona un increment lineal de l'hemòlisi durant els primers dies d'emmagatzematge. Per tant, quant més s'endarrereixi el processament de la sang recollida, o almenys la separació per centrifugació, pitjor serà la qualitat del plasma que s'obtingui (contindrà concentracions més elevades d'hemoglobina i presentarà un color més fosc). Aquest fet explica, en part, la mitjana del grau d'hemòlisi més baixa obtinguda en l'escorxador E, del qual es va analitzar sang fresca sense refrigerar. L'efecte de la refrigeració sobre l'hemòlisi dels glòbuls rojos i, per tant, sobre la qualitat del plasma, ha estat constatat per Lynn Knipe (1988) i Halliday (1973) que recomana la separació per centrifugació dins els 20 minuts que segueixen la recollida de la sang i abans de la refrigeració. Tot i que Akers (1973) va publicar que una pre-refrigeració de la sang sencera abans de la separació incrementa el rendiment en plasma.

En realitzar el present estudi es va observar que l'increment del grau d'hemòlisi amb el temps, tot i partir de nivells més baixos, progressava més ràpidament en les mostres de l'escorxador E (que utilitza polifosfat com a anticoagulant) que en les de la resta d'escorxadors (que utilitzen citrat sòdic tribàsic).

La figura 2.20 mostra l'increment, al llarg del temps, en el valor d'absorbància a 414 nm del plasma de les mostres de sang de cada escorxador mantingudes en refrigeració, per a la primera setmana de mostreig:

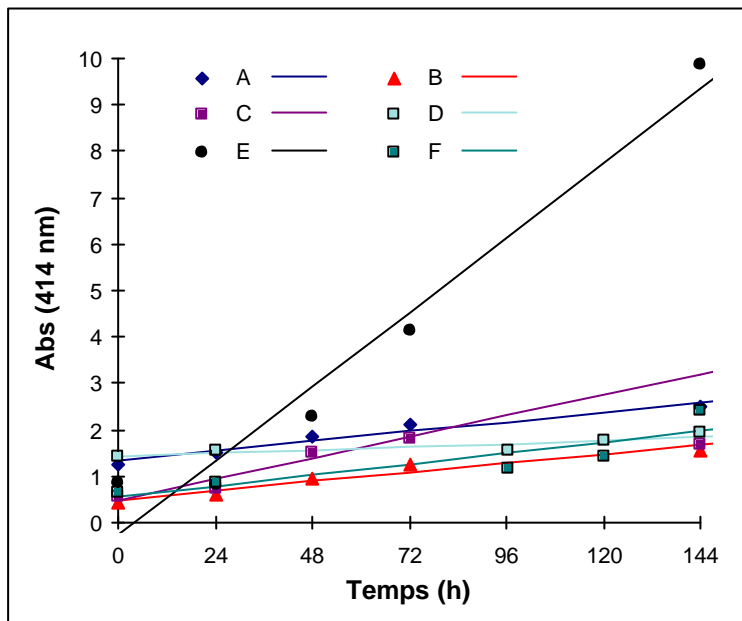


Figura 2.20. Evolució del grau d'hemòlisi de les mostres mantingudes en refrigeració. S'indiquen els valors experimentals obtinguts durant la primera setmana de mostreig i es dibuixa la recta de regressió per a cada escorxador.

Per tal d'estudiar l'evolució del grau d'hemòlisi de les mostres i després de comprovar que la cinètica absorbància/temps és pràcticament lineal, almenys durant els primers dies d'emmagatzematge, es va decidir ajustar, per regressió lineal, les dades obtingudes per a cada escorxador i comparar els pendents (velocitats d'hemòlisi) obtinguts en cada cas (annex 3b).

Es va realitzar una anàlisi de la variància amb els valors dels pendents de les rectes de regressió per comprovar si les diferències entre escorxadors pel que fa a la cinètica d'evolució del grau d'hemòlisi es podien considerar o no significatives. Els valors dels

pendents de les tres setmanes es van considerar repeticions per a cada escorxador. El resultat de l'ANOVA (annex 3b) considera significatiu l'efecte de la font de variació *Escorxador* i, per tant, s'ha fet el test de separació de mitjanes REGWQ ($\alpha=0,05$), el resultat del qual indica que la velocitat d'hemòlisi de l'escorxador E era significativament més alta que la dels altres escorxadors.

2.3.4.3.1 Influència del tipus d'anticoagulant

Les diferències en la cinètica d'evolució de l'hemòlisi, i el fet que l'escorxador E fos l'únic que utilitza polifosfat com a anticoagulant enlloc de citrat trisòdic, ens va portar a plantejar un experiment per determinar la possible influència del tipus d'anticoagulant utilitzat sobre l'evolució de l'hemòlisi de les mostres refrigerades.

Es va treballar també comparant els pendents de les rectes de regressió obtingudes. L'anàlisi de la variància amb els valors dels pendents de les rectes de regressió per comparar les mostres amb diferent anticoagulant (annex 3b1) indica que les diferències són molt significatives i, per tant, que el tipus d'anticoagulant utilitzat és un dels factors que determina que l'increment de l'hemòlisi en mostres de sang conservades en refrigeració sigui més o menys ràpid.

La figura 2.21 mostra l'increment en el valor d'absorbància a 414 nm del plasma de les mostres de sang amb cadascun dels anticoagulants, al llarg del temps. Per tant, es pot deduir que, en cas que no sigui possible la separació per centrifugació de manera immediata i la sang s'hagi de conservar refrigerada, és aconsellable la utilització de citrat sòdic com a anticoagulant enlloc de polifosfat, per minimitzar l'increment d'hemòlisi.

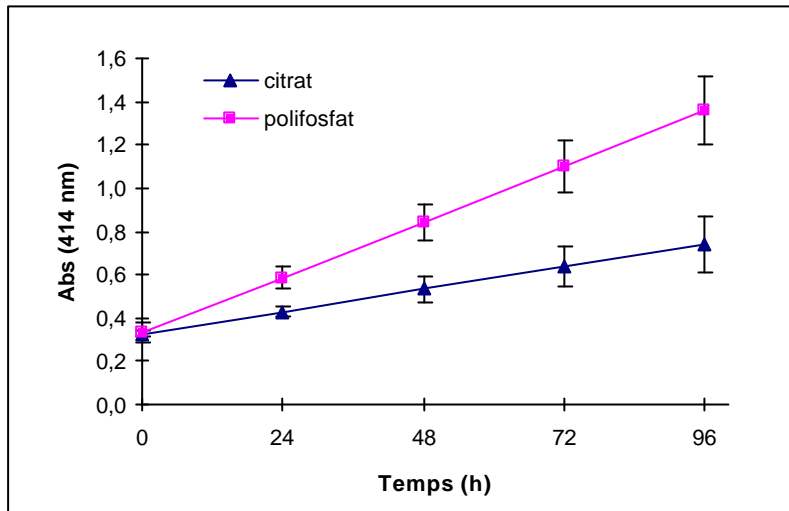


Figura 2.21. Evolució de l'hemòlisi de les mostres amb els dos tipus d'anticoagulant, mantingudes en refrigeració. Rectes de regressió calculades a partir de cinc repeticions. Es representen les mitjanes i l'interval de confiança (95%).

2.3.4.3.2 Influència de la càrrega microbiana

Les diferències entre els nivells de contaminació obtinguts en les mostres de plasma contaminades artificialment (apartat 2.2.2) no van ser prou importants com per considerar les mostres inoculades representatives de càrregues microbianes diferents. A partir d'aquí es va decidir estudiar la influència de la càrrega bacteriana només comparant dos grups arbitraris de mostres: unes amb contaminació elevada, 10^5 - 10^6 ufc/mL (les procedents dels punts de mostreig habituals) i unes amb càrrega microbiana baixa, 10^2 - 10^3 ufc/mL (les recollides directament de l'efluent de l'animal degollat).

Es van utilitzar els resultats de les mostres analitzades per cada escorxador durant el tercer període de mostreig de l'estudi d'evolució del grau d'hemòlisi, com a mostres amb una càrrega microbiològica inicial elevada, i les mostres de l'assaig de l'efecte de l'anticoagulant com a mostres amb càrrega microbiològica inicial baixa.

S'ha fet l'anàlisi de la variància per estudiar l'efecte de la càrrega microbiana incorporant també com a factor de variabilitat el tipus d'anticoagulant utilitzat (tenint en compte que entre les mostres a comparar n'hi havia amb els dos tipus d'anticoagulant i que, de l'estudi anterior, es coneixia que l'efecte de l'anticoagulant era important).

Del resultat de l'anàlisi estadística (annex 3b2) es desprèn que també la càrrega microbiana de les mostres de sang és un factor determinant de la rapidesa de l'hemòlisi de les mostres emmagatzemades en refrigeració ($P < 0,05$).

Ja s'ha comentat que els bacteris β -hemolítics solen representar un 10 % de la microbiota contaminant de la sang recollida en els escorxadors estudiats. El percentatge de bacteris β -hemolítics en sang de baixa contaminació no es va determinar perquè, fins i tot si es tractés del 100 %, podríem assegurar que la presència d'aquest grup en aquest tipus de sang és inferior a la de les mostres analitzades en l'estudi.

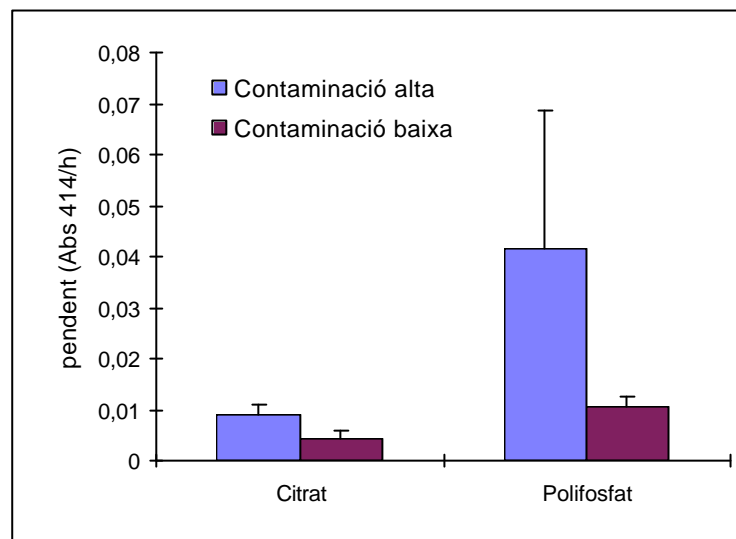


Figura 2.22. Increment d'hemòlisi per cadascuna de les combinacions d'anticoagulant i nivell de contaminació (pendent de la recta de regressió entre l'absorbància i el temps d'emmagatzematge). Mitjana i interval de confiança (95%).

No s'han pogut correlacionar els nivells d'aquest grup de microorganismes amb l'hemòlisi de la sang recollida pels escorxadors, potser perquè comparativament l'activitat d'aquests bacteris no contribueix de manera important en l'hemòlisi en relació als altres factors ja comentats (barreja amb solucions hipotòniques o trencament físic dels eritròcits).

Cal tenir en compte que la majoria de mostres pertanyien a sang amb menys de 12 hores de permanència fóra dels animals sacrificats i l'increment d'hemòlisi degut a la presència de bacteris β -hemolítics és òbviament depenent del temps. Això explicaria en part el fet que les mostres emmagatzemades durant varis dies i amb una contaminació

general més elevada, i per tant també amb major presència de bacteris hemolítics, mostressin un increment més ràpid de l'hemòlisi que altres menys contaminades. Potser també contribuiria a explicar els nivells més elevats d'hemòlisi determinats en les mostres de l'escorxador D, l'únic del qual es va analitzar sang que havia estat emmagatzemada durant més temps .

Sembla que podríem concloure, per tant, que la contribució a l'hemòlisi d'aquest grup de microorganismes serà significativa només quan el temps transcorregut entre la recollida i el processament sigui considerable, ja que sembla ser que el seu efecte no és important de manera immediata.

2.3.4.4 Influència del sistema de dessagnat. Origen de l'hemòlisi

En les mostres recollides durant els dos anys posteriors a l'estudi de caracterització (sang del sagnador i del dipòsit dels escorxadors A i B en cadascuna de les estacions de l'any) també es varen determinar els nivells d'hemòlisi a partir de la lectura d'absorbància a 414 nm (Figura 2.23).

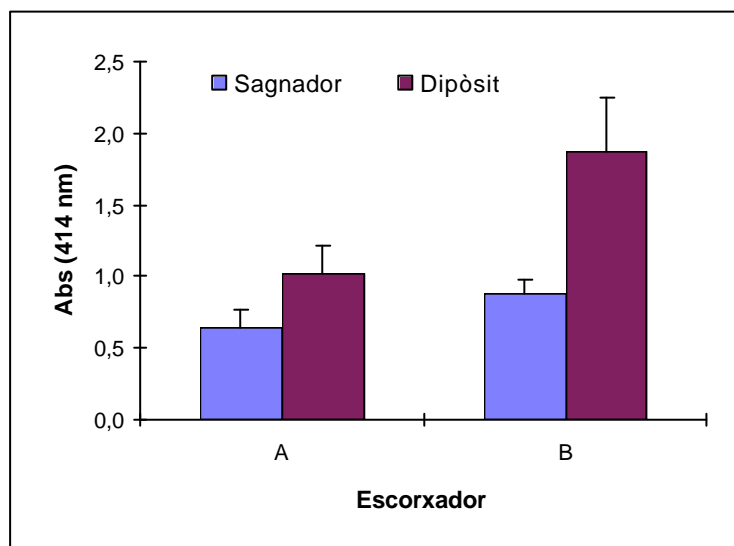


Figura 2.23. Hemòlisi (Abs 414 nm) per cadascun dels escorxadors segons la procedència de la mostra. Mitjanes \pm interval de confiança (95%).

En la taula 2.10 es mostra el resultat de l'anàlisi de la variància pels resultats espectrofotomètrics dels nivells d'hemòlisi. S'ha treballat amb les dades transformades en

logaritmes per tal de normalitzar la seva distribució i s'ha comprovat l'homogeneïtat de variàncies.

Taula 2.10. Efecte de l'origen de les mostres i del període de mostreig sobre l'hemòlisi. Resultats de l'ANOVA (log Abs 414 nm)

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	Hemòlisi	
		<i>F</i>	<i>P</i>
Escorxador	1	38,450	0,0000
Origen	1	54,715	0,0000
Període	3	0,8546	0,4681
Esc. * Origen	1	1,9060	0,1350
Origen * Període	3	2,2758	0,1353
Esc. * Període	3	1,0491	0,3754
Esc.* Orig.* Per.	3	2,1735	0,0974

En aquesta taula es pot apreciar com l'anàlisi estadística dona com a significatives les fonts de variació corresponents a l'escorxador -la mitjana de l'escorxador A és més baixa que la de l'escorxador B- i a l'origen de les mostres -les del sagnador molt inferiors a les del dipòsit-. El model global és molt significatiu i explica un 58 % de la variabilitat de les dades obtingudes per aquest paràmetre.

D'aquests resultats es dedueix que el tractament de la sang en l'escorxador B possibilita un major grau d'hemòlisi que en l'escorxador A. Com que les diferències s'aprecien ja a nivell de sagnador caldria estudiar en detall el procés de recollida per descartar alguns factors que podrien ser responsables d'aquest fenomen: presència d'aigua dels processos de neteja dins la pila de recepció, sistema de dosificació o formulació de la solució d'anticoagulant, etc.

Podem concloure també que l'hemòlisi s'incrementa considerablement durant el transport de la sang cap al dipòsit i el poc temps que resta emmagatzemada fins a la presa de mostres (poques hores ja que s'ha treballat sempre amb sang recollida el mateix dia del sacrifici). Aquest temps d'emmagatzematge en refrigeració ha estat però sempre superior en l'escorxador B ja que l'horari de sacrifici (durant la nit) és diferent del de l'escorxador A (durant el matí). D'acord amb el que s'ha explicat abans es podrien atribuir a aquest fet els nivells d'hemòlisi més elevats en el primer cas.

2.4 SÍNTESI

Els resultats obtinguts ens permeten constatar que la sang que s'està recollint en els escorxadors industrials estudiats, en les condicions actuals, no es pot considerar adequada per a una matèria primera de productes destinats a alimentació humana.

S'ha comprovat que la major part de la microbiota contaminant s'adquireix en el propi sagnador i que el sistema de dessagnat en posició horitzontal podria ser una mesura útil per minimitzar la contaminació d'origen fecal o provinent de la pell de l'animal sacrificat.

En l'estudi realitzat amb mostres de sis escorxadors s'ha vist que també podrien tenir efectes desitjables, per minimitzar els recomptes microbians de la sang, activitats com la separació immediata de les fraccions en el propi escorxador.

Així doncs, en el benentès que l'efectivitat pot obtenir-se del conjunt de mesures preses, més que de l'aplicació d'una sola d'elles, ens ha semblat que es podria suggerir la introducció d'una sèrie d'actuacions que potser permetrien reduir els nivells de contaminació que s'obtenen actualment:

- Incrementar el nivell d'exigència pel que fa a les mesures higièniques que afecten el procés de dessagnat, recollida i emmagatzematge de la sang (operacions de neteja i desinfecció dels animals, de l'equipament i del ganivet, millora dels hàbits higiènics dels treballadors, mesures de control de la contaminació ambiental de la sala de sacrifici, etc.)
- Implementar el sistema de dessagnat en posició horitzontal
- Instal·lar un sistema que permeti centrifugar la sang a mesura que es recull en el mateix escorxador
- Utilitzar un sistema de refrigeració immediata, congelació o deshidratació de les fraccions obtingudes en la centrifugació.

Pel que fa al plasma, un bon sistema sembla ser la separació centrífuga immediata de les dues fraccions i la congelació, que redueix el risc de deteriorament i creixement de patògens sense, aparentment, afectar les propietats funcionals de les proteïnes plasmàtiques (Brooks i Ratcliff, 1959).

Si la introducció de totes aquestes mesures no resultés viable o no solucionés encara el problema de contaminació microbiana, l'alternativa podria venir per dues vies:

1. Minimitzar les possibilitats de contaminació, que implicaria canviar el sistema de recollida obert per un sistema tancat que incorpora un ganivet de degollat balmat (trocar a través del qual la sang s'escola cap a un recipient estèril. Els sistemes oberts de

recollida de sang estudiats no permeten obtenir sang amb una càrrega microbiana comparable a la que s'obté amb sistemes tancats (2×10^3 ufc/mL).

2. Reduir la càrrega contaminant de la sang *a posteriori*, que comportaria haver de trobar un sistema d'higienització del producte un cop recollit amb els sistemes oberts habituals i que no provoqués pèrdua de funcionalitat.

La primera de les solucions proposades s'utilitza de manera eficaç, principalment en escorxadors de boví als Estats Units, però la seva aplicació en porcí és més complicada degut a què la velocitat de la línia de sacrifici és més alta (600-1000 animals per hora en comparació amb els 350-500 animals per hora en el cas de boví), a què la sang que s'obté d'un porc (2,5-3 L) és molt inferior a la que s'obté a partir del bestiar boví (10-12 L) i a més a què en els porcs el flux sanguini es redueix dràsticament als 30 segons (Ockerman i Hansen, 1994). Per tant, el sistema tancat comporta problemes d'alentiment de la línia de sacrifici i un menor rendiment pel que fa a volum de sang obtinguda per animal sacrificat. Els temps de dessagnat òptims amb el sistema obert són de l'ordre de 20-60 segons (Fernando i Townsend, 1976). Utilitzant el ganivet balmat i un sistema tancat només s'aconsegueix recollir en 60 segons un 75 % de la sang obtinguda amb el sistema obert. Per maximitzar el rendiment calen un mínim de 30 segons de dessagnat per porc i 1 minut per vedells (Lynn Knipe, 1988). Per aconseguir un flux ininterromput dins el recipient de recollida, fan falta, com a mínim, 3 ganivets balmats connectats a un sistema de succió (Cironeau, 1974). Amb l'aplicació de buit al sistema pot millorar el rendiment prop d'un 40 % per sobre del mètode obert (Akers, 1973), tot i que existeix el perill de sobredrenar la sang provocant l'obtenció de carn descolorida (Halliday, 1973).

El fet d'utilitzar varis recipients que recullen la sang d'un nombre determinat d'animals, més o menys alt segons la probabilitat de decomís de les canals, permet assegurar que només es processarà sang provinent d'animals que superin la inspecció veterinària *post-mortem*. El desavantatge d'aquest mètode és que el rebuig d'un únic animal pot fer que tota la sang del lot sigui considerada no apta per al consum.

Els escorxadors es resisteixen a implementar el sistema tancat argumentant també que la utilització del trocar, de fulla més ampla que un ganivet de degollat comú, incrementa la probabilitat de malmetre l'espatlla de l'animal, un dels productes valorats del porc, i que el dessagnat que s'aconsegueix no és suficient i s'obté carn amb una vida mitjana més curta. De tota manera el sistema s'utilitza, i sembla ser que eficaçment, en plantes de producció de productes carnis de porc dels països de l'antiga unió soviètica (Gorvatov, 1988), on s'obté sang amb recomptes mitjans de l'ordre de 4×10^3 ufc/mL i els nivells màxims permesos són 10^5 cèl·lules/mL, amb absència de *Escherichia coli* i *Proteus*.

Pel que fa a la segona proposta (intentar reduir la contaminació un cop recollida la sang pel mètode convencional), caldria trobar un sistema d'higienització que pogués ésser instal·lat en la mateixa empresa i permetés el processament immediat de la sang recollida per tal de minimitzar el risc de deteriorament microbiològic. Com a possibles tecnologies podríem suggerir, un cop descartada la possibilitat d'utilitzar un tractament tèrmic sense afectar les propietats funcionals de les proteïnes, la bactofugació, l'aplicació d'un tractament d'alta pressió hidrostàtica o de microfiltració de la fraccions sanguínies separades per centrifugació. Evidentment, cal comprovar quina és l'eficàcia d'aquests tractaments en la reducció de càrrega microbiana i com afecten les propietats dels productes finals (Capítol 4).

Dels resultats obtinguts en l'apartat que estudia l'hemòlisi es pot resumir que els factors que determinen l'hemòlisi de la sang recollida en els escorxadors són principalment el tractament mecànic de la sang, el sistema d'addició d'anticoagulant, el volum i concentració de la solució anticoagulant afegida i el període de temps d'emmagatzematge. Hem vist també que els principals factors determinants de la velocitat d'increment de l'hemòlisi de sang refrigerada són els nivells elevats de contaminació microbiològica i el tipus d'anticoagulant utilitzat.

Pel que fa a l'anticoagulant es pot dir que és millor utilitzar citrat sòdic tribàsic com a anticoagulant enlloc de polifosfat quan la sang no pot ser processada immediatament i s'ha de mantenir en un dipòsit refrigerat perquè l'increment d'hemòlisi de la sang es dona més lentament.

3. DESHIDRATACIÓ DEL PLASMA PER ATOMITZACIÓ

3.1 OBJECTIUS

S'ha comentat en el capítol anterior que el plasma és un producte que conté entre un 90-91 % d'humitat i un 9-10 % de sòlids, la major part dels quals són proteïnes. La seva composició fa que sigui una matèria primera amb una activitat d'aigua molt elevada i que constitueixi un medi idoni pel desenvolupament de diferents tipus de microorganismes. Per tant, cal aplicar un sistema de conservació que garanteixi un temps raonable de vida mitjana del producte.

La deshidratació o assecament és un dels mètodes de conservació més utilitzat actualment en la indústria alimentària, juntament amb la refrigeració i la congelació. Es basa en la disminució de l'activitat de l'aigua dels aliments fins a nivells que impedeixen l'activitat microbiana i que minimitzin les reaccions químiques i bioquímiques de deteriorament. Aquest sistema permet obtenir un producte més concentrat, utilitzable per enriquir diferents tipus d'aliments, estable a temperatura ambient i de fàcil transport i emmagatzematge.

Com ja hem vist en l'apartat 1.3.1, l'atomització és un sistema de deshidratació que consisteix en l'evaporació de l'aigua de petites gotetes del producte en entrar en contacte amb un corrent d'aire calent. La mida petita de les gotes possibilita un assecament ràpid i el temps de residència del material en l'interior de la cambra d'atomització és de l'ordre de segons. El material sec, en forma de pols, és separat de l'aire vehiculador mitjançant un cicló separador i és recollit i refredat de manera contínua. L'avantatge principal d'aquest sistema és que el producte pot tolerar l'elevada temperatura de l'aire d'entrada sense que es malmetin els components sensibles a la calor, i això és degut a que el procés d'evaporació absorbeix bona part de la calor aportada per l'aire calent. En realitat aquest cedeix al producte la calor latent de vaporització fent que l'increment de temperatura de les partícules sigui molt baix. A més, la taxa de reaccions degradatives en els aliments disminueix a baixos continguts d'humitat, i això afavoreix que el curt temps d'exposició de la partícula seca a temperatures elevades no comporti un deteriorament important del producte.

Els objectius generals d'aquesta part del treball consisteixen bàsicament en (1) obtenir un producte deshidratat a partir del plasma líquid, utilitzant un equip d'atomització a escala de laboratori; i (2) estudiar les característiques de la pols obtinguda en el procés de deshidratació a nivell de composició físico-química, qualitat microbiològica, estabilitat tèrmica i propietats funcionals.

L'estudi consisteix concretament en:

1. Posar a punt el procés d'atomització del plasma líquid a escala de laboratori: determinar les condicions de procés que permeten obtenir el producte en pols amb un contingut d'humitat suficientment baix sense afectar les propietats funcionals del producte.
2. Determinar les característiques del producte deshidratat obtingut per atomització i l'efecte del procés de deshidratació sobre determinades propietats, prenent com a referència les que presentava el plasma líquid. Els paràmetres determinats són:
 - 2.1. Composició físico-química: contingut en humitat, proteïna total, greix i sals minerals. S'ha inclòs també una sèrie d'anàlisis per descartar la presència en el plasma deshidratat de substàncies estranyes amb possibles efectes tòxics -com poden ser hormones anabolitzants, antibiòtics o corticoesteroides-; que són residus que poden provenir de tractaments veterinaris de l'animal viu o de la utilització de substàncies d'engreix durant la producció i que podrien ser presents en la sang com a conseqüència de la barreja amb orina i excrements durant la recollida. Encara que la concentració d'aquests residus en la sang sigui baixa cal assegurar que la deshidratació no suposa un increment en les seves proporcions relatives que pugui arribar a ser preocupant.
 - 2.2. Contaminació microbiana: recomptes generals de bacteris aeròbics mesòfils i psicròtrofs, recomptes de grups específics com els enterobacteris i els clostridis sulfit-reductors, i de l'espècie *Staphylococcus aureus*. Degut als elevats recomptes de *Staphylococcus aureus* DNAsa positius obtinguts en les anàlisis de matèria primera (apartat 2.3.3.5) ens hem plantejat la necessitat de confirmar o descartar la presència d'enterotoxines estafilocòciques en el producte deshidratat.
 - 2.3. Estabilitat tèrmica del producte deshidratat: a partir de l'anàlisi calorimètrica diferencial (DSC: *Differential Scanning Calorimetry*) del producte reconstituït s'han determinat la temperatura de desnaturalització (Td) i l'entalpia de transició (*DH*) de les proteïnes plasmàtiques.
 - 2.4. Propietats funcionals: solubilitat, capacitat de formació d'escuma, activitat emulsionant i característiques dels gels obtinguts per escalfament (capacitat de retenció d'aigua (CRA), microestructura i resistència a la penetració).
3. Determinar l'estabilitat del producte deshidratat fent un estudi de l'evolució durant l'emmagatzematge d'alguns paràmetres físico-químics, de la contaminació microbiana, de l'estabilitat tèrmica i d'algunes propietats funcionals de les proteïnes plasmàtiques del producte atomitzat.

3.2 MATERIAL I MÈTODES

3.2.1 Procedència de les mostres

Es va treballar amb mostres de plasma de sang provinent d'un escorxador industrial de la comarca del Gironès que realitza la recollida de la sang amb el sistema descrit en el Capítol 2, consistent en dosificar un anticoagulant i refrigerar immediatament la sang recollida.

Les mostres es van prendre del tanc refrigerat d'emmagatzematge i van ser processades al laboratori per tal d'obtenir, per centrifugació, la fracció plasmàtica de la sang. Les condicions de centrifugació van ser les especificades en l'apartat 2.2.4.1.

3.2.2 Deshidratació per atomització

3.2.2.1 Equip

El plasma obtingut va ser sotmès al procés de deshidratació amb un aparell atomitzador de laboratori Lab-Plant SD-05 (Lab-Plant Ltd., West Yorkshire, Anglaterra) amb els components esquematitzats en la figura 3.1 i amb les característiques tècniques següents: Les dimensions de l'equip són 105 cm d'alçada x 62 cm d'amplada x 50 cm de fons. El rang de temperatura de l'aire d'entrada és de 40 a 250°C i el flux d'aire varia des de 38 fins a 66 m³/h. Permet una taxa d'evaporació de l'aigua d'aproximadament 1.500 mL/h per una temperatura de l'aire de 250°C. El corrent d'aire d'atomització i d'assecamment són en el mateix sentit. L'aparell disposa d'un sistema desbloquejador per evitar l'obtenció de l'injector, que funciona amb aire comprimit suplementari i que treballa amb una freqüència de desbloquejament regulable. L'alimentació de la mostra es realitza mitjançant una bomba peristàtica de flux variable fins a 65 mL/min.

El sistema d'atomització de l'aparell és amb toveres a pressió, amb dos nebulitzadors per líquids i un orifici de sortida de 0,5 mm de diàmetre que determina una força màxima del compressor d'aproximadament 2 bar. Existeixen altres tipus d'atomitzadors, per exemple el de discs rotatoris centrífugs, però només són més recomanables quan el producte a atomitzar es pot deteriorar en ser sotmès a les pressions que requereix el primer sistema o quan es tracta de líquids viscosos, tipus puré, que no poden passar a través dels petits foradets del nebulitzador.

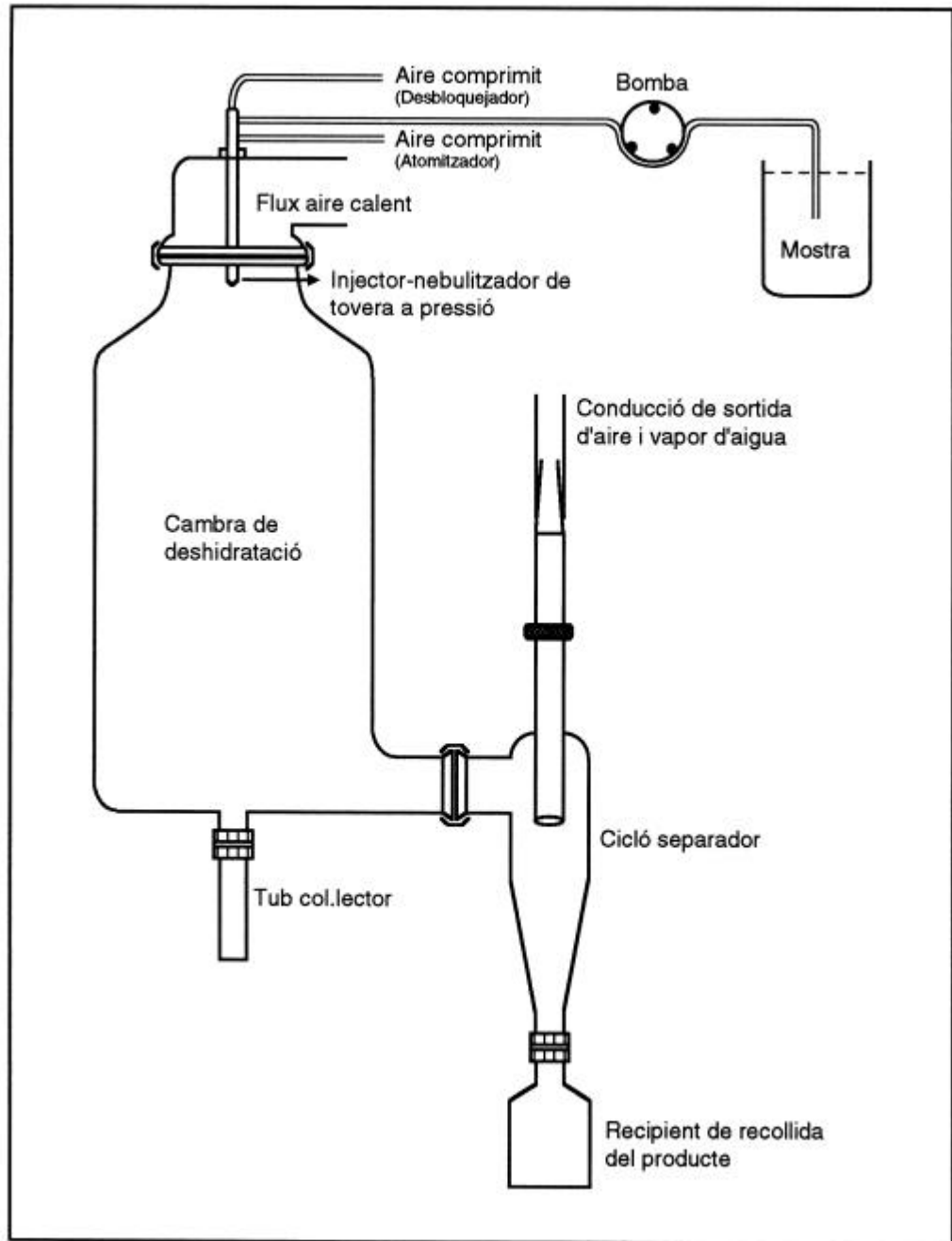


Figura 3.1. Esquema de l'equip d'atomització.

3.2.2.2 Determinació de les condicions de procés

La determinació de les condicions de procés es va fer fixant el flux d'aire i la força del compressor al màxim permès per l'aparell, aproximadament 64 m³/h i 2 bar, respectivament. Es va començar treballant a una temperatura baixa (120°C) i es va regular la velocitat de la bomba peristàltica fins a obtenir un flux que permetia la completa deshidratació de les fines partícules de líquid atomitzat i un bon rendiment en la recuperació de producte deshidratat. Una velocitat més alta no proporcionava una deshidratació completa i un flux més baix comportava la formació de partícules deshidratades massa fines que no eren correctament separades en el cicló.

El plasma gelifica a temperatures elevades i la formació de gel en l'interior de l'injector calent dificulta el pas del producte; per tant va ser necessari utilitzar el dispositiu de desbloquejament, que es va regular a la freqüència que permetia que el flux d'entrada de producte fos el més regular possible.

Es van deshidratar mostres amb diferents condicions de temperatura d'aire d'entrada: 120, 140, 160 i 180°C i es van determinar les característiques de la pols obtinguda, bàsicament quant a contingut en humitat, facilitat de rehidratació i estabilitat tèrmica, que es va considerar com un indicador de l'estat de desnaturalització de les proteïnes del plasma.

El plasma corresponent a la sang d'un dia de mostreig es va repartir en quatre fraccions, a cadascuna de les quals li va correspondre una de les quatre temperatures de deshidratació. Cada fracció va ser dividida en tres alíquotes que es van deshidratar i recollir independentment. Totes les produccions de plasma en pols a partir de la mateixa mostra de sang es feien el mateix dia de la recollida. Aquest procediment es va repetir 3 vegades i, per tant, es van realitzar un total de 36 produccions de plasma deshidratat (3 dies de mostreig x 4 temperatures x 3 alíquotes).

A partir d'aquestes experiències es va determinar la temperatura òptima de procés i es van realitzar -amb els paràmetres estandarditzats- les produccions necessàries per tal de caracteritzar el producte atomitzat obtingut.

3.2.3 Caracterització del plasma atomitzat

3.2.3.1 Caracterització bioquímica

Es van determinar els percentatges d'humitat, proteïna total, greix i sals minerals de les 36 mostres amb les mateixes tècniques d'anàlisi descrites en l'apartat 2.2.4.2 del capítol anterior (dessecació i determinació gravimètrica, Kjeldhal, Soxhlet i incineració, respectivament).

Es van fer determinacions dels valors d'activitat d'aigua (a_w) que corresponien als continguts d'humitat de les mostres deshidratades. Els valors es van obtenir per interpolació a partir de les isoterms d'adsorció a 20°C del producte deshidratat (Figura 3.2) determinades per Toldrà (1998), dades no publicades.

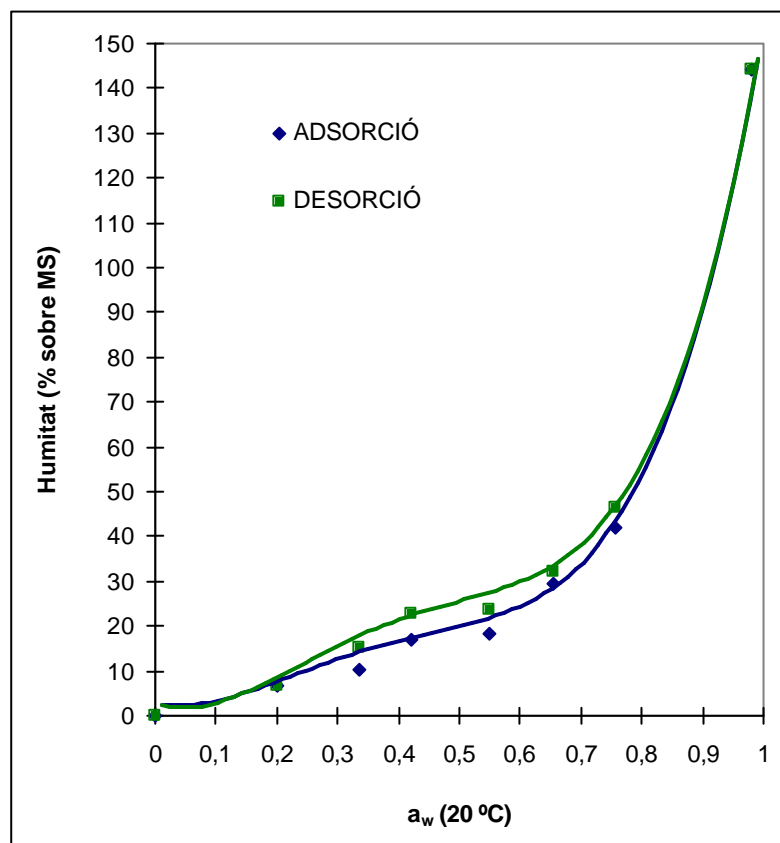


Figura 3.2. Isothermes de sorció del plasma deshidratat per atomització (Toldrà, 1998).

L'activitat d'aigua d'una dissolució és quantitativament igual a la relació entre la pressió de vapor de la solució i la pressió de vapor de l'aigua pura i es pot definir, qualitativament, com a una mesura de la disponibilitat de l'aigua per a què es duuguin a terme reaccions químiques i biològiques.

Les isoterms de sorció són un tipus de representacions que interrelacionen el contingut en aigua d'un aliment (expressat en massa d'aigua per unitat de massa de matèria seca) amb la seva activitat d'aigua a temperatura constant. La informació que es pot derivar d'aquesta representació és útil per avaluar l'estabilitat dels aliments i també per fer el seguiment dels processos de concentració i deshidratació, perquè la facilitat o dificultat per eliminar l'aigua està relacionada amb el valor d'activitat d'aigua. En les isoterms de sorció es mostra doncs quin és el contingut en humitat final de la mostra quan assoleix l'equilibri en atmosferes amb diferents humitats relatives, a una temperatura constant.

Les determinacions de residus varen ser dutes a terme per l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Centre de Tecnologia de la Carn (Monells). Es van fer sobre sis mostres de plasma deshidratat que corresponien a sang de dos escorxadors amb diferents sistemes de dessagnat (vertical i horitzontal) recollida en tres dies diferents. Es va analitzar la presència de les següents hormones naturals i sintètiques: Dietiletilbestrol (DES), Hexestrol, Dienestrol, 17β -Estradiol, Nortestosterona, Metiltestosterona, Progesterona, Estrona, Etinilestradiol i Trenbolona. El mètode utilitzat va ser la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (GC-MS), prèvia derivatització de les mostres amb HFBA o BSTFA (Pérez, 1995). Com a estàndards interns es van fer servir ($^2\text{H}_8$) DES i ($^2\text{H}_3$) Testosterona. Es va determinar també la presència de β -Agonistes -Clenbuterol i Salbutamol- mitjançant GC-MS dels trimetilsililderivats formats per reacció amb BSTFA. Les sulfonamides es van analitzar mitjançant HPLC amb una columna C18 i fase mòbil acetonitril/àcid fosfòric en sistema gradient. Les sulfonamides determinades van ser: Sulfadiacina, Sulfopiridina, Sulfotiazol, Sulfameracina, Sulfametacina, Sulfametoxipiridacina, Sulfametizol, Sulfacoloropiridazina i Sulfisoxazol. Finalment, es va utilitzar una tècnica ELISA (Euro-Diagnòstica B.V Apeldoorn, Holanda) per detectar la presència dels corticoides Dexametasona, Betametasona, Flumetasona, Prednisolona i Triamcinolona.

3.2.3.2 Anàlisis microbiològiques

Es van dur a terme recomptes totals de bacteris aeròbics mesòfils i psicròtrofs, dels grups d'enterobacteris i de clostridis sultit-reductors i de l'espècie *Staphylococcus aureus*, amb els medis de cultiu i els mètodes de sembra descrits en l'apartat 2.2.4.3. Es van analitzar 4 mostres i els recomptes es varen fer, en tots els casos, en la sang, el plasma líquid i en la pols obtinguda en el procés d'atomització del mateix plasma.

Per tal de confirmar o descartar la presència d'enterotoxines estafilocòciques es van analitzar, mitjançant el test Ridascreen® Set A, B, C, D, E (r-Biopharm, Darmstadt, Alemanya), un total de 11 mostres de plasma deshidratat corresponents a dos escorxadors i recollides i processades en dies diferents. La tècnica d'enzimoinmunoassaig es basa en la utilització d'anticossos de captura específics contra les diferents toxines estafilocòciques i anticossos de detecció conjugats amb l'enzim peroxidasa. El revelat de les proves es feia afegint peròxid d'urea (substrat de l'enzim) i un reactiu cromogen, tetrametilbenzidina, que permetia desenvolupar un color blau proporcional a la concentració de toxina present en les mostres. Després del període d'incubació adequat s'utilitzava una solució d'àcid sulfúric per aturar la reacció que provocava un canvi de coloració de blau a groc. La intensitat de color groc es mesurava per espectrofotometria amb un lector de microplaques Bio-Tek ELX800 (Biotek Inst. Winooski, Vermont) a una longitud d'ona de 450 nm.

3.2.3.3 Anàlisi calorimètrica (DSC)

Els mètodes d'anàlisi tèrmica es poden definir com el conjunt de tècniques dinàmiques de detecció dels canvis físics o químics d'una substància, en funció de la temperatura o el temps, quan s'escalfa o es refreda a una velocitat normalment programada en forma lineal. Per a la determinació de l'estabilitat tèrmica del plasma es va utilitzar la tècnica d'anàlisi calorimètrica diferencial o DSC (*Differential Scanning Calorimetry*). És una tècnica basada en la determinació del flux calòric diferencial necessari per mantenir una mostra del material a la mateixa temperatura que una referència inert (principi del balanç nul de temperatura).

L'anàlisi per DSC es pot utilitzar per detectar transicions de primer ordre (fusió), que en aliments estan relacionades, per exemple, amb processos de desnaturalització proteica o gelificació del midó; i de segon ordre (transicions vítries), que es poden donar en grànuls de midó o en productes congelats. La tècnica DSC es pot utilitzar també en estudis d'estabilitat oxidativa (lípid) i puresa (aromes) (Harwalkar i Ma, 1990; Liu i Lelièvre, 1991).

La desnaturalització tèrmica és un fenomen cooperatiu que es pot detectar com un pic endotèrmic en els termogrames DSC, en el qual estan implicats dos tipus de processos que contribueixen a la variació global d'entalpia (ΔH). D'una banda, el trencament de ponts d'hidrogen intermoleculars que és una reacció endotèrmica i, d'altra banda, el trencament d'interaccions hidròfobes i la formació de nous enllaços durant l'agregació posterior al desplegament, que són reaccions exotèrmiques (Myers, 1990; Hayakawa *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1994). El pic endotèrmic observat correspon doncs al balanç net entre aquests dos grups de reaccions.

En molts casos els valors entàlpics es poden utilitzar com a indicador de l'estat de "nativitat" de la proteïna, entenent com a "estat natiu" l'estructura terciària única que s'origina com a conseqüència del plegament provocat per la interacció de les seqüències d'aminoàcids entre elles i amb les molècules de solvent. L'estat natiu d'algunes proteïnes pot consistir, a més, en agregats de diferents cadenes polipeptídiques o subunitats unides per interaccions covalents i/o no covalents. Un estudi acurat per DSC d'una proteïna aïllada, particularment amb diferents combinacions d'agents pertorbants (força iònica, pH, etc.), proporciona tendències en el valor d'entalpia que aporten informació sobre la naturalesa de les forces responsables del manteniment de la integritat estructural de la proteïna i els gels formats com a conseqüència de l'escalfament. Per tant, la tècnica pot ser molt útil com a mètode de control de qualitat per monitoritzar la desnaturalització durant el processament del producte (Arntfield *et al.*, 1990).

Els experiments es van realitzar amb un equip Mettler DSC30 amb nitrogen líquid (Mettler-Toledo, S.A.E., Switzerland). El calibratge de temperatures i energies es va realitzar amb un patró d'indi, plom i zenc, sotmesos a idèntiques condicions d'anàlisi que les mostres d'estudi. Es van analitzar mostres de 100 μL de plasma en càpsules d'alumini de 150 μL de capacitat, tancades hermèticament a pressió. La càpsula de referència contenia una quantitat d'aigua destil·lada equivalent al contingut d'humitat de la mostra.

Es va calcular la variació d'entalpia (ΔH) implicada en el procés de desnaturalització a partir de l'àrea del pic de transició de la corba DSC integrada utilitzant una línia de base recta. S'expressa en J/g d'extracte sec de la mostra i proporciona una estimació de l'energia tèrmica requerida per desnaturalitzar la proteïna (De Wit, 1990; Ma *et al.*, 1990). Es va considerar temperatura de desnaturalització (T_d) la temperatura a la qual s'obté el mínim del pic endotèrmic obtingut en cadascuna de les anàlisis.

Posada a punt del mètode analític. Es van realitzar anàlisis calorimètriques, com a mínim per duplicat, de mostres de plasma líquid escalfades des de 30 fins a 100°C a velocitats d'escalfament de 0,5, 1, 2, 3 i 5°C/min. Els resultats d'aquestes proves preliminars van permetre determinar la velocitat d'escalfament més adequada pel tipus de mostra analitzada.

Un cop establertes les condicions analítiques, es va determinar la reproductibilitat de la tècnica analitzant un total de 23 mostres de plasma i determinant el coeficient de variació obtingut pels valors de *DH* i Td.

Efecte del procés de deshidratació sobre l'estabilitat tèrmica. Es van realitzar anàlisis calorimètriques de mostres de plasma líquid i de plasma atomitzat per determinar quin havia estat l'efecte del procés tecnològic de deshidratació sobre l'estabilitat tèrmica de les proteïnes plasmàtiques. Es va treballar amb solucions de plasma deshidratat en aigua destil·lada amb el mateix extracte sec que el plasma original.

Per completar l'estudi i comprovar que la tècnica permet apreciar diferents nivells de desnaturalització proteica es va determinar l'efecte del pH sobre els valors dels paràmetres calorimètrics, *DH* i Td, analitzant mostres a pH 7,4 (pH del plasma immediatament després de la separació centrífuga) i mostres acidificades amb HCl 4N fins a pH 5,5, 4,5 i 4. Es van realitzar quatre rèpliques de cadascuna.

3.2.3.4 Propietats funcionals

El terme "propietat funcional" aplicat a ingredients alimentaris es defineix com tota propietat no nutricional que influeix en la utilitat d'un ingredient en un aliment. Algunes propietats funcionals afecten les característiques sensorials, però també poden influir sobre el comportament físic de l'aliment o el dels seus ingredients durant la preparació, transformació o emmagatzematge.

Dins les propietats funcionals de les proteïnes (Figura 3.3) s'hi inclouen, segons Pomeranz (1991):

1. Propietats sensorials i organolèptiques (*flavor*, olor, color, textura)
2. Propietats d'hidratació que depenen de les interaccions proteïna-aigua, com la hidratació, la dispersibilitat, la solubilitat i l'inflament
3. Propietats superficials com les capacitats emulsionant i escumant

4. Propietats reològiques com la precipitació, la gelificació i la texturització, que impliquen interaccions proteïna-proteïna
5. Altres propietats: adhesió, cohesió, formació de films i fibres, etc.

