

**ESTUDIO DEL PLASMA SANGUÍNEO BOVINO PARA FERMENTACIÓN  
SUMERGIDA Y SISTEMAS ALIMENTARIOS**

Propuesta Tesis Doctoral



Estudiante

Doctorado en Ciencias Agrarias  
**PEDRO JOSÉ BARRAGÁN ARANGO**, Esp.

Director

**ÓSCAR JULIÁN SÁNCHEZ TORO**, Ph.D.  
Grupo de Investigación en Alimentos y Agroindustria  
Instituto de Biotecnología Agropecuaria

Doctorado en Ciencias Agrarias  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Universidad de Caldas  
Manizales, 2013

## Tabla de Contenido

1	INTRODUCCIÓN .....	4
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	5
3	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA (versión reducida) .....	8
3.1	Introducción .....	8
3.2	Sangre bovina.....	8
3.2.1	Composición de la sangre bovina .....	9
3.2.2	Obtención de sangre de bovino .....	9
3.3	Aprovechamiento de sangre bovina .....	12
3.3.1	Obtención de harina de sangre .....	14
3.3.2	Obtención de proteínas de sangre bovina.....	15
3.3.3	Utilización de la sangre en sectores no alimentarios.....	17
3.4	Aprovechamiento de plasma bovino sanguíneo.....	17
3.4.1	Obtención del plasma bovino.....	18
3.4.2	Propiedades funcionales del plasma sanguíneo bovino .....	19
3.4.3	Suplementación proteica con plasma bovino .....	21
3.4.4	Plasma como componente de medios para cultivos sumergidos.....	23
3.5	Cultivos lácticos .....	24
3.5.1	Utilidad de las bacterias lácticas .....	24
3.5.2	Producción de bacterias lácticas.....	25
4	OBJETIVOS .....	26
4.1	Objetivo General .....	26
4.2	Objetivos específicos .....	26
5	MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
5.1	Evaluación del plasma sanguíneo bovino como componente de medio de cultivo para la fermentación láctica. ....	26
5.1.1	Obtención y separación del plasma de sangre bovina.....	26
5.1.2	Determinación del contenido de proteína, pH y humedad de plasma .....	27
5.1.3	Hidrólisis enzimática de las proteínas del plasma sanguíneo bovino .....	27
5.1.4	Obtención y conservación de las cepas .....	27
5.1.5	Ensayos preliminares de fermentación.....	27
5.1.6	Preparación del medio a base de plasma sanguíneo bovino.....	27
5.1.7	Activación de las cepas y ensayos de fermentación.....	28
5.1.8	Diseño experimental .....	28

5.2	Estudio cinético del cultivo sumergido de <i>Lactobacillus plantarum</i> en medio a base de plasma sanguíneo bovino .....	29
5.2.1	Condiciones de fermentación.....	29
5.2.2	Modelamiento de la cinética de fermentación.....	29
5.2.3	Evaluación de la capacidad fermentativa de la biomasa obtenida .....	29
5.3	Estudio de las propiedades funcionales del plasma sanguíneo bovino con proteínas sin hidrolizar e hidrolizadas en sistemas alimentarios .....	30
5.3.1	Hidrólisis enzimática de proteínas de plasma sanguíneo bovino .....	30
5.3.2	Determinación del contenido de proteína y de solubilidad .....	30
5.3.3	Determinación de la capacidad emulsionante .....	30
5.3.4	Determinación del índice de actividad emulsionante.....	31
5.3.5	Determinación de la estabilidad de la emulsión.....	31
5.3.6	Retención de agua .....	31
5.3.7	Determinación de viscosidad .....	32
5.3.8	Formulación de los productos con incorporación de plasma .....	32
5.3.9	Análisis sensorial .....	32
5.3.10	Análisis estadístico.....	33
6	Resultados esperados .....	33
7	Impactos de la tesis .....	33
8	Cronograma de actividades.....	35
9	Presupuesto .....	36

## RESUMEN

Con el propósito de identificar posibilidades de uso del plasma sanguíneo bovino, se realizará un estudio de su potencial como fuente de nitrógeno en medios líquidos de fermentación para crecimiento de lactobacilos. Igualmente serán estudiadas algunas propiedades funcionales para la posible incorporación del plasma sanguíneo bovino con proteínas hidrolizadas o no en sistemas alimentarios. Para tal fin se realizará la fermentación sumergida de cepas de *Lactobacillus* sp., utilizadas en la iniciación de procesos madurativos en productos cárnicos, para evaluar la eficiencia del plasma sanguíneo bovino en la producción de biomasa celular. Se estudiará la cinética de la fermentación líquida para conocer su comportamiento para lo cual se realizarán ensayos con plasma sanguíneo bovino con proteína hidrolizada y sin hidrolizar. En la fase final, se evaluarán algunas propiedades funcionales de importancia de soluciones de plasma sanguíneo bovino con o sin tratamiento enzimático en la formulación de un aderezo, un helado y un producto cárnico no tradicional. Con este estudio se pretende generar conocimiento para la adopción de alternativas tecnológicas de uso de subproductos de la sangre bovina (plasma sanguíneo bovino), que permitan generar productos de valor agregado y mejorar la calidad de algunos alimentos para consumo humano. Asimismo, se pretende mitigar el impacto ambiental generado por la falta actual de tratamiento de la sangre en las plantas de beneficio animal en Colombia.

**Palabras claves:** plasma sanguíneo bovino, *Lactobacillus* sp., propiedades emulsificantes, hidrólisis enzimática, cinética de fermentación.

## 1 INTRODUCCIÓN

En Colombia la gestión ambiental para el desarrollo sostenible del sector agropecuario es una necesidad imperiosa para garantizar condiciones adecuadas y seguras de las actividades agrícolas y pecuarias que redunden en el mejoramiento del entorno socio-económico, ambiental y sanitario de las regiones. La adopción de tecnologías limpias de aprovechamientos y transformación de subproductos de la industria cárnica para el ahorro y uso eficiente de recursos naturales, es una alternativa de solución para mitigar el impacto ambiental generado por este tipo de subproductos. La sangre bovina se encuentra dentro de uno de los más importantes subproductos obtenidos en la etapa de sangría de los animales de abasto público por su contenido en cantidad y calidad de proteínas de un alto valor nutricional para alimentación humana y animal. La investigación y desarrollo de alternativas tecnológicas para el uso de subproductos a partir de sangre bovina constituyen una solución para mejorar la eficiencia, mitigar el impacto ambiental y generar agregación de valor en los subproductos del sector de la Cadena Cárnica Bovina en Colombia y en el Mundo.

La sangre bovina y sus constituyentes han sido utilizados en diversas aplicaciones desde hace ya varias décadas, como fuentes de suplementación para concentrados animales en principio. Posteriormente se extendió su uso a la alimentación humana para utilizarse como agente emulsificante, estabilizante, clarificante, colorante natural y suplemento nutricional. Asimismo se conocen otras aplicaciones de la sangre bovina no alimentarias: en la industria de fertilizantes como revestimiento de semillas, estabilizante del pH del suelo y fuente de minerales, y en aplicaciones para laboratorios, análisis de taninos, producción de carbón activado, obtención de hemina agar sangre, peptonas, glicerofosfatos, albúminas, globulinas, esfingomielina y catalasa. En la industria de los pegantes se utiliza la sangre como aditivo por su capacidad para formar películas en papeles, litografías, fibras y plásticos y como componente de algunos adhesivos.

Los volúmenes de residuos generados diariamente en los mataderos en el mundo con poco grado de aprovechamiento, la escasez de proteína animal de buena calidad y el surgimiento de nuevas enfermedades causadas en la población humana y animal por estos residuos, hacen que se obligue a analizar la pertinencia que tienen la investigación aplicada y el desarrollo tecnológico realizados por los grupos de investigación para que contribuyan

verdaderamente a la solución de estos problemas. La conversión de los residuos en materias primas de procesos productivos, la obtención de nuevos productos de uso farmacéutico, alimentario y de laboratorio, nuevos procesos tecnológicos para la depuración de residuos de mataderos, el aprovechamiento de la sangre y su fracción líquida o plasma como fuentes de proteínas de alto valor biológico entre otras alternativas, son del mayor interés para la población mundial dados los retos y la responsabilidad mencionados anteriormente.

La presente propuesta de Tesis del Doctorado en Ciencias Agrarias de la Universidad de Caldas se enmarca en la línea de investigación en Biotecnología Industrial del Grupo de Investigación en Alimentos y Agroindustria de la Universidad de Caldas, el cual hace parte de los grupos que soportan la investigación del Instituto de Biotecnología Agropecuaria de la Universidad de Caldas en sus áreas estratégicas de trabajo en Ciencias de los Alimentos e Ingeniería de Procesos Biotecnológicos.

Esta propuesta tiene el apoyo de la Universidad de Caldas al otorgarle comisión de estudios al aspirante al doctorado y tiene financiación en el marco de un proyecto aprobado por el Sistema Nacional de Regalías denominado “Diseño e implementación de una estrategia integral para el tratamiento y aprovechamiento de residuos en el sector agrícola y agroindustrial de Caldas mediante innovación en procesos biotecnológicos y la formación del capital humano pertinente para la generación de valor en el sector agrícola y agroindustrial de Caldas”.

## **2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

Los problemas más significativos asociadas a las operaciones que se llevan a cabo en un matadero son, habitualmente, el consumo de agua, las emisiones al agua de líquidos de alta concentración de materia orgánica y el consumo de energía asociado al agua de calefacción y refrigeración. La sangre tiene la DQO más alta de todos los líquidos residuales procedentes tanto de mataderos de ganado como de aves, y su recolección, almacenamiento, manipulación y transformación es un problema clave para la gestión y el control ambiental (Del Hoyo *et al.*, 2007a). Además, la sangre tiene una alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) que está en el rango de 150.000 a 200.000 mg O<sub>2</sub> / L (Signorini, 2007). Dentro de los factores críticos para la competitividad de la cadena cárnica bovina en Colombia, se señalan entre otros: la actualización tecnológica de las plantas de sacrificio, la integración entre los frigoríficos y las redes de distribución, la eficiencia operacional y productiva de las plantas de sacrificio, la industrialización de subproductos y el desarrollo de productos de valor agregado por parte de las plantas de beneficio (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2009).

Si bien en Colombia existen normas para el aseguramiento de la calidad sanitaria y ambiental (ley 09/79 y ley 99/93) los estudios más recientes del Invima, las Corporaciones Regionales, Fedefondos y Serteagro indican no solo serias carencias y debilidades en los procesos de sacrificio y faenado, sino la ausencia de programas educativos y estrategias de mejoramiento de la calidad de los procesos que apunten a lograr mayor eficiencia y competitividad sanitaria del producto y reducción de los daños ambientales que generan las tecnologías actuales (Ministerio del Medio Ambiente, 2002).

La sangre animal es el primer subproducto que se obtiene en el proceso de sacrificio y su rendimiento es del 4% sobre el peso vivo del animal en bovinos y en la mayoría de los casos se desecha o se subutiliza (Venegas, 1995). Esta práctica industrial se ha profundizado en nuestro país y las centrales de sacrificio enfrentan una seria problemática ambiental: en 26 de los 32 departamentos del país se encuestaron 268 plantas que corresponden al 24% del universo clase IV y Mínimo. De ellas doce (4%) cumplen requisitos en forma completa, veintiuna (8%) tienen no conformidades menores de fácil adecuación, diez (4%) están en proceso de cierre. De este total de plantas encuestadas, 179 (67%) disponen los residuos líquidos directamente a cuerpos de agua (Procuraduría Delegada para Asuntos Ambientales y Agrarios, 2007).