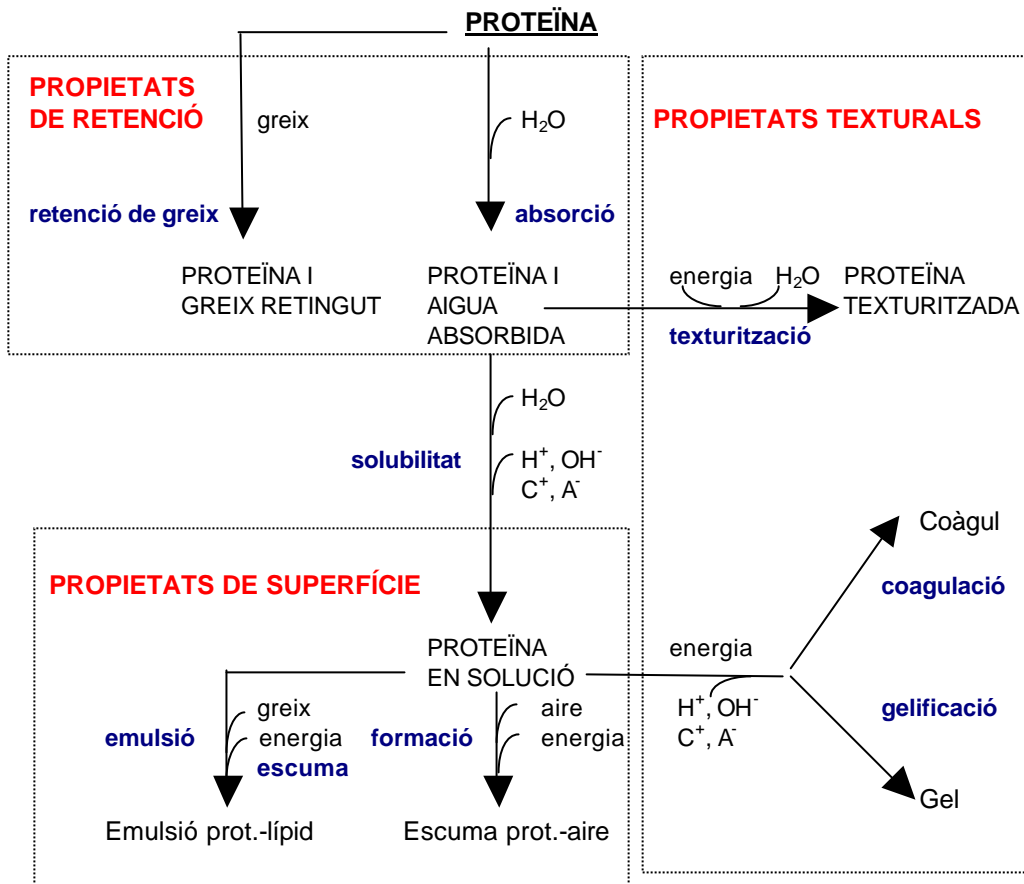


Figura 3.3. Propietats funcionals de les proteïnes i les seves interrelacions (font: Philips i Beuchat, 1981; citat per Pomeranz, 1991).

És difícil preveure les propietats funcionals d'una proteïna a partir de les seves característiques estructurals, i encara més si el que tenim no és una proteïna pura aïllada, sinó un concentrat proteic que conté -a més de diferents tipus de proteïnes- quantitats apreciables d'altres components (sals minerals, lípids, etc.), com en el plasma deshidratat. Un estudi de funcionalitat hauria de combinar avaluacions experimentals de

propietats físico-químiques (viscositat, tensió superficial, solubilitat) amb la realització d'assajos sobre la seva aplicació real (Pomeranz, 1991). Tanmateix, una caracterització de la funcionalitat d'un producte es pot realitzar a través d'una sèrie de proves empíriques simples aplicades a sistemes teòrics, per exemple la mesura de la capacitat emulsionant i l'estabilitat d'una emulsió en una barreja d'oli-aigua-proteïna, o la capacitat escumant d'una solució del concentrat proteic en aigua. L'avantatge d'aquestes proves teòriques és que són ràpides, poc costoses i permeten una aproximació a la funcionalitat del producte, però presenten també una sèrie d'inconvenients: solen ser proves que no estan suficientment estandarditzades i, a més, els resultats obtinguts poden no coincidir amb els de proves d'aplicació sobre sistemes reals.

En aquest estudi s'han determinat les propietats funcionals del plasma líquid i del plasma atomitzat i reconstituït per establir l'efecte del procés de deshidratació sobre la funcionalitat del producte. S'han inclòs també determinacions d'algunes propietats de solucions de clara d'ou deshidratada Sigma A-5253 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanya) i s'han utilitzat com a valors de referència perquè és un producte emprat comercialment com a ingredient funcional de molts aliments.

3.2.3.4.1 Solubilitat

El percentatge de proteïna soluble de les mostres deshidratades es va determinar seguint el mètode de Morr *et al.* (1985). Es determinava el contingut en proteïna del sobrenedant d'una dissolució a l'1 % de pols en aigua destil·lada, centrifugada a 20.000 x g durant 30 minuts, utilitzant la tècnica del biuret. Per obtenir la recta de calibratge s'utilitzava com a patró seroalbúmina bovina Sigma A-4503 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri). El contingut en proteïna total del plasma atomitzat es determinava pel mètode Kjeldahl. Els resultats s'expressen com a percentatge de proteïna soluble sobre la proteïna total. Es van fer les determinacions de solubilitat de cadascuna de les mostres a pH àcid (pH 4,5) i a pH neutre (pH 7) per tal d'observar possibles variacions d'aquest paràmetre en funció del pH.

3.2.3.4.2 Capacitat escumant

La capacitat escumant de les mostres es va determinar empíricament mesurant el volum d'escuma format per agitació violenta (1.600 rpm durant 10 minuts), mitjançant un agitador magnètic, de 50 mL d'una solució al 0,5% (p/v) dels productes estudiats. L'estabilitat de l'escuma generada es va determinar mesurant la cinètica de desaparició de l'escuma: es prenen mesures del volum d'escuma que restava en els recipients cada mitja hora durant un període de dues hores.

Es va treballar amb mostres de plasma líquid, plasma atomitzat i clara d'ou deshidratada. Es van realitzar quatre proves comparatives amb mostres de sang recollides en quatre dies diferents i deshidratades el mateix dia del mostreig. Per cadascun dels productes es van realitzar les proves per quadruplicat.

3.2.3.4.3 Activitat emulsionant

Per a la determinació de l'activitat emulsionant es va utilitzar un mètode turbidimètric basat en la tècnica de Pearce i Kinsella (1978). S'emulsionaven 40 mL d'oli de blat de moro amb 20 mL d'una solució de plasma líquid o de plasma deshidratat i reconstituït al mateix extracte sec que el plasma líquid. Les solucions es varen fer al 2,5, 5, 10 i 20, % (v/v) amb aigua destil·lada i es varen assajar 4 valors diferents de pH: 7,4 (pH del plasma líquid), 6, 5,5 i 4,5, acidificant amb HCl 4N. Les barreges de cada solució amb l'oli s'homogeneïtzaven amb un aparell Politron PT3000 (Kinematica AG, Littau, Suïssa) a 10.000 rpm durant 30 segons. Cadascuna de les emulsions es preparava per duplicat. Es determinava l'absorbància a 500 nm d'una dilució 1:500 de l'emulsió en una solució al 0,1 % de Brij-30 (4-lauril èter).

3.2.3.4.4 Formació de gels per escalfament

Es van obtenir gels per escalfament de plasma líquid, de solucions de plasma deshidratat reconstituït al mateix extracte sec que el plasma líquid original i de clara d'ou deshidratada i reconstituïda a un extracte sec del 10%. Es prenen 4 alíquotes de 25 mL de les solucions corresponents i es mantenen a 80°C, en envasos tapats hermèticament (rosca twist-off), submergits en un bany termostàtic durant 45 minuts. Després de la gelificació les mostres es portaven fins a temperatura ambient i posteriorment es mantenen en refrigeració durant 12 hores.

Per determinar (1) l'efecte del procés tecnològic de deshidratació i (2) la influència del pH sobre aquesta propietat funcional, es van fer gels amb plasma líquid i dissolucions de plasma i clara d'ou deshidratats a pH 7,4 i acidificats amb HCl 4N fins a pH 6, 5,5 i 4,5. Es va comparar la capacitat de retenció d'aigua (CRA) i la resistència a la penetració dels gels formats amb els tres tipus de producte. Es va fer també un estudi de la microestructura només dels gels obtinguts amb les mostres de plasma.

Capacitat de retenció d'aigua (CRA). Es va utilitzar una tècnica que combina la filtració i la centrifugació, basada en la proposada per Kocher i Foegeding (1993) amb algunes modificacions. S'agafaven porcions cilíndriques dels gels (10 mm de longitud i 8 mm de diàmetre) amb l'ajut d'un trepà. S'introduïen en sacs de membrana filtrant amb diàmetre de porus de 0,45 μm (GORE-TEX® W.L. Gore y Asociados S.L.; Barcelona), i es col·locaven en l'interior de tubs de centrifugació suspesos a uns 2 cm de la base del tub. S'aplicava una força centrífuga de 4.000 x g durant 10 minuts a 15°C de temperatura i s'avaluava la CRA com al percentatge (p/p) d'aigua retinguda per cada mostra respecte el contingut d'aigua inicial. L'equip utilitzat va ser una centrífuga Sorvall RC 5C Plus (DuPont Co., Newtown, Connecticut).

Microestructura (SEM). Les mostres de gels destinades a l'anàlisi microscòpica es van obtenir de la mateixa manera que en l'apartat anterior. La preparació de les mostres per a les observacions al microscopi electrònic de rastreig (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) va consistir en una fixació amb glutaraldehid al 2,5 % en tampó cacodilat 0,1M a pH 7,4 durant un període de dues hores a temperatura de refrigeració, 3 rentats amb tampó cacodilat amb una durada total de 12 hores, deshidratació en una sèrie etanòlica (50, 70, 90 i 2x100) en etapes de 10 minuts i asseccament per punt crític en un equip Emitech K850 (EM Integrated Technology, Kent, Anglaterra). Les mostres assecades es fracturaven (tall longitudinal) i es recobrien amb una capa d'or amb un equip "diode sputtering" Emitech K550 (EM Integrated Technology, Kent, Anglaterra). Es va utilitzar un microscopi electrònic de rastreig Zeiss DSM 960 A (1994) (Carl Zeiss. Electron Optics Division, Oberkochen, Alemanya) i es va treballar amb un voltatge d'acceleració de 15 kV.

Textura: resistència a la penetració. Per a l'anàlisi de textura es va mesurar la resistència a la penetració dels gels en dues de les quatre capsuletetes de cada mostra mitjançant un texturòmetre TA XT2 (Stable Microsystems, Surrey, Anglaterra) amb una sonda cilíndrica d'ebonita de 10 mm de diàmetre. Es va valorar la força i el treball necessaris per penetrar, a una velocitat constant de 0,1 mm/segon, una distància de 4 mm. Es va treballar amb la mitjana dels resultats obtinguts a partir de tres penetracions per cadascun dels gels.

3.2.4 Estabilitat del plasma deshidratat

Es van realitzar anàlisis d'estabilitat tèrmica i solubilitat de mostres de plasma deshidratat i mantingut en envasos de plàstic amb tap de rosca durant diferents períodes de temps. Es disposava de mostres amb diferent grau d'envelliment, corresponents pràcticament a cadascun dels mesos anteriors al que es va considerar temps zero i fins a un període màxim d'un any. Els resultats d'aquestes determinacions, juntament amb les observacions de pèrdua de la facilitat de reconstitució del producte en pols amb el temps, ens van portar a plantejar l'experiència de fer el seguiment d'una mateixa mostra de plasma atomitzat al llarg d'un període relativament llarg per determinar l'estabilitat del producte.

Es va partir de quatre produccions diferents de plasma atomitzat obtingut, amb les mateixes condicions de procés, a partir de mostres de sang recollides en quatre dies consecutius. Cadascuna de les produccions va permetre obtenir uns 150 grams de plasma deshidratat que es van envasar en bossetes de plàstic termosegellades en porcions de 10 grams. Es va decidir conservar una de les mostres a temperatura de refrigeració i fer un estudi paral·lel per tal d'establir un possible efecte de la temperatura en l'evolució del producte emmagatzemat. D'aquesta manera, les quatre produccions es van repartir en dos lots i es van mantenir durant tot l'estudi sota les següents condicions d'emmagatzematge:

Lot 1: Temperatura ambient (20-22°C)

Lot 2: Temperatura de refrigeració (4-5°C)

Per tal d'establir les característiques de partida dels diferents lots es van realitzar, prèviament a l'envasat, les determinacions següents:

Percentatge d'humitat

Estabilitat tèrmica: temperatura de desnaturalització i entalpia de transició

Recomptes microbiològics de bacteris aeròbics mesòfils i psicròtrofs

Solubilitat, capacitat escumant i textura dels gels formats per escalfament

Amb l'objectiu de determinar l'estabilitat del producte deshidratat es va fer el seguiment d'aquests paràmetres durant un període de 6 mesos realitzant les determinacions mensualment, excepte les propietats funcionals de capacitat escumant i textura dels gels, que inicialment es realitzaven cada dos mesos.

3.2.5 Tractament estadístic de les dades

L'anàlisi estadística dels resultats es va fer amb els mateixos paquets d'aplicacions, tests estadístics i nivells de significació utilitzats en el capítol anterior (apartat 2.2.5).

3.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.3.1 Atomització

Es van determinar les condicions del procés d'atomització que permetien obtenir un producte deshidratat a partir de plasma líquid sense provocar canvis indesitjables en la fracció proteica. Es van fixar dos dels paràmetres del procés, el flux d'aire i la força del compressor a 64 m³/h i 2 bar, respectivament; i es van regular la temperatura i el cabal d'entrada de producte en funció del rendiment.

La taxa d'assecament de les partícules ha de permetre que la deshidratació es produeixi durant l'interval en què les gotetes surten del nebulitzador i impacten amb la paret de la cambra, per evitar que les partícules sòlides encara massa humides s'adhereixin a les parets. Per tant, es va regular la velocitat de la bomba peristàltica per tal d'obtenir un flux que permetés la completa deshidratació de les fines partícules de líquid atomitzat, que es va fixar en 800 mL/h, ja que una velocitat més alta no permetia assolir una deshidratació completa i les partícules s'adherien a les parets o, fins i tot, s'acumulava líquid al tub col·lector del fons de la cambra d'atomització.

La taxa d'assecament no depèn només de la temperatura de l'aire calent i del coeficient de transferència de calor, sinó també del diàmetre de les gotetes que s'han de deshidratar. Un flux d'entrada de producte més baix que el que s'ha utilitzat comportava la formació de partícules atomitzades molt fines que es deshidrataven molt ràpidament però proporcionaven partícules sòlides molt petites que en el cicló no es separaven de manera correcta i es perdien arrossegades pel flux d'aire sortint, en detriment del rendiment del procés.

Es van buscar unes condicions de treball que assegurassin que la temperatura a la qual estava exposada la partícula durant qualsevol moment del procés no superés mai la temperatura crítica de 80°C, al voltant de la qual es produeixen fenòmens de termocoagulació de les proteïnes plasmàtiques. Segons Martín *et al.* (1995) la temperatura de la partícula sempre és inferior a la temperatura de l'aire sortint i no s'hi aproxima fins que s'ha extret la major part de la humitat. En funció d'això, la temperatura màxima a la qual es va treballar va ser de 180°C perquè és la que permetia que, quan l'aparell treballava en règim estacionari, l'aire sortint no sobrepassés mai aquest valor de 80°C.

Un cop fixats tots aquests paràmetres de procés es van estudiar quines eren les característiques del producte en pols, concretament el contingut d'humitat i els valors

dels paràmetres d'estabilitat tèrmica, en funció de la temperatura de l'aire utilitzat en l'atomització.

Pel que fa als resultats del contingut d'humitat de les mostres de plasma deshidratades sota diferents condicions de temperatura, l'anàlisi de variància dels resultats (annex 4), considerant els efectes del dia de mostreig i de la temperatura de deshidratació, indica que no són significatives les diferències en el grau de deshidratació de mostres recollides en dies diferents però deshidratades a la mateixa temperatura ($P > 0,05$); per tant, en la figura 3.4 es presenten els resultats obtinguts fent la mitjana de 12 determinacions per cada temperatura (3 produccions per cadascun dels quatre mostrejos).

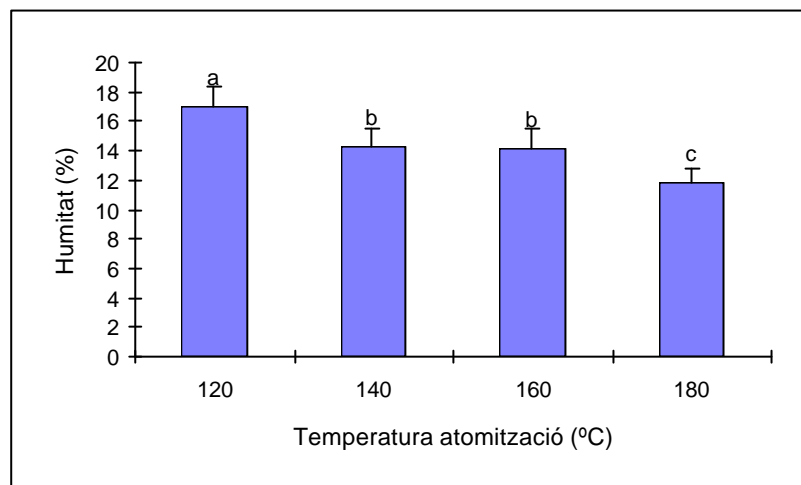


Figura 3.4. Humitat del plasma deshidratat en diferents condicions de temperatura. Mitjana i interval de confiança (95%). Les lletres indiquen els grups de mitjanes obtinguts amb el test Tukey-Kramer ($\alpha = 0,05$).

L'efecte de la temperatura de procés sí que és significatiu ($P < 0,05$) i el test de separació de mitjanes distingeix tres grups: les mostres deshidratades a 120°C, les deshidratades a 180°C i les deshidratades a 140 i 160°C, englobades en un mateix grup. Això indica que treballant a la temperatura de 180°C, màxima temperatura assajada, aconseguim un grau de deshidratació significativament més alt que el que s'assoleix a temperatures de fins a 160°C.

En referència als paràmetres calorimètrics, utilitzats com a indicadors del nivell de desnaturalització sofert per les proteïnes plasmàtiques durant el procés d'atomització (apartat 3.2.3.3) a aquesta temperatura (180°C) s'han obtingut els resultats que es mostren en la taula 3.1. La variació d'entalpia (DH) i la temperatura de desnaturalització (Td) s'han calculat a partir dels pics endotèrmics de la corba DSC obtinguda escalfant el plasma líquid i les dissolucions al 10% de plasma deshidratat des de 30 fins a 100°C a 3°C/min.

Taula 3.1. Paràmetres calorimètrics (DSC) de plasma líquid i plasma atomitzat

PRODUCTE	DH^a (J/g)	Td^b (°C)
Plasma líquid	10,14 ± 0,79	75,74 ± 0,63
Plasma atomitzat (180°C)	10,50 ± 1,26	76,40 ± 0,98

Mitjana i interval de confiança (95%) de quatre determinacions

^a: variació d'entalpia; ^b: temperatura de desnaturalització

Les diferències entre els valors d'entalpia i temperatura de desnaturalització calculats pels dos tipus de mostra no són significatives ($P > 0,05$) (Annex 5) i, per tant, podem deduir que l'atomització a 180°C no suposa una desnaturalització de les proteïnes plasmàtiques prou important per a què sigui detectable i quantificable mitjançant l'anàlisi calorimètrica.

El producte en pols obtingut amb el tractament a 180°C no presentava problemes apreciables d'insolubilització, característica que sovint és conseqüència del procés de desnaturalització. A més, la pols obtinguda amb aquestes condicions d'atomització presentava bones propietats de rehidratació, pròpies, en general, de tots els productes atomitzats degut, en bona part, a la forma de les partícules resultants. Durant el procés la superfície de les gotes perd immediatament l'aigua en sortir del nebulitzador i els soluts solidificats i els sòlids en suspensió formen una crosta a la superfície de la partícula. El diàmetre de la partícula va disminuint a mesura que es va deshidratant. Quan la crosta és prou gruixuda per oferir una resistència considerable al moviment de l'aigua cap a la superfície s'incrementa la temperatura de la partícula i es vaporitza el líquid atrapat en el seu interior, generant pressió. Una part de la crosta superficial es pot trencar i alliberar el vapor. Com a conseqüència d'això, les partícules atomitzades es troben en forma d'esferes buides o fragments d'aquestes esferes que mostren una gran facilitat per la rehidratació (Toledo, 1991).

La conclusió va ser que la temperatura màxima avaluada, 180°C, permetia eliminar la major part del contingut d'aigua de la mostra (quasi un 87 %) sense afectar l'estabilitat tèrmica del producte i la seva facilitat per rehidratar-se; per tant, es va decidir treballar a aquesta temperatura per obtenir el producte en pols a partir del plasma líquid. Chinprahast *et al.* (1995), en un estudi sobre les propietats funcionals de plasma de sang de porc deshidratat per diferents sistemes (al buit, per liofilització i per atomització), també conclouen que les millors condicions per optimitzar el rendiment del procés d'atomització són temperatures de 180-190°C. En aquest mateix treball la velocitat d'alimentació que es considera òptima és de 0,5 L/h, treballant amb un equip on el sentit de circulació de la mostra nebulitzada i l'aire d'assecamment és a contracorrent.

En les condicions proposades s'obtenia un rendiment d'uns 40-45 grams de pols per litre de plasma líquid, valor que, si bé es pot considerar baix tenint en compte que l'extracte sec del plasma és de l'ordre del 10%, coincideix amb els obtinguts per Chinprahast *et al.* (1995) en l'estudi anteriorment esmentat. L'objectiu d'aquesta part del treball no era l'optimització del rendiment i cal tenir present que s'ha treballat amb un equip a escala de laboratori i s'ha fet la deshidratació de plasma sense pre-concentració, factors determinants en el volum de pèrdues que pot suposar el procés. Amb un equipament industrial que permet processar volums més grans, sotmetent el plasma a una concentració prèvia a l'assecamment i amb un sistema de recuperació de partícules fines (un segon cicló, per exemple) probablement s'aconseguiria un increment important en el rendiment del procés.

3.3.2 Caracterització del plasma atomitzat

3.3.2.1 Caracterització bioquímica

Els resultats de les anàlisis de composició de les mostres de plasma deshidratat es mostren en la taula 3.2.

Taula 3.2. Components majoritaris del plasma deshidratat per atomització

Component	% en pes
Humitat	11,88 ± 0,92
Proteïna	66,45 ± 1,92
Greix	3,88 ± 0,75
Cendres	14,13 ± 0,75

S'indiquen les mitjanes de cadascun dels paràmetres analitzats amb el corresponent interval de confiança (95%).

El procés de deshidratació per atomització permet una concentració considerable de l'extracte sec -des del 10% del plasma líquid fins a prop del 90%- i, per tant, un enriquiment de la fracció proteica, responsable de la funcionalitat del producte. La reducció de volum que implica la deshidratació permet disposar d'un producte en pols que, a part de ser més estable, comporta força menys problemes de manipulació i emmagatzematge que el plasma líquid.

L'efecte conservador d'una deshidratació es basa en el seu efecte sobre l'activitat d'aigua del producte, que condiciona tant les seves propietats com la seva estabilitat. L'activitat d'aigua influeix el creixement dels microorganismes, però afecta també moltes altres propietats dels aliments: la reactivitat química i l'equilibri, l'activitat enzimàtica, l'estabilitat dels nutrients i les característiques organolèptiques (gust, aroma, textura, etc.).

Els valors d'activitat d'aigua a 20°C del plasma en pols recentment deshidratat, segons la isoterma d'adsorció del producte (Figura 3.2) i en funció dels continguts d'humitat que s'han determinat, es troba entre 0,3 i 0,4. Els valors mínims d' a_w pel creixement de la majoria de bacteris associats als aliments està al voltant de 0,90. El fongs són més resistent a la dessecació i sovint poden créixer bé en aliments amb a_w per sota de 0,80 i, a temperatura ambient, es pot donar un creixement lent fins i tot en

aliments amb a_w de 0,70. A a_w inferiors a 0,65 el creixement dels fongs també es veu completament inhibit. Per tant, i encara que els valors d' a_w que es donen com a mínims pel creixement dels microorganismes concrets no siguin mai un valor absolut, sinó que puguin ser lleugerament influïts per diversos factors (pH, temperatura, *estatus* nutricional i naturalesa dels soluts específics en la fase aquosa), podem afirmar que els valors assolits en la deshidratació són suficientment baixos per assegurar que el plasma en pols és microbiològicament estable. Podrà ser, per tant, emmagatzemat a temperatura ambient sense el risc de deteriorament microbiològic.

Pel que fa a la possibilitat de deteriorament enzimàtic, cal dir que la majoria d'enzims requereixen un medi aquós per dur a terme la seva activitat catalítica (Figura 3.5). L'aigua és necessària pel manteniment de l'estructura de l'enzim, com a medi de difusió del substrat cap al centre actiu i dels productes des del centre actiu i, en alguns casos, com a un dels reactants de la reacció catalitzada. Tots els estudis sobre l'activitat de determinats enzims en funció de l'activitat d'aigua del medi indiquen que no es donen reaccions enzimàtiques en medis on només hi ha aigua fortament lligada i, per tant, cal la presència d'aigua lliure (Rockland i Beuchat, 1987). Als valors d' a_w del plasma atomitzat, les úniques reaccions de degradació enzimàtica possibles serien les produïdes per enzims lipolítics. Les lipases es mantenen actives a valors extremadament baixos d' a_w (inferiors a 0,2) perquè el substrat és suficientment mòbil i fluid per associar-se amb l'enzim sense que calgui l'aigua com a medi difusor. En el nostre cas, hem de tenir en compte que la fracció susceptible a l'acció d'aquests enzims representa vora un 4% de la composició de la mostra i, per tant, no es pot considerar despreciable. D'altra banda, veiem que l'activitat dels enzims proteolítics, que podrien deteriorar el component majoritari del producte, sí que resulta inhibida a valors d'activitat d'aigua per sota de 0,3. A més, fins a valors d' a_w per sobre de 0,6 la velocitat de les reaccions enzimàtiques és molt lenta i, per tant, des d'aquest punt de vista, el plasma deshidratat es pot considerar també un producte estable.

S'observa també en la figura 3.5 que a valors baixos d' a_w es poden donar algunes reaccions degradatives no enzimàtiques, com enfosquiments deguts a reaccions de Maillard i processos d'oxidació autocatalítica dels lípids. Aquests últims poden estar promoguts per la presència de ferro resultant de l'hemòlisi i són, per tant, més greus quant més hemolítica sigui la sang a partir de la qual s'ha obtingut el plasma. Per això, tot i que no s'ha fet en aquest treball, considerem que seria interessant realitzar un estudi del possible desenvolupament de ranciesa durant l'emmagatzematge del plasma deshidratat.

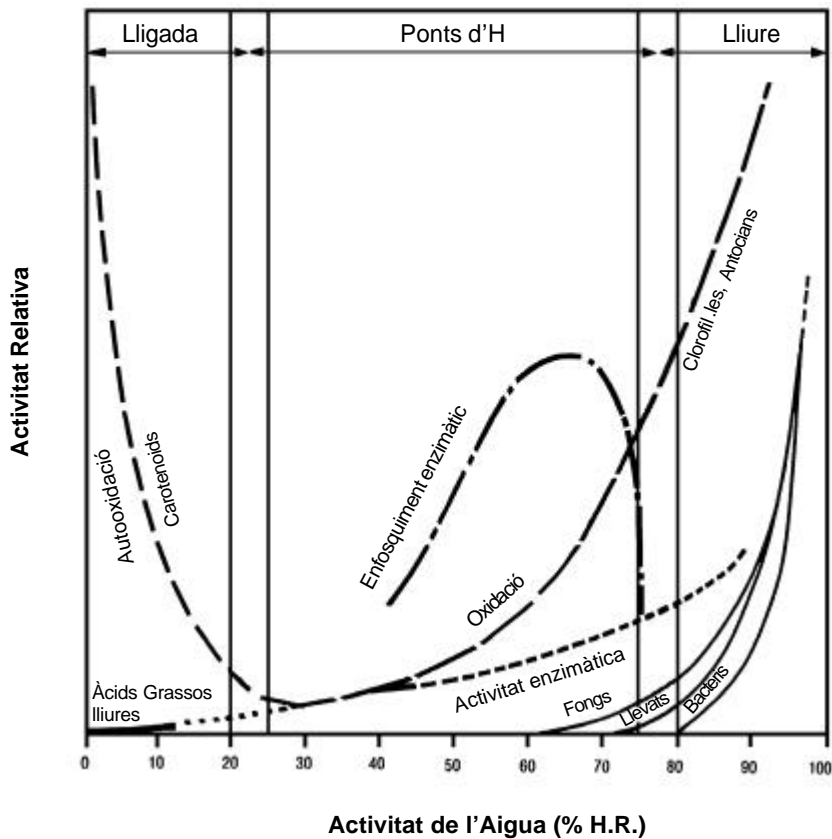


Figura 3.5. Velocitats relatives de les reaccions químiques i bioquímiques de degradació dels aliments i del creixement microbiològic en funció dels valors d' a_w (adaptat de Rockland i Beuchat, 1987).

Les determinacions de residus realitzades per l'IRTA (Centre de Tecnologia de la Carn, Monells) en plasma deshidratat han donat resultats negatius en totes les mostres pel que fa a la presència d'hormones i β -Agonistes. Seria preocupant haver detectat en el plasma la presència de concentracions considerables de promotors del creixement perquè tenen efectes negatius importants sobre la salut humana; poden provocar alteracions hormonals, hiperplàsies, al·lèrgies, alteracions del ritme cardíac i tenen propietats carcinogèniques, mutagèniques i teratogèniques (Pérez, 1995). En relació a les sulfonamides i corticosteroides s'han obtingut resultats positius només en una de les sis mostres analitzades, amb valors de 1,3 $\mu\text{g/g}$ i 320 ng/g , respectivament. Les sulfonamides i corticosteroides poden ser conseqüència de tractaments veterinaris

subministrats als animals abans del sacrifici, possiblement a través del pinso. Com a efectes negatius del consum d'aquestes substàncies poden esmentar-se fenòmens d'intolerància i al·lèrgia en persones sensibles i, en casos d'ingesta continuada, l'aparició de resistències bacterianes. Les concentracions detectades són baixes però caldria aprofundir en l'estudi de la presència d'aquest tipus de substàncies per confirmar els nivells i determinar la freqüència amb què es detecten en el producte en pols i fer una avaluació dels riscos. Seria convenient també incloure determinacions d'alguns pesticides que podrien haver arribat als animals també a través del pinso.

3.3.2.2 Anàlisis microbiològiques

Els resultats dels recomptes de microorganismes per la sang sencera, pel plasma separat per centrifugació i per una solució al 10 % de plasma atomitzat, es mostren en la figura 3.6, on es pot observar la reducció de càrrega microbiana que comporten els tractaments de centrifugació i deshidratació per atomització sobre els diferents grups de microorganismes estudiats. Pel cas del producte deshidratat, s'han representat els nivells de contaminació d'una solució al 10%, és a dir amb el mateix extracte sec que el plasma original, per tenir resultats comparables als del plasma líquid obviat l'efecte de concentració que el procés ha tingut també sobre els microorganismes.

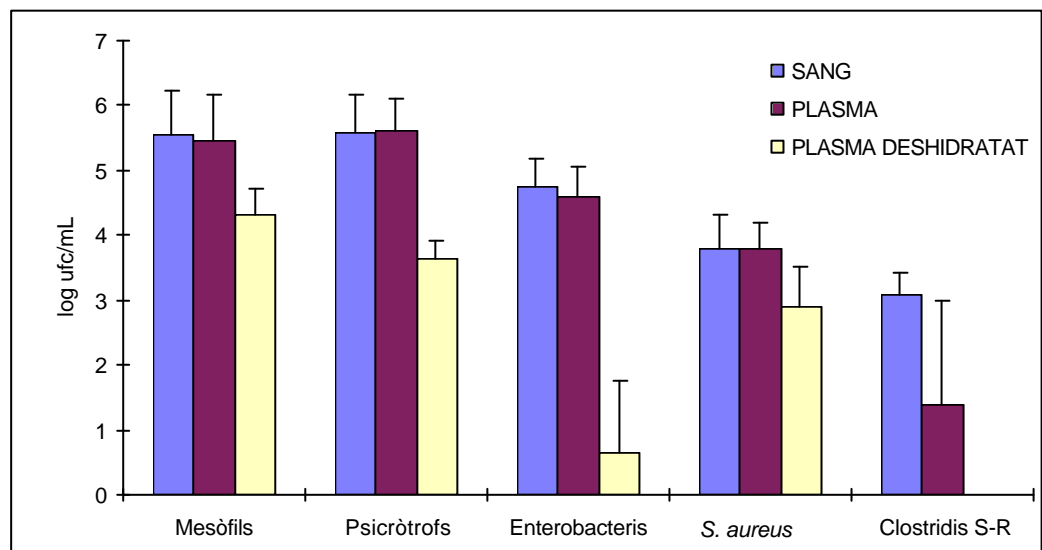


Figura 3.6. Recomptes de microorganismes (log ufc/mL) en sang, plasma i plasma deshidratat reconstituït al 10% (p/v). Les barres indiquen l'interval de confiança (95%) de les mitjanes.

Veiem que l'efecte de la centrifugació ha estat pràcticament inapreciable, mentre que l'atomització sí que ha representat una disminució considerable de la càrrega contaminant, més o menys important segons el grup de microorganismes estudiat. Cal tenir present la possibilitat que una part de la reducció observada sigui deguda a processos d'agregació cel·lular provocats pel procés tecnològic i que es manifesten com a una disminució en el nombre d'unitats formadores de colònies aparegudes en les plaques de sembra. Caldria avaluar quina és la contribució de processos d'aquest tipus sobre els percentatges de reducció que s'han determinat i que, en aquest treball, s'han considerat equivalents a percentatges de mortalitat.

Sobre la càrrega microbiana global, indicada pels recomptes de microorganismes aeròbics mesòfils, s'ha obtingut una reducció d'aproximadament una unitat logarítmica, que, tot i representar l'eliminació del 90% dels microorganismes, comporta l'obtenció d'un producte deshidratat encara amb una contaminació microbiana important. En el cas dels psicròtrofs, la reducció durant l'assecamment ha estat de dues unitats logarítmiques, probablement perquè aquest grup de microorganismes, constituït principalment per bacteris gram-negatius amb capacitat d'adaptar-se al creixement a baixes temperatures, són més sensibles a l'exposició a temperatures elevades, essent el factor limitant la temperatura de desnaturalització dels seus enzims respiratoris. L'elevat contingut en bacteris psicròtrofs, malgrat que el producte en pols s'emmagatzemi a temperatura ambient, és preocupant també pel fet que aquests microorganismes acostumen a ser responsables de la síntesi d'enzims proteolítics i lipolítics termoresistents, i ja hem vist en l'apartat anterior que els processos de lipòlisi es poden donar a valors molt baixos d'activitat d'aigua.

La reducció més important s'obté sobre el grup de les enterobacteriàcies, microorganismes gram-negatius termolàbils, pels quals temperatures d'uns 60-65°C comporten ja efectes letals.

El cas dels clostridis sulfit-reductors mereix un comentari pel fet que el seu comportament no és el que es podia haver suposat *a priori*. Aquest grup està integrat per bacils gram-positius amb capacitat de formar espores, formes de resistència a condicions ambientals adverses, i mostren, per tant, una capacitat per sobreviure a tractaments tèrmics importants molt superior a altres grups bacterians. Ja hem comentat que el procés d'atomització efectuat permet tractar productes termosensibles perquè la temperatura a la qual està exposada la partícula no supera els 80°C. Caldria esperar, doncs, que els clostridis presents en el producte líquid es trobessin també en el plasma deshidratat, però en cap de les mostres de pols analitzades s'han aïllat clostridis sulfit-reductors. Una possible explicació podria ésser que es partia de concentracions en plasma líquid força més baixes que qualsevol dels altres grups investigats, i que probablement en el producte líquid es trobaven en forma vegetativa, per la qual cosa el

tractament tèrmic del procés ha estat suficient per a què no es detecti la seva presència en el producte deshidratat.

En la taula 3.3 es mostren els valors d' a_w mínims pel creixement i la producció de toxines de determinats patògens de transmissió alimentària. Aquestes dades suggereixen que els aliments amb activitats d'aigua per sota de 0,78-0,8 no poden ser responsables d'intoxicacions alimentàries. Observem que les espècies fúngiques són generalment més osmotolerants que les bacterianes tant en la seva capacitat de créixer com en la de produir toxines a baixos valors d' a_w .

Taula 3.3. Límit inferior d' a_w per al creixement i la producció de toxines d'alguns patògens d'aliments

Organisme	a_w mínima	
	Creixement	Producció toxines
espècies de <i>Salmonella</i>	0,94	-
<i>Clostridium botulinum</i> (tipus A i B)	0,93	0,84
<i>Clostridium perfringens</i>	0,95	no es coneix
<i>Bacillus cereus</i>	0,93	-
<i>Aspergillus flavus</i>	0,83	0,78
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	0,94	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86	0,89
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,93	-

Font: Troller (1989)

L'espècie bacteriana que pot créixer a valors més baixos d' a_w (0,86) és *Staphylococcus aureus*, tot i que veiem que la possibilitat d'elaborar toxines d'aquest patògen s'inhibeix a valors superiors. Donat que en les anàlisis de matèria primera es van obtenir recomptes elevats de *Staphylococcus aureus*, que aquesta espècie és el grup de bacteris que s'ha mostrat menys susceptible al procés d'atomització (Figura 3.6) i que les enterotoxines que sintetitza són proteïnes termoestables, es va fer una investigació de la possible presència d'enterotoxines estafilocòciques en el producte deshidratat i en el plasma líquid a partir del qual s'havia obtingut.

Les mostres de sang, plasma o plasma deshidratat no contenen els nivells de contaminació per *S. aureus* enterotoxigenic que generalment s'assumeix que es requereixen per produir nivells apreciables d'enterotoxines, una població de varis milions

de cèl·lules per mil·lilitre o gram d'aliment (Frazier i Westhoff, 1988; Newsome, 1988; De Solan *et al.*, 1990). Malgrat això en l'estudi es va detectar presència d'enterotoxines estafilocòciques en 3 mostres de plasma en pols sobre un total de 11 mostres analitzades. En tots tres casos la investigació d'enterotoxines en el plasma líquid de partida també va resultar positiva. Els grups serològics de les enterotoxines detectades coincidien en el plasma líquid i en el plasma deshidratat corresponent i pertanyien als grups A, el grup serològic més freqüentment responsable d'intoxicacions alimentàries segons Frazier i Westhoff (1988).

Les mostres positives donaven sempre valors d'absorbància propers al considerat com a valor discriminant (*cut-off*) del test i això fa sospitar, tot i que l'enzimoinmunoassaig realitzat és només una prova qualitativa, que la concentració d'enterotoxines que podien contenir estava prop del límit de detecció de la tècnica, entre 0,2 i 0,7 ng/mL, que correspondrien a valors d'entre 2 i 7 ng de toxina per gram de plasma deshidratat. Tanmateix és important tenir en compte el fet que algunes mostres presentin nivells apreciables d'enterotoxines estafilocòciques ja que existeixen estudis que conclouen que només entre 100 i 200 ng de toxina en determinats aliments són suficients per provocar símptomes d'intoxicació en consumidors sensibles (Evenson *et al.*, 1988).

L'elevada càrrega contaminant i la presència de microorganismes deteriorants o capaços de sintetitzar toxines en el producte deshidratat no són preocupants pels possibles efectes sobre la qualitat del producte en pols durant el seu emmagatzematge, ja que com hem vist els baixos nivells d'activitat d'aigua asseguren la inhibició de la seva activitat. Cal tenir-los en compte, però, perquè podrien suposar un risc considerable quan s'afegís el plasma deshidratat com a ingredient en la formulació d'algun altre aliment, on podrien provocar alteracions, introduir olors estranyes i fins i tot suposar un perill des del punt de vista sanitari.

3.3.2.3 Anàlisi calorimètrica (DSC)

Els canvis induïts pels tractaments tèrmics en les proteïnes alimentàries condueixen sovint al desplegament de l'estructura nativa o desnaturalització. La majoria de les propietats funcionals de les proteïnes depenen de la seva capacitat per desplegar-se sota condicions específiques del medi on es troben. Dins el context de funcionalitat de proteïnes alimentàries, entenem com a estat desnaturalitzat una variació significativa en la conformació tridimensional que presenta la proteïna en el seu medi natural (per exemple quan una proteïna globular s'escalfa a temperatures de 80°C). S'anomena sovint "desnaturalització o desplegament parcial" a les petites desviacions de l'estructura nativa que es poden donar degut a lleugeres modificacions de les condicions del medi natural de

la proteïna (força iònica, pH, temperatura, etc.) (Dickinson i McClements, 1995). L'estat desnaturalitzat pot ser reversible o irreversible segons les condicions ambientals i les interaccions inter i intramoleculares de la molècula proteica desplegada. La tècnica DSC, com s'ha comentat anteriorment, és útil per avaluar l'estat natiu o desnaturalitzat d'una proteïna (apartat 3.2.3.3).

Posada a punt del mètode analític

En la figura 3.7, que mostra les corbes DSC obtingudes en l'anàlisi de les mostres de plasma sotmeses a diferents velocitats d'escalfament, podem observar que les velocitats de 0,5, 1, 2 i 3°C/min permeten obtenir un pic endotèrmic d'entalpia quantificable dins el rang de temperatures de 30 a 100°C. Una velocitat superior (5°C/min) proporciona un pic incomplet i, per tant, de difícil quantificació. Per obtenir un pic complet a aquesta velocitat seria necessari arribar fins a temperatures superiors, on es solaparia amb transicions associades a processos de descomposició, observats a partir dels 100°C.

Els valors mitjans d'entalpia (DH) i temperatura de desnaturalització (T_d) obtinguts per a cada velocitat es presenten en la taula 3.4.

Taula 3.4. Temperatures de desnaturalització (T_d) i entalpia de transició (DH) determinats per DSC en plasma sotmès a diferents velocitats d'escalfament.

Velocitat escalfament (°C/min)	T_d (°C)	DH (J/g)
0,5	65,45 ± 1,47	8,1 ± 1,76
1	67,45 ± 0,53	9,15 ± 1,49
2	75,7 ± 0,19	10,35 ± 1,46
3	76,51 ± 0,34	9,64 ± 0,56
5	80,1 ± 0,63	n.d.

S'indica la mitjana de, com a mínim, dues determinacions i l'interval de confiança (95%) de cada mitjana. n.d.: no determinat

Les diferències entre les entalpies calculades per velocitats inferiors a 5°C/min no són molt importants. Per això s'ha considerat adequat realitzar les anàlisis calorimètriques amb la velocitat més elevada, 3°C/min, optimitzant així el temps esmerçat en cada anàlisi.

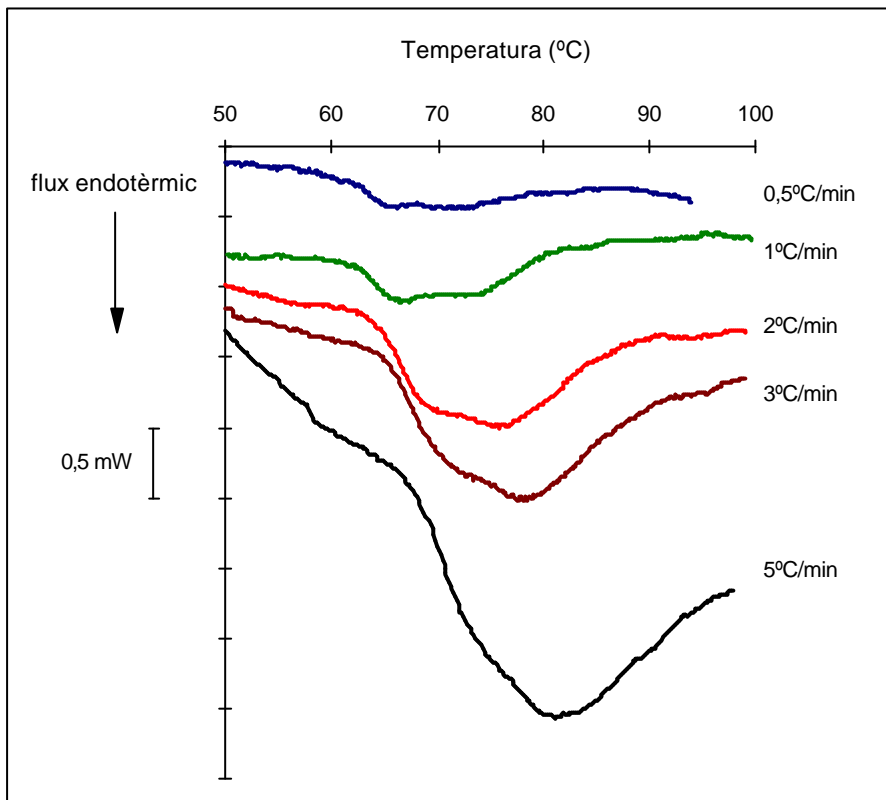


Figura 3.7. Corbes DSC de mostres de 100 μL de plasma de sang porcina a diferents velocitats d'escalfament.

Les anàlisis realitzades a velocitats més lentes (0,5°C/min i 1°C/min) permeten intuir la presència de dos pics endotèrmics solapats, que correspondrien probablement a proteïnes plasmàtiques diferents i que no s'observen a velocitats superiors. No s'ha obtingut una bona separació dels pics sota cap de les condicions experimentals assajades i, per tant, s'ha decidit treballar amb el pic únic obtingut a la velocitat de 3°C/min. Cal tenir en compte que el producte estudiat no està constituït per una única proteïna i que es necessari atribuir el pic observat al conjunt de processos experimentats per les diferents proteïnes del plasma.

Un altre aspecte a considerar és que la formació d'agregats proteics, en aquest cas la gelificació del plasma durant l'escalfament fins a 100°C, comporta l'existència de reaccions exotèrmiques que disminueixen l'entalpia neta del pic de transició (Myers, 1990) i que, per tant, participen de manera important en les variacions observades en els paràmetres estudiats. El valor d'entalpia observat per calorimetria és de difícil interpretació en aquestes situacions on no es manté la reversibilitat termodinàmica. Per mantenir la reversibilitat caldria aconseguir o bé l'absència de gelificació, impossible en el cas del plasma, o bé la separació en el temps dels fenòmens de desplegament i agregació. Les velocitats d'escalfament ràpides afavoririen aquesta separació temporal però existeix la limitació imposada per la transferència de calor de la mostra. Per obtenir informació addicional sobre l'estabilitat tèrmica del plasma seria recomanable utilitzar tècniques analítiques complementàries (espectre infraroig, dicroïsme circular, estudis reològics del gel) que proporcionessin dades relacionables amb les de les anàlisis calorimètriques.

El tractament de les dades obtingudes a una velocitat de 3°C/min mostra una bona reproductibilitat en els valors de ΔH i Td. Els coeficients de variació obtinguts han estat de 1,1% i 14,3%, respectivament, per n=23.

Efecte del procés de deshidratació sobre l'estabilitat tèrmica

En la figura 3.8 es mostren els termogrames obtinguts en l'anàlisi per DSC de mostres de plasma líquid i plasma deshidratat per atomització per dos dels valors de pH estudiats (7,4 i 5,5).

Podem observar que les corbes DSC dels dos tipus de mostra són pràcticament idèntiques pels mateixos valors de pH. En la taula 3.5, on es presenten les mitjanes de totes les anàlisis efectuades, i per a tots els nivells de pH, s'observa que els valors d'entalpia calculats pels dos tipus de mostra són similars. L'anàlisi estadística de les dades confirma que no existeixen diferències significatives ($P > 0,05$) entre elles. Si es donessin aquestes diferències podrien ser atribuïdes a l'efecte desnaturalitzador del procés tecnològic de deshidratació aplicat al plasma líquid per a l'obtenció del producte en pols; per tant, l'anàlisi ens permet deduir que l'atomització no provoca desnaturalització de les proteïnes plasmàtiques. Sí que es pot observar, però, un lleuger desplaçament de la temperatura de pic cap a valors més elevats en totes les mostres de plasma deshidratat respecte a les de plasma líquid als mateixos valors de pH. Això podria ser indicatiu de l'existència de modificacions estructurals de les proteïnes que afecten la seva estabilitat tèrmica i que no es tradueixen en variacions de l'energia global implicada en el procés de desnaturalització i posterior gelificació que es donen durant l'anàlisi.

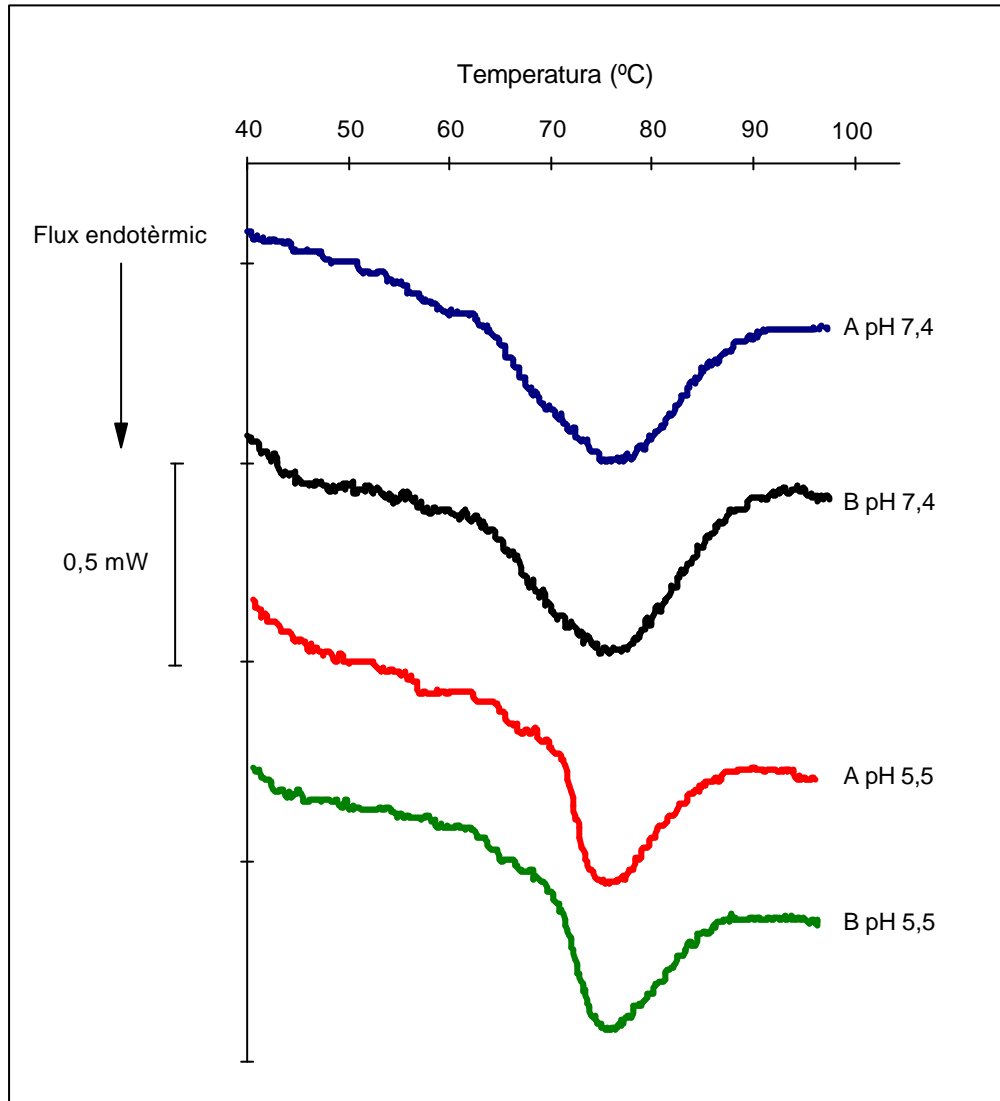


Figura 3.8. Corbes DSC de mostres de 100 μL de plasma líquid (A) i una dissolució al 10 % (p/v) de plasma deshidratat (B). Velocitat d'escalfament de 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Segons els resultats mostrats en la taula 3.5 sí que es donen variacions en ambdós paràmetres calorimètrics, DH i T_d , en funció del pH. S'observa una disminució progressiva del valor de DH a mesura que es redueix el pH i un descens brusc a pH al voltant de 5

que coincideix amb el pH isoelectric de la proteïna plasmàtica majoritària (seroalbúmina). A pH 4 ja no s'obté pic de transició probablement degut a què la desnaturalització de les proteïnes plasmàtiques s'ha produït durant l'ajust de pH, tal com suggereixen Barbut i Findlay (1990) en l'estudi de l'efecte del pH sobre les proteïnes de la clara de l'ou. Igualment, la temperatura de desnaturalització disminueix a mesura que el pH és més baix i això contribueix a evidenciar el canvi conformacional que s'ha produït. Aquests resultats coincideixen amb els descrits en treballs similars sobre altres proteïnes, com la *###*-conglucina (Nagano *et al.*, 1994), la ribulosa 1,5-bisfosfat carboxilasa/oxigenasa (Béghin *et al.*, 1993), la globulina 12S de *Brassica campestris* (Leger i Arntfield, 1993) o altres proteïnes d'origen vegetal (Arntfield *et al.*, 1990; Myers, 1990; Paredes-López *et al.*, 1990; Nagano *et al.*, 1992).

Taula 3.5. Efecte del pH sobre els paràmetres calorimètrics (DSC) del plasma líquid i plasma deshidratat

pH	Plasma líquid		Plasma deshidratat	
	DH ^a (J/g)	Td ^b (°C)	DH (J/g)	Td (°C)
7,4	10,14 ± 0,79	75,74 ± 0,63	10,50 ± 1,26	76,40 ± 0,98
5,5	6,50 ± 0,56	75,55 ± 0,17	6,50 ± 0,98	76,25 ± 1,67
4,5	3,50 ± 0,98	64,45 ± 2,25	2,50 ± 0,98	67,20 ± 1,76
4,0	0	-	0	-

S'indica la mitjana i l'interval de confiança (95%), per n=4.

^a: Entalpia de transició; ^b: Temperatura de desnaturalització

Les diferències entre els valors d'entalpia i els de temperatura de pic obtinguts en diferents condicions de pH són significatives ($P < 0,05$) (annexos 5a i 5b) i indiquen que el grau de desnaturalització àcida de les mostres afecta l'estabilitat tèrmica de les proteïnes plasmàtiques i facilita el procés de desnaturalització que es produeix durant l'anàlisi calorimètrica. Aquestes observacions coincideixen amb les descrites en estudis del mateix tipus per les proteïnes de la clara d'ou (Barbut i Findlay, 1990).

Ja que les diferències en els valors de Td i *###H* poden atribuir-se a diferents nivells de desnaturalització proteica, tal com ha estat proposat per altres autors (Murray *et al.*, 1985) aquests resultats suggereixen que la desnaturalització tèrmica de les proteïnes plasmàtiques es facilita quan el pH baixa per sota de 5. Sembla ser que el grau de protonació dels grups carboxil a pH àcid provoca un canvi en el balanç de forces

electrostàtiques que afavoreix la transició de la forma nativa de les proteïnes a l'estat desnaturalitzat.

3.3.2.4 Propietats funcionals

Les proteïnes, que poden ser presents en els aliments de manera natural (ovoalbúmina en ous, proteïnes sèriques i caseïnes en llet, actomiosina en carn, etc.) o es poden afegir com a ingredients estructurals durant el processament de productes elaborats (postres, begudes, etc.), a més de tenir interès des del punt de vista nutricional presenten un ventall important de propietats funcionals.

En aquest estudi s'han determinat algunes característiques físico-químiques i s'han realitzat proves empíriques amb la intenció d'aconseguir una caracterització de la funcionalitat del plasma deshidratat.

3.3.2.4.1 Solubilitat

Els productes proteics que s'utilitzen com a ingredients en la formulació de molts aliments, generalment deshidratats per atomització, han de presentar sovint un grau de solubilitat elevat per tal de ser útils i funcionals. La solubilitat d'aquests productes depèn del seu estat físico-químic o el de les seves molècules proteiques, que es poden veure afectades favorablement o adversa per la calor, la deshidratació i altres tractaments als quals són sotmeses durant el processament i l'emmagatzematge. En el nostre cas, el tractament tèrmic és imprescindible per reduir el contingut d'aigua del plasma líquid però la solubilitat de la majoria de les proteïnes es redueix de manera irreversible durant l'escalfament. Per tant és important l'avaluació del possible efecte del tractament de deshidratació sobre la solubilitat del producte final i, posteriorment, l'estudi del seu efecte sobre altres propietats funcionals.

La solubilitat de les proteïnes en aigua depèn de nombrosos paràmetres. Des del punt de vista termodinàmic, la solubilització correspon a una dissociació simultània de les molècules del dissolvent i les de les proteïnes, prèviament dispersades en el dissolvent, amb una superfície interfacial de màxim contacte entre aquest i la proteïna (Cheftel *et al.*, 1989). La solubilitat depèn fonamentalment del pH, la força iònica, el tipus de dissolvent i la temperatura. En aquest estudi s'ha determinat la solubilitat en aigua de la fracció proteica del plasma deshidratat, a temperatura ambient, a la força iònica normal del producte (condicionada pel citrat sòdic utilitzat com a anticoagulant en el procés de recollida de la sang) i a dues condicions de pH: neutre (7,0) i àcid (4,5). S'han obtingut els resultats que es mostren en la figura 3.9.

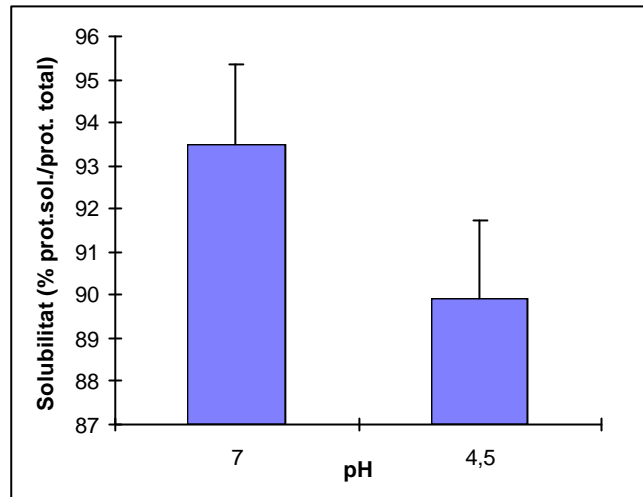


Figura 3.9. Solubilitat del plasma deshidratat a pH 7 i pH 4,5. Mitjana i interval de confiança (95%), n=13.

Hem obtingut valors de solubilitat de la fracció proteica del plasma deshidratat força elevats pels dos valors de pH estudiats: sempre superiors al 90% a pH neutre i quasi del 90% a pH àcid (4,5). Aquestes dades coincideixen amb les descrites per plasma liofilitzat, utilitzat com a control en un estudi sobre l'efecte de la temperatura d'atomització (160 i 193°C) en la solubilitat de les proteïnes de la sang (Tybor *et al.*, 1975).

Veiem que l'efecte del procés tecnològic d'atomització sobre la solubilitat proteica del producte deshidratat en aquest cas ha estat poc important, sobretot en relació als resultats de l'estudi de Tybor *et al.*, on l'atomització comporta una reducció de solubilitat del 20% respecte al control liofilitzat. Chinprahast *et al.* (1995), en canvi, determinen percentatges de solubilitat proteica del voltant del 80% en plasma atomitzat a temperatures de 180-190°C, significativament superiors als que presenten mostres obtingudes per atomització a temperatures més baixes (150, 160 i 170°C).

Una proteïna, amb valors de pH superiors o inferiors al punt isoelèctric, té càrrega negativa o positiva i les molècules d'aigua reaccionen amb aquestes càrregues contribuint a la seva solubilització. En l'estudi de Tybor *et al.* (1975) s'estableix que a pH 4,8, que és el que correspon a la mínima solubilitat de les proteïnes plasmàtiques ja que coincideix amb el punt isoelèctric de la proteïna majoritària, aproximadament un 74 % de la proteïna encara és soluble. Per tant, en el plasma el pH afecta relativament poc al grau de solubilitat.

El grau d'insolubilitat d'una proteïna és, probablement, la mesura més pràctica de la desnaturalització-agregació proteica. L'avantatge principal d'una elevada solubilitat inicial possiblement sigui el fet de permetre una dispersió completa i ràpida de les molècules proteiques, fet que condueix a un sistema col·loidal finament dispers, amb una estructura macroscòpica homogènia, i que millora la seva activitat superficial (Cheftel *et al.*, 1989). És per això que les proteïnes que es troben inicialment en estat desnaturalitzat, parcialment agregat, mostren sovint una disminució en la capacitat de gelificació, emulsió o formació d'escumes. De tota manera, i depenent de la naturalesa de les proteïnes, no sempre és imprescindible una elevada solubilitat inicial per a què aquestes propietats funcionals siguin bones ja que els processos de formació d'emulsions, escumes i gels pressuposen diferents graus de desplegament, agregació i insolubilització. Tanmateix, els resultats de solubilitat del plasma deshidratat condueixen a suposar que hi haurà poques diferències entre les seves propietats funcionals i les que presentava el plasma líquid

3.3.2.4.2 Capacitat escumant

L'escuma es defineix com a un sistema bifàsic que consisteix en una massa de bombolles de gas dispersades en una fase contínua líquida o semi-sòlida (Glicksman, 1982) i separades per pel·lícules primes del líquid o del sòlid. En el nostre cas, el gas és l'aire i la fase contínua és una solució aquosa que conté les proteïnes plasmàtiques. Aquestes, un cop aplicada l'energia mecànica necessària per a la incorporació de l'aire, actuen com a agents de superfície, rebaixant la tensió de la interfase gas-líquid i formant una barrera protectora elàstica entre les bombolles del gas per evitar la coalescència.

En la figura 3.10 es mostra la capacitat de formació d'escuma de les solucions estudiades i l'estabilitat d'aquesta escuma durant un període de dues hores de manteniment en repòs.

La capacitat escumant i l'estabilitat de l'escuma obtinguda són idèntiques per les mostres de plasma líquid i plasma deshidratat, per tant podem afirmar que aquesta propietat funcional tampoc es veu afectada pel procés tecnològic d'atomització.

El volum d'escuma obtingut a partir de les solucions de plasma és un 50% superior al de les de la clara d'ou utilitzada com a referència. L'escuma de la clara d'ou, però, és molt més estable. Les bombolles d'aire en l'escuma són més petites i, al cap de dues hores, encara es manté el 68,7% del volum d'escuma inicial. L'escuma del plasma presenta bombolles d'aire més grans, s'observa una reducció exponencial durant tot el període de repòs i al cap de dues hores només es manté aproximadament un 20 % del

volum d'escuma aconseguit per agitació de les solucions. La reducció del voltant del 30 % del volum que es produeix al cap de dues hores en la clara d'ou es dona, en les solucions de plasma, durant la primera mitja hora de repòs.

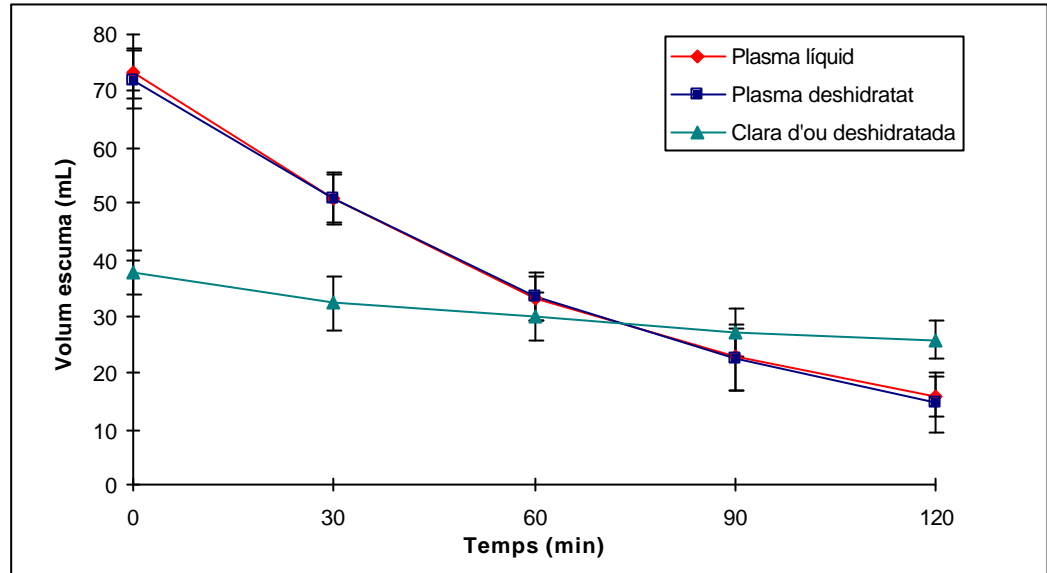


Figura 3.10. Capacitat escumant i estabilitat de l'escuma del plasma líquid, deshidratat i clara d'ou deshidratada. Mitjana de quatre mostres i interval de confiança (95%).

Tybor *et al.* (1975) en un estudi sobre la propietat escumant dels dos productes en funció de la concentració de proteïna no coincideixen amb les nostres conclusions sobre la seva capacitat escumant. En aquest estudi, per a qualsevol concentració de proteïna (des de 0,25 fins a 1,5 g de proteïna per 50 mL de solució) el volum d'escuma obtingut amb solucions de plasma i clara d'ou és similar. L'explicació d'aquestes discrepàncies pot radicar en el fet que la clara d'ou que nosaltres utilitzem com a referència correspon a un producte en pols que pot haver perdut part de la seva funcionalitat en el procés de deshidratació; Tybor *et al.* (1975), en canvi, utilitzaven clara d'ou fresca. De tota manera Raeker i Johnson (1995), obtenen resultats similars als de l'estudi de Tybor i arriben a la conclusió que, sota les seves condicions experimentals, la capacitat escumant del plasma és similar tant a la de la clara d'ou en pols comercial com a la de la deshidratada per atomització a partir d'ous frescos al laboratori.

Tybor *et al.* (1975) obtenen també que amb solucions de 1,7 g de proteïna/100 mL (concentració de proteïna òptima pel que fa a volum d'escuma obtingut) les proteïnes plasmàtiques aïllades donen, en funció del pH, una resposta lineal. El volum d'escuma

decreix des de 133 mL a pH 4 fins a 108 mL a pH 9,6; de Vuono *et al.* (1979), en canvi, publiquen que la capacitat escumant s'incrementa en augmentar el pH des de 4 fins a 8.

Tant en el treball de Tybor *et al.* (1975) com en l'estudi de Raeker i Johnson (1995) es conclou, coincidint amb els nostres resultats, que l'estabilitat de l'escuma formada amb solucions de clara d'ou és molt superior a la de solucions de plasma. El canvi que experimenta l'escuma de les proteïnes plasmàtiques durant els primers deu minuts de repòs en l'estudi de Tybor *et al.* (1975) és de tres a quatre vegades més alt que en el cas de la clara d'ou. Una possible explicació d'aquestes diferències en l'estabilitat pot radicar en el fet que la clara d'ou presenta una viscositat inicial molt baixa, que permet la ràpida incorporació d'aire en el líquid, seguida d'un increment ràpid de la viscositat durant l'agitació. L'excel·lent capacitat escumant és possiblement deguda a la seva gran facilitat per desplegar-se i adsorbir-se en la interfase aire-aigua, per encapsular les bombolles d'aire i per formar polímers proteïna-proteïna que incrementen la viscositat i estableixen l'escuma (Kato *et al.*, 1990a). Malgrat que les proteïnes plasmàtiques semblen funcionar molt bé en les fases inicials del procés (desplegament, adsorció i encapsulament), potser no són capaces de formar els polímers proteïna-proteïna necessaris per proporcionar viscositat i l'estabilitat desitjada a l'estructura.

3.3.2.4.3 Activitat emulsionant

Les propietats emulsionants són importants en moltes aplicacions alimentàries d'ingredients proteics. Normalment s'avaluen a través de paràmetres com la capacitat emulsionant, l'estabilitat de l'emulsió o l'activitat emulsionant. La capacitat emulsionant representa la màxima quantitat d'oli emulsionada per una determinada quantitat de proteïna sota condicions específiques. L'estabilitat de l'emulsió s'expressa normalment com la quantitat d'oli o fase lipídica separada de l'emulsió durant un període de temps, sota condicions determinades de temperatura i camp gravitacional, o bé com el temps necessari per a què es produeixi un determinat grau de separació de fases. L'activitat emulsionant és una mesura de l'eficàcia de l'agent emulsionant basada en la determinació de l'àrea interfacial de les partícules de l'emulsió.

Es va intentar determinar la capacitat emulsionant amb una tècnica basada en la utilització d'un colorant lipofílic (Sudan III) que havia de permetre observar la inversió de fase (oli en aigua → aigua en oli) de l'emulsió obtinguda a partir de l'addició gradual d'oli a una dilució del plasma. Alguns autors (Mohanty *et al.*, 1988b; Mulvihill i Murphy, 1991; Murphy i Fox, 1991b; Guo *et al.*, 1996) descriuen, per emulsions a partir de caseinat sòdic, que amb la fase lipídica tenyida es pot observar el moment en què l'oli passa de ser la fase dispersa a ser la fase contínua de l'emulsió. Amb el nostre producte no s'apreciava bé la inversió i no va ser possible quantificar la capacitat emulsionant amb

aquest mètode. Tanmateix, les proves ens varen permetre observar que el plasma estabilitzava molt millor les emulsions d'aigua en oli (W/O) que les d'oli en aigua (O/W).

Es va desestimar també una tècnica basada en mesures de conductivitat elèctrica ja que no es disposava d'un sistema per poder enregistrar en continu i de manera automatitzada els canvis de conductivitat en l'emulsió que ens podien indicar la quantitat d'oli emulsionada per la solució proteica abans que es produís la inversió de fase.

L'habilitat d'una proteïna per contribuir a la formació d'una emulsió està relacionada amb la seva capacitat d'adsorbir i estabilitzar la interfase oli-aigua. La capacitat emulsionant d'una proteïna ha d'estar relacionada amb l'àrea interfacial que pot ser recoberta per la proteïna disponible; de la mateixa manera, l'estabilitat de l'emulsió ha d'estar relacionada amb la constància d'aquesta àrea interfacial. La dispersió de la llum provocada per partícules esfèriques implica que hi ha una relació simple entre la terbolesa i l'àrea interfacial d'una emulsió (Pearce i Kinsella, 1978). Les mesures de terbolesa són relativament fàcils d'obtenir mitjançant un espectrofotòmetre i per això, tal com es descriu en l'apartat corresponent a material i mètodes, en aquest estudi s'ha utilitzat una tècnica basada en lectures espectrofotomètriques per avaluar l'activitat emulsionant de les solucions de plasma.

Es van trobar força referències bibliogràfiques (Nakamura *et al.*, 1984; Saito *et al.*, 1988; Haque i Kinsella, 1989b, Britten i Giroux, 1991; Matsudomi *et al.*, 1995; Raeker i Johnson, 1995) sobre la utilització del mètode turbidimètric, totes basades en la tècnica proposada per Pearce i Kinsella (1978).

Pearce i Kinsella (1978), a partir de les lectures turbidimètriques d'emulsions diluïdes, calculaven un índex d'activitat emulsionant (EAI) que definien com $EAI = 2T/\phi C$, on C és la concentració (p/v) de proteïna en la solució abans de l'emulsió, T és la terbolesa i ϕ és la fracció volumètrica de la fase dispersa. Els mateixos autors establien que l'EAI era un índex que semblava més directament relacionat amb el comportament pràctic dels productes estudiats que els valors de capacitat emulsionant o estabilitat de l'emulsió, i que podia servir per avaluar el potencial de les proteïnes per actuar com a agents emulsionants. Com que la densitat òptica de l'emulsió diluïda està directament relacionada amb l'àrea interfacial (Pearce i Kinsella, 1978), en el present treball s'ha optat per utilitzar els valors d'absorbància directament com a índex d'activitat emulsionant, tal com s'ha fet en altres estudis (Nakamura *et al.*, 1984).

Cal tenir en compte que el grau de dispersió de l'oli i el valor d'EAI que s'obté es veu afectat pel volum de l'emulsió, el tipus d'aparell emulsionant, la velocitat i la durada de l'operació, i el tipus i quantitat d'oli utilitzat (Tornberg i Hermansson, 1977; Pearce i Kinsella, 1978). Per això els índexs d'activitat emulsionant no s'han de considerar com a una propietat només de les mostres analitzades sinó del conjunt del sistema. Tanmateix,

un cop estandarditzat el mètode d'anàlisi els resultats són prou repetitius per establir comparacions entre les diferents mostres i prou vàlids per evidenciar l'efecte que el processament, l'atomització en aquest cas, i el pH puguin tenir sobre aquesta propietat funcional.

En les figures 3.11 i 3.12 es mostren els resultats de les determinacions de l'activitat emulsionant del plasma líquid i deshidratat en funció del pH i de la concentració proteica de la solució. En aquest estudi no s'inclou la clara d'ou com a producte de referència degut a que presenta unes propietats emulsionants molt pobres (Nakamura *et al.*, 1984) i en la indústria alimentària no s'utilitza com a ingredient funcional amb aquesta finalitat. En l'estudi de Nakamura s'obtenen uns EAI per la seroalbúmina bovina i l'ovoalbúmina de 31 i 8, respectivament, per tant una activitat emulsionant 4 vegades superior en la proteïna majoritària del plasma que en la de la clara d'ou. Observem també en aquests resultats i en els d'altres estudis (De Vuono *et al.*, 1979; Caldironi i Ockerman, 1982) que les proteïnes plasmàtiques tenen millor capacitat emulsionant que la globina i, segons es cita en l'article de Nakamura *et al.* (1984) les proteïnes de llavor de cotó, de soja i de llet són pitjors agents emulsionants que la globina. Es pot concloure, per tant, que aquesta propietat funcional de les proteïnes plasmàtiques supera la de la majoria d'ingredients funcionals proteics utilitzats en aliments.

Els resultats mostren que tant el procés tecnològic (deshidratació per atomització) com el pH tenen poc efecte sobre l'activitat emulsionant del plasma de sang porcina. No s'observen diferències importants en els valors obtinguts per plasma líquid i deshidratat. Tybor *et al.* (1975) havien estudiat fins i tot l'efecte que la temperatura d'atomització podia tenir sobre aquesta propietat funcional, arribant a la conclusió que la capacitat emulsionant es mantenia constant dins tot l'interval de temperatures estudiat (160-193°C).

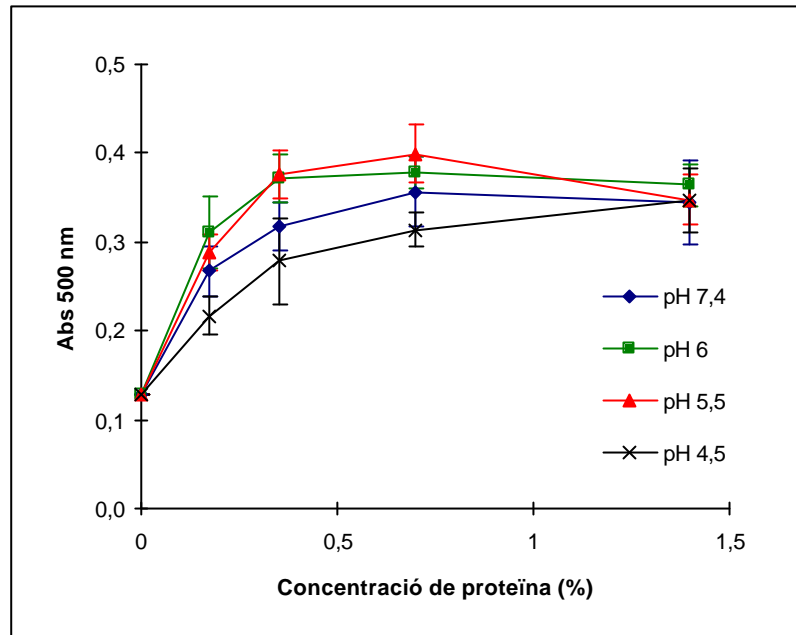


Figura 3.11. Activitat emulsionant del plasma líquid en funció del pH i la concentració de proteïna. Mitjanes i intervals de confiança (95%).

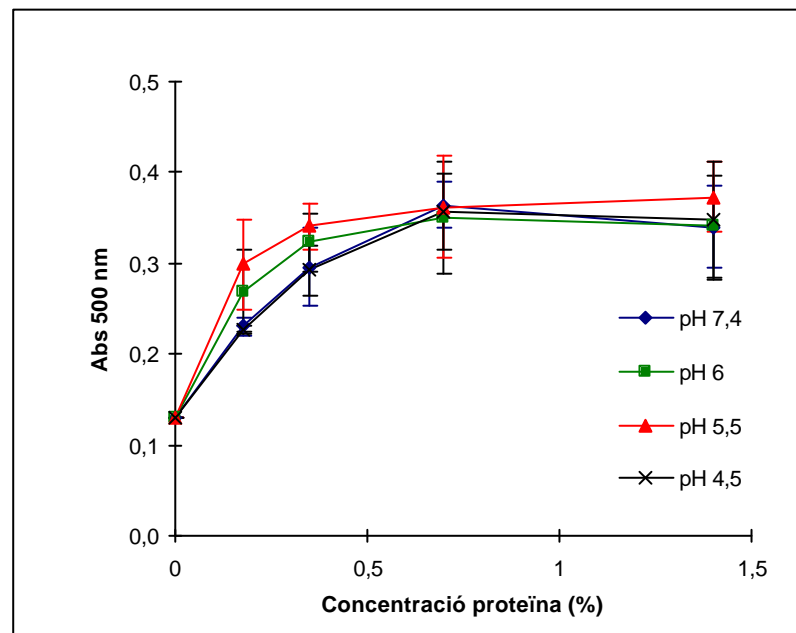


Figura 3.12. Activitat emulsionant del plasma deshidratat per atomització en funció del pH i la concentració de proteïna. Mitjanes i intervals de confiança (95%).

S'observa en les figures 3.11 i 3.12 que l'efecte de la concentració de proteïna sobre l'activitat emulsionant és hiperbòlic, coincidint amb el comportament descrit per altres autors i general per diferents proteïnes (Pearce i Kinsella, 1978; Nakamura *et al.*, 1984). Tybor *et al.* (1973) estableixen la màxima capacitat emulsionant del plasma de sang bovina a concentracions de proteïna al voltant de l'1% (p/v), mentre que en el nostre treball el màxim s'obtindria al voltant del 0,7%, concentració a partir de la qual un increment de concentració no comporta una millora de l'activitat emulsionant.

L'elevada variabilitat obtinguda, reflectida pels intervals de confiança de les mitjanes representades en els gràfics, fa que no es puguin considerar significatives les diferències entre les dues mostres ni entre els diferents nivells de pH. De fet, tant en l'estudi de Tybor *et al.* (1973) com en el de Nakamura *et al.* (1984) es constata també el poc efecte del pH sobre aquesta propietat de les proteïnes plasmàtiques, a diferència, per exemple, de la globina que presenta valors extremadament baixos a pH pròxims a 7, com a conseqüència de la baixa solubilitat de la proteïna al pH proper al seu punt isoelèctric. En el cas del plasma hem vist que la solubilitat es manté a nivells alts fins i tot a valors de pH propers al punt isoelèctric de la proteïna majoritària, la seroalbúmina, fet que explicaria també que sigui poc important l'efecte del pH sobre l'activitat emulsionant.

3.3.2.4.4 Gelificació : formació de gels per escalfament

La gelificació ha estat descrita per Glicksman (1982) com l'associació o enllaç de llargues cadenes polimèriques mitjançant ponts creuats per originar un entramat tridimensional continu que atrapa i immobilitza el líquid en el seu interior formant una estructura rígida resistent al flux sota pressió. La capacitat de les proteïnes globulars per formar xarxes tridimensionals resideix per tant en el desplegament de les molècules (Kinsella i Soucie, 1989). Els canvis induïts pels tractaments tèrmics en les proteïnes alimentàries condueixen sovint al desplegament de l'estructura nativa i, si les condicions són apropiades, els polipèptids s'agreguen formant aquesta xarxa tridimensional que anomenem gel. La gelificació és doncs un fenomen en què decreix el grau de dispersió d'una solució proteica perquè les molècules desnaturalitzades s'agreguen per formar aquesta xarxa ordenada.

La capacitat de gelificar és una propietat funcional interessant perquè els gels proporcionen textura i un medi que permet retenir aigua, nutrients i aromes i, per tant, juga un paper fonamental en la preparació de molts aliments. El més conegut dels agents gelificants proteics és la gelatina, que forma un gel reversible -gelifica a baixes temperatures i fon a temperatures altes- al llarg de tota la gamma de pH sense necessitat d'afegir sucres o cations metàl·lics. Aquest gel no presenta sinèresi. En canvi les proteïnes de la clara de l'ou tenen un comportament completament diferent, i més

semblant a les del plasma sanguini: formen un gel irreversible per escalfament i condicionat pel pH, la força iònica i la presència d'altres substàncies.

En aquest estudi hem fet una aproximació a les característiques dels gels formats per escalfament de les proteïnes plasmàtiques des de tres punts de vista: la seva capacitat per retenir aigua, la seva consistència i la microestructura de la xarxa proteica.

Capacitat de retenció d'aigua (CRA)

En la figura 3.13 es representen les mitjanes de capacitat de retenció d'aigua dels gels obtinguts a partir dels diferents productes i per a cada valor de pH, i es pot observar que, en general, l'acidificació provoca una disminució significativa ($P < 0,05$) d'aquesta propietat.

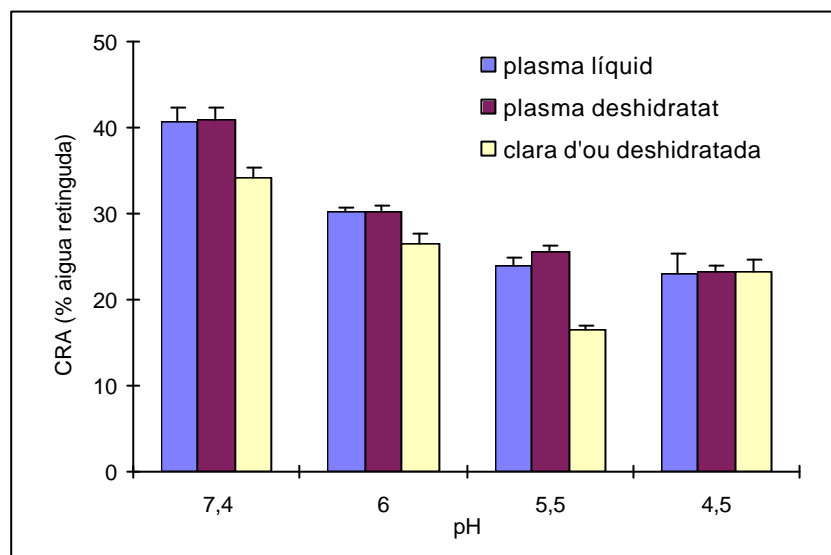


Figura 3.13. Capacitat de retenció d'aigua (CRA) dels gels de plasma de sang porcina líquid i deshidratat i de clara d'ou deshidratada. Mitjanes \pm interval de confiança (95%).

A la taula 3.6 es presenten els resultats del test de separació de mitjanes realitzat en obtenir diferències significatives ($P < 0,05$) entre els tres productes i els diferents nivells de pH (annex 6a). En les proteïnes plasmàtiques, tant de plasma líquid com deshidratat, s'observa que a pH 7,4 els gels presenten un comportament significativament millor que el demostrat per gels a pH inferiors. La desnaturalització àcida de las proteïnes té, per tant, un efecte negatiu sobre la capacitat de retenir aigua dels gels formats per escalfament.

Els valors obtinguts i l'estudi de separació de mitjanes mostren que les diferències entre els valors de CRA a pH 5,5 i 4,5 són molt petites. Aquest resultat indica que a partir de pH 5,5 s'assoleix un mínim en la capacitat de retenció d'aigua i que aquesta propietat es veu poc modificada encara que es disminueixi més el pH.

Taula 3.6. Capacitat de retenció d'aigua de gels de plasma líquid, deshidratat i clara d'ou deshidratada

pH	CRA (% d'aigua retinguda)		
	Plasma líquid	Plasma deshidratat	Clara d'ou deshidratada
7,4	40,7 ± 1,6 A a	41,0 ± 1,4 A a	34,3 ± 1,0 B a
6	30,3 ± 0,5 A b	30,2 ± 0,7 A b	26,5 ± 1,0 B b
5,5	24,0 ± 0,8 A c	25,7 ± 0,7 A c	16,4 ± 0,5 B c
4,5	23,1 ± 2,2 A c	23,3 ± 0,7 A d	23,3 ± 1,4 A b

Mitjana de tres mostres i l'interval de confiança (95%) de cada mitjana. Les lletres darrera els valors indiquen els grups de mitjanes obtinguts a partir del test REGW: les lletres majúscules diferents indiquen diferències significatives entre mitjanes de CRA dels tres productes per cada nivell de pH i les lletres minúscules, diferències significatives en la CRA a diferents pH.

Les diferències que s'observen en la taula 3.6 entre els valors corresponents al plasma líquid (A) respecte als del plasma deshidratat (B) no són significatives ($P > 0,05$) per cap dels valors de pH. La interacció pH/producte tampoc és significativa i això ens indica que el pH afecta de la mateixa manera els dos tipus de productes. D'aquí podem deduir que les modificacions estructurals de les proteïnes plasmàtiques degudes al procés d'atomització, intuïdes en l'anàlisi tèrmica, no es tradueixen en una variació significativa de la capacitat de retenció d'aigua dels gels formats a partir de plasma deshidratat. Per tant, l'asseccament del producte per atomització seria un procés tecnològic recomanable perquè permet obtenir un producte més estable sense afectar negativament aquesta propietat funcional de les proteïnes.

Per altra part, les diferències entre la capacitat de retenció d'aigua dels gels formats a partir de plasma porcí i clara d'ou sí són significatives. La capacitat de retenció d'aigua dels gels de plasma és superior a la mostrada per gels de clara d'ou pels tres valors de pH més alts (7,4; 6 i 5,5) i del mateix ordre en el cas de solucions a pH 4,5. El comportament de la CRA del gels de clara d'ou en funció del pH també és diferent de l'observat en proteïnes plasmàtiques ja que presenta un mínim a pH 5,5, amb valors de CRA molt petits i que milloren en disminuir el pH a 4,5. Aquest és el motiu pel qual dona

significativa la interacció entre producte i pH quan, en l'anàlisi de la variància, s'inclou la clara d'ou deshidratada (Annex 6a).

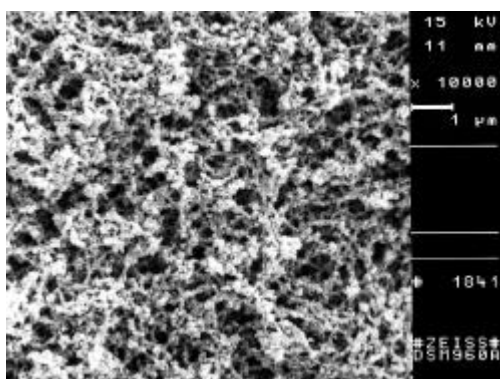
Microestructura

A continuació (figures 3.14 i 3.15) es mostren les micrografies obtingudes en l'observació mitjançant microscopi electrònic de rastreig (SEM) dels gels de plasma líquid i plasma deshidratat en dissolució amb el mateix extracte sec que el plasma líquid, en diferents condicions de pH.

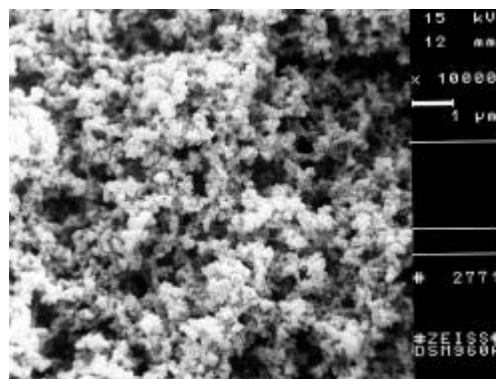
Les micrografies mostren estructures formades per agregats de proteïna esfèrics, densament empaquetats. Les observacions fetes en mostres de característiques idèntiques han estat sempre molt similars i han confirmat la reproduïbilitat del mètode. Malgrat que les micrografies no permeten distingir porus de forma regular, sí que s'observen certes diferències en la matriu proteica de cadascuna de les mostres en diferents condicions de pH. S'aprecia una pèrdua progressiva d'homogeneïtat de l'estructura a mesura que disminueix el pH i les esquerdes i espais buits són cada vegada relativament més grans. Aquest efecte és molt clar si es comparen les mostres a pH 7,4 i pH 6 i potser menys apreciable per valors de pH inferiors a 6. Aquestes modificacions estructurals podrien explicar la disminució de la capacitat de retenció d'aigua observada en els gels en augmentar l'acidesa i coincidirien amb els resultats d'altres estudis (Hermansson, 1982; Wang i Smith, 1992).

No s'han observat diferències en l'estructura microscòpica dels gels procedents de plasma líquid i deshidratat que corroborin el possible canvi conformacional de les proteïnes durant l'assecamment, a diferència del què semblava deduir-se de l'anàlisi calorimètrica de les mostres (apartat 3.3.2.3).

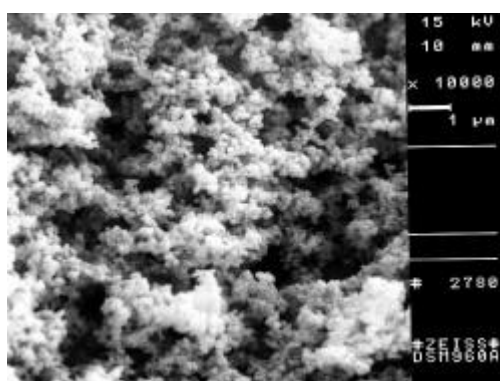
a) pH 7,4



b) pH 6,0



c) pH 5,5



d) pH 4,5

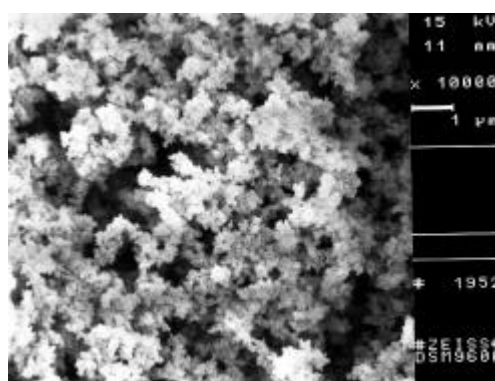
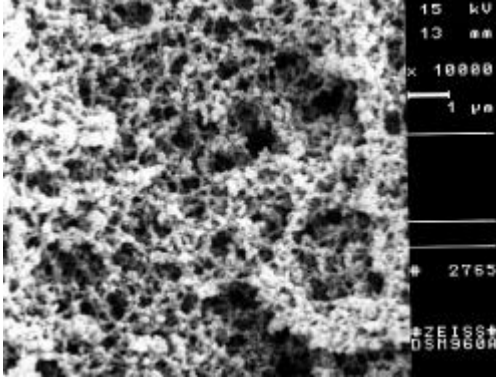
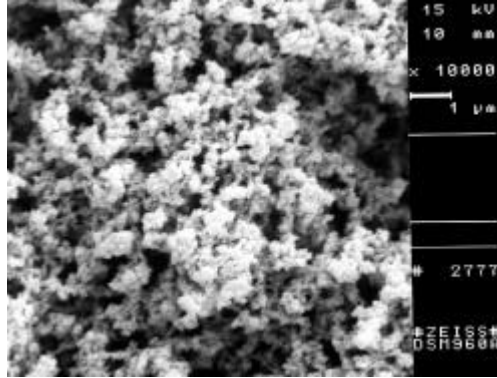


Figura 3.14. Micrografies (SEM) de gels de plasma líquid.

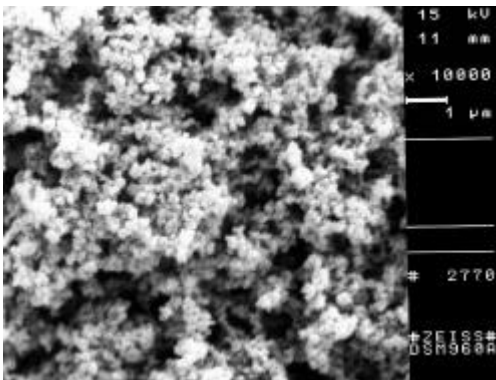
a) pH 7,4



b) pH 6,0



c) pH 5,5



d) pH 4,5

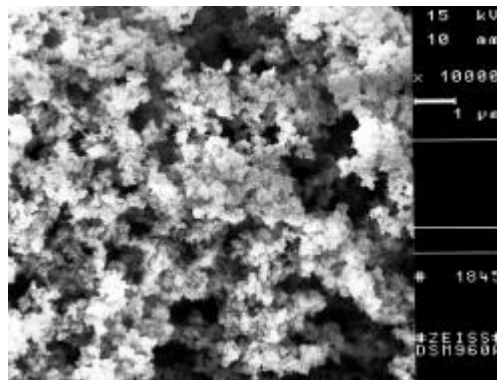


Figura 3.15. Micrografies (SEM) de gels de plasma deshidratat.

Textura: resistència a la penetració

En la taula següent es mostren els valors de les determinacions texturals realitzades sobre gels obtinguts a partir de plasma líquid i solucions al 10% de plasma atomitzat: la força i el treball de penetració realitzat per una sonda cilíndrica en penetrar els gels a una velocitat de 0,1 mm/s fins a una fondària de 4 mm. Els resultats ens permeten quantificar, amb una mesura objectiva, la fermesa del gels.

Taula 3.7. Força i treball de penetració en gels de plasma líquid i plasma atomitzat^a

pH	Plasma líquid		Plasma deshidratat	
	Força (N)	Treball ($\times 10^{-3}$ J)	Força (N)	Treball ($\times 10^{-3}$ J)
7,4	1,34 \pm 0,18 Aa	2,63 \pm 0,31 Aa	0,91 \pm 0,18 Ab	1,98 \pm 0,34 Ab
6,0	0,64 \pm 0,05 Ba	1,37 \pm 0,09 Ba	0,44 \pm 0,05 Bb	1,14 \pm 0,12 Bb
5,5	0,48 \pm 0,05 Ca	1,10 \pm 0,06 Ca	0,33 \pm 0,05 Cb	0,90 \pm 0,12 Bb
4,5	0,14 \pm 0,02 Da	0,39 \pm 0,04 Da	0,13 \pm 0,01 Da	0,34 \pm 0,04 Ca

^a Mitjana de totes les determinacions (6 per a cada pH) (mitjana \pm int. conf. 95%).^b Les lletres diferents indiquen diferències significatives en el test de Tukey-Kramer, les lletres minúscules diferències entre productes i les majúscules entre pH.

En aquesta taula podem observar que els gels de proteïnes plasmàtiques perden consistència a mesura que disminueix el pH. L'anàlisi estadística de les dades (Annex 6b) mostra que les diferències entre els diferents nivells d'acidesa són significatives ($P < 0,05$) i permet separar quatre grups de mitjanes, tant en el cas de gels de plasma líquid com en els de plasma deshidratat. Aquest efecte del pH sobre les característiques texturals coincideix amb les observacions que s'havien fet sobre la capacitat de retenció d'aigua d'aquests mateixos gels.

Observem també que la resistència a la penetració dels gels preparats amb plasma deshidratat és inferior a la dels preparats amb plasma líquid per a qualsevol dels valors de pH. Això implicaria que les petites modificacions degudes al procés de deshidratació observades en l'estudi calorimètric (desplaçament de la temperatura de desnaturalització cap a valors lleugerament més elevats) induïxen una pèrdua de fermesa en els gels obtinguts a partir de plasma deshidratat. Segons el test de Tukey-Kramer les diferències entre els dos tipus de productes són significatives a pH 7,4, 6 i 5,5 però no a pH 4,5. A aquest valor d'acidesa la consistència dels gels és extremadament baixa en els dos tipus de producte i les diferències entre ells són mínimes.

Aquests resultats no es correlacionen amb les observacions per SEM de la microestructura dels gels, ni amb els obtinguts en l'estudi de la capacitat de retenció d'aigua, on no s'havia constatat cap diferència entre els dos tipus de gels. De tota manera en un altre estudi realitzat també sobre gels de proteïnes plasmàtiques (Hermansson, 1982) s'havien observat també canvis texturals a pH alcalí que no es correlacionaven amb la capacitat de retenció d'aigua. El fet que existeixin canvis entre la textura de les mostres de plasma líquid i les de plasma deshidratat però no en la seva capacitat per retenir aigua pot indicar que els canvis que provoca el procés de deshidratació afecten els punts d'unió proteïna-proteïna de manera més important que els punts d'unió proteïna-aigua.

En la figura 3.16 es representa com varia la força de penetració dels gels de plasma de sang de porc i els de clara d'ou deshidratada. La variació del treball de penetració en funció del pH és pràcticament idèntica a la de la força de penetració, tal com es pot observar en la taula 3.7 (per això no s'ha representat gràficament).

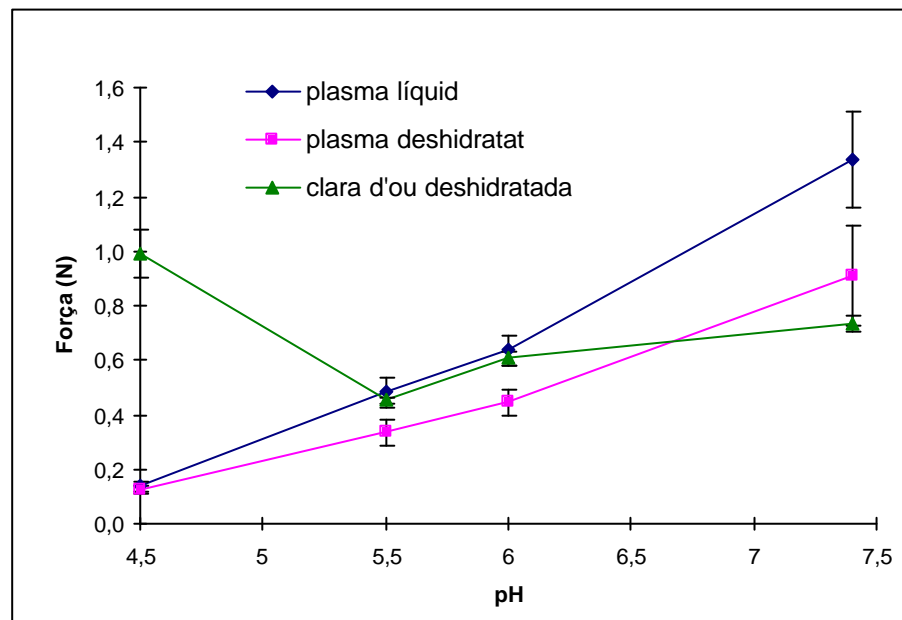


Figura 3.16. Força de penetració dels gels de plasma de sang de porc líquid i deshidratat i de la clara d'ou en funció del pH. Mitjana \pm interval de confiança (95%).

Podem observar com el comportament dels gels de clara d'ou és diferent del que presenten els gels de proteïnes plasmàtiques. A mesura que disminueix el pH des de valors de 7,4 fins a valors de 5,5 disminueix també la fermesa dels gels de clara d'ou, però en aquest producte els gels més consistents són els de pH 4,5. Aquestes observacions mantenen certa correlació amb les que s'havien fet pel cas de la capacitat de retenció d'aigua, on també s'havia obtingut un augment d'aquesta propietat en els gels a pH més baix en relació amb els de pH 5,5. De tota manera, en aquest cas a pH 4,5 s'obté un gel fins i tot més consistent que l'aconseguit a pH 7,4, cosa que no passava amb la capacitat de retenció d'aigua. L'anàlisi estadística dels resultats obtinguts per a cada valor de pH en la clara d'ou separa clarament quatre grups de mitjanes, tant en el cas de la força com en el del treball de penetració.