El sacrificio de un vacuno genera la contaminación equivalente a una población de 70 a 200 habitantes (Signorini, 2007). La carga de contaminación de un matadero depende de la eficiencia en la recuperación de la sangre. En Colombia de 731 plantas de beneficio animal inscritas oficialmente, se encuentran operando 506 y se han cerrado 225, es decir el 30,77% por

incumplimiento a normas sanitarias (INVIMA, 2012). Para dar claridad de la dimensión de la seria problemática ambiental que hoy enfrentan nuestras plantas de sacrificio, es necesario referirse a la estadística oficial del DANE (2013), las cuales indican que el sacrificio de vacunos en el año 2012 alcanzó la suma de 4.124.658 cabezas de ganado vacuno. Esto permite establecer con aproximación el potencial anual de sangre disponible en el país. Si se conoce que el promedio de rendimiento en sangre/cabeza es de 13,50 L para la edad promedio de sacrificio en Colombia, es posible estimar el volumen total afectando este rendimiento por el número de animales sacrificados. Resultado de la estimación de sangre obtenida, este valor es de 55.700.000 L, de los cuales se estima que 19.500.000 L se destinan para la obtención de harina de sangre y 36. 200.000 L se presume se vierten a los cuerpos de agua con una pequeña cantidad destinada a la obtención de plasma. Este volumen para la agroindustria colombiana es altamente significativo, especialmente para la cadena cárnica.

Sin embargo, este potencial agroindustrial no se ha logrado aprovechar óptimamente, entre otras razones, por la débil consolidación de verdaderas cadenas agroindustriales en el país, que no han permitido una integración de los diferentes eslabones que las constituyen. Justamente la posibilidad de aprovechar los subproductos de los procesos tanto de producción primaria como de la transformación industrial, permite contribuir a la estructuración de cadenas agroindustriales mediante la incorporación de todos los actores involucrados, incluyendo el sector académico y los centros de investigación y desarrollo tecnológico.

En general en Colombia y en el Departamento de Caldas en particular, existe una gran cantidad de residuos de mataderos que no han sido suficientemente caracterizados ni evaluados como materia prima para la obtención de productos de alto valor. Dentro de estos productos el plasma sanguíneo bovino (PSB), que constituye la fracción líquida de la sangre, es una fuente valiosa por su contenido de proteínas de alto valor nutricional para alimentación humana y animal. Debido a las propiedades funcionales de las proteínas del plasma y su alto valor proteico, se ha propuesto su aprovechamiento mediante la incorporación en productos cárnicos tradicionales, en productos de panificación, sopas, pastas, galletas y para la formulación de medios de cultivo para producción de probióticos, entre otros.

Considerando la alta disponibilidad mostrada de la sangre, su bajo costo, su alto valor proteico y su impacto generado al ambiente, la sangre constituye un recurso de altísima importancia para su aprovechamiento en diversas aplicaciones. Por lo tanto es necesario abordar con urgencia en Colombia vías de solución no solo a la problemática ambiental causada por este subproducto, si no igualmente a la obtención de productos de valor agregado que ayuden a superar la situación financiera que hoy enfrentan las centrales de sacrificio en Colombia.

La utilización del PSB como mayor fracción de composición de la sangre (60 a 70%), puede constituir una solución viable a la problemática mencionada como ya se ha experimentado en otros países en el mundo. En Latinoamérica, Argentina y Brasil son líderes en este tipo de tecnologías de aprovechamiento de la sangre para la obtención de PSB, y otros subproductos. Pero es urgente la realización de más estudios encaminados a dar uso racional a este recurso tan valioso dada su alta disponibilidad y valor proteico. En la actualidad existen pocos estudios sobre el PSB como fuente de nitrógeno en medios de cultivos en fermentación sumergida de lactobacilos. La situación no es diferente en la industria alimentaria en donde se ha promovido su uso principalmente para el mejoramiento de las propiedades funcionales en embutidos cárnicos tradicionales.

Dentro de los estudios mencionados, Hyun y Shin (1998) propusieron la utilización del PSB como componente de medio para la producción económica de probióticos y Barboza *et al.* (1994) en la misma vía realizaron un estudio del PSB como fuente proteica en la formulación de un medio de cultivo para lactobacilos. La información publicada sobre utilización del PSB como medio de cultivo de lactobacilos no incluye el estudio del efecto combinado de la fuente de carbono, la hidrólisis de las proteínas del PSB y de la incorporación de PSB. De otro lado, no se encontraron reportes sobre el modelamiento de la cinética del proceso de fermentación a nivel de banco o de planta piloto.

En la industria alimentaria también ha cobrado importancia la incorporación del PSB para el mejoramiento de las propiedades funcionales como la gelificación, emulsificación, textura e inclusive para disminuir el porcentaje de grasa en los alimentos principalmente de

origen cárnico. Sin embargo, se encuentran muy pocos estudios sobre las propiedades funcionales de las proteínas del PSB en otros sistemas alimentarios diferentes a productos cárnicos tradicionales. No se han encontrado reportes sobre aplicación del PSB en helados y aderezos, ni siquiera en productos cárnicos no tradicionales como el jamón de conejo. Considerando lo anterior se requiere por tanto realizar estudios que permitan conocer el comportamiento del PSB como componente de medios de cultivo para la producción de cepas iniciadores para la maduración de cárnicos. Se necesita estudiar también las regularidades cinéticas del cultivo de lactobacilos en medios basados en PSB a nivel de banco y piloto. Adicionalmente es necesario explorar otras vías de aplicación de las propiedades funcionales del PSB en productos diferentes a los embutidos cárnicos tradicionales.

La realización del presente proyecto de tesis doctoral contribuirá a la búsqueda de alternativas de uso de subproductos del proceso de sacrificio de población bovina para así contribuir a disminuir los impactos ambientales negativos que causa su disposición en cuerpos de agua naturales. También este proyecto permitirá el desarrollo y la exploración de soluciones biotecnológicas para la obtención de productos de valor agregado a partir de un efluente contaminante (sangre bovina) y alternativas para la incorporación de plasma sanguíneo bovino en diferentes productos alimenticios sustituyendo aditivos químicos y elevando su valor proteico. Además la ejecución de esta tesis contribuirá al futuro desarrollo de un paquete tecnológico integral que será ofrecido al sector productivo. Finalmente el presente proyecto permitirá consolidar una nueva línea de investigación en el grupo de Alimentos y Agroindustria, la Planta de Bioprocesos y el Instituto de Biotecnología Alimentaria de la Universidad de Caldas sobre aprovechamiento de subproductos y residuos cárnicos y asimismo favorecer las relaciones entre el sector productivo y la Academia.

### **3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA (versión reducida)**

#### **3.1 Introducción**

La adopción de tecnologías limpias de aprovechamientos y transformación de subproductos de la agroindustria para el ahorro y uso eficiente de recursos naturales, es una alternativa de solución para mitigar el impacto ambiental generado por este tipo de subproductos.

La protección del medio ambiente en el mundo, se incluye como un elemento esencial del desarrollo sostenible, promoviendo la conservación de los recursos naturales para un desarrollo económico y social con establecimiento de políticas ambientales que contribuyan a reducir o eliminar los impactos negativos de la actividad humana.

Los problemas más significativos asociadas a las operaciones que se llevan a cabo en un matadero son, habitualmente, el consumo de agua, las emisiones al agua de líquidos de alta concentración de materia orgánica y el consumo de energía asociado al agua de calefacción y refrigeración.

En Colombia la gestión ambiental para el desarrollo sostenible del sector agropecuario es una necesidad imperiosa para garantizar condiciones adecuadas y seguras de las actividades agrícolas y pecuarias que redunden en el mejoramiento del entorno socio-económico, ambiental y sanitario de las regiones. La adopción de tecnologías limpias de aprovechamientos y transformación de subproductos de la agroindustria para el ahorro y uso eficiente de recursos naturales, es una alternativa de solución para mitigar el impacto ambiental generado por este tipo de subproductos.

La sangre bovina y sus constituyentes son subproductos de alto valor nutricional por su contenido proteico y propiedades funcionales para la industria de alimentos. La investigación y desarrollo de alternativas tecnológicas para el uso de subproductos a partir de sangre bovina constituyen una solución para mejorar la eficiencia y generar agregación de valor en el sector de la Cadena Cárnica Bovina en Colombia.

Las proteínas de la sangre muestran valiosas propiedades funcionales lo cual hace adecuado su uso en los alimentos procesados para el consumo humano. Igualmente es muy importante desde el punto de vista industrial la evaluación de las proteínas de la sangre en la formación y estabilización de emulsiones. Por otra parte, la incorporación de proteínas en los productos alimenticios puede aumentar su valor nutricional (Silva y Silvestre, 2003).

El plasma es la fracción líquida de la sangre y es un líquido translucido más denso que el agua y ligeramente alcalino, con pH de 7,4, en algunos casos puede presentar un ligero color rosado y está constituido por un 90 % de agua, contiene entre 15 y 20% de proteína, con varios nutrientes esenciales como aminoácidos, minerales, vitaminas y ácidos grasos (Liu, 2002; Selmane *et al.*, 2008).

Desde hace varias décadas el plasma sanguíneo bovino ha sido estudiado dada la importancia nutricional y propiedades funcionales de sus proteínas. En los sistemas alimentarios se han realizado algunos trabajos de aplicación que van desde la incorporación en productos cárnicos, productos de panificación y pastas, hasta su utilización como componente de medios para el cultivo de microorganismos industriales y la producción de probióticos.

#### **3.2 Sangre bovina**

La sangre de los bovinos es un líquido generalmente de color rojo, que circula por las arterias y venas del cuerpo del animal y que tiene importantes funciones fisiológicas como distribuir oxígeno y otras sustancias a las células del organismo, así como recoger de éstas los productos de desecho. Se compone de una parte líquida o plasma y de células en suspensión: eritrocitos, leucocitos y plaquetas. La sangre tiene varios usos importantes: consumo humano (alimenticio y farmacéutico), animal e industrial (Oficina Nacional de Normalización, 2009).

Los eritrocitos se forman en la médula ósea y tras una vida media de 120 días son destruidos y eliminados por el bazo. En cuanto a las células blancas de la sangre, los leucocitos



granulosos o granulocitos se forman en la médula ósea, mientras los linfocitos se forman en el timo, en los ganglios linfáticos y en otros tejidos linfáticos. Las plaquetas se producen en la médula ósea. Todos estos componentes de la sangre se agotan o consumen cada cierto tiempo y, por tanto, se reemplazan con la misma frecuencia. Los componentes del plasma se forman en varios órganos del cuerpo, como el hígado el cual es responsable de la síntesis de seroalbúmina y fibrinógeno y que libera sustancias tan importantes como el sodio, el potasio y el calcio. Las glándulas endocrinas producen las hormonas transportadas en el plasma. Los linfocitos y las células plasmáticas sintetizan ciertas proteínas, mientras otros componentes proceden de la absorción que tiene lugar en el tracto intestinal (Rocha Sánchez, 2006).

### 3.2.1 Composición de la sangre bovina

A pesar de que la sangre es un elemento constante en los organismos, su composición química cambia en función de factores como la raza del animal, su edad, estado fisiológico y alimentación, entre otros. Sin embargo, se puede hablar de una composición media: 80% agua, 18% de proteínas y 2% de hidratos de carbono, lípidos y sales minerales (Linden y Lorient, 1997) La sangre bovina se divide en dos partes, el plasma y el paquete celular, este último constituido por los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las plaquetas. En el bovino, el plasma representa del 60 al 65% del total y el paquete globular del 35 al 40% (Linden y Lorient, 1997). En la Tabla 1 se presenta la composición de la sangre bovina.

Tabla 1. Composición de la sangre, plasma líquido y paquete celular bovino (g/100 mL).