El tractament estadístic per determinar diferències entre productes per a cadascun dels nivells de pH mostra que la fermesa dels gels de clara d'ou a pH 7,4 no difereix significativament dels del plasma deshidratat, que als valors de pH intermitjos (pH 5,5 i 6) té unes característiques de resistència pràcticament idèntiques a les dels gels de plasma líquid i que a pH àcid (4,5) s'allunya completament del comportament que presentaven tant els gels de plasma líquid com deshidratat. De fet en la clara d'ou a pH 4,5 s'observa un canvi important en l'estructura de les mostres escalfades, que passen de tenir un comportament elàstic (a pH 7,4, 6 i 5,5) a ser més semblants a un producte plàstic. Això indica que l'acidificació ha provocat una reordenació molecular que, segons els resultats d'aquest treball, afecta tant la resistència a la penetració com la capacitat de retenció d'aigua dels gels.

Les variacions relacionades amb el pH, observades en les propietats funcionals dels gels obtinguts amb plasma de sang de porc, ja sigui líquid o deshidratat, indiquen que el plasma serà útil com a ingredient funcional a pH neutre o lleugerament àcid ja que proporciona gels amb unes característiques de textura i de CRA iguals o superiors a les que presenten els gels de clara d'ou. El plasma, a diferència de les proteïnes de l'ou, no serà però un bon ingredient gelificant ni amb capacitat de retenció d'aigua en productes amb pH per sota de 5,5, ja que ambdues propietats es veuen negativament afectades pel canvi d'estructura que comporta l'acidificació.

3.3.3 Estabilitat del plasma deshidratat

En la figura següent es mostren els resultats de les determinacions de solubilitat (a pH àcid i a pH neutre) i de la variació d'entalpia, calculada a partir dels pics endotèrmics de les corbes DSC, de diferents mostres de plasma atomitzat que difereixen en el temps que s'han mantingut emmagatzemades a temperatura ambient.

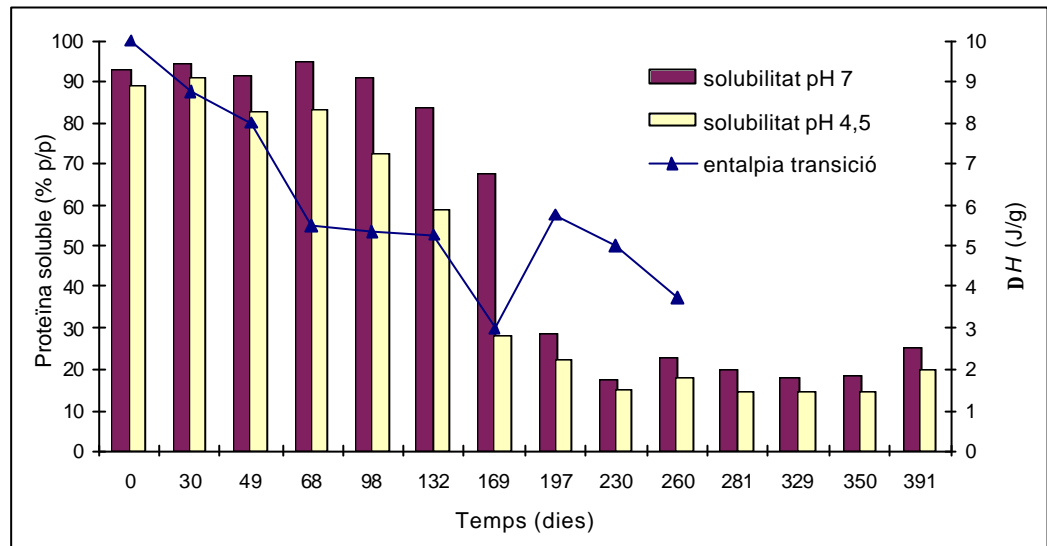


Figura 3.17. Evolució de la solubilitat proteica i l'estabilitat tèrmica del plasma deshidratat emmagatzemat a temperatura ambient.

Els resultats mostren que es produeix una clara pèrdua de solubilitat de la fracció proteica, apreciable sobretot a partir del cinquè mes d'emmagatzematge i força més accentuada a pH àcid, acompanyada a més d'una disminució progressiva durant aquest període del valor d'entalpia. S'observa, doncs, que la mostra de plasma deshidratat per atomització no presenta l'estabilitat que caldria esperar en un producte en pols amb una activitat d'aigua tan baixa ja que no manté la seva funcionalitat.

La disminució en l'entalpia de transició durant els primers mesos d'emmagatzematge feia sospitar que es produïen modificacions estructurals de les proteïnes. Probablement un desplegament que implicava trencament de ponts d'hidrogen intramoleculars i que seria el responsable que l'energia absorbida durant l'escalfament en l'anàlisi calorimètrica fos inferior al que es detectava inicialment, quan la proteïna encara presentava el seu estat natiu.

Donat que els baixos valors d'activitat d'aigua haurien d'inhibir l'activitat microbiana i dificultar o alentir qualsevol procés de degradació enzimàtica, sembla que aquest desplegament s'hauria d'explicar més aviat com a conseqüència de l'establiment d'interaccions intermoleculares afavorides per l'elevada concentració proteica present en el plasma deshidratat.

És difícil interpretar l'increment en el valor d'entalpia del pic de transició que es dona al setè mes d'emmagatzematge. Una possible explicació podria ser que en aquest moment les interaccions proteïna-proteïna comporten la formació d'una estructura prou estable que requereix incrementar l'energia necessària per provocar la fusió durant l'escalfament.

Per tal d'obviar l'efecte de la variabilitat inicial del producte -ja que les mostres analitzades pertanyien a sang recollida i processada en dies diferents- i també per tal d'establir quines són les propietats funcionals que es veuen afectades per aquests canvis durant l'emmagatzematge, es va procedir a fer un estudi de l'evolució d'una mateixa mostra durant un període de sis mesos, al llarg dels quals es van realitzar estudis de la variació en paràmetres físico-químics (humitat i estabilitat tèrmica), microbiològics (recomptes generals de bacteris mesòfils i psicròtrofs) i propietats funcionals (solubilitat, capacitat escumant i característiques dels gels obtinguts per escalfament) de la mostra mantinguda a temperatura ambient. Es va realitzar un estudi paral·lel amb una mostra mantinguda en refrigeració per constatar l'efecte que podia tenir la temperatura sobre l'evolució dels canvis que es donaven en el producte durant l'emmagatzematge.

3.3.3.1 Humitat

En la figura 3.18 es mostra quina va ser l'evolució del contingut d'humitat del producte al llarg dels sis mesos d'estudi per a cadascuna de les dues condicions d'emmagatzematge. La humitat és un paràmetre important a determinar en un producte en pols ja que un lleuger increment durant l'emmagatzematge pot comportar variacions significatives en els valors d'activitat d'aigua i per tant pot modificar la seva estabilitat enfront de la degradació bacteriana o enzimàtica.

S'observa que la humitat de les mostres presenta un lleuger increment des de valors inicials de l'ordre d'un 9 % fins a valors finals de 10,5-11,5 %.

L'evolució de les dues mostres emmagatzemades a diferent temperatura ha estat pràcticament la mateixa: s'ha donat l'increment principal de manera progressiva durant els tres primers mesos de conservació i després s'ha estabilitzat el percentatge d'humitat en valors propers a l'11%. No s'observen diferències importants en cap dels valors obtinguts; únicament en l'últim mes obtenim valors d'humitat un punt superiors en la mostra conservada en refrigeració, explicables potser pel grau més elevat d'humitat

relativa de l'ambient d'emmagatzematge en la nevera, perquè la baixa temperatura provoca una disminució d' a_w que fa que es pugui produir rehidratació a valors d'humitat relativa més baixos, o perquè la refrigeració facilita que es produeixin condensacions dins el recipient. L'increment inicial pot ésser degut a que la mostra ha fixat vapor d'aigua de l'ambient fins assolir les condicions d'equilibri amb l'atmosfera de l'interior del recipient on estava envasat.

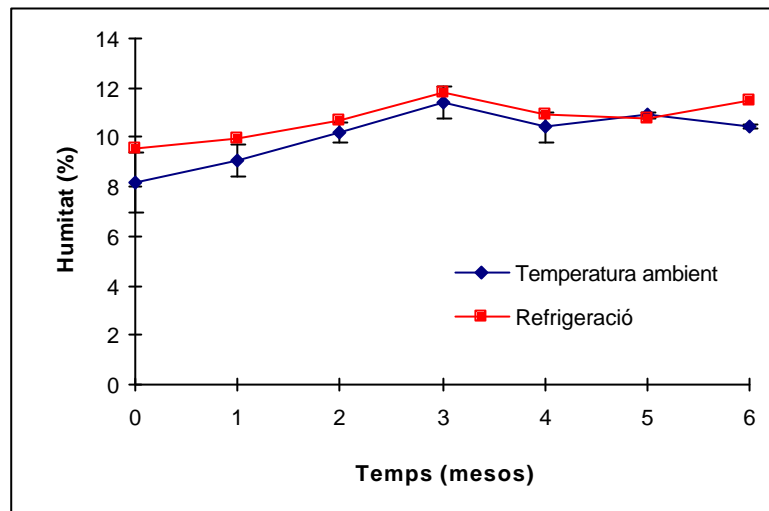


Figura 3.18. Evolució durant sis mesos del contingut d'humitat (%) de les mostres de plasma deshidratat mantingut en diferents condicions d'emmagatzematge. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança (95%) de la mitjana.

Segons les isoterms d'adsorció del plasma deshidratat (Toldrà, 1998; dades no publicades) aquests continguts d'humitat del producte asseguren uns valors d'activitat d'aigua inferiors a 0,3-0,4 durant tot el període, que són suficients per protegir el producte de possibles degradacions microbianes i enzimàtiques, les quals es troben limitades per aquesta baixa disponibilitat d'aigua. Les úniques reaccions degradatives que es podrien donar a aquests valors d' a_w serien reaccions d'oxidació autocatalítica dels greixos i alguns processos de lipòlisi, tot i que aquest últims a una taxa molt baixa.

3.3.3.2 Anàlisi calorimètrica (DSC)

En les figures següents (3.19 i 3.20) es representa l'evolució dels paràmetres calorimètrics obtinguts a partir de les anàlisis DSC realitzades mensualment en les mostres mantingudes a les dues temperatures de conservació.

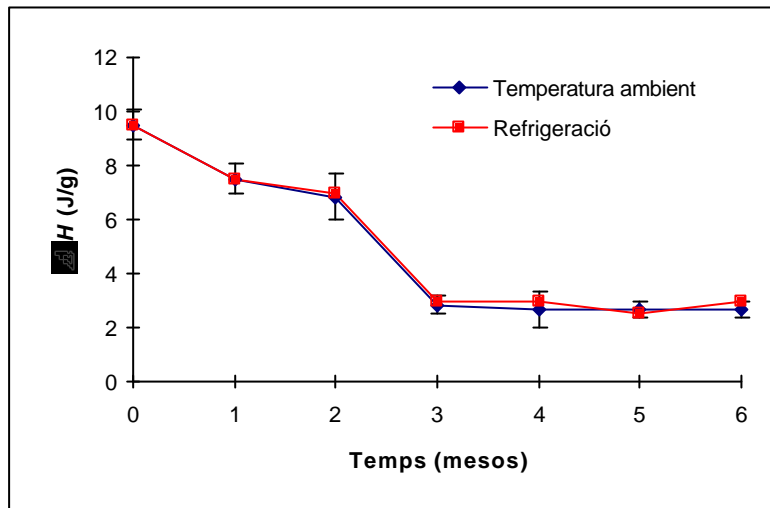


Figura 3.19. Evolució de l'entalpia de transició durant l'escalfament de 30 a 100°C de les proteïnes de plasma deshidratat mantingut en diferents condicions d'emmagatzematge. Els resultats estan referits a gram d'extracte sec de les mostres analitzades. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança (95%) de la mitjana.

Els resultats d'aquest estudi confirmen l'evolució, durant els sis primers mesos d'emmagatzematge, dels valors de l'entalpia de transició de les proteïnes del plasma deshidratat que ja s'havien observat en l'estudi anterior, realitzat a partir de mostres diferents.

El valor d'aquest paràmetre disminueix significativament durant els tres primers mesos d'emmagatzematge i s'estabilitza a valors que corresponen a una tercera part de l'entalpia calculada pel plasma líquid i pel plasma recentment deshidratat.

No s'observen diferències en l'evolució d'aquest paràmetre relatives a la temperatura de conservació, ja que els dos lots estudiats es comporten de manera pràcticament idèntica. Aquest fet ens fa sospitar que les modificacions estructurals de les proteïnes plasmàtiques que havíem deduït a partir de l'estudi previ es donen també a baixes temperatures de conservació, i això ens fa esperar, d'entrada, unes modificacions similars

en les propietats funcionals del producte tant si es conserva a temperatura ambient com en refrigeració.

D'altra banda, cal dir que s'ha confirmat també l'increment d'entalpia de transició que es dona a partir del setè mes d'emmagatzematge, igual per qualsevol de les dues condicions de conservació. Malgrat que el valor del paràmetre calculat pel setè mes no es mostra en la figura, l'entalpia calculada va ser de l'ordre de 5 J/g d'extracte sec pels dos lots objecte d'estudi.

Pel que fa a la temperatura de desnaturalització (Figura 3.20) veiem que augmenta lleugerament i progressiva fins al tercer mes d'emmagatzematge i després es manté força estable amb valors al voltant dels 80°C, que correspondria a la temperatura de desnaturalització de la proteïna majoritària del plasma, la seroalbúmina. Raeker i Johnson (1995) publiquen valors de temperatura de desnaturalització per la seroalbúmina de $78,8 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

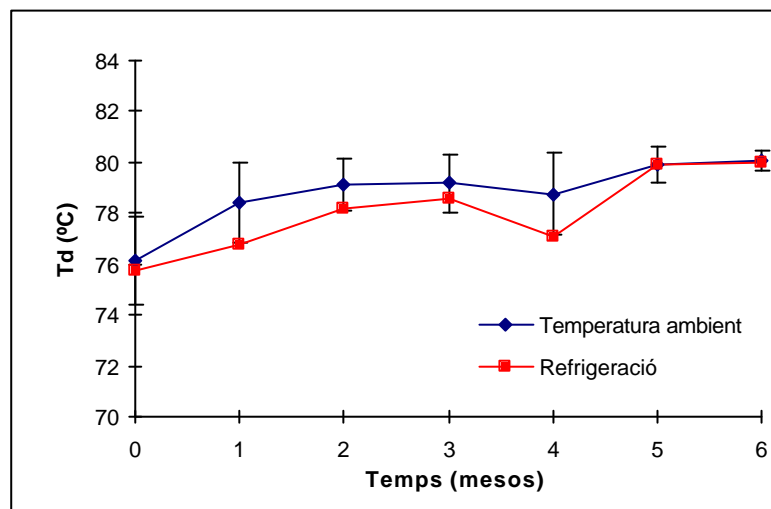


Figura 3.20. Evolució de la temperatura de desnaturalització de les proteïnes de plasma deshidratat mantingut en diferents condicions d'emmagatzematge. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança (95%) de la mitjana.

3.3.3.3 Recomptes microbiològics

En les figures 3.21 i 3.22 es mostra l'evolució dels recomptes microbiològics de bacteris aeròbics mesòfils i psicròtrofs, respectivament, en el plasma deshidratat per atomització, al llarg del període estudiat i per cadascuna de les dues temperatures de conservació.

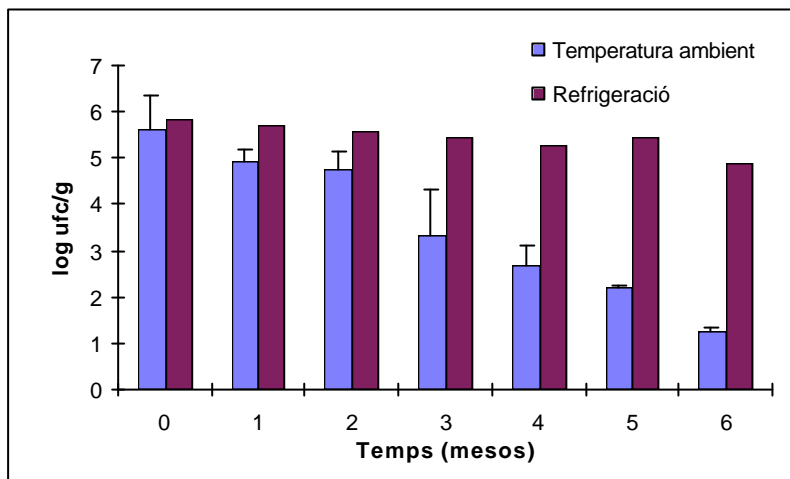


Figura 3.21. Evolució dels recomptes de bacteris aeròbics mesòfils en mostres de plasma deshidratat mantingut en diferents condicions d'emmagatzematge. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança (95%) de la mitjana.

En aquest gràfic s'evidencia una clara disminució de la càrrega microbiana contaminant mesòfila durant l'emmagatzematge del producte a temperatura ambient, mentre que en condicions de refrigeració és molt menys important. En el cas de les mostres no refrigerades, els recomptes es redueixen des de valors inicials de 10^5 - 10^6 ufc/g fins a 10 - 10^2 ufc/g, és a dir la càrrega de bacteris mesòfils disminueix, en sis mesos d'emmagatzematge, al voltant de 4 unitats logarítmiques. Per contra, en les mostres mantingudes a baixa temperatura i durant el mateix període, aquesta disminució és només d'una unitat logarítmica, reducció que a temperatura ambient s'havia assolit ja el segon mes de conservació.

Amb aquests resultats constatem no només que la baixa disponibilitat d'aigua del producte impedeix la proliferació microbiana sinó que, a més, els bacteris contaminants presents inicialment en el plasma en pols es van morint durant l'estocatge. La causa de la mortalitat observada és probablement la plasmòlisi deguda a la deshidratació que

pateixen les cèl·lules en trobar-se en un medi hipertònic com és el plasma deshidratat (amb una concentració de soluts molt més elevada que la del contingut intracel·lular).

A temperatura de refrigeració s'observa també certa mortalitat tot i que a una velocitat molt més lenta, probablement perquè les baixes temperatures alteren la permeabilitat de la membrana cel·lular i potser la sortida de l'aigua es dona més poc a poc, de manera que s'endarrereix la plasmòlisi i, per tant, la mort del bacteri.

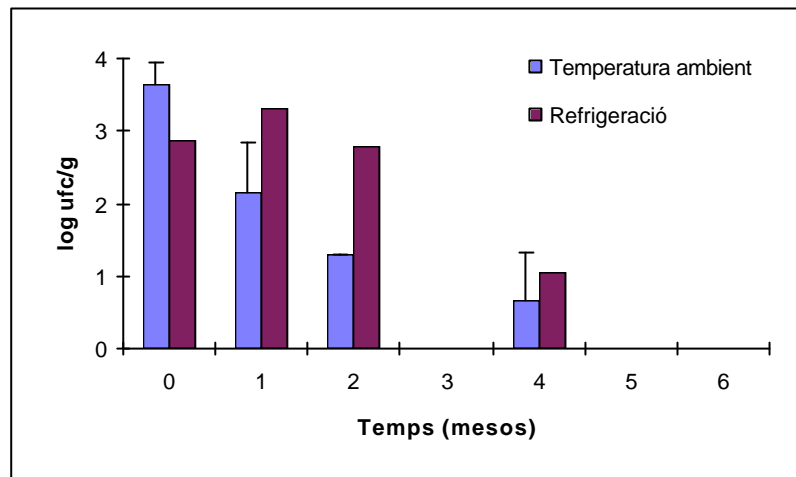


Figura 3.22. Evolució dels recomptes de bacteris aeròbics psicròtrofs en mostres de plasma deshidratat mantingut en diferents condicions d'emmagatzematge. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança (95%) de la mitjana.

Pel que fa als recomptes de bacteris aeròbics psicròtrofs cal comentar que l'evolució ha consistit també en una disminució progressiva i molt important, ja que en les dues condicions d'emmagatzematge els recomptes han estat pràcticament indetectables a partir del tercer mes d'estudi. Fins a aquest moment els nivells d'aquest grup de bacteris es mantenen en valors de 10^3 - 10^4 ufc/g en el cas de les mostres conservades en refrigeració, mentre que en les de temperatura ambient la disminució era més accentuada, de l'ordre d'una unitat logarítmica per mes.

Atribuïm la reducció en aquest grup de bacteris a les causes comentades anteriorment pel cas dels microorganismes mesòfils, és a dir processos de plasmòlisi cel·lular deguts a la deshidratació. Potser en els recomptes de microorganismes psicròtrofs l'efecte retardant del procés degut a les baixes temperatures no ha quedat tan palès com en el dels mesòfils. La mortalitat d'aquest grup s'ha donat amb la mateixa intensitat tant a temperatura ambient com en refrigeració. Això es podria explicar pel fet

que els microorganismes psicròtrofs estan millor adaptats que els mesòfils a les temperatures de refrigeració i són capaços de mantenir-se funcionalment actius. Els bacteris psicròtrofs presenten modificacions induïdes per les baixes temperatures -entre d'altres un increment en la concentració d'àcids grassos insaturats i la consegüent disminució del punt de fusió dels lípids de membrana- que els permeten conservar la fluïdesa de la membrana citoplasmàtica i els processos d'intercanvi amb el medi. Aquests avantatges relatius dels microorganismes psicròtrofs respecte als mesòfils quan es troben en medis sense restriccions en la disponibilitat d'aigua no suposarien cap avantatge en aquest cas, donat que els bacteris moririen per dessecació pel fet d'estar en un ambient hipertònic.

3.3.3.4 Propietats funcionals

3.3.3.4.1 Solubilitat

La figura 3.23 mostra l'evolució en el decurs de sis mesos d'aquesta propietat en mostres emmagatzemades a temperatura ambient. Els resultats s'expressen en forma de percentatge de proteïna soluble respecte al contingut de proteïna total. Es pot observar que la solubilitat a pH neutre es manté en valors alts -superiors al 90%- durant els cinc primers mesos d'emmagatzematge i que pateix una disminució important, fins a valors del 84% al sisè mes. Aquesta disminució coincideix amb la que ja havia estat observada en l'estudi de mostres amb diferent grau d'envelliment, tot i que en aquell cas una reducció de solubilitat d'aquesta magnitud s'apreciava ja als quatre mesos i mig i als sis mesos era encara més accentuada. La pèrdua de solubilitat a pH àcid és més important, coincidint també amb les dades de l'estudi esmentat anteriorment, i s'observa ja a partir del tercer-quart mes d'emmagatzematge. Els valors de solubilitat de l'últim mes són de l'ordre del 70%.

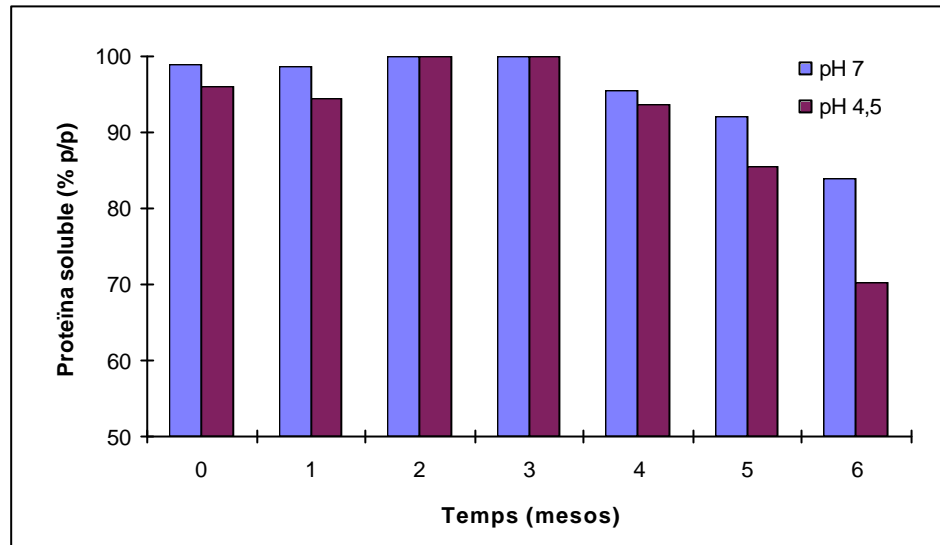


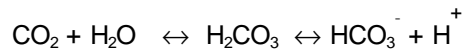
Figura 3.23. Evolució de la solubilitat del plasma deshidratat emmagatzemat a temperatura ambient.

Les dades experimentals obtingudes es poden correlacionar bé amb observacions empíriques sobre la facilitat de reconstitució del producte en pols i sobre les característiques de viscositat i homogeneïtat de la solució aconseguida. A partir del quart mes d'emmagatzematge el plasma deshidratat mantingut a temperatura ambient comença a presentar dificultats de reconstitució i el resultat final és una solució més viscosa, translúcida, més fosca i amb grumolls (poc homogènia), en comparació amb les característiques de la solució obtinguda en els primers mesos d'estudi.

Donat que, com hem vist, no es pot atribuir aquesta pèrdua de solubilitat a processos de degradació enzimàtica endògens o d'origen bacterià, pels restrictius valors d' a_w , pensem que podria ser conseqüència de fenòmens de redistribució de les molècules que es donen degut a l'increment de concentració de proteïna i la poca disponibilitat d'aigua lliure que comporta la deshidratació. Amb el temps es poden haver establert interaccions hidrofòbiques entre grups no-polars (Val, Leu, Ile, Phe) de diferents molècules proteïques. Degut a que l'efecte hidrofòbic és la força més important en el plegament de les proteïnes, qualsevol factor que l'afecti pot alterar també la tendència de la proteïna a trobar-se en estat plegat o desplegat (Dickinson i McClements, 1995). És possible que durant els primers mesos d'emmagatzematge s'hagi anat produint un desplegament gradual però que en aquests primers estadis les interaccions hidrofòbiques entre regions no-polars de diferents proteïnes no fossin suficientment fortes per iniciar l'agregació. Fins que el desplegament no arriba a ser molt estès, probablement a partir del quart mes

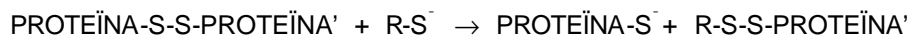
d'emmagatzematge, no s'afavoreix l'agregació i no s'observen els seus efectes sobre la solubilitat.

També cal tenir present que la deshidratació per atomització comporta un increment en el pH del plasma des de valors al voltant de pH neutre (7,4 en el plasma líquid decantat després de la centrifugació) fins a valors de pH de 9,2-9,3 en la pols reconstituïda. L'explicació d'aquest procés d'alcalinització es troba en el fet que el tampó responsable del manteniment del pH sanguini és el sistema carbònic-carbonat:



L'eliminació d'aigua provoca el desplaçament de l'equilibri de les reaccions cap a l'esquerra (formació de carbonat, aigua i diòxid de carboni que s'allibera a l'atmosfera) amb la consegüent disminució de protons en el medi i per tant, alcalinització.

La cisteïna, que és un aminoàcid comú en les proteïnes globulars (Kinsella, 1982, citat per Dickinson i McClements, 1995) presenta un grup tiol (-SH) capaç de formar ponts disulfur (-S-S-) amb altres grups tiol en una reacció d'oxidació. Aquests ponts disulfur poden ser intramoleculars -i ajudar a estabilitzar l'estructura de la proteïna contra el desplegament- o intermoleculars. El pK del grup -SH de la cisteïna està al voltant de 8,3 i, per tant, als valors de pH del plasma deshidratat, predomina la forma ionitzada (-S-) capaç d'interaccionar amb ponts disulfur per desplaçament nucleofílic:



El grup RS^- pot ser de la mateixa o d'una altra molècula de proteïna, o fins i tot d'altres espècies químiques.

Aquests intercanvis tiol-disulfur o oxidacions de grups tiol lliures poden alterar un nombre important d'atributs de les proteïnes i influir les seves propietats funcionals: la propensió de les molècules a desplegar-se, el grau de flexibilitat molecular i l'extensió de la formació de ponts disulfur intermoleculars (Dickinson i McClements, 1995).

En el cas del plasma deshidratat mantingut en condicions de refrigeració observem una evolució de la solubilitat completament diferent, tal com es mostra en la figura 3.24.

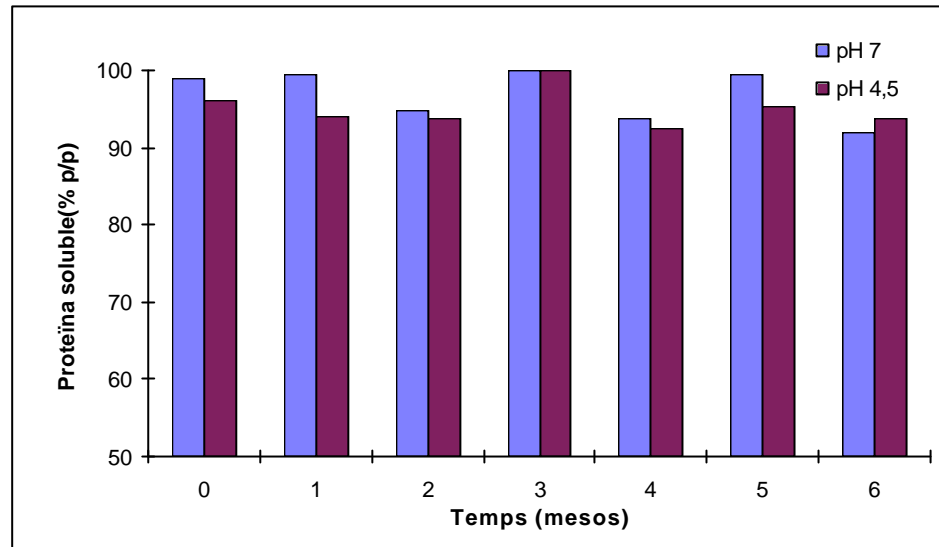


Figura 3.24. Evolució de la solubilitat del plasma deshidratat emmagatzemat en refrigeració.

En aquestes condicions, la solubilitat de les proteïnes plasmàtiques es manté durant els sis mesos d'emmagatzematge en valors superiors o propers al 90 %, tant a pH àcid com a pH neutre. A més, no s'aprecien canvis en l'aspecte de les solucions que s'obtenen a partir d'aquestes mostres i la facilitat de reconstitució del producte es manté durant tot el període d'estudi. Hem comprovat que les mostres refrigerades conserven l'elevada solubilitat inicial, la facilitat de dispersió de les partícules en aigua i la formació d'una solució macroscòpicament homogènia fins i tot al cap de 15 mesos d'emmagatzematge. Aquests fets ens fan esperar que les propietats funcionals relacionades amb l'activitat superficial siguin també millors que en les mostres envellides a temperatura ambient.

Malgrat que en l'anàlisi calorimètrica no s'hagin apreciat diferències entre les dues condicions d'emmagatzematge en els valors d'entalpia global dels processos de desnaturalització i gelificació que es donen durant l'escalfament, aquest comportament diferencial pel que fa a la solubilitat de mostres conservades a temperatures diferents fa pensar que les modificacions estructurals que pateixen les proteïnes plasmàtiques durant l'emmagatzematge depenen de la temperatura de conservació.

En el cas de les mostres no refrigerades, la desnaturalització-agregació que es produeix durant l'emmagatzematge, és a dir el desplegament i les interaccions proteïna-proteïna que s'estableixen amb el temps, dificulten les interaccions proteïna-solvent i

provoquen insolubilització, fenomen que no s'observa en les mostres mantingudes a la nevera.

3.3.3.4.2 Capacitat escumant i estabilitat de l'escuma

En aquest apartat es mostren els resultats de la variació de la capacitat de formar escuma i de l'estabilitat de l'escuma aconseguida per agitació d'una solució de les mostres emmagatzemades en les dues condicions de l'estudi.

Observem tant en la figura 3.25 (emmagatzematge a temperatura ambient) com en la figura 3.26 (emmagatzematge en refrigeració) que el volum d'escuma obtingut en l'agitació és cada vegada una mica menor que en la determinació anterior. Per tant, es pot intuir una tendència de la capacitat escumant a anar disminuint amb el temps. No s'observa la correlació positiva que s'esperava entre el comportament d'aquesta propietat de superfície i el de la solubilitat, ja que la primera no es veu afectada per la temperatura d'emmagatzematge del producte a diferència de la solubilitat. La reducció de capacitat escumant provocada per l'envelliment es produeix en totes les mostres independentment de la temperatura d'emmagatzematge.

La cinètica de reducció del volum d'escuma en dues hores és similar en els sis mesos d'emmagatzematge i per totes dues mostres, les mantingudes en refrigeració i les de temperatura ambient. S'han obtingut reduccions de volum de l'ordre del 80%, més ràpides durant la primera hora de seguiment de l'escuma i a una taxa més suau la resta del període.

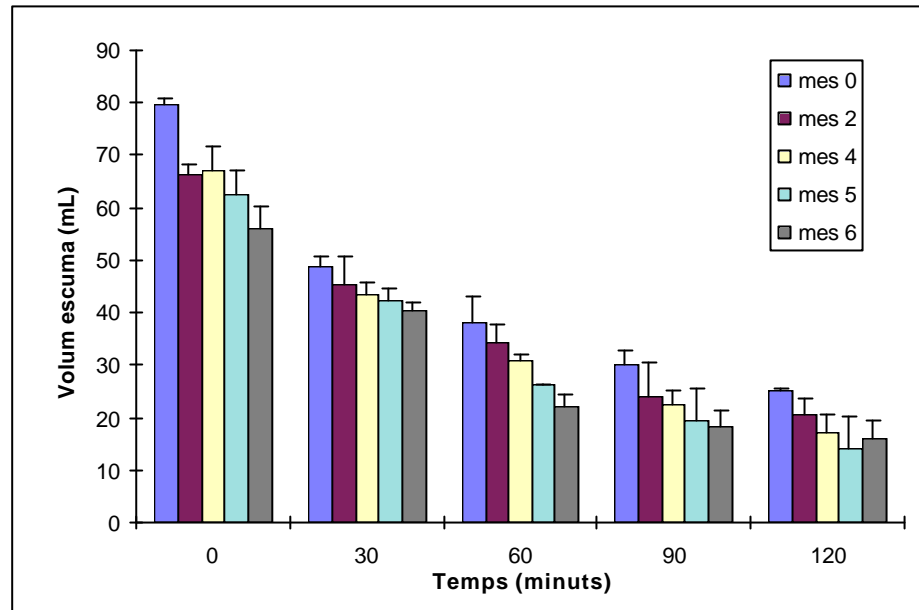


Figura 3.25. Evolució al llarg de sis mesos de la capacitat escumant i de l'estabilitat de l'escuma obtinguda amb solucions al 0,5 % (p/v) de plasma atomitzat mantingut a temperatura ambient.

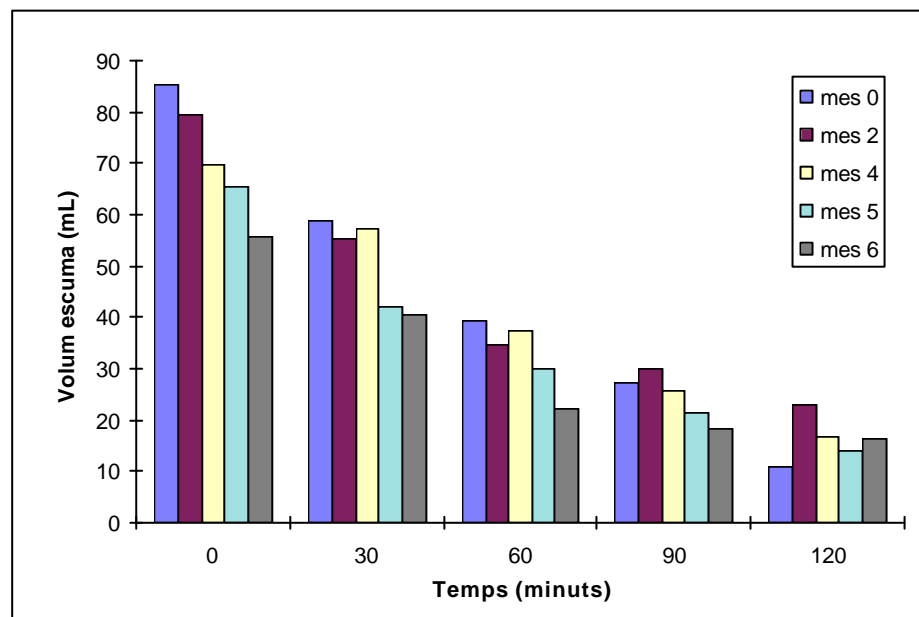


Figura 3.26. Evolució al llarg de sis mesos de la capacitat escumant i de l'estabilitat de l'escuma obtinguda amb solucions al 0,5 % (p/v) de plasma atomitzat mantingut a temperatura de refrigeració.

S'ha fet una regressió no lineal per ajustar les dades a una corba exponencial negativa i poder comparar les mostres corresponents als diferents mesos d'emmagatzematge. S'ha utilitzat la funció $E=E_0e^{-kt}$, on E representa el volum d'escuma en un temps t, E_0 el volum d'escuma inicial i -k la taxa de desaparició de l'escuma. S'ha comprovat (annex 7) que la E_0 disminueix amb el temps i que el valor de k és del mateix ordre per totes les mostres, tant en les de temperatura ambient ($k=0,0118 \pm 0,0009$) com en les que es mantenen en refrigeració ($k=0,0121 \pm 0,0011$) es manté constant durant els sis mesos d'emmagatzematge. Així doncs, es confirma que el temps d'emmagatzematge disminueix la capacitat escumant però no té cap efecte sobre l'estabilitat de l'escuma obtinguda.

3.3.3.4.3 Capacitat de gelificació per escalfament: resistència a la penetració dels gels

En les figures 3.27 i 3.28 es representa l'evolució durant el període d'emmagatzematge dels paràmetres obtinguts a partir del test de penetració realitzat sobre els gels formats per escalfament de solucions al 10% del plasma deshidratat: la força i el treball de penetració realitzat per una sonda cilíndrica en penetrar els gels a una velocitat de 0,1 mm/s fins a una fondària de 4 mm. Obtenim així una mesura de la fermesa dels gels, que, igual que en el cas de la solubilitat, pot matisar-se amb observacions empíriques.

Podem observar com l'emmagatzematge a temperatura ambient del plasma deshidratat comporta una pèrdua de consistència considerable en els gels que s'obtenen per escalfament. -els valors de resistència a la penetració són entre quatre i cinc vegades inferiors al final de l'estudi- que no es detecta en els gels obtinguts a partir de plasma mantingut en refrigeració.

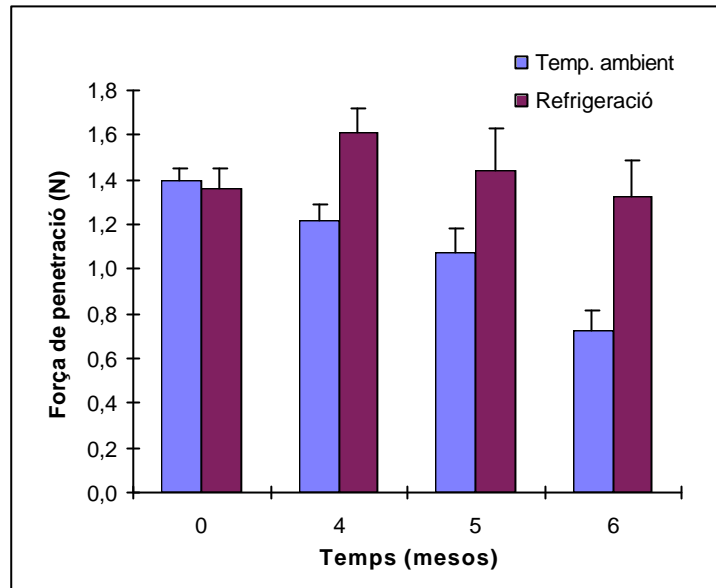


Figura 3.27. Evolució de la força de penetració en gels de solucions al 10 % de plasma atomitzat mantingut a temperatura ambient i en refrigeració. Les barres d'error representen l'interval de confiança (95%) de la mitjana.

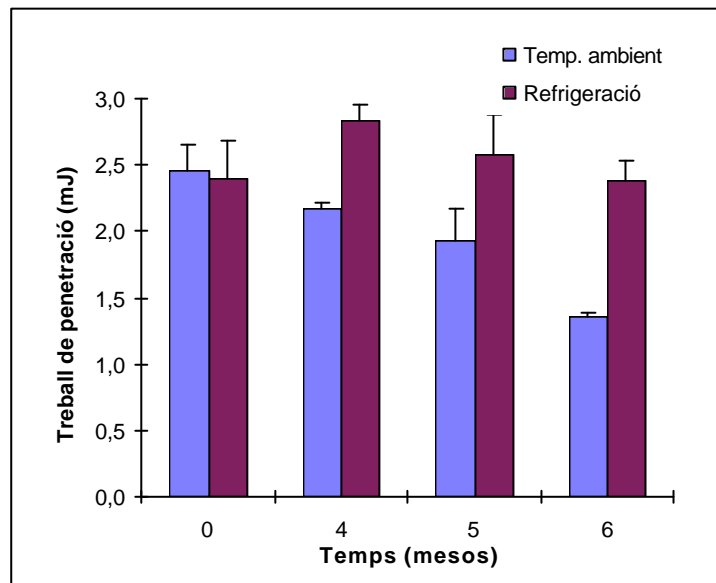


Figura 3.28. Evolució del treball penetració en gels de solucions al 10 % de plasma atomitzat mantingut a temperatura ambient i en refrigeració. Les barres d'error representen l'interval de confiança (95%) de la mitjana.

La caiguda més espectacular es dona entre el cinquè i el sisè mes d'estudi i coincideix amb el moment en què es produeix també la pèrdua més important de solubilitat en aquesta mateixa mostra. En aquest cas, doncs, sí que existeix correlació entre el grau de solubilitat de les proteïnes del plasma i aquesta propietat, ja que el comportament d'ambdues es veu modificat per la temperatura de conservació de la mateixa manera. Les mostres emmagatzemades en refrigeració mantenen les característiques de solubilitat i gelificació durant tot el període d'estudi.

Les observacions empíriques han permès comprovar que els gels del plasma no refrigerat perden progressivament la seva capacitat de retenció d'aigua i que, a partir del cinquè mes, el gel obtingut no és capaç de retenir tota l'aigua de la solució i presenta sinèresi. Aquests fenòmens no s'han observat en els gels de plasma refrigerat.

3.4 SÍNTESI

Les condicions de deshidratació per atomització que s'han considerat adequades per processar el plasma amb l'equip a escala de laboratori del qual es disposa han estat: flux d'aire: 64 m³/h, pressió del compressor: 2 bar, temperatura d'entrada de l'aire: 180°C; temperatura de sortida de l'aire < 80°C; cabal d'alimentació del producte: 800 mL/h. En aquestes condicions s'optimitzava el rendiment, s'obtenia un producte suficientment deshidratat, amb una $a_w < 0,4$ que permetia suposar una bona estabilitat i no es provocava un efecte desnaturalitzador important sobre la fracció proteica.

El fet que algunes mostres analitzades presentessin nivells detectables de determinats residus (sulfonamides i corticosteroides), ens fa plantejar la necessitat d'estudiar un nombre més representatiu de mostres i confirmar la seva presència i la freqüència amb què es detecten. Caldria incloure en aquest estudi determinacions d'alguns pesticides. És recomanable també dur a terme un estudi de les substàncies responsables de l'aroma per tal d'avaluar l'impacte que el plasma pot suposar, en aquest sentit, quan s'utilitzi com a ingredient d'algun aliment.

La qualitat microbiològica del producte en pols reflecteix l'elevada contaminació que contenia la matèria primera utilitzada, tot i que la deshidratació per atomització ha comportat la reducció en una unitat logarítmica de la càrrega contaminant. S'ha considerat que aquesta reducció ha estat deguda a la mortalitat dels microorganismes provocada pel procés tecnològic, però caldria comprovar si la deshidratació fa que es formin agregacions cel·lulars i, si fos així, en quin grau contribueixen a la disminució observada en els recomptes. Els recomptes generals d'una solució de la pols amb el mateix extracte sec que el plasma de partida han estat superiors a valors de 10⁴ ufc/mL. Aquests recomptes són encara preocupants i més tenint en compte que s'ha evidenciat la presència de toxines estafilocòriques en algunes mostres.

L'avaluació de les propietats funcionals del producte deshidratat en relació a les que presentava el plasma líquid ens ha permès comprovar que: (1) El procés de deshidratació no ha afectat la solubilitat de les proteïnes. Això, junt amb el fet que no s'obtinguin diferències significatives en l'anàlisi calorimètrica de mostres líquides o deshidratades, permet concloure que el procés no provoca desnaturalització proteica. (2) No s'observen efectes negatius del procés tecnològic sobre la capacitat escumant ni en l'activitat emulsionant de les proteïnes plasmàtiques, dues propietats funcionals que possibiliten l'aplicació del plasma amb aquestes finalitats en l'elaboració de determinats aliments. (3) La deshidratació tampoc perjudica de manera important les característiques dels gels que s'obtenen per escalfament, ja que els gels obtinguts a partir del plasma líquid i del plasma

deshidratat presenten la mateixa capacitat de retenció d'aigua i no s'observen diferències en la microestructura de la xarxa proteica d'ambdós tipus de gel. Tanmateix, els que s'obtenen a partir del producte en pols mostren una menor resistència a la penetració.

L'activitat emulsionant del plasma no ha mostrat dependència del pH del medi. Les variacions observades en les propietats dels gels en funció del pH, en canvi, indiquen que el plasma pot ser útil incorporat en aliments amb pH neutre o lleugerament àcid, però que no serà un bon agent gelificant ni amb capacitat de retenció d'aigua en productes amb $\text{pH} \leq 5,5$, degut a que aquestes propietats es veuen seriosament afectades pels canvis estructurals que pateixen les proteïnes en incrementar l'acidesa del medi.

L'estudi d'estabilitat ens ha permès comprovar que la mostra de plasma deshidratat per atomització perd algunes de les seves propietats funcionals (facilitat de rehidratació, capacitat de retenció d'aigua i fermesa dels gels) si s'emmagatzema a temperatura ambient, mentre que aquestes característiques es mantenen un mínim de sis mesos quan el producte en pols es conserva a temperatura de refrigeració.

Hem observat també que durant l'emmagatzematge es dona una important reducció en els recomptes de bacteris aeròbics presents en el producte recentment deshidratat quan es conserva a temperatura ambient, però la disminució no és gaire important si es refrigera. Malgrat la disminució en la càrrega microbiana contaminant general que s'observa a temperatura ambient, s'ha de tenir en compte que, després de sis mesos, el producte encara suposa un perill des del punt de vista higiènic o sanitari, perquè prové d'una matèria primera molt contaminada, amb el consegüent risc tant de presència de patògens com de les seves toxines.

Cal tenir present la possibilitat de deteriorament de la fracció lipídica, ja sigui per l'activitat d'enzims lipolítics o per reaccions d'autooxidació, i completar l'estudi d'estabilitat avaluant el desenvolupament de ranciessa durant l'emmagatzematge.

4. HIGIENITZACIÓ DEL PLASMA LÍQUID

4.1 OBJECTIUS

S'ha descrit en el capítol 2 del treball que la sang de porcí d'animals sacrificats en escorxadors gironins i recollida amb un sistema obert té una càrrega microbiològica molt elevada. En el capítol 3 s'ha constatat que també és important la contaminació del plasma que s'obté a partir d'aquesta sang. Malgrat això, s'han estudiat tota una sèrie de propietats, degudes bàsicament a la fracció proteica d'aquesta fracció, que la convertiren en un producte útil com a ingredient funcional (estabilitzant d'emulsions, gelificant, amb capacitat de retenció d'aigua, etc.) en determinats aliments. S'ha constatat que el procés tecnològic de deshidratació per atomització permet millorar les característiques de conservació del producte sense afectar significativament aquestes propietats funcionals; però que els nivells de contaminació microbiana del plasma en pols són encara considerables si es vol destinar a l'alimentació humana.

L'objectiu general d'aquest capítol consisteix bàsicament en assajar una sèrie de sistemes d'higienització que permetin reduir la contaminació microbiològica del plasma líquid i, per tant, obtenir un producte deshidratat amb unes característiques higièniques acceptables que no comporti cap risc quan s'incorpori en la formulació d'algun aliment. Existeixen, però, diverses limitacions per a la utilització de les tècniques convencionals d'esterilització o reducció de càrrega microbiana basades en tractaments tèrmics. La necessitat de conservar les propietats funcionals del producte i el fet que aquestes depenguin de proteïnes que es desnaturalitzen en escalfar-se, arribant a provocar la gelificació del plasma, obliga a utilitzar tècniques alternatives d'higienització que no alterin de manera important l'estructura d'aquestes proteïnes plasmàtiques.

L'estudi consisteix concretament en :

1. Determinar si la bactofugació és un mètode eficaç per higienitzar el plasma de sang de porc. S'avalua la reducció en els recomptes microbiològics generals que suposen els processos de centrifugació:
 - 1.1. discontinus a 12.000 rpm (21.800 x g) durant 5, 10 i 15 minuts a temperatures de 15, 20, 25 i 30°C.
 - 1.2. en continu a 14.000 rpm (21.000 x g) amb dos temps de residència, determinats per cabals diferents (12 i 40 L/h), per tal d'establir la possibilitat de realitzar aquesta operació en un procés industrial.
2. Aplicar la tècnica de microfiltració tangencial al plasma líquid i determinar el seu efecte tant sobre la contaminació microbiològica com sobre la composició físico-química del plasma per tal d'establir possibles modificacions de les propietats funcionals del producte.

3. Assajar l'aplicació d'alta pressió hidrostàtica i determinar:

3.1. El seu efecte sobre la qualitat microbiològica: reducció de la contaminació general (recomptes de bacteris aeròbics mesòfils) i de la capacitat de creixement de la població supervivent (seguiment del creixement dels microorganismes en el plasma després de la pressurització).

3.2. Les modificacions estructurals de la fracció proteica del producte: determinació per DSC dels paràmetres calorimètrics (DH i T_d) de plasma sotmès a diferents tractaments.

3.3. Les conseqüències dels tractaments sobre la funcionalitat del plasma atomitzat: solubilitat, capacitat escumant, activitat emulsionant i gelificant (capacitat de retenció d'aigua, resistència a la penetració i microestructura dels gels).

4.2 MATERIAL I MÈTODES

4.2.1 Procedència de les mostres

Es va treballar amb mostres de sang provinent del tanc refrigerat d'emmagatzematge d'un escorxador industrial de la comarca del Gironès que realitza la recollida de la sang amb el sistema descrit en el Capítol 2 (addició de citrat sòdic com a anticoagulant i refrigeració immediata de la sang recollida). Al laboratori les mostres van ser processades per tal d'obtenir la fracció plasmàtica per centrifugació i posterior decantació (apartat 2.2.4.1).

En algunes de les proves de bactofugació i microfiltració que exigien el tractament de volums considerables de plasma es va utilitzar plasma de sang recollit directament en l'escorxador, ja que una de les empreses col·laboradores disposava de dues centrifugues de discs que treballaven en continu i permetien separar de forma immediata les dues fraccions de la sang procedent del sacrifici. En aquest escorxador el plasma és refrigerat mitjançant un bescanviador de calor i és conduït cap a un sistema de congelació de plaques, d'on surt en forma de blocs congelats. Quan es treballava amb aquest plasma es recollien entre 5 i 15 litres del producte refrigerat, just abans de la congelació.

4.2.2 Bactofugació

4.2.2.1 Equip

L'equip utilitzat per realitzar les proves de bactofugació va ser una centrífuga d'alta velocitat Sorvall model RC-5C plus (DuPont Co., Newtown, Connecticut), amb compensació automàtica de temperatures. Pels processos discontinus es va utilitzar un rotor d'angle fix Sorvall SLA-1500. Per les operacions en flux continu es va treballar amb un rotor Sorvall TZ-28 zonal i una bomba peristàtica Watson Marlow 313S (Watson Marlow Ltd., Cornwall, England) que impulsava el plasma des del dipòsit cap a l'interior del rotor.

4.2.2.2 Procés

Es va determinar la càrrega microbiana general (recompte de bacteris aeròbics mesòfils) del plasma líquid abans i després de la centrifugació. Les mostres es van centrifugar a una velocitat de 12.000 rpm, que corresponia a una força centrífuga relativa de 21.800 x g, i sota diferents condicions de temperatura (15, 20, 25 i 30°C), perquè es va considerar que la disminució de densitat del plasma provocada per un increment en la temperatura podria afavorir la separació dels microorganismes i, en conseqüència, millorar l'eficàcia del procés. Es van realitzar proves mantenint aquestes condicions de procés durant períodes de 5, 10 i 15 minuts per establir el possible efecte d'un increment en el temps de centrifugació. Es va repetir aquesta experiència sobre quatre mostres de plasma corresponents a diferents dies de mostreig.

Es va determinar també la reducció de càrrega microbiana que s'aconseguia en un procés continu de centrifugació a 14.000 rpm, aproximadament 21.000 x g, regulant el flux d'entrada i sortida del plasma del rotor de centrifugació a 12 i 40 L/h, cabals que comportaven diferents temps de residència del producte. Aquestes experiències es van realitzar sobre 20 mostres i sempre a la temperatura de 15°C.

4.2.3 Microfiltració tangencial

4.2.3.1 Equip

Es va treballar amb un mòdul d'ultra (UF) i microfiltració (MF) Micro Kerasep TM 40 de Tech-Sep (Grup Rhône-Poulenc, Cedex, França) d'acer inoxidable, equipat amb una membrana ceràmica tubular de 20 mm de diàmetre i 400 mm de longitud, amb 19 canals (2,5 mm de diàmetre), que proporciona una àrea de filtració de 560 cm². L'equip disposa d'una vàlvula per regular la pressió del *retentat*, dos manòmetres que mesuren la pressió a l'entrada i a la sortida del *retentat* i dues sortides de *permeat*.

El producte és impulsat des del dipòsit cap al mòdul de microfiltració i recirculat mitjançant una bomba Piton helicoidal de rotor excèntric monobloc sanitària (Mapsa ref. A-37/1-T35V1). El material del cos i del rotor és acer inoxidable i l'estator de viton. La bomba funciona amb un motor elèctric de 1.400 rpm i un variador mecànic de discs, que permet reduir la velocitat de treball fins a 335 rpm.

En aquest tipus de mòduls que treballen amb membranes tubulars el líquid circula per l'interior dels tubs mentre que el *permeat* passa a través dels porus i es recull en un segon tub concèntric. És un mòdul fàcilment desmuntable i de fàcil neteja, presenta una pèrdua de càrrega baixa i permet, per tant, una elevada velocitat de circulació del líquid amb un efecte d'escombrat eficaç que evita la formació de dipòsits. Cal, però, una energia de bombeig elevada per assolir l'increment de pressió desitjat i presenta un volum mort important que dificulta la versatilitat de funcionament i incrementa la quantitat de producte necessari en les operacions de neteja. El sistema alternatiu seria la utilització de mòduls plans que tenen una relació superfície/volum molt favorable, són poc voluminosos, permeten també un desmuntatge ràpid i tenen volums morts baixos i canals de circulació estrets. Els inconvenients respecte als tubulars són que alguns provoquen una pèrdua de càrrega elevada i un efecte d'escombrat insuficient per evitar la formació prematura de dipòsits.

Durant molt temps els factors limitants d'aquests processos de separació van ser les resistències tèrmica i química de les membranes disponibles, però actualment existeixen les anomenades de 3era. generació, membranes minerals (d'òxid de zirconi o d'alúmina) que toleren molt bé les condicions de temperatura i pH emprades en l'àmbit agroalimentari, fins i tot durant les operacions de neteja i esterilització. Són simultàniament permeables, selectives i resistents. Existeixen membranes d'altres tipus: cel·lulòsiques (d'acetat de cel·lulosa, molt permeables i selectives però sensibles a la hidròlisi química i a la degradació per determinats microorganismes) i de polímers orgànics (polisulfones, poliacrilonitrils o poliamides aromàtiques).

El muntatge operatiu per aquest treball (Figura 4.1) va consistir en un circuit tancat on el mateix tanc d'alimentació del mòdul s'utilitzava per recollir el concentrat. L'inconvenient d'aquest sistema és que requereix un temps llarg de permanència del producte en l'interior del mòdul i la bomba ha de subministrar pressió suficient i un cabal d'alimentació molt elevat durant molt temps, la qual cosa es tradueix en un consum energètic elevat. Aquest és el motiu pel qual aquest tipus d'instal·lacions només se solen utilitzar a escala de laboratori o de planta pilot. El muntatge alternatiu constaria d'una bomba que conduís el producte des del tanc a un bucle de recirculació i, a mesura que s'anés obtenint el *permeat*, es concentraria el *retentat* i aniria disminuint el volum dins el tanc d'alimentació. Per aquest segon muntatge caldrien dues bombes, una per assolir la pressió operativa necessària i una altra que proporcionés el cabal elevat a l'interior del mòdul. Aquest sistema és el que s'utilitza a escala industrial ja que permet recuperar part de l'energia de bombeig (Mafart i Béliard, 1994b).

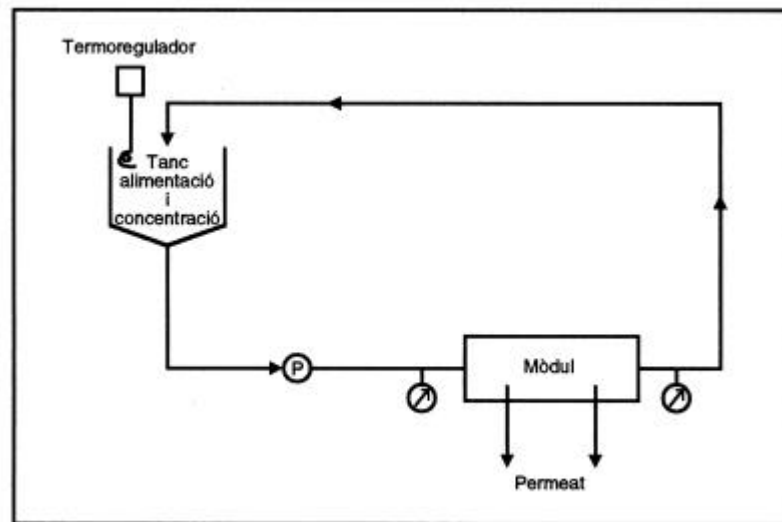


Figura 4.1. Esquema del sistema de microfiltració

4.2.3.2 Procés

Es partia d'un volum de 10-15 L de plasma que s'impulsaven des del tanc d'alimentació a través del mòdul filtrant mitjançant la bomba ajustada per proporcionar un cabal de recirculació aproximat de 1.600 L/h. La mostra es mantenia a 20-25°C de temperatura durant el procés. Les pressions operatives utilitzades van ser de 1,5 a 2 bars a la sortida del mòdul de filtració.

Tots els components del sistema (dipòsit, conduccions, etc.) havien estat prèviament desinfectats amb una solució diluïda d'hipoclorit sòdic i perfectament esbandits. La membrana s'esterilitzava en un autoclau durant 20 minuts a 121°C.

Es mantenia en marxa el sistema durant aproximadament 15 minuts i es recollien, en recipients també estèrils, entre 1 i 2 L de *permeat* del qual es determinava posteriorment l'extracte sec i la càrrega microbiana per avaluar el percentatge de reducció respecte al plasma original.

Després de cada operació es realitzava una rutina de neteja amb una seqüència que incorporava la utilització d'una solució de NaOH 0,5M a 80°C i una d'àcid nítric 0,3M a 40°C per eliminar les restes de producte de l'interior del mòdul i la membrana. Es considerava finalitzat el procés de neteja quan es recuperava el flux de permeació d'aigua destil·lada que presentava la membrana a l'inici del procés. El procés es va repetir 4 vegades amb plasma recollit en diferents dies de mostreig.

4.2.4 Alta pressió hidrostàtica (HP)

4.2.4.1 Equip

Els experiments d'alta pressió hidrostàtica es van dur a terme al Centre Especial de Recerca-Planta de Tecnologia dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona amb una premsa isostàtica discontinua (ACB, Gec Alsthom, Nantes, França) que permet aplicar pressions de fins a 500 MPa (Figura 4.2). La pressió del tractament s'assolia en un temps d'entre 1 i 2 minuts, depenent de la pressió requerida, i la descompressió es feia en un temps d'entre 30 i 45 segons. La cambra de pressurització i el líquid que contenia (aigua o una barreja etanol:aigua (1:1) pels tractaments en fred) es portaven fins la temperatura de tractament mitjançant un flux constant d'aigua, quan calia escalfar, o d'una barreja d'etanol:aigua (3:1), quan es treballava a temperatures de refrigeració.

4.2.4.2 Procés

Per fer els tractaments s'omplien ampolles flexibles de clorur de polivinilidè amb 80 mL o bosses de plàstic amb uns 250 mL de la mostra. Les ampolles s'omplien completament per no deixar espai amb aire i es tapaven amb taps de rosca; les bosses es termosegellaven al buit. S'introduïen les mostres en la cel·la de pressurització on quedaven submergides en el líquid compostat d'una barreja d'aigua i alcohol, per evitar la congelació. Es va treballar amb pressions de 400, 450 i 500 MPa, i amb cicles de compressió des de 5 fins a 30 minuts de durada.

La temperatura de les mostres abans del processament, així com la que s'utilitzava com a control no pressuritzat, es mantenia a uns 5°C. Les determinacions analítiques sobre les mostres sotmeses a pressió es realitzaven dins les 36 hores després del tractament i durant aquest temps la mostra ja tractada també es mantenia a temperatura

de refrigeració (5°C). Totes les condicions de processament es varen repetir un mínim de dues vegades.

Es va considerar la possibilitat d'aplicar alta pressió directament sobre la sang, per tal de reduir la contaminació microbiològica de la matèria primera a partir de la qual s'havia d'obtenir el plasma. Es varen fer algunes proves sobre sang sencera aplicant pressions des de 350 a 400 MPa i amb durades des de 5 fins a 30 minuts de tractament a 5°C de temperatura. Es van observar modificacions en la viscositat de la sang i es van determinar el percentatge de plasma que s'obtenia a partir de sang tractada i el grau d'hemòlisi provocat pel tractament.

Les proves sobre la fracció plasmàtica es van fer a 400, 450 i 500 MPa, amb durades de fins a 30 minuts, mantenint també la temperatura a 5°C. Es va determinar el tractament més efectiu a partir de la seva influència sobre la càrrega microbiana contaminant i sobre l'estabilitat tèrmica de les proteïnes plasmàtiques.

Per mostres pressuritzades a 450 MPa durant 15 minuts a 5°C, 25°C i 40°C es va determinar la desnaturalització proteica, la reducció dels recomptes generals de microorganismes i l'efecte del tractament sobre la capacitat de creixement de la població supervivent i sobre la funcionalitat del producte tractat.

PARÀMETRES DE PROCÉS

DETERMINACIONS

SANG

tractaments a 350 i 400 MPa

durades dels tractaments : 5-30 min

temperatura de tractament : 5°C

rendiment en plasma de la centrifugació

canvis reològics

hemòlisi

PLASMA

tractaments a 400, 450 i 500 MPa

durades dels tractaments : 5-30 min

temperatura de tractament : 5°C

canvis reològics

desnaturalització proteica (DSC)

tractaments a 400 i 450 MPa

durades dels tractaments : 15-30 min

temperatura de tractament : 5°C

recomptes microbiològics

tractaments a 450 MPa

durada del tractament : 15 min

temperatures de tractament : 5, 25 i 40°C

desnaturalització proteica (DSC)

recomptes microbiològics

corbes de creixement

propietats funcionals

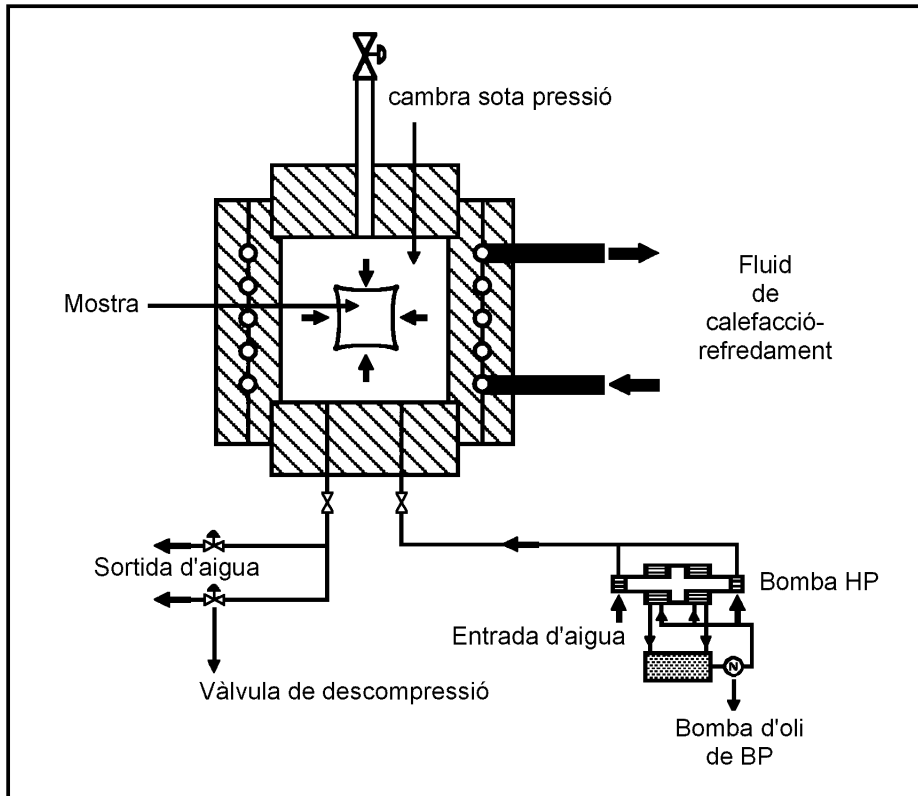


Figura 4.2. Esquema d'un equip discontinu per a la pressurització d'aliments envasats (ACB, Gec Alsthom, França).

4.2.5 Determinacions analítiques

Per realitzar les determinacions de les característiques físico-químiques i els recomptes microbiològics de les mostres estudiades en aquesta part del treball es van utilitzar les tècniques d'anàlisi descrites en el capítol 2 (apartat 2.2.4).

La descripció de les tècniques utilitzades per a les determinacions de l'estabilitat tèrmica i les propietats funcionals es troba en els apartats 3.2.3.3 i 3.2.3.4 del capítol 3, respectivament.

Les corbes de creixement per determinar l'evolució de la càrrega microbiològica contaminant del plasma abans i després dels tractaments per alta pressió es van obtenir mitjançant un lector de microplaques Bioscreen C (LabSystems Corporation. Helsinki,

Findland) que enregistrava les variacions en la absorbància en pouets que contenien mostres de 250 μL de plasma incubades a 37°C. Les lectures d'absorbància es realitzaven a una longitud d'ona de 600 nm a intervals de 15 minuts i es feia el seguiment durant 4 dies.

Amb aquestes corbes es va avaluar la capacitat de creixement del grup mixt de microorganismes que constituïen la contaminació de la mostra a partir de (1) l'àrea delimitada per la corba i una línia de base obtinguda traçant una horitzontal a l'eix d'abscisses a l'alçada del punt d'absorbància mínima de cada corba, (2) la velocitat de creixement de la població a partir del pendent de la fase de creixement exponencial linealitzada mitjançant una transformació logarítmica, i (3) la diferència en l'absorbància final que presentava cadascuna de les mostres tractades respecte al plasma control no pressuritzat.

4.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.3.1 Bactofugació

La bactofugació és un procés que permet sedimentar els bacteris en suspensió en un medi líquid mitjançant l'aplicació una força centrífuga. La separació es fonamenta en la diferència de densitat entre les cèl·lules (més denses) i el medi on es troben. S'ha aplicat bàsicament en la indústria formatgera per reduir els nivells de microorganismes (sovint espores) de la llet. L'eficàcia dels tractaments s'expressa en percentatge de bacteris o espores eliminats mitjançant la centrifugació, que es calcula a partir de recomptes efectuats en el producte abans i després del tractament.

4.3.1.1 Procés discontinu

Els resultats obtinguts mitjançant el procés de centrifugació discontinu de mostres de plasma es mostren en la figura 4.3.

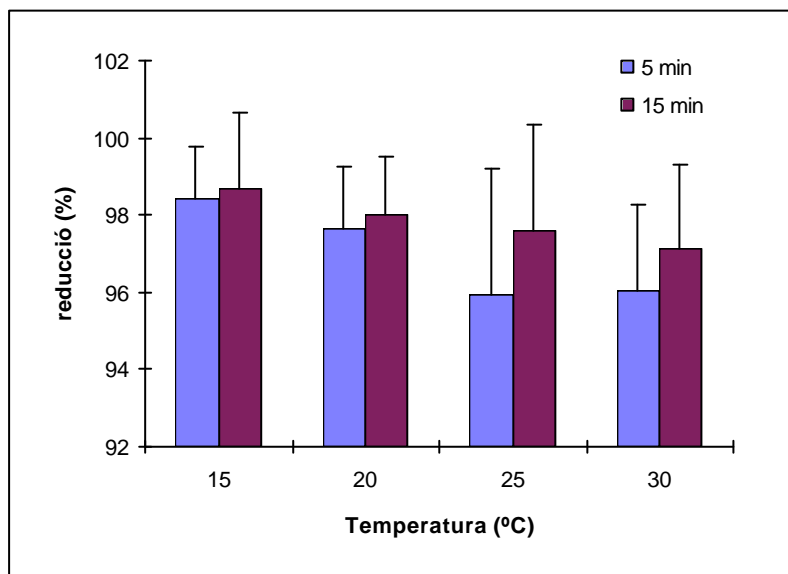


Figura 4.3. Percentatges de reducció de la càrrega microbiana contaminant del plasma aconseguits mitjançant la bactofugació (procés discontinu) en funció de la temperatura i el temps de centrifugació. Mitjanes \pm interval de confiança (95%).

El resultat de les proves de centrifugació durant 10 minuts no es presenten en el gràfic ja que només es van realitzar una vegada. En no observar efectes evidents relacionats amb el temps de centrifugació es va seguir treballant només amb els valors distals de 5 i 15 minuts.

Es pot observar que les reduccions aconseguides van ser del voltant del 96-98%, és a dir entre 1,5 i 2 unitats logarítmiques. Es partia de plasma amb una càrrega inicial entre 10^4 i 10^6 ufc/mL i, per tant, els recomptes en les mostres bactofugades eren de l'ordre de 10^2 - 10^4 ufc/mL. La majoria de les dades publicades sobre percentatges de reducció aconseguits en la llet inclouen l'efecte acumulat del tractament de centrifugació i l'escalfament, ja que normalment es treballa a temperatures de pasteurització. A temperatures de 62-63°C, els percentatges de reducció poden ser d'un 80 a un 99 % (Bergere, 1987). Tenint en compte que el plasma no permet treballar a aquestes temperatures perquè gelifica i que s'han utilitzat temperatures que no tenen efectes letals sobre els microorganismes, podem considerar que l'eficàcia del nostre procés ha estat considerable. Cal tenir present, però, que nosaltres hem treballat a una força centrífuga relativa més elevada (pràcticament el doble) de la que s'aplica en una bactofugació convencional de la llet (al voltant de 12.000 x g).

En el plasma les disminucions en els recomptes com a conseqüència de la bactofugació van ser del mateix ordre independentment de la temperatura del tractament. Malgrat que la comparació dels valors mitjans sembla indicar que l'increment en la temperatura de centrifugació comporta una disminució dels percentatges de reducció, si tenim en compte els intervals de confiança observem que aquest efecte no és significatiu. En el cas de la llet, l'elevada temperatura durant el procés de bactofugació (entre 55 i 74°C) fa disminuir la seva densitat i afavoreix la separació. Per temperatures de 55-57°C, inferiors a les esmentades anteriorment, els valors obtinguts són molt variables i van des d'un 56 a un 97 % de reducció (Bergere, 1987). En el nostre cas, però, l'efecte d'aquest paràmetre sobre la densitat del plasma, dins l'interval de temperatures assajades, no ha influït en l'eficàcia del procés. Potser s'hagués posat de manifest si haguéssim aplicat forces de centrifugació més baixes.

Un increment del temps de tractament des de 5 fins a 15 minuts tampoc va comportar millores significatives, tot i que les mitjanes dels tractaments més llargs van ser lleugerament superiors a les dels tractaments de només 5 minuts de durada.

Les reduccions obtingudes de fins a dues unitats logarítmiques podrien ser interessants si s'aconseguiessin també mitjançant un sistema continu fàcilment adaptable a les instal·lacions de recollida de sang de les indústries. Per això es va plantejar una experiència de bactofugació mitjançant un sistema continu, per tal de veure si era

possible aconseguir la mateixa eficàcia en la disminució de la càrrega microbiana contaminant.

4.3.1.2 Procés en continu

Per una velocitat de la bomba que proporcionava un flux de 12 L/h es van obtenir reduccions del mateix ordre que les aconseguides amb el procés discontinu ($97,55 \pm 0,90$ %). Incrementant la velocitat del procés a 40 L/h va disminuir l'eficàcia fins a valors del 92,69 % ($\pm 2,54$). El nostre sistema presenta les limitacions de tots els equips a escala de laboratori i no ens va permetre assajar velocitats de flux més elevades.

Es van realitzar anàlisis físico-químiques del plasma bactofugat per comprovar l'efecte del procés sobre la composició físico-química del plasma i es van obtenir diferències insignificants (inferiors a un 0,1 % de reducció en l'extracte sec) entre el plasma abans i després de bactofugar. Per aquest motiu no es va considerar necessari determinar si s'afectava la funcionalitat del producte.

La instal·lació en continu de centrífugues de gran capacitat en la mateixa empresa que genera la sang seria un bon sistema per incrementar el valor del subproducte, permetria reduir la contaminació del plasma i obtenir una matèria primera de millor qualitat, possiblement apta per a usos en alimentació humana. El muntatge requeriria la col·locació de centrífugues de baixa velocitat que separessin les dues fraccions (plasma i cèl·lules) i de centrífugues per a la bactofugació en el circuit de la fracció plasmàtica. Aquests equips haurien d'estar intercalats entre el col·lector de sang procedent del sagnador i el sistema de refrigeració previ al dipòsit d'emmagatzematge.

4.3.2 Microfiltració

La microfiltració tangencial pot ser útil per tal de reduir la contaminació microbiana del plasma líquid sense alterar les seves propietats nutricionals i funcionals i, per tant, presenta els mateixos avantatges que la centrifugació en comparació amb els tractaments tèrmics.

Es va avaluar la reducció de càrrega microbiana que es podia assolir mitjançant la microfiltració del plasma, així com l'efecte que aquest procés tenia sobre l'extracte sec i el contingut proteic del producte. L'objectiu era aconseguir un *permeat* amb pràcticament la mateixa composició que el plasma inicial però sense els microorganismes que el contaminaven. Prèviament a la microfiltració es realitzava una centrifugació en continu a alta velocitat (en les mateixes condicions que la bactofugació comentada en l'apartat 4.3.1) per tal d'eliminar restes d'eritròcits i membranes que podrien contribuir a la colmatació prematura del filtre. L'eficàcia dels tractaments s'expressa en percentatge de bacteris eliminats o nombre de reduccions decimals aconseguides, i es calcula a partir de recomptes efectuats en el producte abans i després de cadascun dels tractaments.

La bibliografia que s'ha localitzat sobre utilització de la microfiltració amb l'objectiu de reduir la càrrega microbiana de líquids alimentaris fa referència sempre a aplicacions en productes lactis. Per a la higienització de llet per microfiltració es treballa amb membranes amb porus d'un diàmetre mitjà de 1,4 μm (Tabard, 1990; Jaubert *et al.*, 1991; Trouvé *et al.*, 1991). Tenint en compte que el plasma no presenta l'inconvenient que pot suposar en la llet la presència de glòbuls grassos de volum considerable, es va decidir treballar amb membranes de diàmetre nominal més petit. Les utilitzades normalment en l'esterilització de líquids per filtració són de 0,45 μm però cal tenir present que el que interessa en el nostre cas és que la composició del microfiltrat sigui pràcticament la mateixa que la del plasma abans de tractar; per això es va preferir utilitzar membranes de 0,8 μm de diàmetre nominal amb la intenció de facilitar el flux de *permeat* i minimitzar les pèrdues d'extracte sec del producte durant el procés.

Tot i això, el plasma microfiltrat que es va obtenir tenia un extracte sec inferior en un 0,5 % al que presentava el plasma inicial i, d'aquesta reducció, un 80% era deguda al procés de microfiltració i la resta a la centrifugació prèvia. Aquesta reducció de l'extracte sec del microfiltrat pot explicar-se com a una conseqüència de fenòmens d'adsorció macromolecular que es produeixen a la superfície de la membrana, tal com suggereixen diferents estudis sobre la contribució d'aquests processos a la colmatació de les superfícies filtrants (Matthiasson, 1983; Lockley *et al.*, 1988).

Es va poder constatar també que l'extracte sec del *permeat* era més o menys constant en les diferents mostres recollides durant els primers 20 minuts del procés sempre que la mostra es mantingués a una temperatura aproximada de 22°C. Si la temperatura del plasma durant el procés era més baixa (10-15°C) es produïa una disminució important de l'extracte sec en les mostres de *permeat* recollides. A partir dels 10 minuts de microfiltració s'observava una reducció del 10%, i la mostra dels cinc últims minuts contenia només un 60% de l'extracte sec determinat en la primera mostra recollida. Això, juntament amb l'observació que l'increment de temperatura afavoria sensiblement el rendiment del procés (el volum de *permeat* obtingut durant el temps de microfiltració arribava a ser dues vegades més elevat en els processos realitzats a 22°C), va fer que es decidís avaluar l'efecte higienitzador del procés mantenint el plasma a temperatura ambient.

Aquest increment, tant del rendiment com de l'extracte sec del *permeat*, en augmentar la temperatura pot estar relacionat amb la disminució de viscositat del producte, que té un efecte netament favorable sobre el flux de *permeat*. A més, l'augment de temperatura provoca també un increment de la difusivitat molecular i, per tant, una disminució de l'efecte de polarització, un dels fenòmens que dificulten el flux de *permeat*. Durant les operacions de filtració tangencial sempre s'observa una acumulació massiva de molècules prop de la membrana que són arrossegades cap a la superfície pel mateix flux de *permeat* i retingudes per la capa límit que s'estableix sobre la membrana. Aquestes molècules es troben dins un règim de desplaçament laminar i només poden abandonar la capa límit per difusió, per tant molt poc a poc. L'acumulació de solut en aquesta zona provoca també una sobreconcentració que es tradueix en un increment de la viscositat i, en conseqüència, una disminució del flux de membrana. A més, la concentració tan elevada de solut pot provocar la precipitació de sals que colmaten la membrana i la formació de gels que originen un film que pot arribar a duplicar el gruix d'aquesta (Mafart i Béliard, 1994b).

Per minimitzar aquest efecte de polarització, a més de treballar a temperatura ambient, es va utilitzar una pressió de 2 bar i un cabal elevat d'alimentació del mòdul (1.600 L/h). En la filtració tangencial, un increment lineal del flux de *permeat* en funció de la diferència de pressions a través de la membrana només es produeix dins intervals de baixa ΔP . A partir d'un llindar, variable segons el producte tractat i les condicions de treball, aquesta corba presenta un punt d'inflexió de manera que el flux es fa independent de la pressió. Aquest fenomen s'atribueix a l'efecte de polarització, més accentuat quant més gran sigui el flux de *permeat* (Bennasar *et al.*, 1982; Matthiasson, 1983). Tanmateix, un increment del cabal d'alimentació es tradueix en un augment proporcional de la velocitat de pas del producte paral·lel a la membrana que provoca una disminució del gruix de la capa límit i de l'efecte de polarització (Bennasar *et al.*, 1982). Per tant, per

mantenir una energia de bombeig raonable quan l'efecte de polarització és important, és preferible treballar a una pressió moderada i amb un cabal d'alimentació elevat (Mafart i Béliard, 1994b).

En la figura 4.4 es mostren els resultats dels recomptes de microorganismes en el plasma abans i després dels processos de bactofugació i microfiltració, en les condicions operatives que s'han comentat.

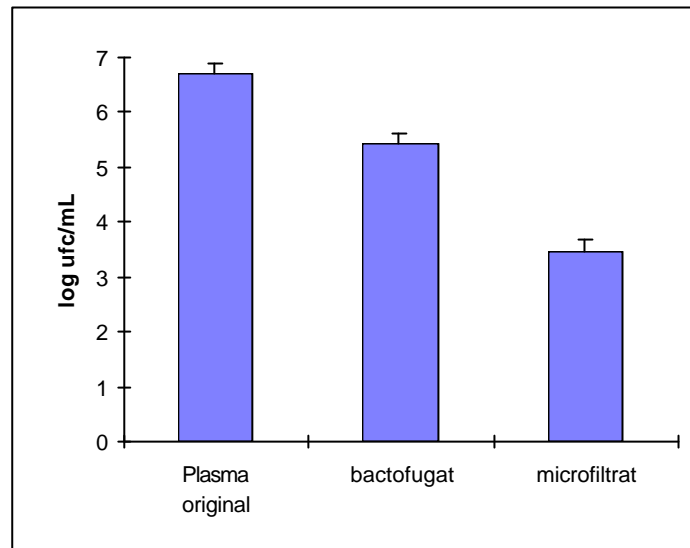


Figura 4.4. Recòmptes del nombre de viables del plasma abans i després dels processos de bactofugació (procés continu) i microfiltració. Mitjanes \pm interval de confiança (95%).

La reducció per microfiltració de la càrrega microbiana contaminant del plasma va ser molt important. En aquestes proves la microfiltració del plasma bactofugat va rebaixar els recomptes un $98,6 \pm 1,1\%$. L'efecte combinat dels dos tractaments (bactofugació i microfiltració) va ser d'un $99,9\%$ de reducció, és a dir $3,2 \pm 0,4$ reduccions decimals. Es van assolir recomptes finals sempre inferiors a 5×10^3 ufc/mL, partint de plasma amb contaminacions inicials des de $4,3 \times 10^6$ fins a 1×10^7 ufc/mL. Globalment, es pot considerar que la població bacteriana del microfiltrat és proporcional a la població present inicialment en el fluid tractat (Trouvé *et al.*, 1991). Així doncs, com en les altres tècniques d'higienització de líquids alimentaris basades en tractaments tèrmics o forces centrífugues, el nombre de reduccions decimals és independent del nivell de població present en el fluid que es tracta. Trouvé *et al.* (1991) van comprovar aquest fet microfiltrant

(amb membranes de 1,4 μm i a temperatures entre 40 i 50°C) diferents líquids alimentaris (de naturalesa làctia) amb contaminacions que anaven des de 10^2 fins 10^7 ufc/mL. En aquest estudi es varen obtenir valors mitjans d'eficàcia d'aproximadament 99,75% (2,6 reduccions decimals) per tant fins i tot més elevades que les descrites en el nostre treball. Veiem, doncs, que l'eficàcia de la microfiltració com a sistema de reducció microbiana pot ser del mateix ordre que la dels tractaments tèrmics i que presenta un avantatge molt clar respecte aquests: es pot realitzar una segona microfiltració, que suposaria -segons els nostres resultats- un increment d'eficàcia fins el 99,98%, sense provocar els efectes negatius acumulatius que un segon tractament per calor tindria sobre les propietats intrínseques de les macromolècules o els seus equilibris d'interacció.

La disminució de l'extracte sec del plasma va suposar una reducció en el contingut proteic que comportava una disminució important en la resistència a la penetració dels gels obtinguts escalfant el plasma després de la microfiltració. Tanmateix les proves realitzades a partir de plasma microfiltrat i deshidratat, després de reconstituir-lo al mateix extracte sec que el plasma líquid original, demostren que l'alteració en les proporcions relatives de les diferents proteïnes plasmàtiques que, en funció del seu pes molecular, pot haver suposat la microfiltració, no afecta les característiques dels gels obtinguts a partir de la pols (resistència a la penetració i capacitat de retenció d'aigua).

4.3.3 Alta Pressió Hidrostàtica (HP)

L'aplicació d'alta pressió hidrostàtica és una tècnica relativament nova que es pot utilitzar per inactivar microorganismes deteriorants en aliments i ingredients alimentaris. És un tractament que indueix una sèrie de canvis en la morfologia, reaccions bioquímiques, mecanismes genètics, la membrana i la paret cel·lular dels microorganismes (Hoover *et al.*, 1989). En comparació amb els tractaments tèrmics clàssics, l'alta pressió actua de manera independent de la mida i geometria del producte i sembla que no afecta les unions covalents. En conseqüència, pot donar lloc a aliments amb una estabilitat microbiològica suficient i que mantenen les seves qualitats nutricionals i organolèptiques (Van Camp, 1996).

El fet que la pressió s'apliqui de manera uniforme sobre tot el producte fa que l'efecte conservant sigui també el mateix en totes les parts del producte tractat; no s'originen gradients, com en el cas de la transmissió de calor, des de l'exterior fins al centre de l'aliment. A diferència també dels tractaments tèrmics l'aplicació de pressió no és temps/massa dependent, els productes més grans no exigeixen l'aplicació de tractaments més intensos o més llargs i aquest fet permet reduir els temps de processament (Eley, 1992).

4.3.3.1 Aplicació sobre sang sencera

Es va plantejar la possibilitat d'utilitzar el tractament d'alta pressió com a mètode d'higienització de la matèria primera, la sang sencera, i per tant, com a tractament previ a la separació centrífuga i posterior revaloració per separat de les dues fraccions.

Les proves preliminars realitzades varen permetre constatar que l'alta pressió no era aplicable a la sang sencera, ja que els tractaments que podrien tenir algun efecte sobre la càrrega microbiana contaminant provocaven també canvis indesitjables en les característiques del producte.

L'aplicació de pressions de 400 MPa durant períodes de temps compresos entre els 5 i 30 minuts comportava un increment progressiu de la viscositat de la sang, possiblement degut tant al trencament de les cèl·lules i al vessament del material citoplasmàtic com a la inducció de processos d'agregació entre components de la sang; això feia disminuir el rendiment de la centrifugació pel que fa a la quantitat de fracció plasmàtica que s'obtenia. En les mostres sotmeses a tractaments llargs (30 minuts) fins i tot es feia impossible la separació posterior per centrifugació de les dues fraccions.

A més, el trencament d'eritròcits incrementava el nivell d'hemòlisi de manera que el plasma que s'obtenia de la sang tractada contenia quantitats inacceptables

d'hemoglobina. Un tractament a 400 MPa de només 5 minuts provocava un augment molt important de la quantitat d'hemoglobina present en la fracció plasmàtica (Figura 4.5). Tanmateix, el plasma sotmès a tractaments de 10 i 15 minuts presentava valors més baixos d'absorbància a 414 nm (longitud d'ona de màxima absorció de l'hemoglobina) que no podien ser interpretats com una disminució de l'hemòlisi. La interpretació d'aquest comportament rau en l'efecte desnaturalitzador de l'hemoglobina que tenen determinats tractaments d'alta pressió i que comporten la seva decoloració. De fet, la pressurització ha estat suggerida en alguna ocasió com a tractament utilitzable per alterar de manera selectiva les propietats d'algunes proteïnes alimentàries (precipitació de β -lactoglobulina per proteòlisi enzimàtica amb termolisina a pressions de 200 MPa, desodorització de proteïnes particulars, solubilització o modificacions amb proteases específiques de proteïnes de peix) i, entre aquestes, també la decoloració de l'hemoglobina (Hoover *et al.*, 1989). Els nostres resultats permeten establir que cal un tractament de la sang superior a 5 minuts a pressions de 400 MPa per provocar aquest efecte decolorant.

Aquesta desnaturalització de proteïnes responsables del color és especialment important quan s'apliquen tractaments d'alta pressió en productes carnis, i exigeixen la realització d'estudis d'estabilització del color mitjançant nitrats, oxigen o altres additius (Javier-Borderías, 1995).

Per comprovar si una pressió més baixa reduïa o no produïa aquests efectes negatius sobre les característiques de la sang (hemòlisi i increment de viscositat) es varen realitzar tractaments a 350 MPa. Els resultats tampoc van ser satisfactoris perquè ja el tractament més suau provocava hemòlisi. En aquest cas, però, es va obtenir una relació positiva entre els nivells d'hemòlisi en les mostres tractades i els temps de tractament (Figura 4.6). Aquest resultat permet deduir que un tractament de 30 minuts a 350 MPa no és suficient per desnaturalitzar l'hemoglobina i provocar la seva decoloració. De fet, el tractament de 30 minuts de durada tenia, pel que fa a l'hemòlisi provocada, un efecte equivalent al tractament de 5 minuts a pressions de 400 MPa. En carns sembla però que els tractaments per sobre de 300 MPa provoquen canvis significatius de coloració (Javier-Borderías, 1995).

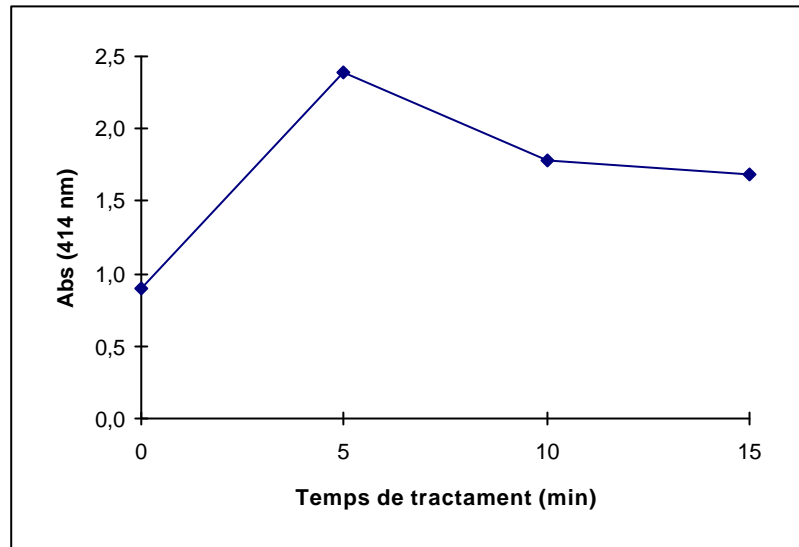


Figura 4.5. Efecte de diferents temps de pressurització a 400 MPa en la concentració d'hemoglobina del plasma obtingut a partir de la sang tractada.

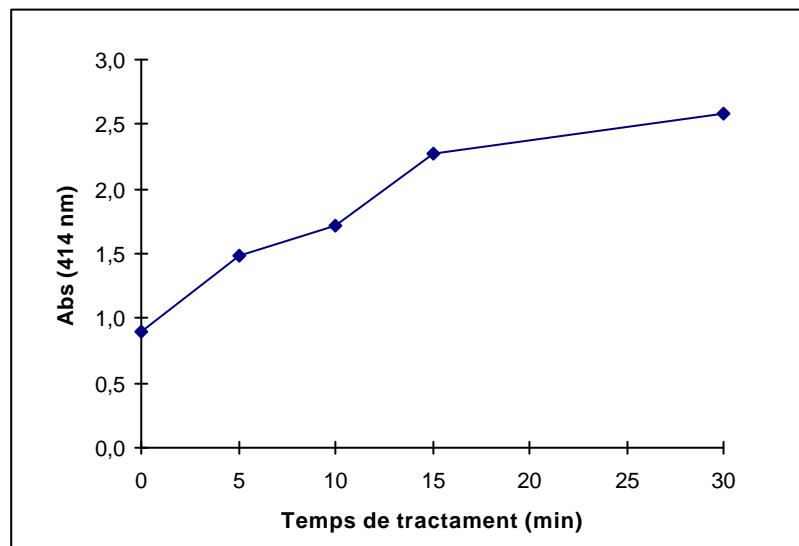


Figura 4.6. Efecte de diferents temps de pressurització a 350 MPa en la concentració d'hemoglobina del plasma obtingut a partir de la sang tractada.

4.3.3.2 Aplicació sobre la fracció plasmàtica

Es varen iniciar les proves sobre la fracció plasmàtica realitzant una sèrie de assajos preliminars per tal de trobar aquella combinació pressió/temps de tractament que no provoqués canvis en l'estat físic del plasma que dificultessin una possible deshidratació per atomització posterior. Les proves es van fer a pressions de 400, 450 i 500 MPa, que es van considerar les adequades per aconseguir algun efecte de reducció en la càrrega bacteriana. Es considera que els bacteris gram-negatius poden ser inactivats a pressions de 300 MPa i els gram-positius a pressions iguals o superiors a 400 MPa (Carlez *et al.*, 1994). Es va treballar a temperatura de refrigeració (5°C), temperatura a la qual es mantenia el plasma líquid des del moment de la seva recollida a partir del dipòsit d'emmagatzematge de l'escorxador, i es van assajar temps de tractament de 5, 10, 15 i 30 minuts.

En les mostres sotmeses a tractaments de 500 MPa s'iniciava un procés de gelificació i es modificava la viscositat del plasma de manera que es feia difícil l'atomització requerida en la deshidratació. En les mostres tractades 30 minuts a 400 MPa i a partir de 15 minuts a 450 MPa, s'evidenciava també un principi de gelificació al cap d'un 3 hores de l'aplicació de pressió, temps durant el qual s'havien mantingut refrigerades (5°C). Tanmateix, el fet que es produís la gelificació unes hores després d'haver aplicat el tractament no representava un problema en el procés d'atomització si aquest es duia a terme ràpidament després de la pressurització. Per tant era possible obtenir plasma deshidratat a partir d'aquest plasma pressuritzat, suposadament de millor qualitat microbiològica que el que s'obtenia del plasma no tractat.

4.3.3.2.1 Anàlisi calorimètrica de les mostres pressuritzades

L'objectiu d'aquest estudi consistia en detectar mitjançant l'anàlisi calorimètrica diferencial (DSC) possibles canvis conformacionals en les proteïnes plasmàtiques deguts a l'aplicació dels tractaments d'alta pressió, de la mateixa manera que en el capítol anterior havíem avaluat els possibles efectes desnaturalitzadors de la deshidratació.

Les interaccions que contribueixen a mantenir l'estat natiu dels biopolímers es veuen afectades per la pressió (Hoover, 1993). La desnaturalització proteica està causada per la redistribució i/o destrucció dels ponts d'hidrogen, interaccions hidrofòbiques i interaccions electrostàtiques (Hayashi, 1989; Okamoto *et al.*, 1990). Veiem, per tant, que els tractaments d'alta pressió modifiquen les proteïnes a nivell de les interaccions no covalents implicades en l'estabilització de l'estructura secundària i terciària.

Un efecte clar de l'alta pressió és la reducció de l'espai molecular disponible i això fa que s'incrementin les interaccions intermoleculares. La formació de ponts d'hidrogen està

associada a una petita reducció de volum i, per tant, segons el principi de Le Chatelier utilitzat per força autors per explicar els canvis estructurals provocats per la pressió en les proteïnes, aquestes interaccions es poden veure afavorides per l'aplicació de pressió (Heremans, 1982). Tot i això, algun autor (Van Camp, 1996) afirma que la reducció de volum que acompanya la formació de ponts d'hidrogen és tan insignificant que aquest tipus d'unions són gairebé insensibles a la pressió.

Per altra banda, sembla ser que les interaccions hidrofòbiques estan associades a un increment de volum i tendeixen a desestabilitzar-se a pressions elevades. Així doncs, la hidrofobicitat d'una proteïna pot condicionar també l'abast de la desnaturalització a una determinada pressió (Hoover *et al.*, 1989).

Les reaccions més fortament influïdes per la pressió són aquelles en què els reactants i els productes difereixen significativament en el nombre de grups ionitzables. En sistemes aquosos la pressió tendeix a dissociar les interaccions electrostàtiques i a exposar més grups ionitzats a l'aigua, i això comporta una reducció del volum deguda a l'electrostricció de l'aigua (molècules més densament empaquetades) en la proximitat dels ions (Hills, 1972).

Taula 4.1. Propietats tèrmiques de plasma porcí pressuritzat^a

Tractament	Temps de tractament (min)			
	15		30	
	DH^b (J/g)	Td^c (°C)	DH (J/g)	Td (°C)
control	10,1 ± 0,8	75,7 ± 0,6	10,5 ± 1,3	76,4 ± 1,0
400 MPa	7,5 ± 0,5	77,2 ± 1,0	8,0 ± 1,0	77,4 ± 2,4
450 MPa	7,3 ± 1,5	77,0 ± 0,2	7,5 ± 0,5	75,3 ± 0,6
500 MPa	4,5 ± 0,5	76,5 ± 0,4	4,0 ± 0,0	75,1 ± 0,5

^a Temperatura de tractament de 5°C. Mitjana d'un mínim de dues determinacions ± interval de confiança (95%).

^b Entalpia de transició

^c Temperatura de desnaturalització

Com es pot observar a la taula 4.1, on es mostren les mitjanes de les anàlisis realitzades per a tots els tractaments de pressurització, l'entalpia dels pics de transició (DH) disminueix a mesura que s'incrementa la pressió aplicada. Per tant, es pot concloure que tots els tractaments tenen un efecte desnaturalitzador sobre les proteïnes plasmàtiques. Tanmateix, la durada del tractament, entesa com el temps durant el qual la mostra està sotmesa a la pressió operativa desitjada, no contribueix significativament al nivell de desnaturalització, com tampoc incrementa notablement el percentatge de reducció de càrrega microbiana, tal com exposarem més endavant. Es pot observar en la figura 4.7 que les corbes DSC de les mostres tractades a la mateixa pressió són pràcticament idèntiques pels dos temps de tractament assajats.

La reducció en els valors d'entalpia mesurats en l'anàlisi calorimètrica han estat aproximadament del mateix ordre (entre el 25 i 28%) pels tractaments a 400 i 450 MPa i molt superiors (més d'un 55%) en el cas de tractaments a 500 MPa. Dumay *et al.* (1994) van obtenir reduccions del 51-52% en solucions del 2,5 i 5% de proteïna, treballant amb β -lactoglobulina. En aquest mateix estudi s'obtenien lleugeres disminucions en la temperatura de transició de les mostres pressuritzades respecte als controls no tractats, en el nostre treball aquest fet s'observa només per tractaments de 30 min de 450 i 500 MPa, mentre que en els altres casos els desplaçaments dels valors de T_d són en sentit oposat, lleugerament més alts en les mostres sotmeses al tractament HP.

S'ha descrit que la seroalbúmina bovina (BSA) en solucions al 0,4 g/L es manté estable a pressions de 400 MPa i s'ha atribuït aquesta elevada estabilitat enfront a l'alta pressió a la presència dels 17 ponts disulfur intramoleculars que estableixen l'estructura tridimensional de la proteïna (Hayakawa *et al.*, 1992). Tanmateix, s'ha vist també que la desnaturalització de les proteïnes induïda per l'alta pressió és un fenomen complex depenent de la concentració i que la desnaturalització induïda a baixes concentracions de proteïna (0,05-0,2%) sovint és parcialment o completament reversible, mentre que a elevades concentracions de proteïna (10%), com és el cas del plasma, s'afavoreixen interaccions intermoleculars i agregacions irreversibles (Dumay *et al.*, 1994).