<i>Componente</i>	<i>Sangre</i>	<i>Plasma (60%)</i>	<i>Paquete celular (40%)</i>
Agua	80-85	90-92	70-78
Proteínas	15-18	6-8	25-29
Lípidos	0,15	0,5-1	0,20
Hidratos de carbono	0,10	0,08-0,12	---
Sales minerales	1,00	0,8-0,90	Trazas
Otras sustancias	0,55	0,20-0,30	---
Materia seca	15-20	8-10	22-30

Fuente: Linden y Lorient (1997).

### 3.2.2 Obtención de sangre de bovino

La obtención de la sangre como subproducto proveniente de las diferentes operaciones de faenado, contiene nutrientes muy valiosos que pueden aprovecharse de diferentes maneras. Este proceso debe realizarse lo más rápido posible después de la insensibilización, del trabado y de la elevación. El degüello y la sangría ocasionan la muerte del animal por pérdida rápida de sangre y la consiguiente falta de oxígeno en el cerebro. La sangría completa tarda seis minutos para todas las especies (Madrid, 1999).

La obtención de la sangre bovina se realiza en la etapa de sangrado vertical y etapas posteriores a la misma. En la recogida de la sangre existe el riesgo de contaminación de la misma con jugos del tubo gástrico, pelos, estiércol, pienso y residuos del animal entre otros. El sangrado se debe efectuar rápido, profuso y completo, debiendo comenzar tan pronto como sea posible y, en cualquier caso, antes de que el animal recobre la conciencia (López y Casp, 2004).

La sangre debe ser de animales aprobados por el control sanitario y recogida en condiciones higiénicas y puede ser utilizada entre dos y tres días después del sacrificio. Para su uso industrial y humano es oportuno conservarla en estado líquido, para lo cual se somete a un proceso de defibrinado por agitación mecánica (Paltrinieri, 2001).

En la sangría solo se recupera más o menos la mitad del volumen de sangre total disponible en el animal. El rendimiento de la sangre obtenida en los vacunos depende del período de inserción del cuchillo de sangría. Con un tiempo de 60 segundos se suele recoger de 10 a 14 L de sangre por bovino adulto, si la sangre sale del animal por impulso propio de los

latidos de su corazón. Si se amplía este tiempo a 90 segundos se suele recoger unos 2 L más de sangre (Ockerman y Hansen, 1994).

El sistema para la recogida de sangre consta de un cuchillo hueco para el degüello que se introduce en el animal, el cual está conectado a una bomba de vacío para succionar la sangre y depositarla en un tanque intermedio. Luego la sangre pasa por un colador y un intercambiador de placas que la enfría en un rango de 4 a 8°C.

El desangrado de los bovinos debe empezar al menos 30 segundos después del aturdimiento. En ciertos países de la Unión Europea la legislación establece 60 segundos (López y Casp, 2004). Si los bovinos son aturdidos con una pistola de perno cautivo, después de 30 segundos se debe buscar signos de insensibilización antes de iniciar el desangrado con el semoviente colgado en el riel de sangría. Entre estos signos se cuenta: desplome inmediato del animal, suspensión de la respiración regular y desaparición del reflejo de la cornea y del parpadeo al tocar el ojo (Veall, 1993).

Se ha determinado que el tiempo máximo para el desangrado después de la insensibilización debe ser de 60 segundos (López y Casp, 2004). El sistema más higiénico de desangrado es de posición vertical con el animal levantado con un tecele hacia un riel sobre el cual puede deslizarse con la ayuda de un gancho, como se muestra en la Figura 1.

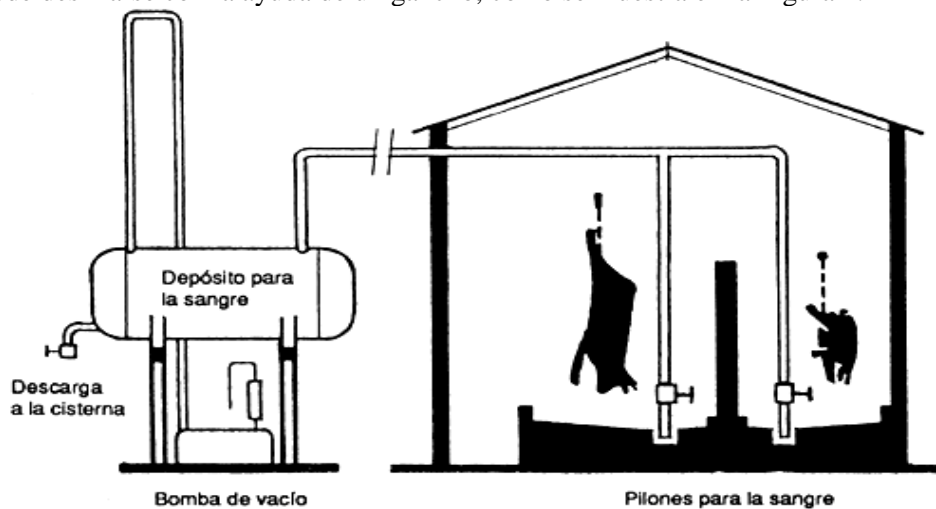


Figura 1. Sistema de sangrado en posición vertical al vacío. Fuente: CPTS (2009).

El desangrado normalmente dura seis minutos y la cantidad media de sangre por bovino es de 10 a 12 L para animales que pesan 400 kg aproximadamente (FAO, 1991). Si la sangre se va a destinar a la obtención de plasma para aplicaciones especiales, es preciso recurrir al sistema cerrado de recogida de la sangre que se ilustra en la Figura 2.

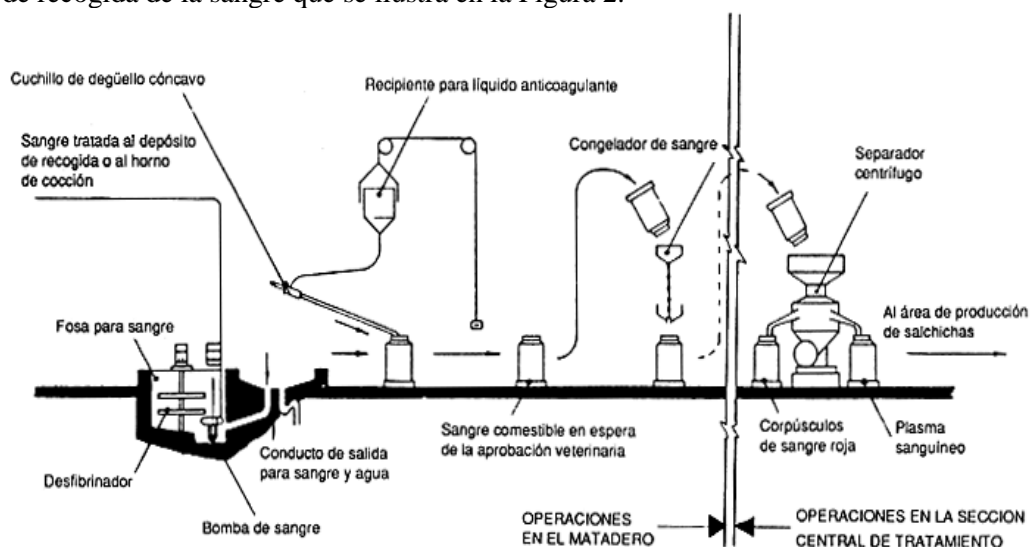


Figura 2. Sistema cerrado e higiénico de recogida de sangre. Fuente: Madrid (1999).

En la mayoría de los mataderos, tradicionalmente se ha aprovechado una mínima parte de la sangre obtenida para la fabricación de morcillas, el gran volumen de ella se destina para la producción de harinas para alimentación animal. Sin embargo, actualmente el mercado de las harinas cárnicas es muy reducido, debido a su prohibición en la producción de concentrados para alimentación de rumiantes, como consecuencia de la crisis ocasionada por la Encefalopatía Espongiforme Bovina (López y Casp, 2004).

Estas restricciones en materia de alimentación de los animales se iniciaron desde julio de 1988, en el Reino Unido en donde se prohíbe la utilización de proteínas derivadas de mamíferos en la alimentación de los rumiantes. Posteriormente esta prohibición entro en vigor en la Unión Europea (UE) en junio de 1994.

En enero de 2001 el reglamento 999 del Consejo de la Unión Europea determina las circunstancias en las que deben eliminarse los subproductos animales a fin de impedir la propagación de riesgos para la salud pública y animal. Asimismo, dicho reglamento específico en qué condiciones pueden emplearse los subproductos animales para la alimentación animal y otros usos diversos, como en cosmética, medicamentos y usos técnicos (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2001). En tal sentido las únicas proteínas de origen animal que se permiten en piensos de rumiantes, son leche, productos lácteos y calostros, huevos y ovoproductos, gelatina derivada de no rumiantes, proteínas hidrolizadas procedentes de partes de no rumiantes y de pieles y cueros de rumiantes.

Igualmente el reglamento prohíbe la utilización de proteínas animales transformadas, de gelatina proveniente de rumiantes, de productos sanguíneos, de proteínas hidrolizadas, de fosfato dicálcico y de fosfato tricálcico de origen animal en la alimentación de animales de cría, con excepción de los carnívoros destinados al aprovechamiento de su piel.

En Colombia cuando la sangre se destine para consumo humano o para elaboración de medicamentos, deberá ser identificada de acuerdo con lo establecido en la reglamentación que para el efecto expedirá el Ministerio de la Protección Social para cada especie. Solo se puede destinarse para consumo humano de forma directa con previa autorización INVIMA, posterior al análisis de laboratorio (Artículo 31 inspección ante y post mortem para las plantas de beneficio) (Ministerio de la Protección Social, 2007).

Una vez obtenida y acopiada la sangre entera en fosa o tanque para tal fin, dependiendo de su uso se puede conservar en su estado natural o recurrir a la separación de la fracción líquida o plasma y paquete celular o glóbulos rojos. En tal sentido se requiere la incorporación de soluciones anticoagulantes (citrato de sodio al 40%, también se puede utilizar como anticoagulante fosfato de sodio o potasio) para aportar 0,8-1% de citrato (CPTS, 2009). Estos anticoagulantes se seleccionan según la finalidad de las determinaciones analíticas, los de mayor uso se muestran en la Tabla 2 como principales anticoagulantes y su concentración requerida.

Los anticoagulantes más comúnmente utilizados en el proceso de separación mencionado anteriormente son el citrato trisódico y el ácido cítrico, en concentraciones del 0,2 % con o sin agua (dos partes de agua por una parte de citrato o cítrico). También se ha empleado como anticoagulante una mezcla de fosfatos con un 22% de ortofosfato, un 22% de difosfato tetrasódico, un 16% de difosfato disódico y un 40% de cloruro sódico (Ockerman y Hansen, 1994).

Todos estos anticoagulantes actúan por diferentes mecanismos de acción. En el caso de la heparina considerada un anticoagulante natural presente en la sangre, su uso se realiza en forma de sales sódicas, líticas o cálcicas, las cuales inhiben la conversión de protrombina en trombina evitando así la coagulación de la sangre. El oxalato de sodio y potasio actúa precipitando el calcio necesario para la coagulación. El citrato sódico convierte el calcio en formas no ionizadas, previniendo la coagulación. El ácido etilen-diaminotetracético, cloruro de potasio (EDTA) actúa como quelante de calcio (Ockerman y Hansen, 1994).

También se ha reportado el efecto anticoagulante de enzimas proteolíticas a través de la hidrólisis de la fibrina (Quaglia y Massacci, 1982).