Es va observar, en el nostre treball, que els tractaments a alta pressió i a temperatura de refrigeració modificaven la textura del plasma líquid, però sense arribar a suposar la formació d'un gel, coincidint amb els estudis de Van Camp (1996). Això podria suggerir que les modificacions en les proteïnes produïdes durant la pressurització són suficients per permetre un cert grau de desplegament i un principi d'agregació però no per a què es doni la formació d'una xarxa ben estructurada. La desnaturalització per pressurització no ha de conduir necessàriament a la formació de gels similars als provocats per l'escalfament ja que els ponts d'hidrogen i les interaccions hidrofòbiques tenen un comportament completament diferent davant la pressió del que tenen davant un tractament tèrmic (Defaye *et al.*, 1995).

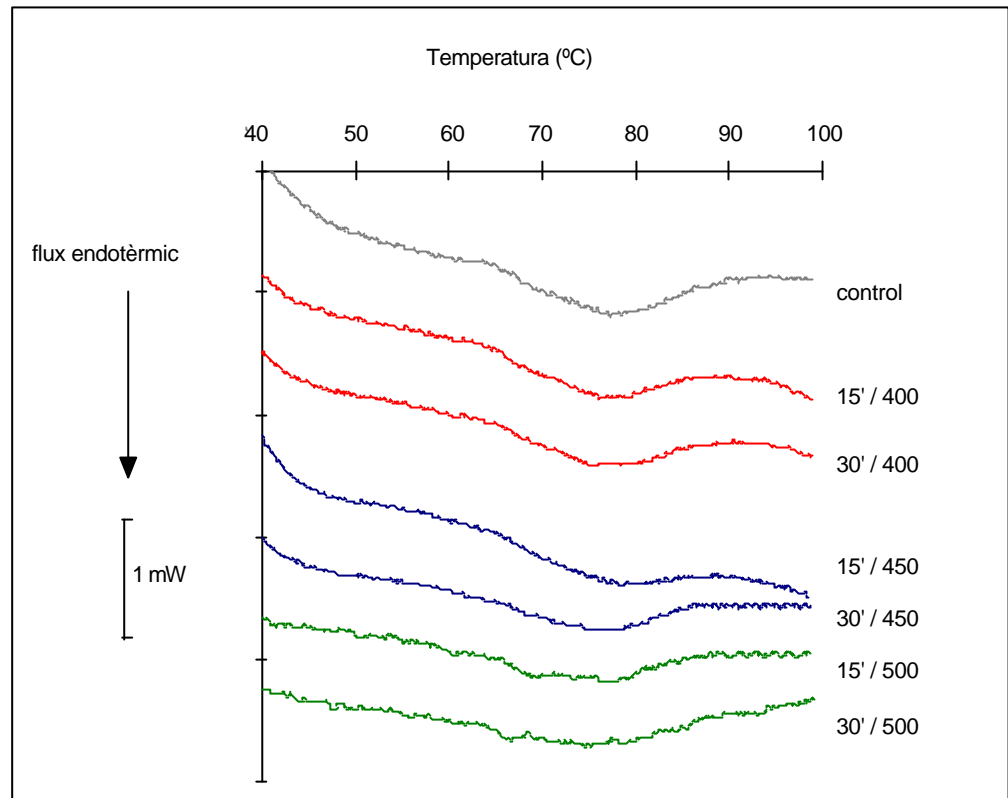


Figura 4.7. Corbes DSC de mostres de 100 μL de plasma no tractat (control) i plasma tractat per alta pressió a 5°C i amb diferents combinacions de temps (minuts) / Pressió (MPa). Velocitat d'escalfament : 3°C/min.

Com ja hem comentat a l'inici d'aquest apartat, quan s'aplicaven pressions de 400 o 450 MPa es produïa gelificació després de poques hores de manteniment en refrigeració de les mostres de plasma pressuritzat. Tanmateix, es va observar que aquest procés de gelificació no es produïa en mostres de plasma pressuritzat i mantingudes a temperatura ambient després del tractament; en aquest cas el plasma es mantenia líquid. Aquest diferent comportament en funció de la temperatura d'emmagatzematge del plasma tractat podria explicar-se de la manera següent: les modificacions provocades per l'alta pressió en l'estructura proteica comporten la seva desestabilització; la pressurització produeix un desplegament parcial de les proteïnes plasmàtiques les quals, a temperatura ambient, tendeixen a recuperar gradualment la seva estructura original durant el període que segueix el tractament de pressurització; finalment, les molècules tornen a formar els enllaços intramoleculars que mantenen la proteïna plegada (estructura nativa) abans de la

desestabilització. En la bibliografia consultada hem trobat varies referències a processos de “renaturalització” total o parcial durant l'emmagatzematge de proteïnes desnaturalitzades per la pressió i que recuperen part de les característiques o dels nivells de solubilitat que presentaven abans del tractament: β -lactoglobulina (Dumay *et al.*, 1994); metamioglobina (Defaye *et al.*, 1995); proteïnes làcties (Johnston *et al.*, 1993). Malgrat que no hem trobat cap autor que es referís a un comportament on la gelificació es produís de manera gradual durant el període d'emmagatzematge en refrigeració posterior a la pressurització podem sospitar que les proteïnes de les mostres mantingudes en refrigeració no disposen de l'energia suficient per tornar a establir els enllaços intramoleculars de l'estructura nativa i aconseguen un estat termodinàmicament més favorable a partir d'interaccions intermoleculars que condueixen a la formació d'un gel poc consistent i que es pot liquar aplicant una força mecànica, com pot ser per exemple una agitació violenta durant poc temps. Cal tenir present que, malgrat que les forces electrostàtiques no es consideren significatives en l'agregació de proteïnes desnaturalitzades en solució sotmeses a un tractament tèrmic, poden ser importants en proteïnes pressuritzades degut a l'efecte ionitzador i de reducció de volum que comporta la pressió.

Per tal d'observar l'efecte de la temperatura de tractament sobre les propietats tèrmiques i les característiques reològiques del plasma es van realitzar proves de pressurització durant 15 minuts a 450 MPa també a temperatures de 25 i 40°C. Els resultats de l'anàlisi calorimètrica d'aquestes mostres es presenten en la taula següent.

Taula 4.2. Propietats tèrmiques de plasma porcí tractat a 450 MPa durant 15 minuts^a

Tractament	DH^b (J/g)	Td ^c (°C)
control	10,1 ± 0,8	75,74 ± 0,6
5°C	7,3 ± 1,5	77,1 ± 0,2
25°C	8,0 ± 0,0	77,5 ± 1,5
40°C	6,3 ± 0,7	79,3 ± 0,2

^a Mitjana d'un mínim de tres determinacions ± interval de confiança (95%)

^b Entalpia de transició

^c Temperatura de desnaturalització

Observem que existeixen modificacions tant en els valors d'entalpia de transició com en els de temperatura de desnaturalització, amb desplaçaments cap a valors més baixos en el cas de l'entalpia i superiors en la temperatura de desnaturalització, a mesura que s'incrementa la temperatura del tractament.

A partir d'aquests resultats deduïm que l'efecte desnaturalitzador del tractament de pressurització és depenent de la temperatura a la qual es troba la mostra durant la pressurització i, en el nostre cas, més accentuat a temperatura elevada (40°C) i a temperatura baixa (5°C) que no pas a temperatura ambient (25°C). De fet, Suzuki (1960) ja va suggerir que la desnaturalització induïda per l'alta pressió depenia de la temperatura. Si es representa gràficament un diagrama de fase amb dos components -estat natiu/estat desnaturalitzat d'una proteïna- en funció de les possibles combinacions temps/temperatura s'obté la regió dins la qual la proteïna conserva la seva estructura nativa (Figura 4.8). S'observa que el traçat de la línia que divideix els dos possibles estats de la proteïna té una forma el·lipsoidal, de manera que, en general, els tractaments a temperatures intermitjtes requereixen pressions més elevades per induir processos de desnaturalització que els que es fan a temperatures inferiors (zona I) o superiors (zones II i III) (Hawley, 1971; Van Camp, 1996; Dumoulin *et al.*, 1998). Això fa sospitar que intervenen diferents mecanismes de desnaturalització en funció de combinacions específiques de pressió i temperatura.

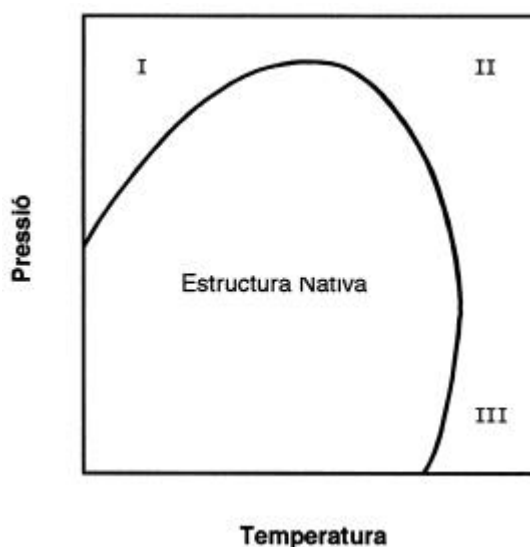


Figura 4.8. Diagrama de fase pressió/temperatura de les proteïnes (Van Camp, 1996).

Sorprenentment, també es va constatar que el procés de gelificació que s'observava en les mostres pressuritzades a 5°C durant l'emmagatzematge en refrigeració no es donava en les mostres de plasma tractades a la mateixa pressió (450 MPa) durant el mateix temps (15 minuts) però a temperatures superiors (25 i 40°C). Encara que es conservessin refrigerades després del tractament per alta pressió aquestes últimes es mantien líquides i amb una fluïdesa similar a la del plasma líquid no pressuritzat. No es tractava d'un alentiment del procés observat en les mostres tractades a 5°C, ja que fins i tot cinc dies després del tractament d'alta pressió el plasma pressuritzat a 25 i 40°C es mantenia líquid. Aquestes observacions confirmen el fet que l'efecte desnaturalitzador de l'alta pressió és degut a diferents mecanismes en funció de la temperatura de tractament.

4.3.3.2 Reducció de la càrrega microbiana contaminant

Es va realitzar el recompte de microorganismes aeròbics mesòfils totals en les mostres de plasma líquid abans del tractament i en les mostres tractades a 400, 450 i 500 MPa durant 15 i 30 minuts a 5°C de temperatura.

En tots els casos els tractaments de pressurització del plasma es varen mostrar en principi força efectius ja que van permetre aconseguir reduccions "aparents" en la contaminació inicial de l'ordre d'entre dues i tres unitats logarítmiques, és a dir aproximadament del 99,50 % en tractaments a 400 MPa i del 99,67 % en tractaments a 450 MPa, assolint recomptes de l'ordre de 10^2 i 10^3 ufc/mL a partir de plasma amb una contaminació inicial de 10^5 - 10^6 ufc/mL. No es va observar cap millora significativa en les reduccions microbiològiques de mostres tractades a 500 MPa respecte de les tractades a 450 MPa. Estudis realitzats sobre l'efecte del temps de tractament indiquen que a pressions suficients per provocar l'inici de l'efecte letal, la supervivència dels microorganismes disminueix de manera més o menys exponencial amb el temps i pot mostrar dos pendents diferents o bé assolir un mínim i estabilitzar-se (Isaacs *et al.*, 1993); potser per això tampoc es va obtenir un efecte important de l'increment de 15 a 30 minuts en el temps de tractament.

Hem descrit l'avaluació de la càrrega microbiana com a "recomptes aparents" perquè es va observar que el nombre de colònies que s'obtenia a partir de les plaques on s'havien sembrat dilucions 1:10 del plasma pressuritzat no concordaven amb el nombre de colònies que creixien en la placa que contenia directament 1 mL de la mostra. En aquestes últimes s'obtenien colònies relativament grans (d'uns 0,5-1mm de diàmetre) en un nombre corresponent a una unitat logarítmica superior al de les que creixien en la placa amb la primera dilució decimal, però en la primera hi apareixien, a més, un nombre in comptable de petites colònies puntiformes que no s'observaven en la placa que contenia la dilució.

Es va descartar la possibilitat que es tractés de microorganismes amb alguna lesió de membrana que els convertís en extremadament sensibles a petits canvis de pressió osmòtica i no suportessin el procés de dilució. Els recomptes de les colònies crescudes en plaques on s'havia sembrat un volum de 0,1 mL de plasma no diluït coincidien amb els recomptes de la placa amb la primera dilució decimal i tampoc s'hi observaven les microcolònies de la placa amb 1 mL de la mostra. Isaacs *et al.*, (1993) havien obtingut diferents recomptes de *Listeria* en mostres pressuritzades utilitzant dos medis de cultiu (TSA i TSA enriquit amb sang), deduint que els medis més rics permetien una millor recuperació de cèl·lules danyades. Per això es va decidir fer proves utilitzant dos medis de cultiu diferents: Agar de recompte en placa (PCA) i el que s'havia utilitzat fins aleshores (BAS); i es varen assajar també aigua de triptona amb sal, també ringer 1/4 i també fosfat amb diferents osmolaritats (des de 0,035M fins 0,2M) com a diluents. Tanmateix, en tots els casos es va repetir el fet que ja s'havia observat inicialment: en la placa que contenia 1 mL de plasma apareixien microcolònies en un nombre que no es corresponia amb el recompte obtingut en les plaques que contenien la primera dilució decimal o només 0,1 mL de plasma.

Es va plantejar una experiència per tal de descartar la possibilitat que ens trobéssim davant un mecanisme de *Quorum Sensing*, pel qual els microorganismes lesionats requerissin la presència en el medi de cultiu de molts altres individus per poder-se dividir i donar colònies macroscòpicament visibles en la placa d'agar. Es coneixen mecanismes de regulació de l'expressió de determinats gens bacterians el control dels quals depèn de la densitat cel·lular. Certs grups de bacteris mostren patrons cooperatius de comportament, coneguts també com a processos d'autoinducció i que impliquen l'existència de senyals de comunicació entre les cèl·lules. Les pròpies cèl·lules sintetitzen la molècula que actua com a inductor de l'expressió d'aquests gens però aquesta no es fa efectiva fins que la concentració cel·lular és elevada i per tant, també la concentració d'autoinductor en el medi on es troben. Exemples d'aquest tipus de mecanismes es donen en el control de l'emissió de bioluminescència de bacteris marins (*Vibrio fischeri*) (Fuqua *et al.*, 1994), en la durada de la fase de latència de poblacions en estat dorment de *Micrococcus luteus* (Kaprelyants i Kell, 1996), en la regulació de l'expressió dels gens de virulència del patògen *Pseudomonas aeruginosa* (Greenberg, 1997) i en moltíssims altres casos (processos de conjugació, inducció d' esporulació, síntesi d'enzims extracel·lulars, síntesi de metabolits secundaris, etc.) apareguts durant els últims anys en publicacions especialitzades (Kell *et al.*, 1995a i 1995b; Fuqua *et al.*, 1996; Kleerebezem *et al.*, 1997).

S'ha observat que l'addició del sobrenedant d'un cultiu de *Micrococcus luteus* en fase de creixement exponencial a un cultiu de cèl·lules en estat de semi-latència, reverteix la seva incapacitat per formar colònies en medis de cultiu artificials (Kaprelyants i Kell,

1996). Els mateixos autors (Kell *et al.*, 1995a) suggereixen, a partir d'uns experiments en el mateix sentit i amb aquest mateix microorganisme, que les cèl·lules viables poden excretar una substància d'acció similar a una feromona necessària per revivificar cèl·lules dorments. S'ha comprovat que en absència de cèl·lules viables, o quan per dilució s'elimina aquesta substància, no s'observa aquest efecte estimulador de la capacitat de creixement.

En el nostre cas quan sembrem 1 mL de mostra tractada en el medi de cultiu artificial, estem avaluant el creixement dels microorganismes supervivents a la pressurització en presència del líquid on es trobaven les cèl·lules en suspensió (el plasma), que introduïm amb el propi inòcul. Quan sembrem un volum deu vegades inferior (0,1 mL) o una dilució 1:10 del plasma tractat avaluem el creixement en el medi artificial en absència (o en una concentració 10 vegades inferior) d'aquest medi original (plasma). Això planteja dos interrogants: (1) és possible que el plasma contingui algun factor (potser nutricional) indispensable per al creixement de bona part de la població de bacteris contaminants que han sobreviscut al tractament per alta pressió o (2) pot ésser que aquest factor inductor del creixement sigui un senyal alliberat al medi per les mateixes cèl·lules i, per tant, que ens trobem davant un mecanisme de *Quorum Sensing*.

Les cèl·lules semi-latents (dorments) de *Micrococcus luteus* es troben en un estat fisiològic reversible de baixa activitat metabòlica, on persisteixen durant períodes extensos sense dividir-se (Kaprelyants i Kell, 1996). En aquest estat són permeables a colorants que normalment no poden penetrar a través de la membrana, de manera que un dels primers esdeveniments que es donen durant la "revivificació" d'aquestes cèl·lules és la reparació de la permeabilitat de membrana. El tractament d'alta pressió, entre altres efectes, provoca també lesions importants a nivell de la membrana dels bacteris que poden alterar la seva funció respiratòria o com a barrera de permeabilitat selectiva. La membrana cel·lular és la primera estructura microbiana lesionada per la pressió (Morita, 1975). Se sap que pressions elevades provoquen un increment del punt de fusió dels triglicèrids i que alguns lípids que són líquids a temperatura ambient cristal·litzen a pressions elevades. Es produeix per tant la cristal·lització dels fosfolípids de la membrana i, en conseqüència, un increment en la seva permeabilitat. Seria possible que existís un mecanisme que els permetés refer-se de les lesions en la membrana i que requerís l'activació de determinats gens regulats per una molècula autoinductora, present en concentració suficient en el plasma però no en una dilució d'aquest o en un volum d'inòcul més petit.

Kaprelyants *et al.* (1993) insisteixen en què els mecanismes que estan implicats en la "revivificació" de cèl·lules dorments no són els mateixos que els que permeten la recuperació de cèl·lules lesionades, de la mateixa manera que els processos que condueixen a les dues situacions són completament diferents -una lenta adaptació del

metabolisme, en el primer cas, i un estrès sobtat, en el segon-. Per tant, existeix també la possibilitat de que aquest factor de creixement que sembla ser que conté el plasma no sigui una molècula sintetitzada pels mateixos microorganismes sinó un dels components del propi plasma sanguini que afavoreixi el procés de reparació de les lesions provocades pel tractament.

Una manera d'evidenciar si un determinat comportament respon a mecanismes de *Quorum Sensing* s'aconsegueix demostrant que els sobrenedants lliures de cèl·lules de cultius en un estadi avançat de la fase de creixement exponencial indueixen l'expressió de determinats gens en cultius diluïts (Fuqua *et al.*, 1996). Així doncs, i per tal d'esbrinar la causa de la presència de quantitats importants de bacteris només en les plaques amb sembra directa d'1 mL de plasma, es va plantejar una experiència que consistia en fer la sembra de diferents dilucions decimals de plasma pressuritzat utilitzant com a diluent plasma estèril (on no hi havia hagut microorganismes) i el sobrenedant obtingut per centrifugació a alta velocitat (30 min a 21.000 x g) del mateix plasma pressuritzat, lliure de microorganismes.

En ambdós casos, en les plaques amb la primera dilució decimal es van obtenir recomptes superiors en dos ordres de magnitud (x100) als recomptes del plasma diluït amb el diluent convencional i que mantenien en les plaques de les dilucions següents la proporció esperada segons el factor de dilució.

Les conclusions derivades d'aquesta experiència van ser que:

1. el tractament de pressurització aplicat a la temperatura de 5°C no produeix l'efecte letal que aparentaven els primers recomptes. L'ordre de magnitud real de les reduccions estaria només al voltant d'una unitat logarítmica, és a dir del 90 % de la població contaminant del plasma.
2. la major part de la població bacteriana del plasma pateix lesions importants que les converteix en cèl·lules no-viables en absència d'algun factor de creixement, probablement una molècula capaç d'afavorir la reparació de les lesions.
3. aquesta molècula és un component del plasma sanguini, no un producte segregat pels mateixos microorganismes.

La població bacteriana mixta que contaminava el plasma no ha mort durant el tractament, però la pressió ha alterat la seva capacitat de creixement. Això ens fa qüestionar la validesa d'utilitzar la capacitat de formar colònies en medis artificials com a únic criteri per determinar si una cèl·lula és viva o no després d'un tractament amb efectes suposadament letals. El fet que el factor que permet a les cèl·lules recuperar la viabilitat sigui un component del propi plasma comporta que el producte obtingut després de la pressurització segueixi essent inestable i susceptible de deteriorament

microbiològic. Tanmateix, es va constatar que el deteriorament d'aquest plasma pressuritzat s'endarreria considerablement respecte del no tractat. No s'apreciaven símptomes olfactivs de deteriorament fins al cap d'uns 20 dies d'emmagatzematge en refrigeració, mentre que el plasma líquid en les mateixes condicions els presentava ja a les 24-48 hores.

Es va fer el seguiment durant 3 dies del creixement dels microorganismes en plasma no tractat i en plasma pressuritzat durant 15 minuts a 450 MPa i 5°C de temperatura. Es van utilitzar les determinacions de l'increment de terbolesa de les mostres (absorbància a 600 nm) incubades a 37°C. Es van obtenir les corbes de creixement que es mostren en la figura 4.9, cadascuna de les quals correspon al promig de 8 repeticions. És important remarcar que la variabilitat en les corbes obtingudes per les 8 repeticions del plasma tractat va ser considerable.

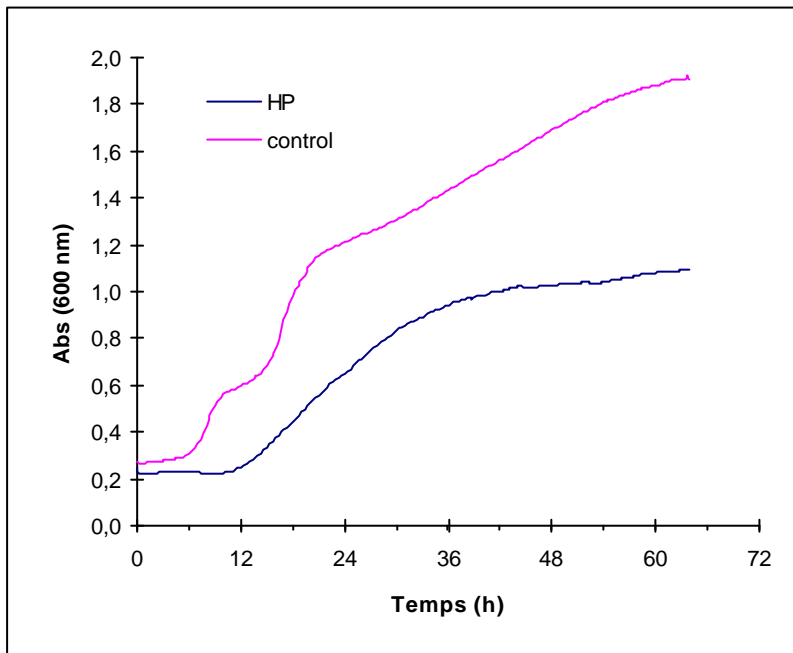


Figura 4.9. Corbes de creixement dels microorganismes del plasma sotmès a un tractament a 450 MPa durant 15 minuts i a 5°C (HP) i el mateix plasma no pressuritzat (control).

En la corba de creixement dels microorganismes del plasma control s'observa un comportament diàuxic, explicable pel fet que la contaminació microbiològica del plasma està composta per una microbiota mixta amb diferents grups de microorganismes que no tenen ni els mateixos requeriments nutritius, ni les condicions òptimes d'incubació, ni les mateixes velocitats de creixement. Probablement les diferents fases exponencials corresponen a poblacions també diferents o bé a l'esgotament d'alguns dels recursos nutritius utilitzats per la població bacteriana. Aquesta forma no s'aprecia ja en la corba obtinguda en plasma pressuritzat potser degut a què el tractament d'alta pressió ha suposat una disminució en la variabilitat de la contaminació, destruint els grups de microorganismes més sensibles i, per tant, la corba correspon a una població més homogènia, només dels grups de microorganismes resistents o numèricament predominants en el plasma inicial.

L'efecte del tractament per alta pressió sobre la corba de creixement dels microorganismes del plasma va ser considerable. D'entrada observem com la durada de la fase de latència es duplica, ja que s'incrementa des de les 6 hores que presentava el plasma no tractat fins a les 12 hores del plasma pressuritzat. La durada d'aquesta fase de la corba de creixement depèn tant de la concentració de cèl·lules viables en el moment d'iniciar la corba com del temps d'adaptació metabòlica i fisiològica a les noves condicions del medi que requereixen els microorganismes. La velocitat específica de creixement en la fase exponencial es redueix des d'una velocitat de $0,1 \text{ h}^{-1}$ pel plasma no tractat, que correspon a un temps de generació de 6,87 hores, a una taxa de creixement de $0,09 \text{ h}^{-1}$ en el plasma tractat, és a dir, un temps de generació de 7,22 hores. Observem també en aquesta figura una disminució important en la biomassa present en el plasma en la fase estacionària; el creixement s'estabilitza a valors d'absorbància més baixos. La corba de creixement del plasma pressuritzat mostra un comportament asimptòtic (fase estacionària) a partir de les 36 hores d'incubació sense arribar a assolir els valors de contaminació que conté el plasma no tractat ja a les 24 hores.

Per tant, encara que la reducció real en els recomptes de microorganismes no fos molt important, veiem que el que sí es modifica és la capacitat de creixement de la microbiota supervivent i la seva evolució durant l'emmagatzematge. Tenint en compte que aquest és el creixement obtingut incubant les mostres a 37°C i que, com és de suposar, el que es donaria en refrigeració seria encara més lent, s'explica perfectament el fet que la vida útil en refrigeració de les mostres pressuritzades s'incrementi de manera important. En estudis realitzats sobre el creixement en refrigeració (3°C) de poblacions microbianes supervivents a diferents tractaments d'alta pressió (20 min a 20°C) en carn picada, es va obtenir que pressions de 200 o 300 MPa endarrerien entre 2 i 6 dies l'inici del seu creixement durant l'emmagatzematge, sense afectar significativament els recomptes generals. Tractaments a 400-450 MPa provocaven de 3 a 5 reduccions

decimals i endarrerien el creixement dels supervivents entre 10 i 15 dies (Carlez *et al.*, 1994).

Efecte de la temperatura de tractament sobre la càrrega microbiana

A més de la magnitud i la durada de la compressió hi ha tota una sèrie d'altres factors que condicionen els efectes d'un tractament de pressurització sobre els microorganismes: el seu estadi de creixement, la composició del medi on es troben i paràmetres com el pH o la temperatura durant la compressió (Hoover *et al.*, 1989).

Es va estudiar quin era l'efecte de la temperatura de tractament sobre els microorganismes contaminants del plasma amb la intenció de trobar una combinació de paràmetres de procés més efectiva que el tractament a 5°C pel que fa a la reducció de la població microbiana.

Igual que en l'estudi calorimètric es van realitzar experiències a temperatures de 25 i 40°C, sempre amb temps de tractament de 15 minuts i pressions de 450 MPa. Es van pressuritzar un mínim de tres mostres per cadascun dels tractaments i es va determinar l'efecte de reducció de càrrega microbiana realitzant recomptes en placa de medi BAS del plasma tractat i del plasma control corresponent.

En aquestes condicions de tractament (temperatures de 25 i 40°C) no es va observar l'aparició de les microcolònies en les plaques corresponents a les sèries directes de 1 mL de plasma i els recomptes per a les diferents dilucions van ser els que calia esperar a partir de dilucions decimals seriades. La població microbiana contaminant es va reduir en un 99,82 ($\pm 0,21$)% en les mostres de plasma tractades a 25°C i en un 99,97 ($\pm 0,02$)% en les mostres tractades a 40°C. De manera que la contaminació va disminuir des de valors inicials de l'ordre de 10^5 - 10^6 ufc/mL fins a recomptes de 10 - 10^3 ufc/mL.

Una possible explicació del fet que la supervivència de microorganismes en mostres tractades a 5°C sigui superior que en tractaments a temperatures de 25 i 40°C es podria basar en la possibilitat que molts dels supervivents siguin microorganismes que durant el tractament es trobaven en forma d'espores i que l'aplicació d'alta pressió a temperatures de 25 i 40°C indueixi una major germinació que el tractament en refrigeració. Està descrit que la pressió hidrostàtica pot causar la germinació d'espores bacterianes de manera fortament influenciada per la temperatura (Gould i Sale, 1970; Mallidis i Drizou, 1991; Lechowich, 1993; Roberts i Hoover, 1996; Hölter *et al.*, 1997). Gould i Sale (1970) varen estudiar la germinació de varies espècies de *Bacillus* i van demostrar que pressions de 250 atmosferes produïen una germinació del 50-64% després de 30 minuts a 50°C, mentre que a temperatures de 30°C la germinació era només del 21% i els supervivents, espores no germinades, eren recuperats com a cèl·lules viables quan es plaquejaven en medis sòlids adequats. Van constatar també que les condicions òptimes per a la

inactivació eren les exposicions que produïen una major germinació de les espores. Roberts i Hoover (1996) reduïen menys de $0,5 \log_{10}$ poblacions de *Bacillus coagulans* sotmeses a tractaments de 400 MPa durant 15 i 30 minuts si la temperatura era de 25°C i fins a $2 \log_{10}$ si realitzaven els tractaments a 45°C. Varis estudis coincideixen en l'efecte positiu per a la inactivació de bacteris esporulats que pot tenir un pre-tractament de la mostra a pressions baixes (<150 MPa) abans de fer el tractament d'alta pressió per inactivar les espores germinades. Hölters *et al.* (1997) suggereixen un tractament de 4 hores a 40°C per aconseguir 6 reduccions decimals en una població d'espores de *Bacillus subtilis*, la major part del temps la pressió es pot mantenir per sota de 60 MPa i només calen uns minuts a pressions superiors.

Altres possibles explicacions de la menor eficàcia del tractament a 5°C respecte dels realitzats a temperatura més elevada podrien radicar en l'alentiment dels efectes letals de la pressió a baixes temperatures (Hoover *et al.*, 1989) o en el fet que alguns microorganismes en refrigeració modifiquin la composició de la membrana cel·lular per mantenir la fluïdesa i siguin més resistents a la pressió (Russell *et al.*, 1995). ZoBell (1970), en relació a la interacció entre els efectes de la pressió i la temperatura, estableix que, de la mateixa manera que un increment en la pressió endarrereix els efectes letals que tindrien temperatures elevades a la pressió atmosfèrica, temperatures baixes alenteixen els efectes letals que podria tenir un increment de pressió. Caldria confirmar, però, si aquest efecte es produeix també a pressions elevades ja que aquestes deduccions es van fer a partir d'observacions realitzades dins el que seria l'interval de pressions que es donen en ambients naturals (≤ 1.000 atm). D'altra banda, es coneix que l'adaptació al creixement a baixes temperatures dels microorganismes comporta una sèrie de modificacions en la composició dels àcids grassos dels seus lípids de membrana (un augment en la concentració d'àcids grassos de cadena més curta i d'àcids grassos insaturats) que provoquen una disminució del seu punt de fusió i, per tant, incrementen la fluïdesa de la membrana. En general els microorganismes són menys sensibles als tractaments d'alta pressió si presenten aquest increment en la fluïdesa de la membrana cel·lular (Russell *et al.*, 1995). Aquest fet pot ajudar també a explicar la major supervivència de microorganismes quan els tractaments de pressurització es fan a temperatura baixa.

Quan fem la determinació del percentatge de reducció provocat pels tractaments de pressurització basant-nos en recomptes de colònies crescudes en plaques d'agar cal tenir present que l'aplicació d'altres pressions pot haver provocat també fenòmens d'agregació cel·lular. El fet que allò que considerem reducció sigui en realitat la diferència percentual entre els recomptes d'unitats formadores de colònies abans i després del tractament, fa que els possibles fenòmens d'agregació puguin ser responsables d'una part, de difícil quantificació, de la disminució observada. Per això, a més dels recomptes

en placa es van realitzar, en dues de les tres repeticions de cada tractament, les corbes de creixement corresponents a l'evolució de la microbiota supervivent a la pressurització (5, 25 i 40°C) (Figura 4.10). Es van fer 10 rèpliques de cadascuna de les mostres tractades així com del plasma control corresponent. Això es va fer en tres dies de tractament diferents: un pels tractaments a 5°C, un altre pels de 25°C i l'últim pels tractaments a 40°C. Cada dia es van tractar independentment dues mostres procedents de dos escorxadors diferents.

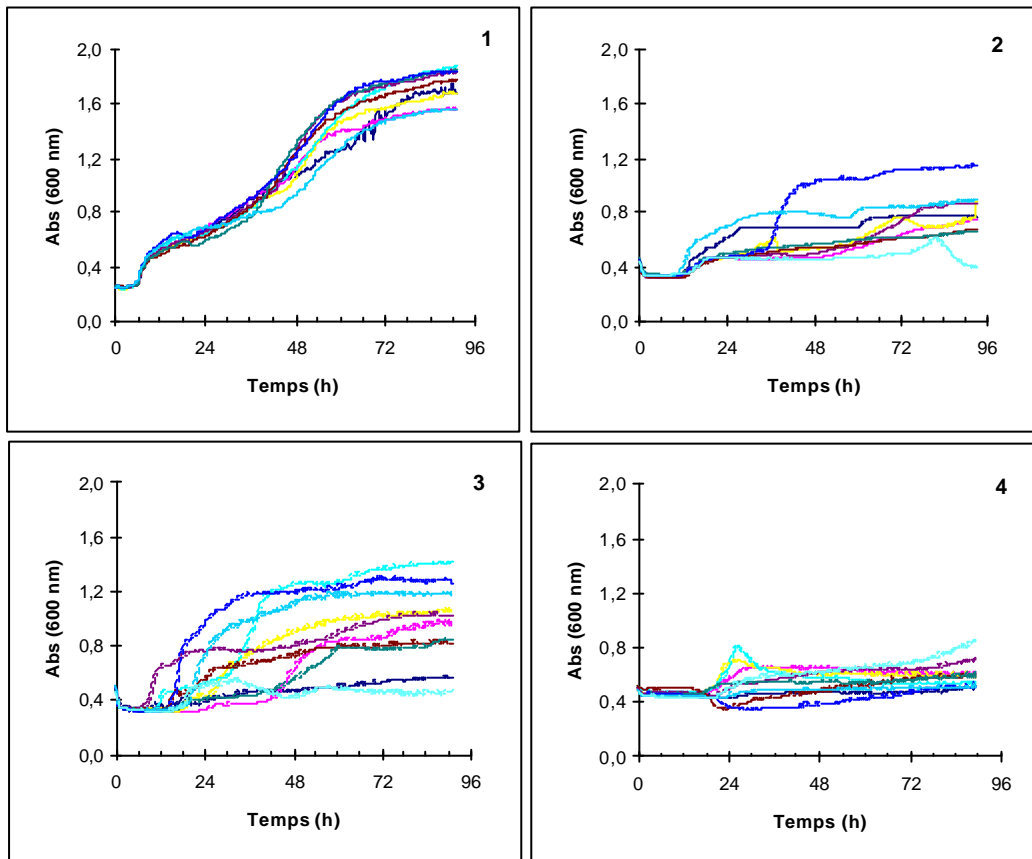


Figura 4.10. Corbes de creixement corresponents a les deu repeticions de plasma sense tractament (1) i tractat a 450 MPa durant 15 minuts a 5 (2), 25 (3) i 40°C (4).

La gran variabilitat obtinguda en les corbes de creixement corresponents a rèpliques de la mateixa mostra de plasma pressuritzat ens van fer desestimar d'entrada la validesa de comparar les corbes de creixement promig obtingudes a partir de les deu repeticions analítiques. Aquesta variabilitat en la forma de les corbes és baixa només per les repeticions del plasma control i també en el cas de les mostres tractades a 40°C, si es representa sobre eixos amb la mateixa escala que les tractades a temperatures de 5 i 25°C. En aquestes últimes, però, existeixen diferències tan importants entre les corbes corresponents a repeticions de la mateixa mostra que dificulten el procés de comparació amb el plasma control per establir l'efecte del tractament.

Es va decidir utilitzar, com a paràmetre comparable i que permetia quantificar d'alguna manera la capacitat de creixement de les poblacions, l'àrea delimitada pels punts de la corba i una línia horitzontal paral·lela a l'eix d'abscisses traçada a partir del punt d'ordenada mínima (per tal d'obviar l'efecte del diferent valor de terbolesa inicial de la mostra). Es van calcular també els increments d'absorbància (Abs màx.-Abs mín.) provocats pel creixement microbià en cada corba per utilitzar-los com a indicadors de l'increment de biomassa que representava cadascuna. Amb aquestes dades es van elaborar les taules 4.3, 4.4 i 4.5, que il·lustren també la gran variabilitat existent entre repeticions.

Taula 4.3. Àrees i increments d'absorbància de les corbes de creixement dels microorganismes de plasma sotmès a 450 MPa durant 15 minuts a 5°C

Rep.	mostra 1				mostra 2			
	control		HP a 5°C		control		HP a 5°C	
	Àrea	D Abs	Àrea	D Abs	Àrea	D Abs	Àrea	D Abs
1	60,89	0,924	17,51	0,490	54,37	0,969	29,00	0,448
2	76,66	1,187	42,95	0,763	70,62	1,287	17,29	0,418
3	79,23	1,145	68,34	1,297	52,64	0,933	20,91	0,543
4	80,33	1,217	48,92	0,865	61,30	1,069	75,05	1,493
5	77,30	1,097	53,76	0,988	56,85	0,921	22,39	0,544
6	76,63	1,073	43,37	0,735	59,50	1,086	18,29	0,351
7	75,09	1,177	38,45	0,812	69,83	1,402	18,39	0,322
8	82,38	1,171	54,09	0,931	56,19	0,848	43,98	0,815
9	70,87	1,066	45,84	0,880	74,58	1,542	36,47	0,553
10	72,96	1,053	48,48	1,081	65,58	1,076	10,52	0,267

Taula 4.4. Àrees i increments d'absorbància de les corbes de creixement dels microorganismes de plasma sotmès a 450 MPa durant 15 minuts a 25°C

Rep.	mostra 1				mostra 2			
	control		HP a 25°C		control		HP a 25°C	
	Àrea	D Abs	Àrea	D Abs	Àrea	D Abs	Àrea	D Abs
1	49,13	0,769	11,71	0,238	48,22	0,732	13,22	0,327
2	72,17	1,501	26,22	0,666	90,87	1,560	40,82	0,727
3	72,21	1,333	39,61	0,753	96,04	1,660	15,92	0,230
4	74,25	1,451	59,19	1,092	98,96	1,619	22,97	0,436
5	80,14	1,643	42,23	0,700	102,29	1,601	65,74	1,221
6	81,75	1,607	30,47	0,509	101,78	1,629	75,81	1,257
7	78,03	1,536	22,54	0,532	105,49	1,689	36,90	0,681
8	81,36	1,614	64,22	0,983	103,60	1,605	44,79	0,830
9	83,83	1,603	53,44	0,874	106,94	1,677	75,41	0,403
10	67,21	1,317	11,91	0,244	98,01	1,537	62,85	1,136

Taula 4.5. Àrees i increments d'absorbància de les corbes de creixement dels microorganismes de plasma sotmès a 450 MPa durant 15 minuts a 40°C

Rep.	mostra 1				mostra 2			
	control		HP a 40°C		control		HP a 40°C	
	Àrea	D Abs	Àrea	D Abs	Àrea	D Abs	Àrea	D Abs
1	48,39	0,735	3,13	0,079	37,10	0,565	26,06	0,560
2	61,51	1,290	12,09	0,213	57,68	0,898	3,33	0,114
3	50,48	0,802	12,01	0,260	81,78	1,392	13,24	0,246
4	56,95	1,035	7,81	0,348	90,34	1,458	4,62	0,158
5	83,78	1,797	11,34	0,263	88,73	1,371	3,91	0,143
6	55,93	0,903	13,67	0,271	92,97	1,399	15,70	0,239
7	63,16	1,428	7,12	0,153	88,88	1,425	6,78	0,137
8	82,56	1,699	7,58	0,191	88,67	1,384	16,69	0,286
9	58,50	1,135	3,36	0,086	87,80	1,341	9,05	0,251
10	55,02	1,015	15,79	0,431	94,32	1,398	14,24	0,307

A partir d'aquestes dades es va calcular la mitjana entre les diferències de cadascuna de les àrees de les corbes de les mostres pressuritzades respecte a l'àrea promig de les corbes del plasma control corresponent i el percentatge de reducció d'àrea provocat pels diferents tractaments. El percentatge de reducció en l'increment d'absorbància que representa el creixement es va obtenir mitjançant el mateix procediment de càlcul.

En la taula 4.6 podem observar que l'efecte del tractament a 5°C sobre les dues mostres és molt variable, i que provoca una reducció de la capacitat de creixement dels microorganismes contaminants en alguns casos similar a la que produeixen tractaments a 25°C i en altres casos molt més baixa. Si es realitzen els mateixos càlculs amb les dades obtingudes a partir de les corbes que ja s'havien realitzat per aquesta temperatura de tractament, la mitjana de les quals s'ha presentat en la Figura 4.9, s'obté la mateixa variabilitat pel que fa a l'efectivitat del tractament. En aquell cas s'obtenia una reducció d'àrea del 56,58 % ($\pm 13,30$) en una de les experiències i un 31,9 % ($\pm 10,90$) en l'altra, mentre que les reduccions en l'increment d'absorbància eren de 54,81 % ($\pm 13,99$) i de 32,71 % ($\pm 8,32$), respectivament.

Taula 4.6. Reducció de la capacitat de creixement de les poblacions microbianes contaminants de plasma pressuritzat a 450 MPa durant 15 min en funció de la temperatura de tractament.

temperatura de tractament (°C)	reducció àrea (%)		reducció D Abs (%)	
	Mostra 1	Mostra 2	Mostra 1	Mostra 2
5	38,63 \pm 17,30	52,97 \pm 30,41	20,34 \pm 19,46	48,16 \pm 32,24
25	51,15 \pm 25,35	52,28 \pm 24,87	54,23 \pm 19,88	52,63 \pm 24,86
40	84,76 \pm 6,92	85,94 \pm 8,91	80,55 \pm 9,34	80,63 \pm 10,30

mitjanes \pm desv. estàndard

Observem també que l'efecte dels tractaments, avaluat com a percentatge de reducció de la capacitat de creixement, és del mateix ordre pels dos paràmetres que s'utilitzen com a indicadors (l'àrea i l'increment d'absorbància).

Pel que fa a l'efectivitat dels tractaments a 25 i 40°C, s'observa que el primer redueix poc més d'un 50% la capacitat de creixement de la població, mentre que els supervivents a un tractament a 40°C tenen una capacitat de creixement inferior en un 80% a la que presentava la contaminació original. De fet, ja ha estat descrit en altres estudis que

l'aplicació de tractaments combinats d'alta pressió i temperatures moderades són efectius tant en aliments com en sistemes model (Knorr, 1993).

Per tal de tenir una representació gràfica que permeti fer-nos una idea aproximada de l'efecte de la temperatura de tractament, representem en la figura 4.11 les corbes mitjanes obtingudes per cada tractament a partir de mostres de plasma procedents del mateix escorxador. Cal tenir present que, malgrat la gran variabilitat existent, s'han utilitzat mitjanes de totes les repeticions analítiques per obtenir la corba de creixement que es representa i que s'ha fet una translació d'eixos per a què el valor d'absorbància inicial fos similar per a totes les corbes.

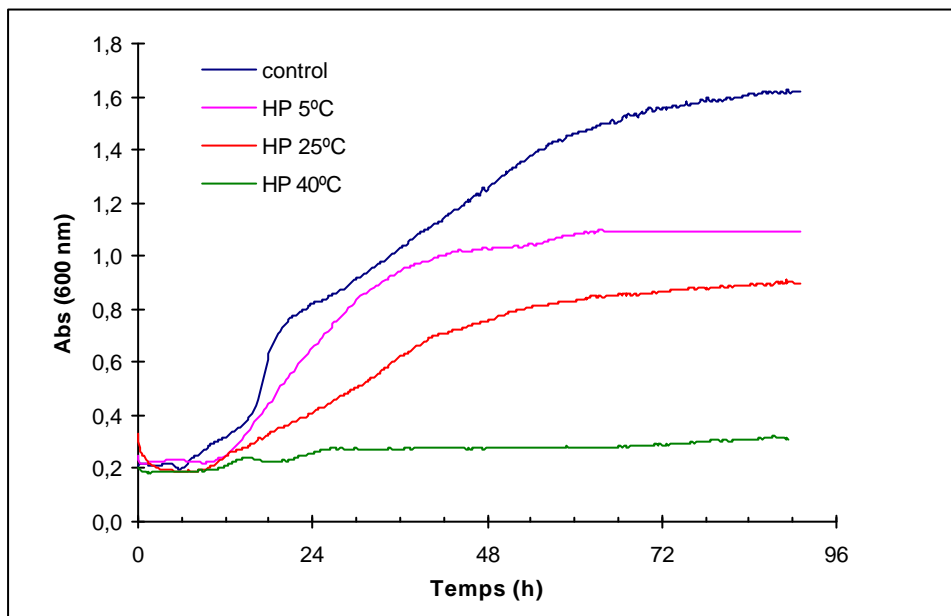


Figura 4.11. Corbes de creixement dels microorganismes del plasma no tractat (control) i del plasma sotmès a tractaments de pressurització (HP) a 450 MPa durant 15 min i temperatures de 5, 25 i 40°C.

A partir d'aquestes corbes s'han calculat els pendents de les rectes de la fase de creixement exponencial, linealitzada mitjançant una transformació en logaritmes neperians dels valors d'absorbància i s'ha determinat la taxa de creixement de la població i el temps de generació (Taula 4.7).

Taula 4.7. Velocitat de creixement i temps de generació de les poblacions microbianes contaminants de plasma supervivents a un tractament de pressurització a 450 MPa durant 15 min en funció de la temperatura de tractament.

Tractament	velocitat de creix. (h ⁻¹)	Temps generació (h)
Control	0,101	6,87
5°C	0,096	7,22
25°C	0,049	14,08
40°C	0,008	88,22

La figura 4.11 i la taula 4.7, amb les constants de creixement, permeten observar clarament que el tractament més efectiu és el que es realitza a una temperatura de 40°C ja que, malgrat que no semblava significativa la millora en la reducció respecte al tractament a 25°C quan es calculava a partir dels recomptes de les mostres pressuritzades, sí que és molt important la reducció en la capacitat de creixement de la població que ha resistit la pressurització. No s'aconsegueix un producte estèril però sí amb una població microbiana amb poca capacitat d'alteració del substrat i que, probablement, acabarà de desaparèixer en el procés de deshidratació posterior.

Està descrit que un tractament d'alta pressió pot inactivar els microorganismes sense matar-los. Watanabe *et al.* (1991) van utilitzar la pressió per inactivar cultius d'*Erwinia ananas* de manera que els cultius tractats es podien addicionar als aliments sense incrementar el risc de deteriorament però, a diferència del què passava amb cultius morts mitjançant un tractament tèrmic, les cèl·lules mantenien la seva capacitat nucleadora de gel. Un altre exemple en aquest sentit seria la utilització de l'alta pressió per aturar l'acidificació en el iogurt quan el grau d'acidesa és l'adequat, però sense que disminueixin els recomptes de microorganismes viables, de manera que les lesions provocades pel tractament siguin suficients per impedir la replicació dels microorganismes en un ambient amb pH àcid i a baixes temperatures (Hoover, 1993).

4.3.3.2.3 Efecte del tractament sobre la funcionalitat del plasma

L'efecte del tractament sobre les propietats funcionals es va determinar sobre mostres tractades a 450 MPa durant 15 minuts i 40°C de temperatura, ja que van ser les condicions de procés que es van mostrar més adequades pel que fa al seu efecte sobre la microbiota contaminant. S'han inclòs també resultats d'algunes determinacions fetes sobre plasma pressuritzat a 5°C, malgrat no ser un tractament molt efectiu pel que fa a la reducció de la contaminació microbiològica. Donat que l'anàlisi calorimètrica indicava que el tractament en fred produïa un menor grau de desnaturalització proteica que la pressurització a 40°C es va voler avaluar quin era el seu efecte sobre la funcionalitat.

Solubilitat

En la figura 4.12 es mostra quin va ser l'efecte dels tractaments per alta pressió sobre el percentatge de solubilitat proteica de les mostres tractades.

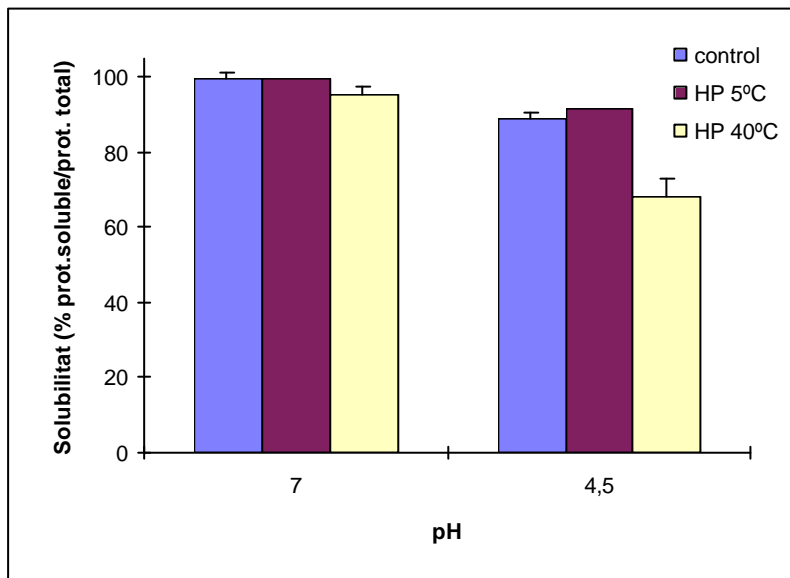


Figura 4.12. Solubilitat a pH 7 i pH 4,5 del plasma en pols obtingut per atomització de plasma no tractat (control) i del plasma pressuritzat a 450 MPa durant 15 minuts a 5 i 40°C. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança (95%) de les mitjanes.