Igualmente se realizó estudio de la eficiencia del tripolifosfato de sodio como anticoagulante a diferentes concentraciones en sangre de ave, cerdo y bovino, comparado con

un control con citrato de sodio. Los resultados mostraron que el tripolifosfato de sodio es tan eficiente como el citrato de sodio como agente anticoagulante (Rangel *et al.*, 1995).

Tabla 2. Principales anticoagulantes y concentraciones requeridas.

<i>Anticoagulantes</i>	<i>Concentración</i>	<i>Referencia</i>
Heparinato de amonio, litio o sodio	0,2 a 0,75 mg o 10 unidades / mL sangre	Álvarez (2001)
EDTA disódico (ácido etilen-diaminotetracético), cloruro de potasio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 mg / mL de sangre, 0,02 mL de una solución de 5 g en 100 mL de H<sub>2</sub>O / 100 mL de sangre.</li> <li>• 2ml de solución al 10% /100 mL de sangre.</li> </ul>	Álvarez (2001)  Silva y Silvestre (2003)
Fluoruro sódico	2 mg / mL	Álvarez (2001)
Citrato sódico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solución de 2,0 y 2,50% / L sangre</li> <li>• 5 mg / L de sangre, un volumen de una solución de 3,8 g de citrato de sodio dihidratado en nueve volúmenes de sangre.</li> <li>• 0,10-0,15 y 0,20 g/ 100 mL de sangre</li> <li>• 0,60%</li> <li>• 2% p/v</li> </ul>	Isaza Rengifo <i>et al.</i> (2010)  Álvarez (2001)  Rangel <i>et al.</i> (1995)  Hyun y Shin (1998) Barboza <i>et al.</i> (1994)
Oxalato de sodio	1 – 2 mg / L de sangre, un volumen de una solución de 0,75 g de oxalato de sodio en nueve volúmenes de sangre	Álvarez (2001)
Polietanolsulfonato sódico	1,25 mg / mL de sangre	Álvarez (2001)
Ácido cítrico	0,20 %	Álvarez (2001) Ockerman y Hansen (1994)
Mezcla de fosfatos	22% de ortofosfato, un 22% de difosfato tetrasódico, un 16% de difosfato disódico y un 40% de cloruro sódico	Ockerman y Hansen (1994)
Tripolifosfato de sodio	0,10-0,15 y 0,20 g/ 100 mL de sangre	Rangel <i>et al.</i> (1995)

### 3.3 Aprovechamiento de sangre bovina

Uno de los principales subproductos obtenidos en la etapa de sangría de animales de abasto público es la sangre, por su contenido en cantidad y calidad de proteínas. La sangre recolectada higiénicamente en los mataderos en el mundo tiene muchas posibilidades de

aprovechamiento, ya sea de forma entera o fraccionada, en la industria alimenticia, farmacéutica, entre otras.

En los países en vía de desarrollo el acceso a proteínas de origen animal se ha dificultado por su elevado costo. A escala mundial se viene presentando un déficit de oferta de proteína animal de debido al creciente aumento de la población mundial (Rodríguez Furlán *et al.*, 2011). Por este motivo ha cobrado importancia en los últimos años, el aprovechamiento de la sangre y sus subproductos.

Otro factor importante para promover el aprovechamiento de los subproductos del sacrificio de animales de abasto público, hace referencia a su efecto producido a nivel ambiental en el mundo. Las plantas de sacrificio o mataderos generan volúmenes muy elevados de sangre, uno de los residuos más contaminantes debido a su alta cantidad de sólidos totales (18%), a su elevada demanda química de oxígeno (DQO) de 500.000 mg O<sub>2</sub> / L (Del Hoyo *et al.*, 2007b) y o su alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) de 150.000 a 200.000 mg O<sub>2</sub> / L (Signorini, 2007).

En Colombia el tratamiento dado a los subproductos cárnicos es escaso y en la mayoría de las situaciones se opta por la contaminación ambiental. Esta situación se genera por las limitaciones de cumplir requerimientos sanitarios exigidos por las autoridades competentes de vigilancia y control (INVIMA) y protección a la salud pública (Ministerio de Salud y Protección Social). En consecuencia para dar cumplimiento a dichos requerimientos, se requiere de inversiones altas frente al bajo volumen de operación de sacrificio de la mayoría de plantas de beneficio en Colombia, situación que no las hace económicamente viables.

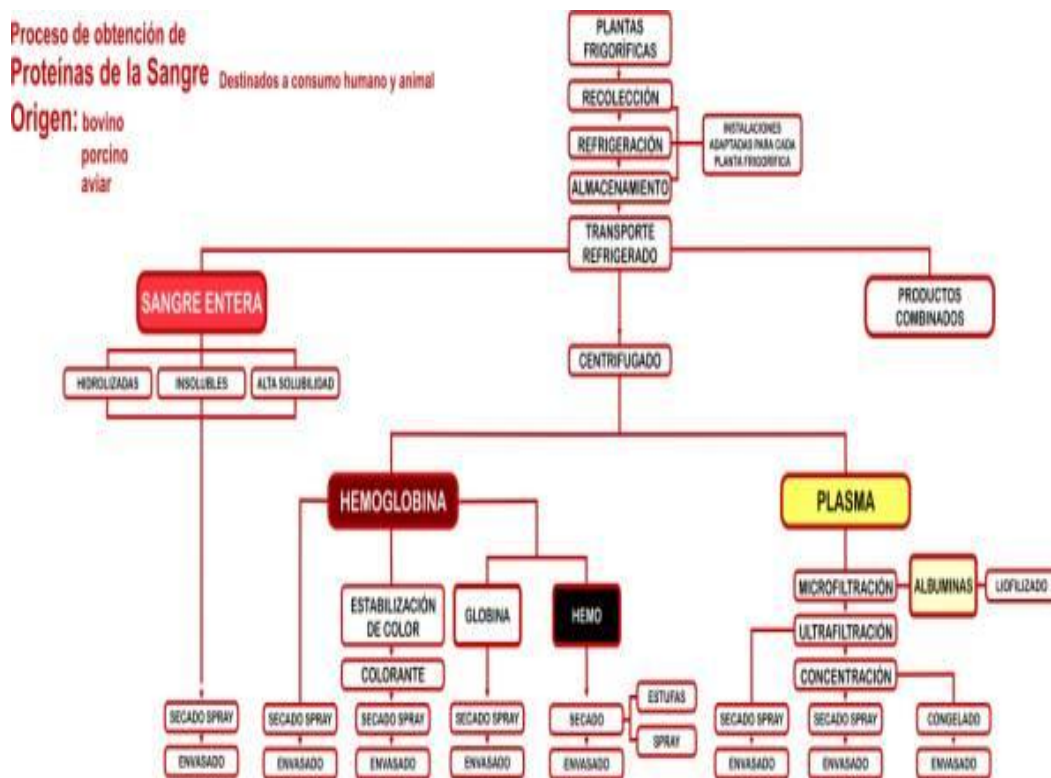


Figura 3. Proceso de separación de los constituyentes de la sangre bovina. Fuente: Ockerman y Hansen (1994).

Lo anterior ocasiona cierres temporales y definitivos de mataderos, así como de sanciones y multas. Esto sugiere mejorar el aprovechamiento de los subproductos del beneficio animal orientado a productos de alto valor agregado, que permitan el mejoramiento de la cadena cárnica en Colombia.

Según el DANE (2013), en Colombia, en el año 2012 se sacrificaron 4.124.658 cabezas de ganado vacuno, lo que indica un potencial anual de producción de sangre entera bovina de aproximadamente 55.700.000 L para su aprovechamiento en distintas formas.

De acuerdo a la investigación técnica realizada, se han identificado principalmente cuatro sistemas de aprovechamiento de la sangre animal; la separación en plasma y corpúsculos o hemoglobina, la obtención de harina de sangre por eliminación de agua, la producción de sangre soluble y la producción de plasma en polvo (Madrid, 1999). A continuación se describe en la Figura 3, el proceso de obtención de las proteínas de la sangre bovina, porcina y aviar.

### 3.3.1 Obtención de harina de sangre

La harina de sangre se considera una proteína animal transformada derivada del tratamiento térmico de la sangre o partes de sangre.

Parte de la importancia nutricional de la harina de sangre como una de las materias primas utilizadas en alimentación animal, se fundamentan en su contenido de lisina. La lisina presenta unas características nutritivas muy especiales que no existen en los restantes aminoácidos esenciales.

Al igual que todos los aminoácidos, la lisina es necesaria para la síntesis de las proteínas a nivel celular y puede servir como aporte de grupos amino (- NH<sub>2</sub>) para la síntesis de otros aminoácidos (Waldroup, 1985).

Lo que hace de gran importancia en la alimentación animal a la harina de sangre, es su contenido de lisina, el cual se constituye en una fuente potencial de aminoácido esencial para nutrición animal en la etapa de iniciación (Waldroup, 1985). En la Tabla 3 de contenido de lisina de algunos concentrados proteicos, se puede apreciar el alto valor de lisina en harina de sangre deshidratada y algunos concentrados proteicos de origen vegetal.

Tabla 3. Contenido de lisina de algunos concentrados proteicos.

<i>Alimentos</i>	<i>% Proteína</i>	<i>% Lisina</i>	<i>% Lisina en la proteína</i>
Harina de sangre deshidratada	85,9	7,56	8,80
Caseína	84,0	7,14	8,50
Harina de pescado (anchoas)	65,5	5,04	7,69
Guisantes desecados	22,5	1,54	6,84
Soya -extracción con disolvente	49,7	3,17	6,37
Semillas de soya	38,0	2,4	6,31
Harina de carne y huesos	50,4	2,9	5,75
Harina de colza	37,0	1,98	5,35
Alfalfa	20,2	0,90	4,45
Tota de algodón -extracción con disolventes-	41,3	1,89	4,41
Torta de girasol	46,3	1,92	4,15
Torta de maní	48,1	1,5	3,11
Harina de cártamo descortezado	4,3	1,27	2,95
Torta de sésamo	45,5	1,27	2,79
Harina de gluten de maíz	60,07	1,01	1,66

Fuente: Waldroup (1985).

Las principales fuentes de proteína utilizadas en la formulación de piensos pueden ser de origen vegetal o animal. Las de origen animal suelen ser más equilibradas a nivel de aminoácidos y más digestibles que las de origen vegetal. Entre ellas, las harinas de pescado procesadas y los subproductos sanguíneos son muy digestibles y suelen ser de elección en edades tempranas debido a su precio. Sin embargo, el suero lácteo (en el caso de alimentación líquida) y la harina de carne pueden utilizarse en todas las fases productivas, aunque a niveles bajos.

La prohibición del uso de harinas de carne y huesos en concentrados de animales no rumiantes en la UE en el año 2000 provocó un incremento del uso de harina de soja como principal fuente de proteína en concentrados. En la actualidad, la proteína de soja es difícilmente sustituible en el mercado de materias primas. Esto, unido al hecho de que la mayoría de la soja que utiliza Europa es importada, supone que la UE tenga una enorme dependencia de los mercados internacionales.

La UE se está replanteando flexibilizar esta prohibición y reautorizar la utilización de proteínas animales procesadas en piensos para monogástricos.

Según el reglamento del Consejo Europeo (CE) N°1069 /2009, la sangre de animales distintos de rumiantes que precisen pruebas de diagnóstico de Encefalopatía Espongiforme Trasmisible (EET) y rumiantes sometidos a pruebas de diagnóstico con resultado negativo se clasifican según el riesgo que generan para la salud pública y animal en categoría 3 o de menor riesgo. Estos subproductos deben ser sometidos a métodos de transformación especial para su uso en la fabricación de alimentos crudos para animales de compañía y productos técnicos (Consejo Europeo, 2009).

Para la utilización de la sangre en alimentación de algunas especies animales se requiere recurrir a su conservación. El secado es un método de conservación de la sangre y tiene igualmente como objeto principal la obtención de harina de sangre de buena calidad nutricional y microbiológica. La harina de sangre es utilizada principalmente en la industria avícola, porcícola y piscícola como suplemento de alimento balanceado en la etapa de iniciación.

Existen numerosos métodos de secado de la sangre desde el secado al sol de poca eficiencia, hasta complejos sistemas de secado como la liofilización que tienen un mayor costo. Dentro de estos métodos, para la obtención de harina de sangre, a partir de sangre cruda de animales de abasto público, los más utilizados y permitidos por el Consejo Europeo, se ilustran en la Tabla 3. Métodos de deshidratación de la sangre animal.

Sin embargo el sistema más utilizado en el mundo, es el secado por aspersion de sangre o plasma sanguíneo bovino, porcino y aviar entre otros. Este sistema en el momento es considerado, como una de las alternativas técnicas más económicas.

En Colombia se ha realizado el diseño de un prototipo de deshidratador de sangre bovina a nivel de laboratorio, en atención a necesidades de aprovechamiento de volúmenes pequeños de sangre en la operación de sacrificio en la mayoría de los mataderos Colombianos. El método propuesto está fundamentado en la deshidratación por agitación o remoción suave y transferencia de calor, como una solución de aplicación en pequeños mataderos municipales del país. El parámetro de comparación fue la humedad aparente de la harina de sangre debido a que este factor depende del flujo de calor, de la velocidad de giro y de la geometría del agitador y sus paletas (Larrotta y Ortega, 2007).

En todos estos procesos se debe determinar los puntos críticos de control, dentro de los cuales debe estar incluido; la dimensión granulométrica, las condiciones de tratamiento térmico (tiempo, temperatura y presión), o la velocidad de alimentación si el proceso es continuo (López y Casp, 2004).

### ***3.3.2 Obtención de proteínas de sangre bovina***

Las proteínas de la sangre presentes en la fracción líquida de ella o plasma sanguíneo, como la albúmina y globulina tienen una gran importancia para la industria alimenticia por presentar propiedades funcionales emulsificantes de grasas, de retención de agua en los sistemas alimentarios, principalmente en emulsiones cárnicas o embutidos de pasta fina. Además dentro de los emulsificantes de origen animal, las proteínas del plasma sanguíneo bovino presenta una

menor actividad emulsificante que la caseína, pero mejor que la de la harina de soya y que las proteínas cárnicas (Ockerman y Hansen, 1994).

Tabla 3. Métodos de deshidratación de sangre bovina.

Método	Condiciones	Observaciones	Referencias
Secado convencional con o sin coagulación y prensado	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proceso discontinuo</li> <li>Calentamiento continuo y prolongado ( 5 a 6 horas) a más de 300°C</li> <li>Formación de incrustaciones sólidas en paredes del secador</li> <li>Humedad final 5% a 10%</li> <li>Eliminación previa de agua por prensado intermedio antes del secado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alto consumo de energía</li> <li>Calidad deficiente producto final (desnaturalización proteínas por exposición prolongada a más de 75°C.</li> <li>Transferencia de calor deficiente.</li> <li>Altos costos de mantenimiento</li> </ul>	Madrid (1999)
Secado centrífugo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coagulación a 90 °C</li> <li>Separación mecánica por decantador centrífugo horizontal, eliminación del 75% humedad.</li> <li>Secado final de 1 a 3 horas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bajos tiempos de secado</li> <li>Elevada calidad de la harina de sangre</li> <li>Alta eficiencia inicial en la eliminación de agua(3/4 partes)</li> </ul>	Madrid (1999)
Secado por aspersión	<ul style="list-style-type: none"> <li>Concentración en evaporador hasta 28% de sólidos</li> <li>Atomización en torre de secado de partículas concentradas (aumento de área de las partículas 700 veces).</li> <li>Temperatura de secado 170°C</li> <li>Diferencial de temperatura en la torre de 90 °C</li> <li>Temperatura final del producto 70 a 80°C</li> <li>Transporte neumático para envasado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alta velocidad de secado</li> <li>Poca exposición al calor de las proteínas</li> <li>Bajo consumo de energía</li> <li>Se alcanza humedades finales de 6 a 4%</li> </ul>	Madrid (1999)
Proceso continuo o discontinuo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tamaño de la partícula &lt; 50 mm</li> <li>Tiempo exposición 20 minutos a temperatura (T &gt; 133°C)</li> <li>Presión ≥ 3 bar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Para material categoría 1 y 3 según Reglamento Consejo Europeo (CE) N°1069/2009</li> </ul>	Consejo Europeo (2009)
Proceso discontinuo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tamaño de la partícula &lt; 150 mm</li> <li>Tiempo exposición 125 minutos a (T &gt; 100°C), 120 minutos a (T &gt; 110 °C) y 50 minutos a (T &gt; 120 °C).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Para material categoría 1 y 3 según Reglamento Consejo Europeo (CE) N°1069/2009</li> </ul>	Consejo Europeo (2009)

La separación de los componentes proteínicos del plasma animal, ha constituido, hasta ahora, un campo de gran importancia en la investigación científica, no sólo desde el punto de vista del conocimiento bioquímico de muchos fenómenos, sino también en su aplicación inmediata a diversas áreas del conocimiento (González *et al.*, 1985).

En general se puede hablar de cinco métodos para la obtención de globina (Ockerman y Hansen, 1994):

- Obtención de globina mediante extracción con solventes
- Obtención de globina por acción enzimática
- Obtención de globina por precipitación con carboximetilcelulosa
- Precipitación del grupo hemo con alginato de sodio
- Decoloración del grupo hemo con peróxido de hidrógeno.

La albúmina bovina ha sido también empleada especialmente en estudios inmunológicos e inmunohematológicos; desde que en 1945 se descubrió su capacidad para promover la aglutinación específica de eritrocitos humanos por anticuerpos IgG (González *et al.*, 1985). Igualmente se utiliza en las pruebas cruzadas de compatibilidad, en la determinación de factor Rh-hr en tubo, como diluyente o estabilizador en estudios con factores de características particulares y en la preparación de estándares para la cuantificación de proteínas o albúminas séricas. Para su obtención se utiliza normalmente el método por precipitación con sulfato de amonio y el de fraccionamiento alcohólico, consiguiéndose mejores resultados de rendimiento y pureza de la albúmina bovina con el fraccionamiento etanólico.



Dependiendo del método empleado para su producción las propiedades de las albúminas comerciales usadas en los laboratorios, difieren unas de otras, estas diferencias son principalmente: la naturaleza y la cantidad de impurezas presentes, la fuerza iónica, el pH y las sustancias unidas a la albúmina tales como iones, lípidos y ácidos grasos (González *et al.*, 1985).

La albúmina de suero bovino como proteína de alta pureza, se encuentra dentro de las materias primas más importantes en las aplicaciones industriales y de investigación para utilizarse como; medio de crecimiento para cultivos de tejidos y células, patrón de proteína, aditivo en diluyentes específicos, producción de vacunas, agente bloqueador en inmunoensayos, estabilizador de proteínas, aplicaciones en biología molecular (BovoGen, Australia).

### 3.3.3 Utilización de la sangre en sectores no alimentarios

Son diversos los usos que se le ha dado a la sangre de los animales de abasto público, desde el empleo en alimentos, concentrados, material de laboratorios, en aplicaciones médicas, aditivo industrial y fertilizante entre otros. Los constituyentes de la sangre bovina en los laboratorio son las fuentes más comunes de proteínas para medios de cultivo celular y componente de diferente tipos de agar para fines bacteriológicos. Estos componentes modificados de la sangre bovina también se emplean en el ensayo biológico de la heparina y como soluciones patrón de proteínas en la calibración de equipos en hematología (Ockerman y Hansen, 1994).

En la industria de los pegantes se utiliza como aditivo por su capacidad para formar películas en papeles, litografías, fibras y plásticos y como componente de algunos adhesivos. En la Tabla 4 se presentan los principales usos en sectores no alimentarios. La sangre también se aprovecha como fertilizante del suelo, ayudando al aporte de nitrógeno y a la formación de humus para mejorar la estructura del mismo.

Tabla 4. Usos de la sangre bovina en aplicaciones no alimentarias.

<i>Usos</i>	<i>Aplicaciones</i>
Fertilizantes	Revestimiento de semillas, estabilizante del pH del suelo, componentes minerales.
Laboratorio	Medios de cultivo, análisis de taninos, carbón activado, hemina agar sangre, peptonas, glicerofosfatos, albúminas, globulinas, esfingomielina, catalasa.
Medicina	Pruebas de aglutinación, inmunoglobinas, técnicas de fraccionamiento, factores de coagulación, suturas, fibrinógeno, productores de fibrina, serotonina, plasminógeno, aditivos de plasma.
Industria	Adhesivos, aditivos para resinas, finalizadores para cuero y tejidos, coadyuvantes en insecticidas pulverizables, hormigón poroso, sustituto de la clara del huevo, extintores de incendios, fabricación de cerámica y plástico, formulaciones base de plásticos y cosméticos.

Fuente: modificado de Divarkaran (1980).

### 3.4 Aprovechamiento de plasma bovino sanguíneo

El plasma bovino sanguíneo es una fuente potencial de proteínas de alto valor nutricional, biológico e industrial. Encontrar aplicaciones de sus proteínas en más sistemas alimentarios, constituye una tarea relevante para los investigadores de la industria alimenticia. La incorporación del plasma sanguíneo bovino en alimentos contribuye al mejoramiento de su valor nutricional de una manera relativamente significativa y económica, por la alta disponibilidad de esta fuente de proteína en el mundo y en Colombia. Para ilustrar con mayor detalle su potencial como fuente de proteína, en la Tabla 1 se muestra la composición de la sangre,

plasma líquido y paquete celular bovino (g/100 mL) y en la Tabla 5 las propiedades físico-químicas más importantes de algunas proteínas del plasma.

### 3.4.1 Obtención del plasma bovino

Para la obtención del plasma sanguíneo se debe partir de sangre de animales sanos y en condiciones higiénicas adecuadas. Inmediatamente después la sangre debe mezclarse con anticoagulantes y transportarse a tanques de refrigeración a baja temperatura (5°C) hasta la planta de procesamiento (López y Casp, 2004). Posteriormente se somete a centrifugación para separar por un lado el plasma (60-70% de la sangre original) y por otro lado paquete celular o glóbulos rojos (30-40%) tal como se observa en la Figura 2 de la Sección 2.2. (Obtención de sangre de bovino). Tanto el plasma como el paquete celular sanguíneo obtenido pueden conservarse en refrigeración o congelación o someterse a secado por aspersión lo cual permite la obtención de productos con sus proteínas intactas y completamente solubles y con una óptima calidad microbiológica y bromatológica.

Tabla 5. Propiedades físico-químicas de algunas proteínas del plasma.

<i>Proteína</i>	<i>Punto isoelectrico</i>	<i>Peso molecular</i>
Albúmina	-	61.000
Albúmina sérica	4,70	69.000
$\alpha$ -Globulinas		
$\alpha$ -Globulinas	5,06	200.000-300.000
$\alpha$ -ácido glucoproteína (orosomucoide)	2,70	44.100
$\alpha$ -lipoproteínas	-	435.000
Haptoglobina	4,10	85.000
$\alpha$ -2-glicoproteína	3,80	-
Plasminógeno	5,60	143.000
Ceruloplasmina	4,40	151.000
$\beta$ - Globulinas		
$\beta$ -Globulinas	5,12	93.000
$\beta$ -lipoproteína	-	3.2 x 10 <sup>6</sup>
Transferrina	4,40	88.000
$\gamma$ -Globulinas		
$\gamma$ -Globulinas	6,85	160.000
Fibrinógeno	5,80	330.000

\* Separado por efecto salino con NaCl 1.5 M.