Es pot observar que un tractament de 15 minuts a 450 MPa provocava una disminució de la solubilitat només en les mostres pressuritzades a 40°C i que aquesta insolubilització era més accentuada a pH àcid, el pH més proper al punt isoelèctric de la proteïna majoritària del plasma.

El grau de desnaturalització provocat pel tractament a 5°C, més baix que el del tractament a 40°C segons indicaven les anàlisis calorimètriques, no afectava aquesta propietat funcional del producte, ja que els percentatges de solubilitat de les mostres pressuritzades van ser del mateix ordre que els del plasma control.

Els resultats representats corresponen a plasma en pols, és a dir, plasma que havia estat deshidratat per atomització després del tractament d'alta pressió. Per poder atribuir l'efecte insolubilitzant només al tractament combinat de pressió i elevada temperatura (sense cap efecte addicional de la deshidratació o l'escalfament a 40°C) es va comprovar que el percentatge de proteïna soluble del plasma líquid pressuritzat també era significativament inferior al del plasma líquid control (67,6% de proteïna soluble a pH 4,5) i que un escalfament a 40°C durant 15 minuts del plasma líquid no tenia cap conseqüència sobre la solubilitat de la fracció proteica.

En altres estudis sobre l'efecte de la pressió en la solubilitat de concentrats de proteïnes plasmàtiques (Huyghebaert i Van Camp, 1993) s'arriba a la conclusió que tractaments a 400 MPa durant 30 minuts provoquen una disminució de la solubilitat només quan les concentracions de proteïna en les mostres pressuritzades són elevades. Donada la relativament elevada estabilitat enfront a l'alta pressió del component majoritari d'aquests concentrats (seroalbúmina), per la presència de 17 ponts disulfur en la seva estructura, els autors no exclouen la possibilitat que els efectes trobats puguin ser atribuïts a components proteics minoritaris presents en la solució, per exemple, i d'acord amb Suzuki i Mujosawa (1965), les gamma-globulines.

Els resultats del nostre estudi sobre les conseqüències de l'alta pressió en la solubilitat de les proteïnes plasmàtiques, juntament amb els obtinguts en la determinació de l'estabilitat tèrmica (DSC), indicaven que s'havia produït un desplegament parcial de les proteïnes, de major magnitud en mostres tractades a 40°C, que es podria veure reflectit en alguna de les altres propietats funcionals. Segons alguns autors (Galazka *et al.*, 1995) els canvis conformacionals provocats per la pressió en determinades proteïnes pot suposar una modificació positiva de les propietats funcionals de superfície (capacitats escumant i emulsionant).

Capacitat escumant i estabilitat de l'escuma

En la figura 4.13 es mostren els resultats de les determinacions de la capacitat escumant i l'estabilitat de l'escuma obtinguda a partir del plasma pressuritzat a una temperatura de tractament de 40°C. Es mostren també els resultats de les determinacions sobre les mateixes mostres de plasma sense pressuritzar.

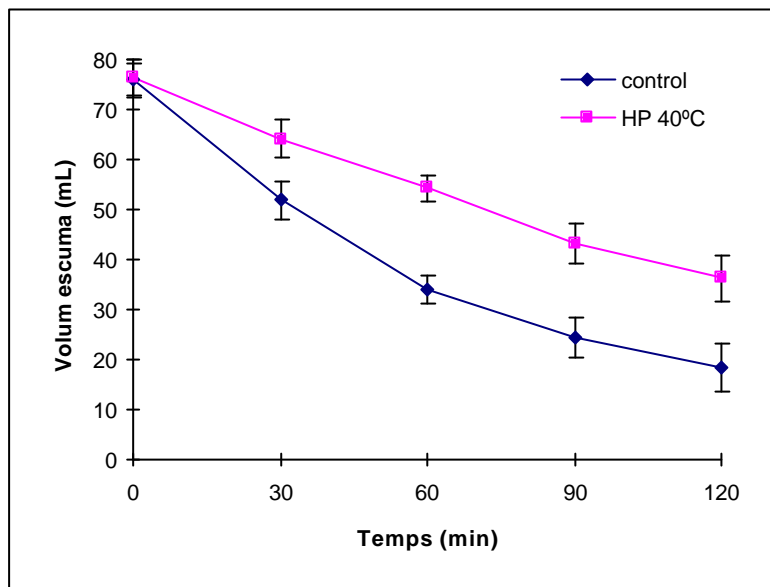


Figura 4.13. Capacitat escumant i estabilitat de l'escuma del plasma líquid no tractat (control) i plasma pressuritzat a 450 MPa durant 15 min a 40°C. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança (95%) de les mitjanes.

Segons mostren aquests resultats, la pressurització (450 MPa durant 15 minuts i a 40°C) no va afectar la capacitat escumant del plasma, ja que el volum d'escuma obtingut en agitar les corresponents dissolucions de les mostres tractades era del mateix ordre que el del plasma control. De tota manera, es pot observar també que la cinètica de desaparició de l'escuma formada va ser més lenta en el cas de les mostres pressuritzades; per tant, es va obtenir un efecte positiu del tractament per alta pressió sobre l'estabilitat de l'escuma produïda.

Per verificar aquest efecte s'han ajustat les dades de cadascun dels productes a una corba exponencial negativa. S'ha fet per regressió no lineal utilitzant la funció $E = E_0 e^{-kt}$, on E representa el volum d'escuma en un temps t , E_0 el volum d'escuma inicial, i $-k$ la taxa de desaparició de l'escuma. S'ha comprovat (annex 8) que la E_0 pel plasma pressuritzat

és la mateixa que pel plasma no tractat i, en canvi, el valor de k es redueix a la meitat, des de 0,0126 fins a 0,0062. Així doncs, es confirma que el tractament per alta pressió no afecta la capacitat escumant del plasma i millora l'estabilitat de l'escuma obtinguda. Tenint en compte que la capacitat escumant del plasma és prou bona, si més no del mateix ordre que la de la clara d'ou (Tybor *et al.*, 1975; Raeker i Johnson, 1995), i que el principal problema, en comparació amb l'activitat de proteïnes d'altres orígens rau en la seva poca estabilitat, la pressurització representa una millora considerable del producte en aquest aspecte.

S'ha exposat en el capítol anterior (apartat 3.3.2.4.2) que la relativament baixa estabilitat de l'escuma formada per solucions de proteïnes plasmàtiques pot ésser deguda a la dificultat de les molècules en solució per establir interaccions proteïna-proteïna que permetin mantenir el sistema de bombolles d'aire encapsulades per les molècules prèviament desplegadas i adsorbides en la interfase aigua-aire. Sembla ser que l'efecte de la pressió, a més de provocar el desplegament parcial de les proteïnes plasmàtiques, afavoreix un cert grau d'agregació que contribueix a millorar aquesta propietat de superfície. Cal tenir present, com s'ha comentat en l'apartat anterior, que les forces electrostàtiques poden contribuir a l'agregació de proteïnes en solució desnaturalitzades en haver estat sotmeses a un tractament de pressurització.

És important constatar que l'efecte de l'alta pressió sobre la propietat escumant de les proteïnes plasmàtiques no coincideix amb el que s'ha observat per altres proteïnes. En la clara d'ou, per exemple, determinades condicions de pressió/temperatura comporten una precipitació selectiva i una pèrdua de funcionalitat en aquest sentit (Knorr *et al.*, 1992).

Activitat emulsionant

En la figura 4.14 es mostren els resultats de l'activitat emulsionant de solucions a pH 7,4 de plasma pressuritzat a 450 MPa durant 15 minuts a 5°C i 40°C.

Sembla que, igual que havíem observat en la capacitat escumant, el tractament per alta pressió a 40°C comporta una millora de l'activitat emulsionant de les dissolucions de proteïnes del plasma. Aquest efecte positiu de la pressió sobre les propietats emulsionants de les proteïnes ha estat comprovat també en l'ovoalbúmina i la proteïna de soja (Denda i Hayashi, 1992) i es pot atribuir a l'augment d'hidrofobicitat superficial (Hayakawa *et al.*, 1994; Galazka *et al.*, 1995) que comporta el desplegament parcial de les proteïnes induït per la pressió. Sembla ser però que, igual que s'havia observat en l'estudi de la solubilitat, un tractament a temperatura baixa (5°C) no provoca un grau de desnaturalització suficient com per modificar aquesta propietat funcional; l'activitat emulsionant de les solucions de plasma pressuritzat a 5°C ha estat pràcticament idèntica a la que s'havia obtingut per solucions de plasma no pressuritzat.

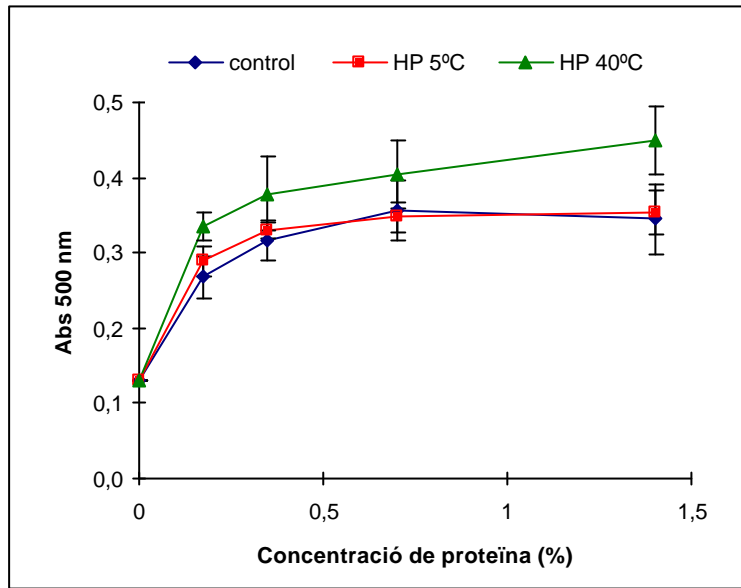


Figura 4.14. Activitat emulsionant del plasma líquid no tractat (control) i del plasma sotmès a pressurització a 450 MPa durant 15 min a temperatures de 5 i 40°C. Mitjanes i intervals de confiança (95%).

En aquesta figura s'observa també que amb una concentració de 1,5% de proteïna en el plasma pressuritzat a 40°C encara no s'ha arribat al màxim d'activitat emulsionant, al contrari del que succeeix amb les mostres no tractades o pressuritzades a 5°C. Seria interessant doncs seguir estudiant aquest efecte de la concentració per comprovar si l'alta pressió a temperatura elevada permet assolir activitats emulsionants més altes en incrementar la concentració de proteïna.

Galazka *et al.* (1995, 1996) varen demostrar que el tractament per alta pressió podia provocar també una pèrdua de funcionalitat referida a l'eficàcia emulsionant en la β -lactoglobulina o, en general, en les proteïnes sèriques de la llet. Aquests autors ho atribuïen a fenòmens d'agregació produïts com a conseqüència d'una major exposició de grups hidrofòbics i a la possible formació de ponts disulfur. En aquests mateixos estudis es va determinar que l'efecte de la pressió sobre emulsions obtingudes amb la proteïna nativa era molt poc important degut a que la conformació desplegada de la proteïna adsorbida a la interfase aigua-oli era menys sensible a l'alta pressió que quan el tractament es realitzava sobre la proteïna en solució abans d'emulsionar.

Capacitat gelificant

L'estudi de la influència del tractament per alta pressió sobre la capacitat gelificant s'ha basat, com en els apartats anteriors, en la determinació de la capacitat de retenció d'aigua, l'estudi de la microestructura i la resistència a la penetració dels gels obtinguts per escalfament a 80°C durant 45 minuts del plasma líquid. S'han fet totes les determinacions sobre mostres de plasma pressuritzades a 450 MPa durant 15 minuts i a temperatures de tractament de 5°C i 40°C. En les figures 4.15 i 4.16 es representen els resultats de la capacitat de retenció d'aigua i el test de penetració, respectivament.

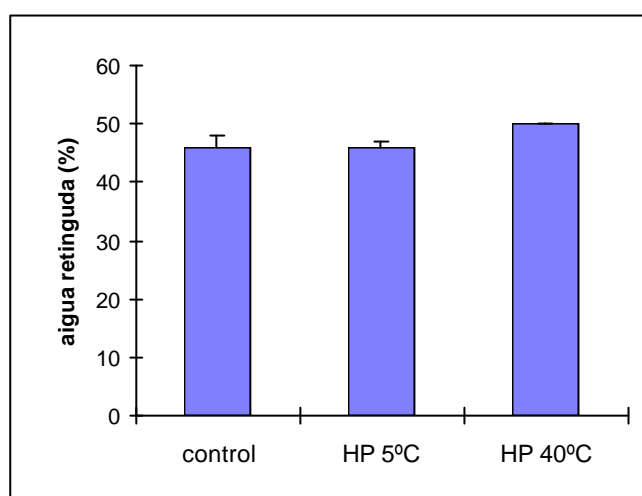


Figura 4.15. Capacitat de retenció d'aigua (CRA) dels gels de plasma no tractat (control) i del plasma pressuritzat a 450 MPa durant 15 min a 5 i 40°C. Mitjanes i intervals de confiança (95%).

Igual que s'havia observat en l'estudi de les propietats funcionals de superfície, l'efecte del tractament sobre aquesta propietat és més evident en les mostres tractades a 40°C. Els gels obtinguts amb plasma pressuritzat a 5°C presenten la mateixa capacitat de retenció d'aigua que els del plasma control, mentre que els gels de plasma pressuritzat a 40°C retenen un percentatge d'aigua més alt que el plasma no tractat. L'increment en la capacitat de retenció d'aigua en gels de plasma pressuritzat reflecteix els canvis conformacionals de la proteïna que ja s'havien demostrat a partir de l'estudi calorimètric, de la solubilitat i de les propietats de superfície.

S'ha descrit que un dels efectes dels tractaments de pressurització de llet previs a una gelificació àcida consisteix també en un increment en les propietats mecàniques i en la capacitat de retenció d'aigua dels gels obtinguts després de l'acidificació, en

comparació amb les característiques dels obtinguts després d'un tractament tèrmic de pasteurització o a partir de llet no tractada (Johnston *et al.*, 1993; Ferragut i Needs, 1998; Martínez, 1998). S'ha publicat també (Suzuki i Macfarlane, 1984) que l'aplicació d'alta pressió millora la gelificació tèrmica de la miosina sota determinades condicions.

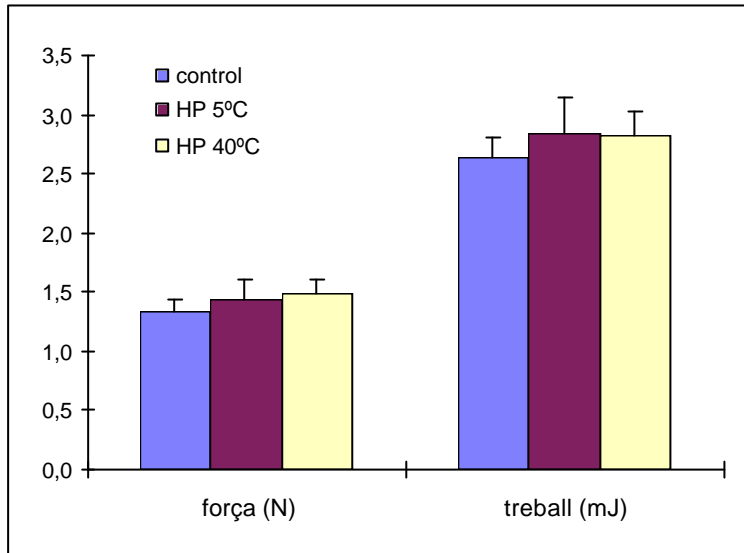


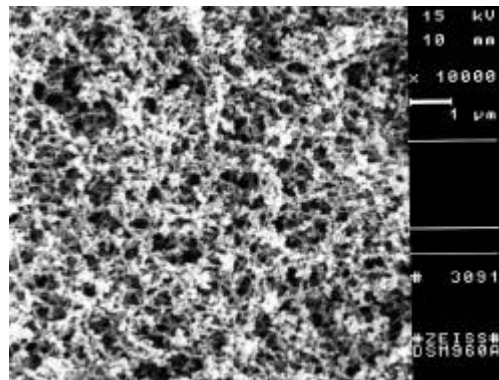
Figura 4.16. Força i treball de penetració en gels de plasma no tractat (control) i de plasma sotmès a tractaments de 450 MPa durant 15 min a 5 i 40°C. Mitjanes i intervals de confiança (95%).

A partir dels resultats obtinguts es pot concloure que el tractament per alta pressió no té conseqüències negatives sobre la capacitat de gelificació ni les característiques dels gels que s'obtenen per escalfament del producte. Fins i tot es pot apreciar en les figures 4.15 i 4.16 que les característiques de capacitat de retenció d'aigua i de duresa dels gels de plasma pressuritzat s'incrementen lleugerament respecte de les que presenta el plasma control. Seria interessant aprofundir en l'estudi de l'efecte de la pressurització sobre aquestes propietats per tal de comprovar el nivell de significació de les diferències observades en aquest treball, i establir la influència de la temperatura de tractament.

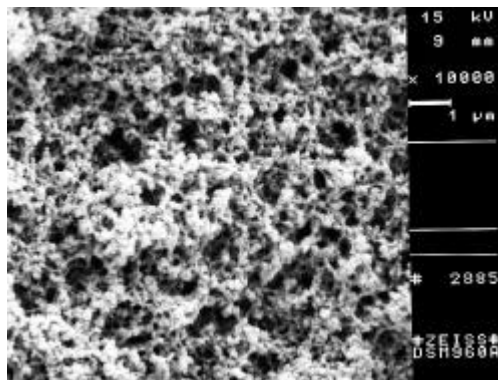
Microestructura

En les micrografies de la figura 4.17 s'observa l'efecte dels tractaments per alta pressió (450 MPa durant 15 minuts a 5 i 40°C) sobre l'estructura dels gels formats per escalfament.

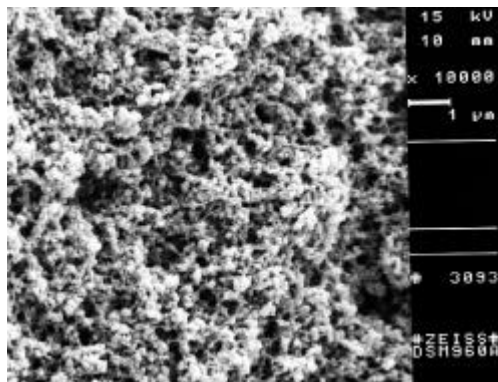
La xarxa proteica dels gels de plasma pressuritzat és més densa, els agregats proteics són més grans i els porus menys regulars que els del gel obtingut a partir de plasma no tractat. Sembla ser que el tractament fa que l'estructura que es forma en escalfar-se sigui més compacta, fet que podria estar relacionat amb l'increment de la capacitat de retenció d'aigua i de resistència a la penetració comentades anteriorment. En aquest cas, però, no s'arriben a apreciar diferències entre les característiques dels gels obtinguts amb plasma tractat a diferents temperatures.



a) Control



b) 450 MPa, 15 min, 5°C



c) 450 MPa, 15 min, 40°C

Figura 4.17. Micrografies (SEM) de gels de plasma líquid sotmès a diferents tractaments de pressurització.

4.4 SÍNTESI

Els tractaments de bactofugació aplicats permeten reduir entre el 96 i el 98% la contaminació microbiana del plasma. Aquesta reducció s'aconsegueix tant amb un sistema discontinu com amb un sistema continu treballant a una velocitat de 12 L/h, fet que permetria adaptar el tractament de bactofugació a un procés de producció industrial. Els recomptes de bacteris aerobis mesòfils totals després del tractament d'un plasma amb contaminacions inicials de 10^4 i 10^6 ufc/mL són de l'ordre de 10^2 - 10^4 ufc/mL. La bactofugació podria ser, per tant, una alternativa a la instal·lació de sistemes tancats de recollida de sang, ja que solucionaria el problema de qualitat microbiològica de la sang recollida amb un sistema higiènic obert i permetria destinar-la a l'elaboració de productes per al consum humà.

Un sistema combinat de bactofugació en continu i microfiltració tangencial permet incrementar l'eficàcia fins a un 99,9 % de reducció, i assolir recomptes inferiors a 5×10^3 ufc/mL a partir de plasma amb càrregues inicials de l'ordre de 10^6 - 10^7 ufc/mL. Cal tenir present, però, que aquest tractament provoca també una disminució de l'extracte sec que afecta negativament les propietats funcionals del plasma líquid. Malgrat suposar una pèrdua pel que fa al rendiment, aquest efecte negatiu sobre la funcionalitat no suposaria cap inconvenient si s'utilitzés la deshidratació com a tecnologia de conservació del plasma, ja que es podria corregir l'extracte sec durant la reconstitució del producte. Caldria avaluar si la millora en la qualitat higiènic-sanitària del producte compensa o no les pèrdues que suposa aquest sistema d'higienització combinat.

Amb relació als tractaments d'alta pressió, de totes les condicions de tractament assajades, les pressions de fins 450 MPa permeten obtenir plasma sense modificacions importants que impedeixin la seva deshidratació per atomització. Els tractaments a 450 MPa provoquen un grau de desnaturalització proteica del mateix ordre que tractaments a 400 MPa i són més efectius que aquests pel que fa a l'efecte higienitzador. No s'ha observat un augment d'eficàcia higienitzadora en allargar el temps de pressurització des de 15 fins a 30 minuts. Així doncs, les condicions de procés que s'han aplicat són pressuritzacions a 450 MPa de 15 minuts de durada. S'han assajat tractaments a diferents temperatures, 5, 25 i 40°C. La temperatura de tractament que s'ha mostrat més eficaç en la reducció dels recomptes de microorganismes ha estat de 40°C. Els tractaments a aquesta temperatura permeten assolir reduccions del 99,97% i disminuir en

un 80% la capacitat de creixement dels microorganismes supervivents a la pressurització en relació a la que presentava la població contaminant del plasma abans del tractament.

L'estudi de l'efecte d'aquest tractament (450 MPa, 15 min i 40°C) sobre les propietats funcionals del plasma ha permès observar que la pressurització comporta una disminució en la solubilitat del producte però una millora en les propietats de superfície -estabilitat de l'escuma i activitat emulsionant- i un increment de la capacitat de retenció d'aigua i de la duresa dels gels obtinguts per escalfament. Calen més estudis per confirmar i caracteritzar aquesta millora en la funcionalitat, així com per establir si el tractament de pressurització afecta també l'estabilitat del producte durant l'emmagatzematge.

De totes les tecnologies d'higienització assajades, l'alta pressió és la que permet obtenir millors resultats en el sentit de poder garantir un producte de bona qualitat microbiològica i segur, des del punt de vista sanitari i tecnològic, per a la seva utilització com a ingredient alimentari.

Pel que fa a les possibilitats reals d'aplicació de l'alta pressió en el tractament de la sang, cal tenir en compte que els assajos realitzats en aquest treball s'han dut a terme amb un equip de tipus discontinu que exigeix el tractament de productes ja envasats. Evidentment, aquesta tecnologia seria impossible de plantejar pel processament del plasma en la pròpia indústria generadora del subproducte. De tota manera, s'han dissenyat i desenvolupat equips d'alta pressió semi-continus, amb cilindres de gran volum, que poden processar productes líquids no envasats (Moreau, 1995). Són sistemes que permeten la seva adaptació a una línia de producció industrial i que ja s'estan utilitzant actualment. En una planta de processament de suc de fruita al Japó (Wakayama) s'han acoblat en línia tres cel·les d'alta pressió de 50 litres i s'aconsegueix una capacitat de producció de 4.000 L/h. Una altra planta també japonesa (Pokka Corporation) tracta 600 L/h de suc de raïm en una sola cambra de 210 litres de capacitat. Malgrat això, degut a la baixa demanda, els costos derivats de la construcció de la maquinària són encara molt elevats (Felipe et al., 1994) i exigeixen una inversió considerable. Un estudi econòmic realitzat per l'empresa francesa ACB, Gec Alstom assenyala que els costos de producció poden ser de l'ordre de 0,58F (12-15 ptes) per litre, per a una capacitat de 2.000 m³/any (500 L/h durant 4.000 hores) (Moreau, 1995).

De moment, per tant, la inversió en l'equip i els costos de processament són massa elevats per pensar en la seva aplicació a un subproducte, ja que només es rendibilitzarien en el cas de poder obtenir productes finals amb un alt valor afegit.

5. CONCLUSIONS

1. La sang objecte d'aquest estudi, recollida amb sistemes oberts, presenta una càrrega microbiana molt elevada, tant de microorganismes indicadors de contaminació general (mesòfils i psicròtrofs) com dels diferents grups específics de microorganismes investigats (fongs i llevats, enterobacteris, bacteris proteolítics i β -hemolítics, clostridis sulfit-reductors i *S.aureus*).
2. S'ha obtingut un efecte significatiu del període de mostreig en els nivells de contaminació de la sang. En general, la càrrega contaminant de la sang recollida durant el període d'hivern és menor que la de la resta de l'any.
3. La major part de la microbiota contaminant s'adquireix en el mateix sagnador. El sistema de dessagnat amb l'animal en posició horitzontal permet reduir la contaminació d'origen fecal i la que prové de la pell de l'animal sacrificat. Evitar el retard en la refrigeració o processar immediatament la sang són mesures útils per minimitzar el desenvolupament de microorganismes contaminants. Tanmateix, cap d'aquestes mesures individualment permet assegurar una qualitat microbiològica acceptable de la sang recollida.
4. Els factors que determinen l'hemòlisi de la sang són principalment el tractament mecànic, el sistema d'addició d'anticoagulant, i el volum i concentració de la solució d'anticoagulant afegida. La velocitat d'increment de l'hemòlisi en sang refrigerada depèn dels nivells de contaminació microbiològica i del tipus d'anticoagulant. Quan la sang no pot ser processada immediatament és millor utilitzar com a anticoagulant citrat sòdic perquè l'increment de l'hemòlisi durant l'emmagatzematge en refrigeració es dona més lentament que quan s'utilitza polifosfat.
5. Els paràmetres de procés establerts per a obtenir plasma deshidratat per atomització a escala de laboratori són: un flux d'aire de 64 m³/h, 2 bar de pressió del compressor, un cabal d'alimentació del producte de 800 mL/h, i les temperatures d'entrada i de sortida de l'aire de 180°C i $\leq 80^\circ\text{C}$, respectivament. En aquestes condicions s'obté un producte amb una activitat d'aigua inferior a 0,4 i no es provoca desnaturalització de la fracció proteica.
6. La qualitat microbiològica del producte en pols reflecteix l'elevada contaminació que conté la matèria primera utilitzada. Tot i que la deshidratació per atomització ha comportat la reducció en una unitat logarítmica de la càrrega contaminant, els recomptes generals d'una solució de pols reconstituïda han estat superiors a valors de 10⁴ ufc/mL i s'ha evidenciat la presència de toxines estafilocòciques en algunes mostres.
7. El procés tecnològic de deshidratació per atomització no afecta la solubilitat de les proteïnes plasmàtiques, no produeix efectes negatius sobre les propietats de

superfície (capacitat escumant i activitat emulsionant) i tampoc perjudica de manera important les característiques dels gels que s'obtenen per escalfament. Els gels formats a partir de solucions de plasma deshidratat presenten la mateixa capacitat de retenció d'aigua que els del plasma líquid però una menor resistència a la penetració.

8. L'activitat emulsionant del plasma no ha mostrat dependència del pH del medi. Les característiques dels gels, en canvi, es veuen seriosament afectades pels canvis estructurals que pateixen les proteïnes en incrementar l'acidesa del medi. S'ha observat una disminució en la capacitat de retenció d'aigua i en la fermesa dels gels del plasma acidificat.
9. Durant l'emmagatzematge a temperatura ambient el plasma deshidratat per atomització perd algunes de les seves propietats funcionals; a partir dels tres mesos es redueix la facilitat de rehidratació i disminueixen tant la capacitat de retenció d'aigua com la fermesa dels gels. Aquestes propietats es mantenen un mínim de sis mesos quan el producte en pols es conserva refrigerat. En sis mesos de conservació del plasma a temperatura ambient es produeix una disminució de 4 unitats logarítmiques en la càrrega de bacteris aeròbics, molt superior a la que s'obté en el producte en refrigeració.
10. Els tractaments de bacteriòfugació aplicats (aprox. 21.000 x g) permeten reduir entre el 96 i el 98% la contaminació microbiana del plasma. Els recomptes de bacteris aeròbics mesòfils totals després del tractament del plasma amb contaminacions inicials de 10^4 i 10^6 ufc/mL són de l'ordre de 10^2 - 10^4 ufc/mL. La bacteriòfugació podria ser una solució al problema de qualitat microbiològica de la sang recollida amb un sistema higiènic obert.
11. Un sistema combinat de bacteriòfugació en continu i microfiltració tangencial permet incrementar l'eficàcia d'higienització fins a un 99,9 % de reducció en la càrrega microbiana, i assolir recomptes inferiors a 5×10^3 ufc/mL a partir de plasma amb recomptes inicials de l'ordre de 10^6 - 10^7 ufc/mL. Aquest tractament provoca, però, una pèrdua de 0,5% de l'extracte sec.
12. L'eficàcia higienitzadora de l'aplicació d'alta pressió hidrostàtica al plasma és independent de la durada de la pressurització però es veu condicionada per la temperatura de tractament. Els tractaments de 15 minuts a 450 MPa provoquen reduccions del 90% a 5°C, del 99,82 % a 25°C i del 99,97 % a 40°C.
13. De totes les condicions d'alta pressió aplicades, els tractaments de 15 minuts a 450 MPa a 40°C són els que han permès assolir una major reducció de la càrrega microbiana contaminant, des de recomptes de l'ordre de 10^5 - 10^6 ufc/mL fins a 10 - 10^2 ufc/mL. La capacitat de creixement de la població de microorganismes supervivents a

aquest tractament de pressurització disminueix en un 80% en relació a la que presentava la població contaminant inicial del plasma.

14. La pressurització a 450 MPa i a 40°C comporta una disminució en la solubilitat de les proteïnes del plasma, més important a pH àcid (20% a pH 4,5) que a pH neutre (4% a pH 7) però millora les propietats de superfície (estabilitat de l'escuma i activitat emulsionant) i produeix un increment de la capacitat de retenció d'aigua i de la duresa dels gels obtinguts. Els tractaments a 5°C no afecten la solubilitat ni les propietats funcionals de superfície del plasma.

BIBLIOGRAFIA

- AKERS, J.M. 1973. Utilisation of blood. *Food Manufacture*, 9, 31-32.
- ARNTFIELD, S.D.; ISMOND, M.A.H.; MURRAY, E.D. 1990. Thermal analysis of food proteins in relation to processing effects. A: Harwalkar, V.R.; Ma, C.-Y. (Eds.). Elsevier Applied Food Science Series. Elsevier Science Publishers Ltd. Essex. 51-91.
- BALNY, C.; HAYASHI, R.; HEREMANS, K.; MASSON, P. 1992. High pressure and biotechnology. Colloque INSERM. Vol. 224. John Libbey Eurotext Ltd. Montrouge. 321 pp.
- BARBUT, S.; FINDLAY, C.J. 1990. Thermal analysis of egg proteins. A: Harwalkar, V.R.; Ma, C.-Y. (Eds.). Elsevier Applied Food Science Series. Elsevier Science Publishers Ltd. Essex. 126-148.
- BÉGHIN, V.; BIZOT, D.; AUDEBRAND, M.; LEFEBVRE, J.; LIBOUGA, D.G.; DOUILLARD, R. 1993. Differential scanning calorimetric studies of the effects of ions and pH on ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *Int. J. Biol. Macromol.*, 15, 195-200.
- BENNASAR, M.; ROULEAU, D.; MAYER, R.; TARODO DE LA FUENTE, B. 1982. Ultrafiltration of milk on mineral membranes: improved performance. *J. Soc. Dairy Technol.*, 35, 43-49.
- BERGDOLL, M.S. 1991. *Staphylococcus aureus*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, 706-710.
- BERGERE. 1987. Eliminación de las bacterias de la leche por centrifugación. A: Eck, A. (coord.) 1990. *El queso*. Ed. Omega. Barcelona. 162-164.
- BOLDER, N. M. 1997. Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 221-227.
- BOOREN, A.M.; WEISS, G.M. 1988. Lean skeletal meat trimmings incidental to slaughter. A: Pearson, A.M.; Dutson, T.R. (Eds.). *Edible meat by-products. Advances in Meat Research, Volume 5*. Elsevier Science Publishers Ltd. London-New York. 219-230.
- BRAENDLIN, N.; STEKETEE, M. 1990. Comparative evaluation of three kits for the detection of staphylococcal enterotoxins in food. Departament de Qualitat de Transia.
- BRITTEN, M.; GIROUX, H.J. 1991. Coalescence index of protein-stabilized emulsions. *J. Food Sci.*, 56, 792-795.
- BROOKS, J.; RATCLIFF, P.W. 1959. Dried bovine plasma. I. The storage of freeze-dried plasma. *J. Sci. Food Agric.*, 9, 486-494.
- CALDIRONI, H.A.; OCKERMAN, H.W. 1982. Incorporation of blood proteins into sausage. *J. Food Sci.*, 47, 405-408.
- CARLEZ, A.; ROSEC, J.P.; RICHARD, N.; CHEFTEL, J.C. 1994. Bacterial growth during chilled storage of pressure-treated minced meat. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 27, 48-54.
- CARTER, J.V.; KNOX, D.G.; ROSENBERG, A. 1978. Pressure effects on folded proteins in solution. Hydrogen exchange at elevated pressures. *J. Biol. Chem.*, 253, 1947-1953.

- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. 1989. Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 346 pp.
- CHEFTEL, J.C. 1992. Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. A: Balny, C.; Hayashi, R.; Heremans, K.; Masson, P. (Eds.). High pressure and biotechnology. Colloque INSERM. Vol. 224. John Libbey Eurotext Ltd. Montrouge. 195-209.
- CHEN, S.X.; SWAISGOOD, H.E.; FOEGEDING, E.A. 1994. Gelation of β -lactoglobulin treated with limited proteolysis by immobilized trypsin. J. Agric. Food Chem., 42, 234-239.
- CHINPRAHAST, N.; JANTAWAT, P.; KRISTAVEE, D. 1995. Functional properties of vacuum-dried, freeze-dried and spray-dried porcine blood plasma. ASEAN Food J., 10, 10-14.
- CIRONEAU, I. 1974. Fleischerei, 25, 46.
- COHEN MAUREL, E. 1995. Valorisation des protéines du sang. Vapran Bactocatche le sang. Process, 1111, desembre.
- COLLADO, J. 1995. Situación medioambiental de la industria cárnica de Cataluña. Cárnica 2000, juliol/agost, 43-47.
- CREVEN, S.E. 1988. Activation of *Clostridium perfringens* spores under conditions that disrupt hydrophobic interactions of biological macromolecules. Appl. Environ. Microbiol., agost, 2042-2048.
- CURT, C. 1994. Revue: méthodes d'évaluation de la stabilité des émulsions. Principe, applications, avantages et inconvénients. Sciences des Aliments, 14, 699-724.
- DE SOLAN, M.N.; FOUSSE, I.; DROUET, X. 1990. Global immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins. Colloque de la Société Française de Microbiologie.
- 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.
- DE WIT, J.N.; KLARENBECK, G. 1984. Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. J. Dairy Sci., 67, 2701-2710.
- DE WIT, J.N. 1990. Thermal stability and functionality of whey proteins. J. Dairy Sci., 73, 3602-3612.
- DEFAYE, A.B.; LEDWARD, D.A.; MacDOUGALL, D.B.; TESTER, R.F. 1995. Renaturation of metmyoglobin subjected to high isostatic pressure. Food Chem., 52, 19-22.
- DELAITRE, J.M. 1983. Contribution à l'étude de la valorisation du sang bovin: propriétés fonctionnelles des protéines plasmatiques et du cruor. Thèse de 3ème cycle. ENSBANA, Dijon.
- DELANEY, R.A.M. 1977. Protein concentrates from slaughter animal blood. I. Preparation and purification of red blood cell concentrates. J. Food Technol., 12, 339-354.

- DENDA, A.; HAYASHI, R. 1992. Emulsifying properties of pressure-treated proteins. A: Balny, C.; Hayashi, R.; Heremans, K.; Masson, P. (Eds.). High pressure and biotechnology. Colloque INSERM. Vol. 224. John Libbey Eurotext Ltd. Montrouge. 333-335.
- DICKINSON, E. 1992. An introduction to food colloids. Oxford University Press. Oxford. 210 pp.
- DICKINSON, E.; McCLEMENTS, D.J. 1995. Advances in food colloids. Blackie Academic & Professional. Glasgow. 333 pp.
- DIVAKARAN, S. 1980. Animal blood. National Information Center for Leather and Allied Industries, Series-2. Madras, India.
- DUMAY, E.M.; KALICHEVSKY, M.T.; CHEFTEL, J.C. 1994. High-pressure unfolding and aggregation of β -lactoglobulin and baroprotective effects of sucrose. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1861-1868.
- DUMOULIN, M.; OZAWA, S.; HAYASHI, R. 1998. Textural properties of pressure-induced gels of food proteins obtained under different temperatures including subzero. *J. Food Sci.*, 63, 92-95.
- DUNNY, G.M.; LEONARD, B.A.B. 1997. Cell-cell communication in Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 51, 527-564.
- ELEY, E. 1992. Under pressure. *Food Proc.*, abril, 23-24.
- ERIKSON, G.; VON BOCKELMANN, I. 1975. Ultrafiltration of animal blood serum: technology and microbiology. *Proc. Biochem.*, setembro, 11-15.
- ETHERIDGE, P.A.; HICKSON, D.W.; YOUNG, C.R.; LANDMANN, W.A.; DILL, C.W. 1981. Functional and chemical characteristics of bovine plasma proteins isolated as a metaphosphate complex. *J. Food Sci.*, 46, 1782-1784.
- EVENSON, M.L.; WARD HINDS, M.; BERNSTEIN, R.S.; BERGDOLL, M.S. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 7, 311-316.
- FAO. 1998. <http://pps.fao.org:8080/servlet/xteServlet>.
- FELIPE-CUYÁS, X.; TRUJILLO-MESA, A.J.; SENDRA-NADAL, E.; GUAMIS-LÓPEZ, B. 1994. Utilización de los tratamientos por alta presión para la conservación de alimentos. *Alimentaria*, octubre, 35-39.
- FERNANDO, T.; TOWNSEND, R.N. 1976. Blood concentration by ultrafiltration. Report Meat Industry Research Institute. New Zealand. Publ. nº 536.
- FERRAGUT, V.; NEEDS, E.C. 1998. The rheology of set yogurt gels formed from high pressure treated milk Book of Abstracts of the 35th. Meeting on high pressure food science, bioscience and chemistry of the EHPRG, Reading.
- FERRAGUT, V.; GILL, A.L.; STENNING, R.A.; NEEDS, E.C. 1998. The reology of rennet gels formed from high pressure treated milk. *Congrés: Food emulsions and foams interfaces, interactions and stability*. Sevilla, 16-18 març.

- FERREIRA, M.; BEHRINGER, R.; JOST, R. 1995. Instrumental method for characterizing protein foams. *J. Food Sci.*, 60, 90-93.
- FILSTRUP, P. 1980. Processes and equipment for protein by-products in the meat industry. A: Grant, R.A. (Ed.). *Applied protein chemistry*. Applied Science Publishers. London. 181-222.
- FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. 1988. *Food Microbiology* (4a. ed.). McGraw-Hill Co. New York. 539 pp.
- FUNTENBERGER, S.; DUMAY, E.; CHEFTEL, J.C. 1995. Pressure-induced aggregation of β -lactoglobulin in pH 7.0 buffers. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28,410-418.
- FUQUA, W.C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell. Density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, 176, 269-275.
- FUQUA, C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 727-751.
- GALAZKA, V.B.; LEDWARD, D.A.; DICKINSON, E.; LANGLEY, K.R. 1995. High pressure effects on emulsifying behavior of whey protein concentrate. *J. Food Sci.*, 60, 1341-1343.
- GALAZKA, V.B.; DICKINSON, E.; LEDWARD, D.A. 1996. Effect of high pressure on the emulsifying behavior of β -lactoglobulin. *Food Hydrocoll.*, 10, 213-219.
- GERRARD, F.; MALLION, F.J. 1977. *The complete book of meat*. Virtue Press. London.
- GLICKSMAN, M. (Ed.). 1982. *Food Hydrocoll.*. Vol. 1. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- GOLDBERG, M.; CHEVRIER, D. 1979. Traitement du plasma de bovins par ultrafiltration. Estimation des surfaces nécessaires. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 1979, 951-956.
- GORVATOV, V.M. 1988. Collection and utilization of blood and blood proteins for edible purposes in the USSR. A: Pearson, A.M.; Dutson, T.R. (Eds.). *Edible meat by-products*. Advances in meat research. Vol 5. Elsevier Science Publisher Ltd. London-New York. 167-195.
- GOULD, G.W.; SALE, A.J.H. 1970. Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure. *J. Gen. Microbiol.*, 60, 335-346.
- GOULD, G.W. (Ed.). 1995. *New methods of food preservation*. Blackie Academic & Professional. Glasgow. 321 pp.
- GRANT, R.A. (Ed.). 1980. *Applied protein chemistry*. Applied Science Publishers Ltd. London. 332 pp.
- GREENBERG, E.P. 1997. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *ASM News*, 63, 371-377.
- GROSS, M.; JAENICKE, R. 1994. Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *European. J. Biochem.*, 221, 617-630.

- GUO, M.R.; FOX, P.F.; FLYNN, A.; KINDSTEDT, P.S. 1996. Heat-induced modifications of the functional properties of sodium caseinate. *Int. Dairy J.*, 6, 473-483.
- GUSTONE, J. W. 1980. Using blood plasma. *Nat. Prov.*, 182, 20.
- HAAS, G.J.; PRESCOTT, H.E.; DUDLEY, E.; DIK, R.; HINTLIAN, C.; KEANE, L. 1989. Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. *J. Food Safety*, 9, 253-265.
- HALLIDAY, D.A. 1973. Blood - A source of proteins. *Proc. Biochem.*, 8, 15.
- HAQUE, Z.; KINSELLA, J.E. 1988. Emulsifying properties of food proteins: bovine serum albumin. *J. Food Sci.*, 53, 416-420.
- HAQUE, Z.; KINSELLA, J.E. 1989a. Emulsifying properties of food proteins: development of a standardized emulsification method. *J. Food Sci.*, 54, 39-44.
- HAQUE, Z.; KINSELLA, J.E. 1989b. Relative emulsifying activity of bovine serum albumin and casein as assessed by three different methods. *J. Food Sci.*, 54, 1341-1344.
- HARDMAN, T.M. (Ed.). 1989. *Water and food quality*. Elsevier Applied Science. London-New York. 370 pp.
- HARPER, J.P.; SUTER, D.A.; DILL, C.W.; JONES, E.R. 1978. Effects of heat treatment and protein concentration on the rheology of bovine plasma protein suspensions. *J. Food Sci.*, 43, 1201-1209.
- HARWALKAR, V.R.; MA, C.-Y. (Eds.). 1990. *Thermal analysis of foods*. Elsevier Applied Food Science Series. Elsevier Science Publishers Ltd. Essex. 362 pp.
- HAWLEY, S.A. 1971. Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochem.*, 10, 2436-2442.
- HAYAKAWA, I.; KAJIHARA, J.; MORIKAWA, K.; ODA, M.; FUJIO, Y. 1992. Denaturation of bovine serum albumin (BSA) and ovoalbumin by high pressure, heat and chemicals. *J. Food Sci.*, 57, 288-292.
- HAYAKAWA, I.; KANNO, T.; TOMITA, M.; FUJIO, Y. 1994. Application of high pressure for spore inactivation and protein denaturation. *J. Food Sci.*, 59, 159-163.
- HAYASHI, R. 1989. Application of high pressure to food processing and preservation: philosophy and development. A: Spiess, W.E.L.; Schubert, H. (Eds.). *Engineering and food*. Vol 2. Elsevier Applied Science. London. 815-826.
- HAYASHI, R. 1992. Utilization of pressure in addition to temperature in food science and technology. A: Balny, C.; Hayashi, R.; Heremans, K.; Masson, P. (Eds.). *High pressure and biotechnology*. Colloque INSERM. Vol. 224. John Libbey Eurotext Ltd. Montrouge. 185-193.
- HEINZE, P.H.; MITCHELL, G. 1989. Stress resistant and stress susceptible landrace pigs: comparison of blood variables after exposure to halothane or exercise on a treadmill. *The Veterinary Record*, 18, 163-168.
- HEREMANS, K. 1982. High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 11, 1-21.

- HEREMANS, K. 1997. (Ed.). High pressure research in the biosciences and biotechnology. Universitaire Pers Leuven. Leuven. 531 pp.
- HERMANSSON, A.M. 1978. Physicochemical aspects of soy proteins structure formation. *J. Text. Studies*, 9,33.
- HERMANSSON, A.M. 1982. Gel characteristics-structure as related to texture and waterbinding of blood plasma gels. *J. Food Sci.*, 47, 1965-1972.
- HERMANSSON, A.M. 1994. Microstructure of protein gels related to functionality. A: Yada, R.Y.; Smith, J.L.; Jackman, R.L. (Eds.). Protein structure function in foods. Blackie Academic & Professional. London. 22-42.
- HILLS, G. 1972. The physics and chemistry of high pressure. A: Sleigh, M.A.; MacDonald, A.G. (Eds.). Effects of pressure on living organisms. Academic Press. New York. 1-26.
- HÖLTERS, C.; SOJKA, B.; LUDWIG, H. 1997. Pressure-induced germination of bacterial spores from *Bacillus subtilis* and *Bacillus stearothermophilus*. A: Heremans, K. (Ed.). High pressure research in the biosciences and biotechnology. Universitaire Pers Leuven. Leuven. 257-260.
- HOOVER, D.G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A.M.; FARKAS, D.F.; KNORR, D. 1989. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technol.*, 43, 99-107.
- HOOVER, D.G. 1993. Pressure effects on biological systems. *Food Technol.*, juny, 150-155.
- HOWELL, N.K.; LAWRIE, R.A. 1984. Functional aspects of blood plasma proteins. II. Gelling properties. *J. Food Technol.*, 19, 289-295.
- HUNT, J.A.; DALGLEISH, D.G. 1995. Heat stability of oil-in-water emulsions containing milk proteins: effect of ionic strength and pH. *J. Food Sci.*, 60, 1120-1131.
- HUYGHEBAERT, A.; VAN CAMP, J. 1993. High pressure induced gel formation of food proteins.
- ISAACS, N.S.; MACKIE, B.; BROOKER, B. 1993. Kinetics and mechanisms of high pressure inactivation of microorganisms. Interim Report. Universitat de Reading.
- JAUBERT, G.; COSTES, P.; GUYONNET, P.; GAY, M.Y.; PIERRE, A.; MAUBOIS, J.L. 1991. Une épuration bactérienne à presque 100%. *Proces*, novembre, 62-67.
- JAVIER-BORDERIAS, A. 1995. Aplicación de las altas presiones en la tecnología de alimentos. *Alimentación, equipos y tecnología*, març, 109-111.
- JENSEN, L.B.; JESS, W.R. 1941. *Food Res.*, 6, 273.
- JENSEN, L.B. 1954. *Microbiology of meats*. 3rd. ed. Garrard Press. Champaign, Illinois.
- JOHNSTON, D.E.; AUSTIN, B.A.; MURPHY, R.J. 1993. Properties of acid-set gels prepared from high pressure treated skim milk. *Milchwissenschaft*, 48, 206-209.
- KALICHEVSKY, M.T.; KNORR, D.; LILLFORD, P.J. 1995. Potencial food applications of high-pressure effects on ice-water transitions. *Trends Food Sci. Technol.*, agost, 253-259.