Fuente: Hauowitz (1959, 1963)

### 3.4.2 Propiedades funcionales del plasma sanguíneo bovino

Las propiedades funcionales se definen como aquellas propiedades físico-químicas de los componentes de los sistemas alimentarios que son relevantes desde el punto de vista de su producción y procesamiento, las cuales afectan y modifican las características de un alimento contribuyendo a la calidad final del producto.

Tabla 5. Aplicaciones del plasma sanguíneo bovino en sistemas alimentarios

<i>Propiedad Funcional</i>	<i>Sistemas Alimentarios</i>	<i>Referencias</i>
Gelificación	Galleta –harina de yuca	Benítez <i>et al.</i> (2008)
Emulsificación	Salchichón de pollo Embutido de pollo Jamón cocido Mayonesa	Isaza Rengifo <i>et al.</i> (2010) Márquez <i>et al.</i> (2006) Rodas <i>et al.</i> (1998) Rodríguez (1986)
Fijación de agua	Sistema modelo	Silva y Silvestre (2003)
Textura Color Aroma Sabor	Masa harina galletas Producto cárnico de pollo	Barboza <i>et al.</i> (1994) Benítez <i>et al.</i> (2002)
Sustitución de grasa	Paté	Viana <i>et al.</i> (2005)
Estabilizante	Carne de res, cerdo y pollo	Márquez <i>et al.</i> (2008)

#### 3.4.2.1 Propiedades emulsificantes

Una propiedad funcional de superficie de las proteínas empleadas en los alimentos es la emulsificación. Para los sistemas aceite/agua, las proteínas tienen un buen comportamiento a diferencia de los sistemas agua/aceite o compuestos lipófilico-hidrófilo en donde no actúan adecuadamente y el mecanismo de emulsificación consiste en la orientación de los aminoácidos apolares hacia la fase lipídica y la de los polares hacia la fase acuosa (Badui, 1993).

En tal sentido Satterlee *et al.* (1973), estudiaron la capacidad de emulsificación con proteínas de sangre en polvo para ser utilizada en la emulsificación de productos cárnicos; posteriormente Caldironi y Ockerman (1982) estudiaron la capacidad emulsificante de la carne, el plasma y las globinas, así como diferentes mezclas. De estos estudios se concluyó que las proteínas del plasma tienen unas propiedades de emulsificación muy aceptables, ya que ésta fue equivalente a la de la carne, cuando las pruebas de emulsificación se realizaron a concentraciones de 0,4% de la proteína total. Igualmente se encontró que es factible la sustitución de carne por el plasma como agente emulsificante. Sin embargo, estos autores advirtieron que es importante observar que a medida que se reducen los niveles de carne, disminuye la estabilidad de las emulsiones principalmente en aquellas donde no se utiliza plasma para compensar la disminución de carne.

Como fuente de proteína funcional en el procesamiento de alimentos para consumo humano algunos autores han estudiado ciertas propiedades funcionales del plasma sanguíneo bovino con adición de tripolifosfatos y para la emulsificación y sustitución de grasa en sistemas alimentarios. En dicha vía Rangel *et al.* (1995), realizaron un estudio para evaluar el efecto del tripolifosfato en el proceso de coagulación y propiedades emulsificantes del plasma de ave, cerdo y bovino. Los resultados indicaron que el tripolifosfato es efectivo como anticoagulante. En concentración de 0,2% en sangre se evita la coagulación de la sangre de cerdo y bovino, mientras que para ave solo se necesita 0,1%. La capacidad y estabilidad de las emulsiones no se vieron afectadas por la adición de tripolifosfato.

En la misma vía, Ornellas *et al.* (2001), con el objetivo de utilizar el plasma sanguíneo bovino como agente funcional en los alimentos, estudiaron el efecto de la hidrólisis enzimática y el pH sobre la solubilidad, hidrofobicidad y capacidad para formar y estabilizar emulsiones,

del plasma en el intervalo de pH 3,0 a 8,0. Para este caso se determinaron la capacidad emulsionante (CE), el índice de actividad emulsionante (EAI) y la estabilidad de la emulsión (ES). Se utilizó como proteasa la tripsina para preparar cinco hidrolizados enzimáticos. Los resultados mostraron que la hidrofobicidad y EAI se afectaron a un valor máximo de pH 3,0 y 7,0, respectivamente, mientras que las otras propiedades prácticamente no se vieron influenciadas por la variación del pH. La hidrólisis con tripsina produjo una reducción de la solubilidad y la CE, que no mostró ningún efecto sobre EAI y ES y mejoró sólo la hidrofobicidad en algunos períodos de reacción.

Silva y Silvestre (2003) realizaron un trabajo investigativo modelo muy similar al anteriormente descrito con el fin de determinar el efecto del pH, la hidrólisis enzimática y la adición de NaCl sobre la solubilidad, hidrofobicidad y propiedades emulsionantes de plasma sanguíneo bovino. Los resultados mostraron que la hidrofobicidad y el índice de actividad emulsionante (EAI) de plasma de sangre bovina alcanzaron un máximo a pH 3,0 y 7,0, respectivamente, mientras que los otros parámetros permanecieron casi constantes con cambio de pH. La hidrofobicidad, hidrólisis enzimática a diferentes tiempos, la solubilidad y la capacidad emulsionante (CE) no mostraron ningún efecto sobre EAI y la estabilidad de la emulsión (ES). La influencia de NaCl probada a pH 5,0 y 6,0 fue beneficiosa al EAI del plasma a pH 5,0 en la formulación y redujo significativamente la solubilidad, hidrofobicidad y la CE a pH 5,0 y 6,0. Para ES, la adición de NaCl no produjo ninguna modificación el efecto de la hidrólisis enzimática y el pH en las propiedades funcionales de plasma bovino.

#### **3.4.2.2 Propiedades gelificantes**

Las reacciones de asociación de proteínas se refieren a cambios producidos a nivel molecular o de subunidades. El proceso de agregación ordenada de proteínas desnaturalizadas para formar una red proteica se le denomina gelificación (Fennema, 1993). Esta propiedad de las proteínas se utiliza en los sistemas alimentarios no solo para formar geles sólidos viscoelásticos, sino también para mejorar la absorción de agua, los efectos espesantes, la fijación de partículas (adhesión) y para estabilizar emulsiones y espumas.

El grado de gelificación de algunas proteínas, como las del plasma sanguíneo bovino, se puede predecir midiendo la hidrofobicidad correspondiente, pues esta característica favorece la interacción proteína-proteína; en el caso de la asociación de la albúmina de suero bovino, se ha comprobado que los enlaces disulfuro que se presentan en la creación del gel dependen del pH. Estos enlaces desaparecen por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas, dando lugar a los enlaces hidrófobos e hidrófilos. Se ha encontrado que la dinámica de gelificación es variable y no todas las proteínas la producen en las mismas condiciones, modificando la rigidez y la textura de cada gel (Badui, 1993).

Cuando el plasma sanguíneo bovino obtenido por centrifugación se emplea en la elaboración de emulsiones cárnicas o embutidos de pasta fina (embutido tipo salchichón), se reduce la retracción, aumenta los rendimientos o disminución de las pérdidas por cocción (aproximadamente 4-5%), aumenta la humedad y la textura del producto mejora debido a las propiedades gelificantes del plasma (Isaza Rengifo *et al.*, 2010)

Silva y Silvestre (2003), propusieron un estudio modelo de las propiedades funcionales del plasma sanguíneo bovino, en el cual se estudió el efecto de la hidrólisis enzimática, el pH y la adición de NaCl sobre la hidrofobicidad del plasma sanguíneo bovino, como medida de predicción del grado de gelificación. Lo anterior con el objeto de utilizar sangre bovina como ingrediente funcional. Se encontró que la hidrofobicidad del plasma se ve afectada significativamente a pH cercano a 3.

#### **3.4.2.3 Mejorador de textura y propiedades sensoriales**

Son diversas las aplicaciones del plasma sanguíneo bovino en la industria alimenticia, como mejorador de atributos sensoriales. Cuando el plasma sanguíneo bovino se utiliza a concentraciones superiores al 2% en embutidos, se adquiere una textura elástica como la de

goma. En productos de panadería el plasma tiene una gran capacidad espumante similar a la de la albúmina de huevo y de inflamiento por lo cual se ha propuesto su uso en esta industria como sustituto de la clara de huevo (Ockerman y Hansen, 2000).

Entre los trabajos dirigidos a la utilización del plasma como mejorador de textura, cabe destacar el realizado por Yousif *et al.* (2002) para evaluar el efecto de la incorporación de plasma sanguíneo bovino secado sobre el color, textura, aroma y sabor a una masa de harina de galletas. Los resultados de la evaluación sensorial indicaron que la adición de plasma secado mejoró la textura y intensidad de: color, aroma y sabor. Las evaluaciones subjetivas y objetivas de las formulaciones de las galletas con harina mezclada con plasma secado indicaron que la formulación de pasta que contiene 2,2 g/100 g de este plasma dio un balance entre el contenido de proteína de la pasta y aceptabilidad organoléptica.

#### **3.4.2.4 Retención de agua**

Las proteínas por ser sustancias polares, se hidratan en soluciones acuosas. Este grado de hidratación (agua de hidratación / g proteína) es variable. Por ejemplo para la albúmina de huevo (en sulfato amónico) es de 0, 22; para la  $\beta$ -lactoalbúmina 0,8 y para la hemoglobina 0,3 (Grosch y Belitz, 1997).

La absorción de agua (también llamada afinidad o fijación de agua), el hinchamiento, la humectabilidad y la capacidad de retención de agua se ven influenciadas por factores como la concentración proteica, el pH, la temperatura el tiempo, la fuerza iónica y la presencia de otros componentes que toman parte en las interacciones proteína- proteína y proteína-agua (Fennema, 1993).

Para la determinación de las propiedades de hidratación se utilizan cuatro grupos de métodos: (a) método de la humedad relativa que mide la cantidad de agua absorbida a una  $a_w$  dada, (b) método instrumental de hinchamiento (aparato de Bauman), consistente en un capilar graduado, unida a una placa de vidrio porosa a través de la cual se absorbe espontáneamente el agua, y permite determinar tanto la intensidad como la velocidad de hidratación, (c) método de agua en exceso en el cual la muestra se somete a una cantidad de agua en exceso de la que la muestra puede retener y separar luego la retenida de la que no lo ha sido, mediante filtración o aplicación de una fuerza centrífuga moderada y (d) método de saturación, en el cual se determina por centrifugación la cantidad de agua necesaria para lograr el estado de saturación de la proteína (Fennema, 1993).

Silva y Silvestre (2003) con el fin de estudiar las propiedades funcionales del plasma sanguíneo bovino para su uso como un ingrediente funcional en alimentación humana, realizaron un estudio tipo modelo que incluyó el efecto del pH, la hidrólisis enzimática y la adición de NaCl sobre la hidrofobicidad proteica. Los resultados obtenidos establecieron que la retención de agua del plasma se ve afectada significativamente por el pH, el valor más alto se alcanzó a pH 3.

#### **3.4.3 Suplementación proteica con plasma bovino**

El plasma sanguíneo bovino constituye una fuente importante de proteína animal, por lo que se ha planteado su utilización para suplementar alimentos. Lo anterior, considerado que el plasma ofrece una elevada disponibilidad de una fuente de proteína animal de alta calidad nutricional y de relativo bajo costo.

Benítez *et al.* (2000) y Benítez *et al.* (2002) realizaron estudios preliminares para formular y evaluar características de productos cárnicos elaborados con carne de pollo mecánicamente deshuesada (CPDM) con incorporación de plasma sanguíneo bovino (PSB) y glóbulos rojos (GR) de sangre bovina. Considerando la importancia nutricional y el aprovechamiento de los constituyentes básicos de la sangre entera bovina como el plasma sanguíneo bovino y los glóbulos rojos en la formulación de embutidos. Se evaluaron el rendimiento del producto, humedad, proteínas, aminoácidos y calidad microbiológica de los productos. Para este propósito se estructuró un producto control (A) con 53,97 % de carne de

pollo deshuesada mecánicamente y 20% de plasma sanguíneo bovino. Los tratamientos B y C se formularon con 48,68% de CPDM, 20% de PSB y 2% GR para el tratamiento B y 1,5% de GR para el tratamiento C. El tratamiento D fue formulado con 40% CPDM, 30% de PSB y 1,5 % de GR. Los resultados no mostraron diferencias significativas en el rendimiento del producto, humedad, proteínas, y calidad microbiológica de los cuatro productos formulados. Lo anterior indica que las proteínas del PSB pueden ser utilizadas para sustituir las proteínas de la carne. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Márquez *et al.* (1995), quienes sustituyeron 50% de carne de res por PSB, en la elaboración de productos cárnicos emulsificados, sin afectar el rendimiento y contenido de proteico del producto final.

Posteriormente, Benítez *et al.* (2002) realizaron la evaluación de la calidad nutricional y aceptabilidad del producto formulado con carne de pollo deshuesada mecánicamente, plasma y glóbulos rojos de bovino, mencionados anteriormente. En donde se encontró que las proteínas del producto son altamente digeribles con un 92,40 % de digestibilidad aparente y un índice de eficiencia proteica probado en ratas de 2,18 g de peso por cada gramo de proteína ingerida, lo que sustenta que las fuentes de proteínas utilizadas en la formulación del producto, son capaces de favorecer y sustentar el crecimiento de animales jóvenes.

En el 2008 investigadores en la industria alimenticia propusieron la suplementación de harina de yuca con plasma sanguíneo bovino en sustitución de la harina de trigo para elaboración de un producto panificable (galleta) y se evaluó la composición proximal y las características microbiológicas de este producto. Concluyéndose que este tipo de producto tuvo alta aceptabilidad sensorial y microbiológica y es susceptible de ser elaborado en países en desarrollo, utilizando harina de yuca en sustitución de harina de trigo y enriquecido por un subproducto con proteína de alto valor biológico, como el plasma sanguíneo bovino. Una ración de 100g de galleta formulada con harina de yuca y plasma bovino sanguíneo aporta 10 a 11% de los requerimientos proteicos diarios para un escolar de 10 a 12 años. También en el estudio se observó una diferencia significativa en el porcentaje de grasa entre la galleta comercial (con harina de trigo) y la formulada con harina de yuca y plasma que presentó un menor contenido de grasa.

También en Colombia en investigaciones más recientes se ha estudiado el aprovechamiento de plasma sanguíneo bovino en la alimentación humana, incorporándolo a los alimentos como fuente de proteína de bajo costo. Así, Isaza Rengifo *et al.* (2010) investigaron la influencia del método de extracción, purificación y concentración del plasma bovino hidratado como reemplazo de la proteína cárnica en la elaboración de salchichón de pollo tipo Frankfurt, comparado con una fuente comercial por medio de análisis bromatológico, microbiológico, sensorial e instrumental. Encontrándose que el plasma obtenido por centrifugación presenta mayor porcentaje de proteínas que el obtenido por la empresa comercial y que el incremento en la incorporación de plasma sanguíneo bovino muestra una disminución en el porcentaje de grasa en el producto final formulado y una disminución de mermas o aumento de rendimiento después del tratamiento térmico del producto. La evaluación microbiológica del producto formulado con plasma sanguíneo bovino hidratado demostró el cumplimiento de los requisitos sanitarios y no presenta riesgo para el consumidor.

Se reporta un estudio reciente de crioprotección de la estructura nativa, relacionada con las propiedades funcionales de las proteínas del plasma sanguíneo bovino, para lo cual Rodríguez Furlán *et al.* (2012) propusieron la utilización del oligosacárido inulina como agente protector y se comparó con la glucosa y la sacarosa, durante la liofilización. En este estudio, la estabilidad térmica de la proteína se investigó en un intervalo de concentración de azúcar protector de 5-15% (w / v), y a diferentes pH. Los resultados de las propiedades de las proteínas térmicas (temperatura de desnaturalización y entalpía), demostraron que la transición endotérmica desplaza a temperaturas más altas, siendo el efecto estabilizador: inulina mayor que el de la glucosa y la sacarosa. Los cambios en las propiedades funcionales pueden determinar el uso de una proteína como un aditivo a un producto alimenticio o invalidar su uso. Todas las muestras tenían buen funcionamiento propiedades y por lo tanto se podría utilizar en la formulación de productos alimenticios. Los resultados también mostraron que el intercambio iónico y UF mejora la capacidad emulsionante mientras que tiene poco efecto sobre las otras propiedades funcionales.

### 3.4.4 Plasma como componente de medios para cultivos sumergidos

El plasma sanguíneo bovino tiene un contenido importante de proteínas (ver Tabla 1), las cuales pueden servir como fuente de nitrógeno en medios de cultivo para fermentaciones sumergidas industriales. De esta manera, el plasma puede aprovecharse en la industria microbiológica para la obtención tanto de biomasa celular (por ejemplo, en el caso de los cultivos iniciadores), como para la obtención de diferentes metabolitos).

#### 3.4.4.1 Cultivo de bacterias probióticas

En la búsqueda de medios de cultivo económicos para la producción de *Lactobacillus* sp., varios investigadores han estudiado la posibilidad de sustituir los componentes nitrogenados del medio comercial MRS (Man, Rogosa y Sharpe) por las proteínas del plasma sanguíneo bovino enteras o hidrolizadas enzimáticamente. Este medio contiene como fuentes de nitrógeno peptona, extracto de carne y levadura que proporcionan los niveles adecuados de este elemento para el crecimiento de lactobacilos. Como fuente de carbono contiene dextrosa o glucosa, fosfato de sodio como regulador del pH y como inhibidor de bacterias gram negativas acetato de sodio. En la Tabla 6 se ilustra la composición del medio MRS en g / L.

Tabla 6. Composición típica del medio MRS en g / L.

Componente	Cantidad
Polipeptona	10,00 g
Extracto de carne	10,00 g
Extracto de levadura	5,00 g
Glucosa	20,00 g
Tween 80	1,08 g
Fosfato diácido de potasio	2,00 g
Acetato de sodio	5,00 g
Citrato de amonio	2,00 g
Sulfato de magnesio	0,20 g
Sulfato de manganeso	0,05 g
pH: 6,4 ± 0,2 8 a 25°C	

Fuente: Man *et al.* (1960).

Se han reportado pocos estudios de utilización del plasma sanguíneo bovino como sustrato de medio de cultivo a fin de promover la producción de productos de valor agregado en la industria cárnica. Entre ellos, Barboza *et al.* (1994) y Hyun y Shin (1998) propusieron la utilización del plasma de sangre bovina obtenida de mataderos para la producción económica de medios de cultivo para el crecimiento de lactobacilos. Barboza *et al.* (1994), utilizaron plasma sanguíneo bovino entero como fuente de nitrógeno orgánico a diferentes niveles de incorporación (25%, 50% y 75%), adicionando dextrosa o sacarosa como fuente de carbono para la elaboración de un medio de cultivo a base de plasma de bovino y lo enriquecieron con extracto de levadura. Se comparó la eficiencia del medio elaborado con plasma sanguíneo bovino con un medio comercial (MRS). Los resultados mostraron que la incorporación del plasma bovino sanguíneo como fuente de nitrógeno y la adición de sacarosa o dextrosa como fuente de carbono, es suficiente para soportar un crecimiento adecuado de *L. plantarum* y *L. casei*.

Hyun y Shin (1998) propusieron la utilización del plasma sanguíneo bovino para la producción económica de probióticos, en especial *Lactobacillus* sp., también estudiaron la tasa de sobrevivencia de las cepas producidas en este medio contra el proceso de liofilización. Para tal fin se prepararon hidrolizados enzimáticos de plasma de sangre bovina usando una proteasa seleccionada industrialmente (alcalasa). Este hidrolizado sustituyó la fuente de nitrógeno orgánico en un medio complejo (MRS) para la elaboración del medio de cultivo a base de plasma de bovino. Igualmente se comparó el crecimiento celular de *Lactobacillus* sp. entre el medio a base de hidrolizados de plasma sanguíneo bovino y un medio comercial MRS La producción de masa celular de cepas de *Lactobacillus* sp en el medio a base de hidrolizados de

plasma sanguíneo bovino fue significativamente alta  $5,2 \times 10^9$  UFC / mL. El hidrolizado de proteína de la sangre en el medio también mejoró la tasa de supervivencia de la cepa contra liofilización y la sacarosa fue seleccionada como el estabilizador más eficaz del medio contra el mismo proceso.

#### **3.4.4.2 Componente de medios de cultivos especiales**

El plasma sanguíneo bovino puede suministrar también nutrientes valiosos para medios de cultivo especiales requeridos para la producción de sustancias de interés farmacológico. En particular, se ha patentado la utilización del plasma sanguíneo bovino en medios líquidos de fermentación para la producción de ácido hialurónico (Chong y Mun, 1988), el cual es ampliamente utilizado en cirugías estéticas y en la industria cosmética. Asimismo, se ha patentado el uso del plasma como componente de medios para la producción de sustancias anticoagulantes (Nagoya y Saiono, 1988) y para el cultivo de células animales (Kazuo *et al.*, 1991).

### **3.5 Cultivos lácticos**

Las bacterias lácticas (BAL) son cocos o bacilos gram positivos, no esporulados no móviles, aeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el principal producto de la fermentación de carbohidratos (Ramírez *et al.*, 2011).

Diferentes factores afectan el crecimiento de las BAL. Existe una temperatura óptima a la cual la velocidad de crecimiento es más alta y depende de las características del microorganismo utilizado, como también de las condiciones ambientales; la mayoría de las especies necesitan aminoácidos y vitaminas del complejo B (lactoflavina, tiamina, biotina, ácido dicotínico, ácido pantoténico y ácido fólico) y varios aminoácidos (Parra, 2010).

También hace varias décadas se conoce que las bacterias lácticas poseen un potencial inhibidor en los alimentos frente al desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos, lo que es de utilidad para prolongar la vida útil e incrementar la calidad higiénica de los alimentos. Este potencial inhibidor de las bacterias lácticas se debe principalmente a la producción de compuestos antimicrobianos denominados bacteriocinas, y son ellas las que hacen tecnológicamente importantes los BAL.

#### **3.5.1 Utilidad de las bacterias lácticas**

Las BAL desarrollan un papel importante en los procesos de fermentación; ellas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, no solamente por su habilidad para acidificar y, por lo tanto, preservar los alimentos de las esporas, sino también su implicación en la textura, olor y desarrollo de aroma en los alimentos fermentados (Parra, 2010). Dentro de este grupo de bacterias BAL se encuentran los *Lactobacillus* spp. que presentan amplios usos a nivel industrial tales como; capacidad fermentativa en productos cárnicos, lácteos y vegetales, bioconservante, para incrementar la vida útil de los productos alimenticios y función probiótica. Proporcionando así grandes beneficios en la salud humana y animal (Fiorentini *et al.*, 2001; Silveira Rodríguez *et al.*, 2003; Cabeza, 2006; Castellano *et al.*, 2008; Vásquez M. *et al.*, 2009).