- KANTEREWICZ DE, R.J.; ELIZALDE, B.E.; PILOSOF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. 1987. Water-oil absorption index (WOAI): a simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. *J. Food Sci.*, 52, 1381-1383.
- KAPRELYANTS, A.S.; KELL, D.B. 1993. Dormancy in stationary-phase cultures of *Micrococcus luteus*: flow cytometric analysis of starvation and resuscitation. *Appl. Env. Microbiol.*, 59, 3187-3196.
- KAPRELYANTS, A.S.; GOTTSCHAL, J.C.; KELL, D.B. 1993. Dormancy in nonsporulating bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 104, 271-286.
- KAPRELYANTS, A.S.; KELL, D.B. 1996. Do bacteria need to communicate with each other for growth?. *Trends Microbiol.*, 4, 237-242.
- KATO, A.; IBRAHIM, H.; WATANABE, H.; HONMA, K.; KOBAYASHI, K. 1990a. Enthalpy of denaturation and surface functional properties of heated egg white proteins in the dry state. *J. Food Sci.*, 55, 1280-1282.
- KATO, A.; IBRAHIM, H.; WATANABE, H.; HONMA, K.; KOBAYASHI, K. 1990b. Structural and gelling properties of dry-heating egg white proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 32-37.
- KELL, D.B.; KAPRELYANTS, A.S.; GRAFEN, A. 1995a. On pheromones, social behaviour and the functions of secondary metabolism in bacteria. *Trends Ecol. Evol.*, 10, 126-129.
- KELL, D.B.; DAVEY, H.M.; MUKAMOLOVA, G.V.; VOTYAKOVA, T.V.; KAPRELYANTS, A.S. 1995b. A summary of recent work on dormancy in non-sporulating bacteria: significance for marine microbiology and biotechnology. *J. Marine Biotechnol.*, 3, 24-25.
- KINSELLA, J.E.; SOUCIE, W.G. (Eds.). 1989. Food proteins. Am. Oil Chem. Soc. Champaign, Illinois.
- KLEEREBEZEM, M.; QUADRI, L.N.; KUIPERS, O.P.; DE VOS, W.M. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, 24, 895-904.
- KNEIFEL, W.; PAQUIN, P.; ABERT, T.; RICHARD, J.P. 1991. Water-holding capacity of proteins with special regard to milk proteins and methodological aspects - A review. *J. Dairy Sci.*, 74, 2027-2041.
- KNEIFEL, W.; ABERT, T.; SENDA, M.; SEILER, A. 1992. Water-holding properties of milk protein products as characterized by three different methods. *Milchwissenschaft*, 47, 139-142.
- KNORR, D.; BOTTCHER, A.; DORNENBURG, H.; ESHTIAGHI, M.; OXEN, P.; RICHWIN, A.; SEYDERHELM, I. 1992. High pressure effects on microorganisms, enzyme activity and food functionality. A: Balny, C.; Hayashi, R.; Heremans, K.; Masson, P. (Eds.). High pressure and biotechnology. Colloque INSERM. Vol. 224. John Libbey Eurotext Ltd. Montrouge. 211-218.
- KNORR, D. 1993. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technol.*, juny, 156-161.

- KNORR, D. 1994. Effects of high pressure on microbial systems. High pressure for process development. Technische Universität Berlin. (Research Report).
- KOCHER, P.N.; FOEGEDING, E.A. 1993. Microcentrifuge-based method for measuring water-holding of protein gels. *J. Food Sci.*, 58, 1040-1046.
- LATREILLE, B.; PAQUIN, P. 1990. Evaluation of emulsion stability by centrifugation with conductivity measurements. *J. Food Sci.*, 55, 1666-1668.
- LECHOWICH, R.V. 1993. Food safety implications of high hydrostatic pressure as a food processing method. *Food Technol.*, juny, 170-172.
- LEDWARD, D.A.; LAWRIE, R.A. 1984. Recovery and utilization of by-product proteins of the meat industry. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 34B, 223-228.
- LEGER, L.W.; ARNTFIELD, D. 1993. Thermal gelation of the 12S canola globulin. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 70, 853-861.
- LEVIE, A. 1976. *The meat handbook* (2a. ed.). AVI. Westport, Connecticut.
- LEWIS, M.J. 1987. *Physical properties of foods and food processing systems*. Ellis Horwood. New York. 465 pp.
- LIN, C-H.; YANG, J-H.; LIOU, Y-J. 1998. Microbiological and chemical changes in porcine blood obtained by two collection systems. *Fleishwirtschaft Int.*, 3, Maig, 22-24.
- LIU, H.; LELIÈVRE, J. 1991. A differential scanning calorimetry study of glass and melting transitions in starch suspensions and gels. *Carbohydrate Research*, 219, 23-32.
- LOCKLEY, A.K.; WHITE, W.J.P.; HALL, G.M. 1988. A method of assessing protein adsorption onto ultrafiltration membranes. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 23, 11-15.
- LÓPEZ, A.M.; MORERA, S.; PLANIOL, J. 1992. Utilización de proteína plasmática en la formulación de embutidos cárnicos curados. *Alimentación, equipos y tecnología*, setembre, 117-121.
- LYNN KNIPE, C. 1988. Production and use of animal blood and blood proteins for human food. A: Pearson, A.M.; Dutson, T.R. (Eds.). *Edible meat by-products. Advances in Meat Research, Volume 5*. Elsevier Science Publishers Ltd. London-New York. 147-165.
- MA, C.-Y.; HARWALKAR, V.R.; MAURICE, T.J. 1990. Instrumentation and techniques of thermal analysis in food research. A: Harwalkar, V.R.; Ma, C.-Y. (Eds.). *Elsevier Applied Food Science Series*. Elsevier Science Publishers Ltd. Essex. 1-15.
- MAFART, P.; BÉLIARD, E. 1994a. *Ingeniería industrial alimentaria. Volumen I. Procesos físicos de conservación*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 277 pp.
- MAFART, P.; BÉLIARD, E. 1994b. *Ingeniería industrial alimentaria. Volumen II. Técnicas de separación*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 277 pp.
- MALLIDIS, C.G.; DRIZOU, D. 1991. Effects of simultaneous application of heat and pressure on the survival of bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol.*, 71, 285-288.
- MARTÍN, M.; GARCÍA, J.; GUTIÉRREZ, S.; GONZÁLEZ, A. 1995. Tecnología de deshidratación de la sangre y sus fracciones. *Alimentaria*, 49, 49-53.

- MARTÍNEZ, V. 1998. Contribución al estudio de la funcionalidad de la leche de oveja tratada por altas presiones en la elaboración y características del yogur. Memòria de Magister. Unitat de Tecnologia dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona.
- MATSUDOMI, N.; INOUE, Y.; NAKASHIMA, H.; KATO, A.; KOBAYASHI, K. 1995. Emulsion stabilization by maillard-type covalent complex of plasma protein with galactomannan. *J. Food Sci.*, 60, 265-268.
- MATTHIASSEN, E. 1983. The role of macromolecular adsorption in fouling of ultrafiltration membranes. *J. Membrane Sci.*, 16, 23-36.
- MAUBOIS, J.L. 1974. Utilization des techniques à membranes osmose inverse et ultrafiltration, dans les industries agricoles et alimentaires. *Bulletin Technique d'Information*, 291, 495-503.
- MERTENS, B.; DEPLACE, G. 1993. Engineering aspects of high-pressure technology in the food industry. *Food Technol.*, juny, 164-169.
- MITJÀ, A. 1994. La gestión del agua en el sector matadero. Programa de ahorro de agua en la industria. Alimentación, equipos y tecnología, gener/febrer, 121-127.
- MOHANTY, B.; MULVIHILL, D.M.; FOX, P.F. 1988a. Hydration-related properties of caseins at pH 2.0-3.0. *Food Chem.*, 27, 225-236.
- MOHANTY, B.; MULVIHILL, D.M.; FOX, P.F. 1988b. Emulsifying and foaming properties of acidic caseins and sodium caseinate. *Food Chem.*, 28, 17-30.
- MORALES, M.; DILL, C.W.; LANDMANN, W.A. 1976. Effect of Maillard condensation with D-glucose on the heat stability of bovine serum albumin. *J. Food Sci.*, 41, 234-236.
- MORÉ, M.I.; FINGER, L.D.; STRYKER, J.L.; FUQUA, C.; EBERHARD, A.; WINANS, S.C. 1996. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use to defined substrates. *Science*, 272, 1655-1658.
- MOREAU, C. 1995. Semi-continuous high pressure cell for liquid processing. A: Ledward et al. (Eds.). High pressure processing of foods. Nottingham University Press. Loughborough. 181-197.
- MORGAN, P. 1985. Traitement du sang d'abattoir par conservateur biologique. *Filiere Viande*, 92, 21-23.
- MORITA, R.Y. 1975. Psychrotrophic bacteria. *Bact. Rev.*, 39, 144-167.
- MORR, C.V. 1985. Composition, physicochemical and functional properties of reference whey protein concentrates. *J. Food Sci.*, 50, 1406-1411, 1421.
- MORR, C.V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.M.; VAN BUREN, J.P.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. 1985. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *J. Food Sci.*, 50, 1715-1718.
- MULLER, H.G. 1973. Introducción a la reología de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 174 pp.
- MULVIHILL, D.M.; MURPHY, P.C. 1991. Surface active and emulsifying properties of caseins/caseinates as influenced by state of aggregation. *Int. Dairy J.*, 1, 13-37.

- MURATA, M.; TANI, F.; HIGASA, T.; KITABATAKE, N.; DOI, E. 1993. Heat-induced transparent gel formation of bovine serum albumin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 43-36.
- MURPHY, J.M.; FOX, P.F. 1991a. Fractionation of sodium caseinate by ultrafiltration. *Food Chem.*, 39, 27-38.
- MURPHY, J.M.; FOX, P.F. 1991b. Functional properties of α_s -/ κ - or β -Rich casein fractions. *Food Chem.*, 39, 211- 228.
- MURRAY, E.D.; ARNTFIELD, S.D.; ISMOND, M.A.H. 1985. The influence of processing parameters on food protein functionality. II. Factors affecting thermal properties and analyzed by differential scanning calorimetry. *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.*, 18, 158.
- MYERS, C.D. 1990. Study of thermodynamics and kinetics of protein stability by thermal analysis. A: Harwalkar, V.R.; Ma, C.-Y. (Eds.). Elsevier Applied Food Science Series. Elsevier Science Publishers Ltd. Essex. 16-50.
- NAGANO, T.; HIROTSUKA, M.; MORI, H.; KOHIYAMA, K.; NISHINARI, K. 1992. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans. *J. Food Sci.*, 56, 726-729.
- NAGANO, T.; MORI, M.; NISHINARI, K. 1994. Rheological properties and conformational states of β -conglycin gels at acidic pH. *Biopolymers*, 34, 293-298.
- NAKAMURA, R.; HAYAKAWA, S.; YASUDA, K.; SATO, Y. 1984. Emulsifying properties of bovine blood globin: a comparison with some proteins and their improvement. *J. Food Sci.*, 49, 102-104.
- NEWSOME, R.L. 1988. *Staphylococcus aureus*. *Food Technol.*, abril, 194-195.
- NILSSON, R. 1975. The utilization and processing of blood. Symposium on the prospects for industrial meat processing in developing countries. United Nations Industrial Development Organization. Viena, 13-17 octubre.
- NUCKLES, R.O.; SMITH, D.M.; MERCKEL, R.A. 1990. Meat by-product protein composition and functional properties in model systems. *J. Food Sci.*, 55, 640-643, 682.
- OCKERMAN, H.W.; HANSEN, C.L. 1994. Industrialización de subproductos de origen animal. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, 387 pp.
- OKAMOTO, M.; KAWAMURA, Y.; HAYASHI, R. 1990. Application of high pressure to food processing: textural comparison of pressure- and heat-induced gels of food proteins. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 183-189.
- OSHODI, A.A.; OJOKAN, E.O. 1997. Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate. *Food Chem.*, 59, 333-338.
- PAFYLIAS, I.; CHERYAN, M.; MEHAIA, M.A.; SAGLAM, N. 1996. Microfiltration of milk with ceramic membranes. *Food Res. Int.*, 29, 141-146.
- PAREDES-LÓPEZ, O.; ORDORICA-FALOMIR, C.; OLIVARES-VÁZQUEZ, M.R. 1990. Chickpea protein isolates: physicochemical, functional and nutritional characterization. *J. Food Sci.*, 56, 726-729.

- PARRIS, N.; HOLLAR, C.M.; HSIEH, A.; COCKLEY, K.D. 1997. Thermal stability of whey protein concentrate mixtures: aggregate formation. *J. Dairy Sci.*, 80, 19-28
- PAULY, D.; HEINRICHS, M.; LUCK, T. 1996. Evaluation of the denaturation kinetics of two differently prepared protein concentrates from bovine blood plasma. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3251-3256.
- PAULY, D.; LUCK, T.; MÜLLER, W.D. 1998. Blood plasma preparations. 1. Process development for plasma protein formation. *Fleishwirtschaft Int.*, 3, Maig, 48-56.
- PEARCE, K.N.; KINSELLA, J.E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 716-723.
- PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. (Eds.). 1988. Edible meat by-products. *Advances in meat research*. Volume 5. Elsevier Science Publishers Ltd. London-New York. 439 pp.
- PÉREZ, B. 1995. Sistemas de evaluación del uso de sustancias anabolizantes y promotores del crecimiento en producción animal. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.
- POMERANZ, Y. 1991. Functional properties of food components. 2a. ed. Academic Press, Inc. London. 571 pp.
- RAEKER, M.Ö.; JOHNSON, L.A. 1995. Thermal and functional properties of bovine blood plasma and egg proteins. *J. Food Sci.*, 60, 685-690.
- RANKEN, M.D. 1980. Application of blood proteins. A: Grant, R.A. (Ed.). *Applied protein chemistry*. Applied Science Publishers. London. 169-180.
- REAL DEL SOL, E.; MARTÍN, M. 1991. Empleo de la ultrafiltración en la obtención de concentrados de plasma sanguíneo. *Alimentaria*, 21, 21-23.
- REIZENSTEIN, P. 1980. Hemoglobin fortification of food and prevention of iron deficiency with heme iron. *Acta Med. Sacnd. Suppl.*, 629.
- RELKIN, P. 1996. Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36, 565-601.
- ROBERTS, C.M.; HOOVER, D.G. 1996. Sensitivity of *Bacillus coagulans* spores to combinations of high hydrostatic pressure, heat, acidity and nisin. *J. Appl. Bacteriol.*, 81, 363-368.
- ROCKLAND, L.B.; BEUCHAT, L.R. (Eds.). 1987. Water activity: theory and applications to food. Marcel Dekker, Inc. New York. 404 pp.
- RODRÍGUEZ, I. 1994. Aprovechamiento de subproductos de la industria cárnica. *Alimentación, equipos y tecnología*, abril, 69-73.
- RUÍZ, I.; VEIGA, M.C.; DE SANTIAGO, P.; BLÁZQUEZ, R. 1993. Características de los efluentes de matadero. *Alimentación, equipos y tecnología*, setembre, 77-83.
- RUSSELL, N.J.; EVANS, R.I.; TER STEEG, P.F.; HELLEMONS, J.; VERHEUL, A.; ABEE, T. 1995. Membranes as a target for stress adaptation. *Int. J. Food Microbiol.*, 28, 255-261.
- SAITO, M.; ICHIKAWA, N.; TAIRA, H. 1988. Fractionation and emulsifying properties of plasma proteins. *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2831-2836.

- SATTERLEE, L.D. 1975. Improving utilization of animal by-products for human foods - A review. *J. Anim. Sci.*, 41, 687-697.
- SCHWENKE, K.D.; MOTHESE, R. (Eds.). 1993. Food proteins. Structure and functionality. VCH. Weinheim. 363 pp.
- SPECK, M.L. (Ed.). 1984. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association (APHA). Washington, D.C. 914 pp.
- SUZUKI, K. 1960. Studies on the kinetics of protein denaturation under high pressure. *Rev. Phys. Chem. Japan*, 29, 49-56.
- SUZUKI, K.; MUJOSAWA, Y. 1965. Denaturation and renaturation of γ -globulin under high pressure. *J. Biochem.*, 57, 116-124
- SUZUKI, T.; MACFARLANE, J.J. 1984. Modification of the heat-setting characteristics of myosin by pressure treatment. *Meat Sci.*, 11, 263-274.
- SWINGLER, G.R.; LAWRIE, R.A. 1979. Improved protein recovery from some meat industry by-products. *Meat Sci.*, 3, 63-73.
- SWINGLER, G.R.; NAYLOR, P.E.L.; LAWRIE, R.A. 1979. Microbial aspects of protein recovery from meat industry by-products. *Meat Sci.*, 3, 83-95.
- SWINGLER, G.R. 1982. Microbiology of meat industry by-products. A: Brown, M.H. (Ed.). *Meat microbiology*. Applied Science Publishers Ltd. London-New York. 179-224.
- TABARD, J. 1990. Nouvelle technique d'épuration bactérienne Le Bactocatch. *Revue des ENIL*, 156, 22-26.
- TESSIER, J.P. 1980. Application des membranes semi-perméables à la valorisation du plasma bovin. *RTVA*, 159, 19-25.
- TOLEDO, R.T. 1991. Fundamentals of food process engineering. 2a. ed. Van Nostrand Reinhold. New York. 601 pp.
- TORNBERG, E.; HERMANSSON, A.M. 1977. Functional characterization of protein stabilized emulsions: effect of processing. *J. Food Sci.*, 42, 468-472.
- TRITT, W.P.; SCHUCHARDT, F. 1992. Materials flow and possibilities of treating liquid and solid wastes from slaughterhouses in Germany - A review. *Bioresource Tech.*, 41, 201-207.
- TROLLER, J.A. 1989. Water activity and food quality. A: Hardman, T.M. (Ed.). *Water and food quality*. Elsevier Applied Science. London-New York. 1-32.
- TROUVÉ, E.; MAUBOIS, J.L.; PIOT, M.; MADEC, M.N.; FAUQUANT, J.; ROUAULT, A.; TABARD, J.; BRINKMAN, G. 1991. Rétention de différentes espèces microbiennes lors de l'épuration du lait par microfiltration en flux tangentiel. *Lait*, 71, 1-13.
- TRZEBIATOWSKA, M.; SZANIAWSKI, A.R. 1996. Effects of pH on the ultrafiltration of bovine serum albumin at high ionic strength using a macroporous titania membrane. *J. Food Proc. Eng.*, 19, 469-478.
- TYBOR, P.T.; DILL, C.W.; LANDMANN, W.A. 1973. Effect of decolorization and lactose incorporation on the emulsification capacity of spray-dried blood protein concentrates. *J. Food Sci.*, 38, 4-7.

- 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.
- VALLADARES, C.; ESPINOSA, R.; MARTÍN, M. 1995. Una contribución al estudio del efecto de las radiaciones gamma sobre sangre en polvo. *Alimentaria*, maig, 75-77.
- VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT, A. 1994a. High pressure induced gel formation of a whey protein and haemoglobin protein concentrate. Air project contract No. air 1-CT92-0296.
- VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT, A. 1994b. A comparative study between the rheological properties of heat and high pressure induced whey protein gels. Air project contract No. air 1-CT92-0296.
- VAN CAMP, J.; FEYS, G.; HUYGHEBAERT, A. 1994. Influence of operating temperature on the strength of high pressure induced whey protein and haemoglobin protein gels. Air project contract No. air 1-CT92-0296.
- VAN CAMP, J. 1996. High hydrostatic pressure-induced denaturation, aggregation, and gel formation of food proteins. Tesi Doctoral, Universitat de Gent.
- VANDANJON, L.; JAQUEN, P.; QUEMENEUR, F. 1996. Utilisations et potentialités des membranes pour la valorisation du sang d'abattoir. *Ind. Alim. Agric.*, gener/febrer, 11-16.
- VOTYAKOVA, T.V.; KAPRELYANTS, A.S.; KELL, D.B. 1994. Influence of viable cells on the resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in extended stationary phase. The population effect. *Appl. Env. Microbiol.*, 60, 3284-3291.
- WANG, S.F.; SMITH, D.M. 1992. Functional properties and microstructure of chicken breast salt soluble protein gels as influenced by pH and temperature. *Food Structure*, 11, 273-285.
- WATANABE, M.; MAKINO, T.; KUMENO, K.; ARAI, S. 1991. High pressure sterilization of ice-nucleation active bacterial cells. *Agric. Biol. Chem. Tokyo*, 54, 3085-3091.
- WISMER-PEDERSEN, J. 1979. Utilization of animal blood in meat by-products. *Food Technol.*, 33, 76-80.
- WISMER-PEDERSEN, J. 1988. Use of hemoglobin in foods - A review. *Meat Sci.*, 24, 31-45.
- WOUTERS, P.C.; DE SOUZA, W.; GLAASKER, E.; HELLEMONS, J.; STEEG, P.F.; SMELT, J.P.P.M. 1995. Some mechanistic aspects of high pressure inactivation of microorganisms. Report AAIR Project.
- YADA, R.Y.; JACKMAN, R.L.; SMITH, J.L. (Eds.). 1994. Protein structure-function relationships in foods. Blackie Academic & Professional. London. 202 pp.
- YOUNG, C.R.; LEWIS, R.W.; LANDMANN, W.A.; DILL, C.W. 1973. Nutritive value of globin and plasma protein fractions from bovine blood. *Nutr. Rep. Intl.*, 8, 211.
- YOUNG, R.H.; LAWRIE, R.A. 1974. Utilization of edible protein from meat industry by-products and waste. I. Factors influencing the extractability of protein from bovine and ovine stomach and lungs. *J. Food Technol.*, 9, 69-78.

- YOUNG, R.H.; LAWRIE, R.A. 1975a. Utilization of edible protein from meat industry by-products and waste. IV. Studies on the physical and mechanical properties of spun fibrous products. *J. Food Technol.*, 10, 465-474.
- YOUNG, R.H.; LAWRIE, R.A. 1975b. Utilization of edible protein from meat industry by-products and waste. V. The characterization of extracted proteins, using polyacrylamide gel electrophoresis incorporating sodium dodecyl sulphate. *J. Food Technol.*, 10, 523-532.
- ZAPICO-VIGO, J.; ROMERO-RODRÍGUEZ, M.A.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, A.; MÉNDEZ-DONEGA, J. 1993. Puesta a punto del módulo de ultrafiltración. *Alimentación equipos y tecnología*, diciembre, 39-42.
- ZIMMERMAN, F.; BERGMAN, C. 1993. Isostatic high-pressure equipment for food preservation. *Food Technol.*, juny, 162-163.
- ZOBELL, C.E. 1970. Pressure effects on morphology and life processes of bacteria. A: Zimmerman, A.M. (Ed.). *High pressure effects on cellular processes*. Academic Press. New York.

ANNEXOS

ANNEX 1

ANÀLISI ESTADÍSTICA: CARACTERITZACIÓ MICROBIOLÒGICA DE LA SANG

1a. Bacteris aeròbics mesòfils

Test de normalitat Shapiro-Wilk W : W : 0,970415 ; Prob < W : 0,373

ANOVA : Efecte de l'escorxador i el període de mostreig

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	17	4,847699	0,285159	1,4330
Error	34	6,765583	0,198988	Prob > F
C total	51	11,613283		0,1815
<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>F</i>	<i>Prob > F</i>
Escorx.	5	1,7187639	1,7275	0,1549
Període	2	2,3963282	6,0213	0,0058
Escorx.*Període	10	0,6589821	0,3312	0,9664

ANOVA : Efecte del període de mostreig sobre els recomptes de bacteris mesòfils

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	2	2,5019649	1,25098	26,7534
Error	50	2,3379902	0,04676	Prob > F
C total	52	4,8399551		0,0000

1b. Bacteris aeròbics psicrotrofs

Test de normalitat Shapiro-Wilk W : W : 0,974389; Prob < W : 0,5135

ANOVA : Efecte de l'escorxador i el període de mostreig

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	17	14,5432873	0,8554875	1,83
Error	33	15,4417167	0,4679308	Prob > F
C total	50	29,9850039		0,0674
<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>F</i>	<i>Prob > F</i>
Escorx.	5	5,26030513	2,25	0,0726
Període	2	4,11560267	4,40	0,0203
Escorx.*Període	10	5,13341813	1,10	0,3927

ANOVA : Efecte del període de mostreig sobre els recomptes de bacteris psicròtrofs

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	2	4,0572463	2,02862	36,5549
Error	50	2,7747644	0,05550	Prob > F
C total	52	6,8320107		0,0000

1c. Enterobacteris

Test de normalitat Shapiro-Wilk W : W : 0,965723; Prob < W : 0,4628

ANOVA: Efecte de l'escorxador

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	5	3,12227376	0,62445475	2,15
Error	25	7,27451333	0,29098053	Prob > F
C total	30	10,39678710		0,0929

1d. Clostridis sulfit-reductors

Test de normalitat Shapiro-Wilk W : W : 0,848779; Prob < W : 0,0003

1e. Staphylococcus aureus

Test de normalitat Shapiro-Wilk W : W : 0,960326; Prob < W : 0,2950

ANOVA: Efecte de l'escorxador

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	5	12,277232	2,47545	5,1505
Error	28	13,938037	0,48062	Prob > F
C total	33	26,315269		0,0017

Test de separació de mitjanes: Ryan-Einot-Gabriel-Welsch ($\alpha=0,05$)

	<i>mitjanes</i>
F	4,19 a
C	3,59 ab
A	3,36 ab
E	2,79 b
D	2,67 b
B	2,45 b

1f. Fongs i llevats

Test de normalitat Shapiro-Wilk W : W : 0,861314; Prob < W : 0,0152

ANOVA: Efecte de l'escorxador

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	5	5,65812157	1,13162431	2,26
Error	11	5,49626667	0,49966061	Prob > F
C total	16	11,15438824		0,1201

1g. Bacteris hemolítics

Test de normalitat Shapiro-Wilk W : W : 0,964420; Prob < W : 0,4457

ANOVA: Efecte de l'escorxador

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	5	2,23470333	0,44694067	1,31
Error	24	8,17761667	0,34073403	Prob > F
C total	29	10,41232000		0,2924

1h. Bacteris proteolítics

Test de normalitat Shapiro-Wilk W : W : 0,919325; Prob < W : 0,1136

ANOVA: Efecte de l'escorxador

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	5	1,38419579	0,27683916	1,45
Error	13	2,47372000	0,19028615	<i>Prob > F</i>
C total	18	3,85791579		0,2699

ANNEX 2

ANÀLISI ESTADÍSTICA: ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓ I EFECTE DEL SISTEMA DE DESSAGNAT SOBRE LA CONTAMINACIÓ MICROBIANA

2a. Bacteris aeròbics mesòfils

Test de normalitat Shapiro-Wilk W : W : 0,975947 ; Prob < W : 0,3249

Test de Barlett d'homogeneïtat de variàncies : Prob > F : 0,2547

ANOVA : Efecte de l'escorxador, l'origen de les mostres i el període de mostreig

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	15	8,758032	0,583869	1,6776
Error	34	29,931914	0,348046	Prob > F
C total	51	38,689946		0,0707

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>F</i>	<i>Prob > F</i>
Escorx.	1	0,0759067	0,2181	0,6417
Origen	1	0,8156890	2,3436	0,1295
Període	3	4,4024734	4,2164	0,0078
Escorx.*Origen	1	0,0026181	0,0075	0,9311
Origen*Període	3	1,2157372	1,1643	0,3281
Escorx.*Període	3	2,1169367	2,0275	0,1160
Esc.*Orig.*Per.	3	0,4609558	0,4415	0,7239

ANOVA : Efecte del període de mostreig sobre els recomptes de bacteris mesòfils

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	3	4,187527	1,39584	3,9647
Error	98	34,502420	0,35207	Prob > F
C total	101	38,689946		0,0103

ANOVA : Efecte del període de mostreig i l'origen de les mostres sobre els recomptes de bacteris mesòfils en l'escorxador A

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	7	6,017556	0,859651	2,1061
Error	42	17,143126	0,408170	Prob > F
C total	49	23,160682		0,0639

Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Període	3	4,3348256	3,5401	0,0225
Origen	1	0,4464079	1,0937	0,3016
Període*Origen	3	1,4472564	1,1819	0,3281

ANOVA : Efecte del període de mostreig i l'origen de les mostres sobre els recomptes de bacteris mesòfils en l'escorxador B

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	2,725243	0,389320	1,3395
Error	44	12,788787	0,290654	Prob > F
C total	51	15,514031		0,2550
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Període	3	2,1481787	2,4636	0,0749
Origen	1	0,3703735	1,2743	0,2651
Període*Origen	3	0,2148415	0,2464	0,8635

ANOVA : Efecte de l'escorxador i el període de mostreig sobre els recomptes de bacteris mesòfils recollides del dipòsit

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	2,418649	0,345521	1,7726
Error	43	8,381802	0,194926	Prob > F
C total	50	10,800451		0,1178
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Escorxador	1	0,1083252	0,5557	0,4600
Període	3	1,6193283	2,7691	0,0531
Escorx.*Període	3	0,6909786	1,1816	0,3279

ANOVA : Efecte de l'escorxador i el període de mostreig sobre els recomptes de bacteris mesòfils recollides del sagnador

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	5,957221	0,851032	1,8332
Error	42	19,497997	0,464238	Prob > F
C total	49	25,455218		0,1060
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Escorxador	1	0,0523099	0,1127	0,7388
Període	3	4,5208764	3,2461	0,0312
Escorx.*Període	3	1,5725087	1,1291	0,3482

2b. Bacteris aeròbics psicròtrofs

Test de normalitat Shapiro-Wilk W : W : 0,986451 ; Prob < W : 8460

Test de Barlett d'homogeneïtat de variàncies : Prob > F : 0,1173

ANOVA : Efecte de l'escorxador, l'origen de les mostres i el període de mostreig

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	15	13,730164	0,915344	2,2062
Error	86	35,681818	0,414905	Prob > F
C total	101	49,411981		0,0118

Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Escorx.	1	0,3315091	0,7990	0,3739
Origen	1	4,3043458	10,3744	0,0018
Període	3	5,7590064	4,6268	0,0048
Escorx.*Origen	1	0,5195667	1,2523	0,2662
Origen*Període	3	0,3214917	0,2583	0,8552
Escorx.*Període	3	1,1554156	0,9283	0,4307
Esc.*Orig.*Per.	3	1,4850249	1,1931	0,3173

ANOVA : Efecte del període de mostreig sobre els recomptes de bacteris psicròtrofs

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	3	5,344172	1,78139	3,9615
Error	98	44,067810	0,44967	Prob > F
C total	101	49,411981		0,0103

ANOVA : Efecte de l'origen de les mostres sobre els recomptes de bacteris psicròtrofs

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	1	4,380777	4,38078	9,7283
Error	100	45,031204	0,45031	Prob > F
C total	101	49,411981		0,0024

ANOVA : Efecte del període de mostreig i l'origen de les mostres sobre els recomptes de bacteris psicròtrofs en l'escorxador A

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	9,207822	1,31540	3,0376
Error	42	18,187930	0,43305	Prob > F
C total	49	27,395752		0,0112

Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Període	3	2,9151216	2,2439	0,0972
Origen	1	3,8305860	8,8457	0,0049
Període*Origen	3	2,3299296	1,7934	0,1631

ANOVA : Efecte del període de mostreig i l'origen de les mostres sobre els recomptes de bacteris psicròtrofs en l'escorxadador B

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	4,354688	0,622098	1,5647
Error	44	17,493887	0,397588	Prob > F
C total	51	21,848575		0,1713
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Període	3	3,1854312	2,6706	0,0591
Origen	1	0,9352813	2,3524	0,1323
Període*Origen	3	0,2669005	0,2238	0,8794

ANOVA : Efecte de l'escorxadador i el període de mostreig sobre els recomptes de bacteris psicròtrofs recollides del dipòsit

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	2,142794	0,306113	1,2127
Error	44	11,106858	0,252429	Prob > F
C total	51	13,249652		0,3162
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Escorxadador	1	0,0107339	0,0425	0,8376
Període	3	1,0973936	1,4491	0,2415
Escorx.*Període	3	0,9930442	1,3113	0,2827

ANOVA : Efecte de l'escorxadador i el període de mostreig sobre els recomptes de bacteris psicròtrofs recollides del sagnador

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	7,206592	1,02951	1,7595
Error	42	24,574960	0,58512	Prob > F
C total	49	31,781552		0,1214
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Escorxadador	1	0,8240230	1,4083	0,0306
Període	3	5,7293171	3,2639	0,2420
Escorx.*Període	3	0,8298909	0,4728	0,7029

2c. Enterobacteris

Test de normalitat Shapiro-Wilk W : W : 0,979174 ; Prob < W : 0,4811

Test de Barlett d'homogeneïtat de variàncies : Prob > F : 0,4508

ANOVA : Efecte de l'escorxador, l'origen de les mostres i el període de mostreig

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	15	27,334197	1,82228	3,8469
Error	85	40,264168	0,47370	Prob > F
C total	100	67,598364		0,0000
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Escorx.	1	3,5850129	7,5682	0,0073
Origen	1	2,5694286	5,4242	0,0222
Període	3	7,8424398	5,5186	0,0016
Escorx.*Origen	1	0,9694390	2,0465	0,1562
Origen*Període	3	1,5722804	1,1064	0,3511
Escorx.*Període	3	6,4926741	4,5688	0,0051
Esc.*Orig.*Per.	3	3,5999710	2,5332	0,0623

ANOVA : Efecte del període de mostreig i l'origen de les mostres sobre els recomptes d'enterobacteris en l'escorxador A

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	4,532942	0,647563	1,5510
Error	42	17,535858	0,417520	Prob > F
C total	49	22,068800		0,1769
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Període	3	2,7166399	2,1689	0,1059
Origen	1	0,1887252	0,4520	0,5051
Període*Origen	3	1,8087738	1,4441	0,2436

ANOVA : Efecte del període de mostreig i l'origen de les mostres sobre els recomptes d'enterobacteris en l'escorxador B

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	18,375824	2,62512	4,9665
Error	43	22,728310	0,52857	Prob > F
C total	50	41,104133		0,0004
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Període	3	11,766453	7,4204	0,0004
Origen	1	3,391701	6,4168	0,0150
Període*Origen	3	3,465755	2,1856	0,1035

ANOVA : Efecte de l'escorxador i el període de mostreig sobre els recomptes d'enterobacteris recollides del dipòsit

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	3,569121	0,509874	1,1262
Error	42	19,014817	0,452734	Prob > F
C total	49	22,583938		0,3653
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Escorxador	1	0,7726688	1,7067	0,1985
Període	3	1,1672590	0,8594	0,4696
Escorx.*Període	3	1,3823257	1,0718	0,3944

ANOVA : Efecte de l'escorxador i el període de mostreig sobre els recomptes d'enterobacteris recollides del sagnador

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	21,234396	3,03349	6,1744
Error	41	20,143168	0,49130	Prob > F
C total	48	41,377563		0,0001
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Escorxador	1	4,0330859	8,2091	0,0065
Període	3	7,6358522	5,1807	0,0040
Escorx.*Període	3	8,4078416	5,7045	0,0023

2d. Clostridis sulfit-reductors

Test de normalitat Shapiro-Wilk W : W : 0,916688; Prob < W : 0.0000

Test de Barlett d'homogeneïtat de variàncies : Prob > F : 0,0266

ANOVA : Efecte de l'escorxador, l'origen de les mostres i el període de mostreig

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	15	30,60475	2,0432	1,9734
Error	85	87,88319	1,03392	Prob > F
C total	100	118,48794		0,0267
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Escorx.	1	7,223985	6,9870	0,0098
Origen	1	1,229984	1,1896	0,2785
Període	3	10,305391	3,3224	0,0235
Escorx.*Origen	1	4,508265	4,3604	0,0398
Origen*Període	3	0,375447	0,1210	0,9475
Escorx.*Període	3	4,240524	1,3671	0,2584
Esc.*Orig.*Per.	3	0,629858	0,2031	0,8940

2e. Staphylococcus aureus

Test de normalitat Shapiro-Wilk W : W : 0,976374 ; Prob < W : 0,3434

Test de Barlett d'homogeneïtat de variàncies : Prob > F : 0,2332

ANOVA : Efecte de l'escorxador, l'origen de les mostres i el període de mostreig

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	15	5,466976	0,364465	1,1454
Error	86	27,363926	0,318185	Prob > F
C total	101	32,830902		0,3302

Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Escorx.	1	0,5148283	1,6180	0,2068
Origen	1	0,5402043	1,6978	0,1961
Període	3	2,3184836	2,4289	0,0708
Escorx.*Origen	1	0,1052243	0,3307	0,5667
Origen*Període	3	0,3860397	0,4044	0,7502
Escorx.*Període	3	1,0980211	1,1503	0,3336
Esc.*Orig.*Per.	3	0,1794856	0,1180	0,9043

ANNEX 3. ANÀLISI ESTADÍSTICA: HEMÒLISI

3a. Efecte de l'escorxador i el període de mostreig sobre el nivell d'hemòlisi

Test de normalitat Shapiro-Wilk W : W: 0,935931 i Prob < W : 0,0108

ANOVA : Efecte de l'escorxador i el període de mostreig

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	17	1,4571688	0,085716	4,4620
Error	34	0,6531505	0,019210	Prob > F
C total	51	2,1103192		0,0001
<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>F</i>	<i>Prob > F</i>
Escorx.	5	1,0204476	10,6240	0,0000
Període	2	0,0475771	1,2383	0,3026
Escorx.*Període	10	0,4088953	2,1285	0,0494

ANOVA : Efecte de l'escorxador sobre l'hemòlisi

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	5	1,0464165	0,209283	26,6762
Error	47	0,3687161	0,007845	Prob > F
C total	52	1,4151326		0,0000

3b. Estudi d'evolució de l'hemòlisi en mostres de sang refrigerades

Ajust per regressió lineal dels resultats de l'evolució de l'hemòlisi en mostres conservades en refrigeració.

EXPERIMENT 1

Escorxador	equació de regressió	R ²	Prob>F
A	$y = 1,348226 + 0,008559x$	0,9493	0,0049
B	$y = 0,494491 + 0,008123x$	0,9357	0,0071
C	$y = 0,474200 + 0,018988x$	0,9362	0,0324
D	$y = 1,418642 + 0,002942x$	0,8045	0,0391
E	$y = -0,245491 + 0,066543x$	0,9574	0,0038
F	$y = 0,552776 + 0,009813x$	0,7729	0,0495

EXPERIMENT 2

Escorxador	equació de regressió	R ²	Prob>F
A	$y = 1,324200 + 0,011092x$	0,7977	0,1068
B	$y = 0,514753 + 0,012027x$	0,9944	0,0002
C	$y = 1,244200 + 0,012013x$	0,9808	0,0011
D	$y = 2,182655 + 0,006381x$	0,9455	0,0276
E	$y = 0,613100 + 0,039213x$	0,9834	0,0084
F	$y = 0,660603 + 0,005469x$	0,7728	0,1209

EXPERIMENT 3

Escorxador	equació de regressió	R ²	Prob>F
A	$y = 1,208400 + 0,010100x$	0,9563	0,0221
B	$y = 1,253929 + 0,008554x$	0,9478	0,0264
C	$y = 1,078811 + 0,005427x$	0,8529	0,0251
D	$y = 2,348000 + 0,004250x$	1,000 *	—
E	$y = 0,177736 + 0,019060x$	0,9200	0,0098
F	$y = 0,926000 + 0,014333x$	1,000 *	—

* : recta determinada només a partir de dos punts

ANOVA : Efecte de l'escorxador en l'evolució de l'hemòlisi en sang refrigerada

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Escorxador	5	0,00274246	0,00054849	5,15
Error	12	0,00127810	0,00010651	Prob > F
C total	17	0,00402056		0,0094

Test de separació de mitjanes REGWQ ($\alpha = 0,05$)

Escorxador	pendent
E	0,041605 a
C	0,012143 b
A	0,009917 b
F	0,009872 b
B	0,008847 b
D	0,004524 b

3b1. Efecte de l'anticoagulant en l'evolució de l'hemòlisi

Ajust per regressió lineal dels resultats de l'evolució de l'hemòlisi en mostres de sang amb diferent anticoagulant

Anticoagulant	equació de regressió	R ²	Prob>F
CITRAT :			
A1	$y = 0,346800 + 0,003037x$	0,9106	0,0117
A2	$y = 0,325600 + 0,003433x$	0,9044	0,0129
A3	$y = 0,325000 + 0,003404x$	0,9504	0,0048
A4	$y = 0,326714 + 0,004815x$	0,9767	0,0117
A5	$y = 0,300900 + 0,007121x$	0,8868	0,0583
POLIFOSFAT :			
B1	$y = 0,242600 + 0,012667x$	0,9423	0,0060
B2	$y = 0,368000 + 0,012400x$	0,9835	0,0009
B3	$y = 0,367600 + 0,010567x$	0,9849	0,0008
B4	$y = 0,356000 + 0,009708x$	0,9675	0,0025
B5	$y = 0,311600 + 0,008142x$	0,9274	0,0085

ANOVA : Efecte de l'anticoagulant en l'evolució de l'hemòlisi en sang refrigerada

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Anticoagulant	1	0,00010032	0,00010032	31,28
Error	8	0,00002566	0,00000321	Prob > F
C total	9	0,00012598		0,0005

3b2. Efecte de l'anticoagulant i la càrrega microbiana en l'evolució de l'hemòlisi

ANOVA : Efecte de l'anticoagulant i el nivell inicial de contaminació microbiana en l'evolució de l'hemòlisi en sang refrigerada

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	3	0,00305902	0,00101967	17,62
Error	24	0,00138913	0,00005788	Prob > F
C total	27	0,00444815		0,0001
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Anticoagulant	1	0,00188931	32,64	0,0001
Contaminació	1	0,00158503	27,38	0,0001
Antic.*Contam.	1	0,00085856	14,83	0,0008

ANOVA : Efecte de l'escorxador (sistema de dessagnat), l'origen de les mostres i el període de mostreig en l'hemòlisi

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	15	3,1761335	0,211742	7,5216
Error	82	2,3083897	0,028151	Prob > F
C total	97	5,4845232		0,0000

Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Escorx.	1	1,0824183	38,4503	0,0000
Origen	1	1,5402954	54,7153	0,0000
Període	3	0,0721759	0,8546	0,4681
Escorx.*Origen	1	0,0640655	2,2758	0,1353
Origen*Període	3	0,1835594	2,1735	0,0974
Escorx.*Període	3	0,0886024	1,0491	0,3754
Esc.*Orig.*Per.	3	0,1609686	1,9060	0,1350

3c. Efecte del sistema de dessagnat i l'origen de les mostres en el nivell d'hemòlisi

ANOVA : Efecte del període de mostreig i l'origen de les mostres sobre l'hemòlisi en l'escorxador A

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	0,8972721	0,128182	4,2763
Error	40	1,1989848	0,029975	Prob > F
C total	47	2,0962570		0,0013

Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Període	3	0,11644300	1,2949	0,2894
Origen	1	0,47766301	15,9356	0,0003
Període*Origen	3	0,31877245	3,5449	0,0229

ANOVA : Efecte del període de mostreig i l'origen de les mostres sobre l'hemòlisi en l'escorxador B

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	1,223402	0,175477	6,6432
Error	42	1,1094049	0,026414	Prob > F
C total	49	2,3377451		0,0000

Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Període	3	0,0440492	43,2007	0,0000
Origen	1	1,1411209	0,5559	0,6471
Període*Origen	3	0,0205634	0,2595	0,8541

ANOVA : Efecte de l'escorxador i el període de mostreig sobre l'hemòlisi en mostres recollides del dipòsit

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	1,2689129	0,181273	5,4190
Error	40	1,3380620	0,033452	Prob > F
C total	47	2,6069750		0,0002
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Escorxador	1	0,83560500	24,9796	0,0000
Període	3	0,17216529	1,7156	0,1792
Escorx.*Període	3	0,15450389	1,5396	0,2191

ANOVA : Efecte de l'escorxador i el període de mostreig sobre l'hemòlisi en mostres recollides del sagnador

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	0,4162202	0,059460	2,4825
Error	40	0,9580737	0,023952	Prob > F
C total	47	1,3742939		0,0325
Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Escorxador	1	0,30331247	12,6634	0,0010
Període	3	0,02641188	0,3676	0,7768
Escorx.*Període	3	0,10101978	1,4059	0,2552

ANNEX 4

ANÀLISI ESTADÍSTICA: DETERMINACIÓ DE LES CONDICIONS DE DESHIDRATACIÓ

ANOVA : Efecte de la temperatura de deshidratació i el dia de mostreig

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	11	139,48984	12,6809	4,1510
Error	20	61,09739	3,0549	Prob > F
C total	31	200,58723		0,0028
<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>F</i>	<i>Prob > F</i>
Temperatura	3	108,11398	11,7969	0,0001
Dia mostreig	2	3,71357	0,6078	0,5543
Temperatura*dia	6	28,53066	1,5566	0,2114

ANNEX 5

ANÀlisi ESTADÍSTICA: EFECTE DEL pH SOBRE ELS PARÀMETRES CALORIMÈTRICS DEL PLASMA

5a. Variació de l'entalpia de transició

ANOVA : Efecte del tipus de producte (plasma líquid o deshidratat) i del pH sobre la variació d'entalpia (dades log-transformades)

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	7	3,4229696	0,48996	244,1644
Error	17	0,0340464	0,002003	Prob > F
C total	24	3,4570160		0,0000
<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>F</i>	<i>Prob > F</i>
Producte	1	0,0029806	1,4882	0,2391
pH	1	3,3444288	556,6447	0,0000
Producte*pH	3	0,0115525	1,9228	0,1642

5b. Temperatura de desnaturalització

ANOVA : Efecte del tipus de mostra (plasma líquid o deshidratat) i del pH sobre la temperatura de desnaturalització

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	5	338,92095	67,7842	77,7511
Error	15	13,07714	0,8718	Prob > F
C total	20	351,99810		0,0000
<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>F</i>	<i>Prob > F</i>
Producte	1	7,87202	9,0295	0,0089
pH	1	330,15255	189,3490	0,0000
Producte*pH	2	3,43503	1,9701	0,1739

ANNEX 6

ANÀLISI ESTADÍSTICA: EFECTE DEL pH SOBRE LA CAPACITAT DE GELIFICACIÓ DEL PLASMA

6a. Capacitat de retenció d'aigua (CRA)

ANOVA : Efecte del tipus de producte (plasma líquid, deshidratat) i del pH sobre la CRA

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	7	1353,8495	193,407	127,2098
Error	20	30,4076	1,520	Prob > F
C total	27	1384,2571		0,0000
<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>F</i>	<i>Prob > F</i>
Producte	1	1,9353	1,2729	0,2726
pH	3	1314,7549	288,2515	0,0000
Producte*pH	3	3,3189	0,7276	0,5475

ANOVA : Efecte del tipus de producte (plasma líquid, deshidratat i clara d'ou deshidratada) i del pH sobre la CRA

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	11	1905,6156	173,238	83,1720
Error	24	58,3208	2,083	Prob > F
C total	35	1963,9364		0,0000
<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>F</i>	<i>Prob > F</i>
Producte	2	147,5187	35,4121	0,0000
pH	3	1633,0889	261,3505	0,0000
Producte*pH	6	64,7496	5,1811	0,0011

6b. Resistència a la penetració

ANOVA : Efecte del tipus de producte (plasma líquid, deshidratat) i del pH sobre la força de penetració (dades log-transformades)

<i>Font de variació</i>	<i>g.l.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Model	7	5,5324036	0,790343	158,2710
Error	40	0,1997443	0,004994	Prob > F
C total	47	5,7321479		0,0000

Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Producte	1	0,2077285	41,5989	0,0000
pH	3	5,2860858	352,8568	0,0000
Mostra*pH	3	0,0385893	2,5759	0,0672

ANOVA : Efecte del tipus de producte (plasma líquid, deshidratat i clara d'ou deshidratada) i del pH sobre la força de penetració

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	11	6,5866652	0,598788	165,6198
Error	60	0,2169261	0,003615	Prob > F
C total	71	6,8035913		0,0000

Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Producte	2	0,8939206	123,6256	0,0000
pH	3	3,0878434	284,6908	0,0000
Mostra*pH	6	2,6049011	120,0824	0,0000

ANOVA : Efecte del tipus de producte (plasma líquid, deshidratat) i del pH sobre el treball de penetració (dades log-transformades)

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	7	4,0559387	0,579420	155,3520
Error	40	0,1491889	0,003730	Prob > F
C total	47	4,2051276		0,0000

Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Producte	1	0,0968384	25,9640	0,0000
pH	3	3,9510399	353,1129	0,0000
Mostra*pH	3	0,0080604	0,7204	0,05457

ANOVA : Efecte del tipus de producte (plasma líquid, deshidratat i clara d'ou deshidratada) i del pH sobre el treball de penetració

Font de variació	g.l.	SQ	QM	F
Model	11	4,725394	0,429576	152,9831
Error	60	0,1684799	0,002808	Prob > F
C total	71	4,8938193		0,0000

Font de variació	g.l.	SQ	F	Prob > F
Producte	2	0,4295375	76,4847	0,0000
pH	3	2,3751847	281,9547	0,0000
Mostra*pH	6	1,9206172	113,9968	0,0000

ANNEX 7

ANÀlisi ESTADÍSTICA: EVOLUCIÓ DURANT L'EMMAGATZEMATGE DE LA CAPACITAT ESCUMANT I L'ESTABILITAT DE L'ESCUMA

Ajust per regressió no lineal dels resultats de la capacitat escumant en mostres conservades a temperatura ambient

Mes	equació de regressió $E=E_0 e^{-kt}$		R^2	Prob>F
0	$E_0 = 76,1885$	$k = 0,0108$	0,9482	0,0033
2	$E_0 = 65,3022$	$k = 0,0107$	0,9874	0,0004
4	$E_0 = 65,7335$	$k = 0,0122$	0,9912	0,0002
5	$E_0 = 62,3112$	$k = 0,0132$	0,9952	0,0000
6	$E_0 = 55,7558$	$k = 0,0123$	0,9582	0,0024

Ajust per regressió no lineal dels resultats de la capacitat escumant en mostres conservades en refrigeració

Mes	equació de regressió $E=E_0 e^{-kt}$		R^2	Prob>F
0	$E_0 = 76,5625$	$k = 0,0138$	0,9482	0,0033
2	$E_0 = 65,3022$	$k = 0,0107$	0,9874	0,0004
4	$E_0 = 72,5762$	$k = 0,0110$	0,9710	0,0014
5	$E_0 = 64,5667$	$k = 0,0129$	0,9952	0,0000
6	$E_0 = 55,7558$	$k = 0,0123$	0,9582	0,0024

ANNEX 8**ANÀLISI ESTADÍSTICA: EFECTE DE LA PRESSURITZACIÓ SOBRE LA CAPACITAT ESCUMANT I L'ESTABILITAT DE L'ESCUMA**

Ajust per regressió no lineal dels resultats de la capacitat escumant del plasma líquid no tractat i pressuritzat a 450 MPa durant 15 minuts a 40°C.

Mostra	equació de regressió $E=E_0 e^{-Kt}$		R²	Prob>F
control	$E_0 =75,5053$	$k=0,0126$	0,9968	0,0000
HP	$E_0 =76,9305$	$k=0,0062$	0,9968	0,0000