En Colombia se han aplicado BAL silvestres (*Lactobacillus* sp.LBM9 y *Lactobacillus brevis* LBM13) en combinación con levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*), en la industria de productos panificables de masa ácida a fin de mejorar las propiedades de la masa y del producto terminado. Los resultados mostraron que las BAL silvestres *Lactobacillus* sp. LBM9 y *Lactobacillus brevis* LBM13, son adecuadas para descender el pH y aumentar la acidez de las masas panificables, disminuir el porcentaje proteico, aumentar el volumen final y retrasar el endurecimiento (firmeza) del pan (León *et al.*, 2006).

Las bacterias lácticas también pueden vehicular genes heterólogos que les confieran actividades antimicrobianas de interés frente a determinados microorganismos patógenos, lo que



permitirá analizar diversos modelos teóricos y experimentales de antagonismo microbiano mediado por las bacterias lácticas (Hernández *et al.*, 1993).

### 3.5.2 Producción de bacterias lácticas

En Colombia y en el mundo la importancia de las bacterias ácido lácticas (BAL) en general, como de los lactobacilos en particular, hace necesario la búsqueda de alternativas tecnológicas para su producción económica.

Algunos investigadores en Colombia han propuesto métodos alternativos para su crecimiento, utilizando sustratos diferentes para su desarrollo. Para lo cual se propuso el empleo de melaza de caña como sustrato iniciador para el crecimiento de *L. plantarum*. Se evaluaron condiciones y variables que afectan el crecimiento microbiano. Se maneja como cepa control *L. plantarum* WS417 y se inocularon diferentes concentraciones de melaza estéril a diferentes valores de pH, temperatura y agitación. El crecimiento, se determinó con microbiología tradicional utilizando recuentos directos en placa, con agar MRS. Las condiciones óptimas para el crecimiento de *L. plantarum* fueron 20% concentración,  $30\pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 horas,  $5,2\pm 0,1$  (pH) y 100rpm, donde se obtuvo un recuento de  $43\times 10^9$  UFC/mL. Se concluyó que la melaza de caña podría ser usada como sustrato para el desarrollo de *Lactobacillus* sp. (Ossa *et al.*, 2010).

También se han probado distintos medios para la obtención de biomasa de *Lactobacillus* sp, en tal sentido, se evaluó la composición de tres medios de cultivo para la producción de biomasa de *Lactobacillus* sp. aislado de aguamiel, con potencial probiótico. Los medios evaluados para este propósito fueron TYG (Triptona-Extracto de Levadura-Glucosa), TYGS (Triptona-Extracto de Levadura-Glucosa y Soya), y MRS. La cinética de crecimiento fue en el medio TYGS (48 h), se determinó biomasa (peso seco), cuenta viable (Miles, A.A & Misra, S.S., 1938), glucosa y ácido láctico en condiciones de anaerobiosis (An) y aerobiosis agitación. Finalmente se determinó el potencial probiótico [resistencia a pH, ácidos biliares (Hugas M., 1993), adherencia (células HeLa) y antagonismo] de la cepa de *Lactobacillus*, aislada de aguamiel. Los resultados obtenidos indican que la composición de los medios de cultivo en la producción de biomasa de *Lactobacillus*, es determinante. El medio TYGS fue el más atractivo por el costo de elaboración y el rendimiento del cultivo probiótico que se obtuvo en condiciones de aerobiosis (Castañeda *et al.*, 2007).

Se han propuesto igualmente una gran variedad de sustratos agroindustriales no diversificados, con usos muy tradicionales; jugo de caña de azúcar, agua de coco, jugo de naranja y suero de quesería entre otros para el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) y *Lactobacillus johnsonii* (La1). Las bacterias probióticas se aislaron de productos lácteos fermentados comerciales. La concentración microbiana se cuantificó en agar MRS a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 h en anaerobiosis. Los sustratos donde hubo mayor crecimiento de ambos probióticos fueron suero de queso y jugo de naranja. El mayor crecimiento se produjo en jugo de naranja a las seis horas de cultivo (Jiménez Vera *et al.*, 2008).

Lo anterior permite recomendar la exploración de nuevas fuentes de producción económica de biomasa de lactobacilos a partir de sustratos naturales. Además de proporcionar valor agregado a los recursos agroindustriales de la región. Actualmente se utilizan medios complejos o enriquecidos con algunos componentes que elevan el costo de producción de los cultivos lácticos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Estudiar las propiedades del plasma sanguíneo bovino como componente de medios líquidos de fermentación y fuente de proteínas con propiedades funcionales en sistemas alimentarios.

### 4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la eficiencia del plasma sanguíneo bovino como componente base de un medio líquido de fermentación para el crecimiento de cultivos lácticos iniciadores de la maduración en productos cárnicos.
- Realizar la cinética del cultivo sumergido de *Lactobacillus* sp., en el medio base de plasma sanguíneo bovino.
- Evaluar las propiedades funcionales de las proteínas del plasma sanguíneo bovino con o sin tratamiento enzimático en algunos sistemas alimentarios.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

En la propuesta de investigación en su primera fase de estudio se realizará la fermentación sumergida de cepas de *Lactobacillus* sp., utilizadas en la iniciación de procesos madurativos en productos cárnicos, para evaluar la eficiencia del plasma sanguíneo bovino en el crecimiento de dichos microorganismos. En la fase final se evaluarán propiedades funcionales de soluciones de plasma sanguíneo bovino en un aderezo, helado y un producto cárnico.

### 5.1 Evaluación del plasma sanguíneo bovino como componente de medio de cultivo para la fermentación láctica.

#### 5.1.1 *Obtención y separación del plasma de sangre bovina*

La sangre fresca para la obtención del plasma bovino sanguíneo se acopiará de una central de sacrificio del Departamento de Caldas al momento de la etapa de sangría del animal, mediante cuchillo de sujeción para degüelle (Anitec, Italia), previa higienización de la piel para luego conducirse a recipientes plásticos que contienen 100 mL de una solución de citrato de sodio al 2% (p/v) por cada litro de sangre. Para la separación del plasma la mezcla se transportará inmediatamente bajo condiciones isotermas y sin agitación al Laboratorio de Nutrición Animal y Vegetal del Departamento de Producción Agropecuaria de la Universidad de Caldas, para posterior refrigeración hasta alcanzar 5°C y someterse a centrifugación (centrífuga HETT, Alemania) a 5.000 rpm durante 10 minutos, con el fin de separar el mismo día el plasma y almacenarlo a -18 °C para su posterior uso. Se evaluarán dos tipos de plasma (plasma sanguíneo bovino fresco y un plasma comercial deshidratado referencia PD70 con 70% de proteína marca FRIGODAN) el cual se reconstituirá con agua destilada estéril para su posterior uso, con el fin de conocer si sus comportamientos son similares o no frente al crecimiento celular de *Lactobacillus* sp. y con los resultados obtenidos se seleccionará el tipo de plasma para el resto de la investigación.

### **5.1.2 Determinación del contenido de proteína, pH y humedad de plasma**

Para la determinación de proteína se utilizará el método descrito por Lowry *et al.* (1951) modificado por Hartree (1972). El pH del plasma se determinará directamente en potenciómetro (Metrohm 827, Suiza). La humedad se determinará por secado en horno (AOAC, 1980).

### **5.1.3 Hidrólisis enzimática de las proteínas del plasma sanguíneo bovino**

Se utilizará el método descrito por Chobert *et al.* (1988), para lo cual se solubilizará por separado la muestra de plasma y la tripsina en calidad de enzima proteolítica. Alternativamente se plantea el uso de la enzima Alcalasa (Novozymes, Dinamarca). Se empleará una solución amortiguadora de 0,02 mol/L de fosfato de sodio y 0,01 mol/L de ácido cítrico, para ajustar el pH a 8,0; posteriormente se añadirá la enzima solubilizada a la muestra de plasma fresco para obtener una relación enzima sustrato de 1:100. La mezcla se mantendrá en un baño de agua a 37°C (Julabo SW 21, Alemania), con agitación hasta 60 minutos para obtener el hidrolizado. La reacción hidrolítica se detendrá mediante reducción de pH hasta 2,0 usando ácido clorhídrico. El hidrolizado será almacenado a -18°C hasta el momento de su uso. Esta hidrólisis se llevará a cabo en el Laboratorio de Control de Calidad de la Unidad Tecnológica de Alimentos del Departamento de Ingeniería de la Universidad de Caldas.

### **5.1.4 Obtención y conservación de las cepas**

Será utilizada la cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 que se obtendrá del banco de cepas de la ATCC (American Type Culture Collection, EUA). Para la activación de la cepa se realizarán suspensiones del liofilizado de la misma en solución salina esterilizada (1% p/v) para su siembra en agar MRS e incubación a 37°C durante 48 horas. Luego de este período de incubación, se transferirán alícuotas de 0,5 mL de estos cultivos a criotubos de 1,5 mL con adición de 0,5 mL de una solución de glicerol al 20% como crioprotector para su posterior conservación en armario de congelación a -70°C. Se prepararán lotes de varios tubos para cada cepa a conservar, utilizando en su totalidad un tubo para cada prueba. De esta manera se evitará que las cepas se congelen y se descongelen varias veces. Estos procedimientos se realizarán en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Unidad Tecnológica de Alimentos del Departamento de Ingeniería de la Universidad de Caldas.

### **5.1.5 Ensayos preliminares de fermentación**

Se realizarán ensayos preliminares de fermentación para determinar las condiciones de cultivo principales en medio líquido en matraces (pH inicial, temperatura y necesidad de agitación), que serán empleadas para el desarrollo del diseño experimental posterior. Estos ensayos se llevarán a cabo en la Planta de Bioprocesos del Instituto de Biotecnología Agropecuaria de la Universidad de Caldas.

### **5.1.6 Preparación del medio a base de plasma sanguíneo bovino**

Para la realización de los ensayos preliminares de fermentación se utilizará un medio a base de plasma bovino sanguíneo (MBPSB) con 50% de plasma como fuente de nitrógeno orgánico en matraces de 250 mL. En calidad de fuente de carbono para los lactobacilos se empleará glucosa al 1%; también se evaluará la sacarosa como fuente alternativa de carbono de menor costo. Los demás micronutrientes serán adicionados al medio de acuerdo con las recomendaciones de Morishita *et al.* (1981) para el cultivo de lactobacilos (ver Tabla 7). Posteriormente se procederá al ajuste de pH a 6 con ácido clorhídrico y finalmente la esterilización de los medios por filtración al vacío utilizando un filtro SEITZ colocado sobre un Kitasato. Alternativamente, se realizará la esterilización por tratamiento térmico al vacío.

### 5.1.7 Activación de las cepas y ensayos de fermentación

Para la preparación de los inóculos se realizará la descongelación de los criotubos a 37°C, para su posterior propagación en matraces con 100 mL de caldo MRS durante 36 h de incubación a 37°C sin agitación para su uso como cultivo de siembra en el MBPSB. Para la inoculación se empleará una cantidad de 0,25 mL de este cultivo de siembra (1% v/v) para inocular 250 mL de MBPSB en matraces de 500 mL de capacidad. Se realizarán ensayos preliminares para cada cepa a fin de establecer las condiciones de fermentación que no se variarán durante el diseño experimental subsiguiente (pH y temperatura). Se evaluará también la posibilidad de sustituir la glucosa por sacarosa. Con el propósito de comparar el crecimiento y la morfología de la biomasa celular frente al medio de cultivo, se utilizará otro medio alternativo (caldo MRS). Para determinar la cantidad de biomasa celular se utilizará el método de peso seco descrito por Arnaiz *et al.* (2000).

### 5.1.8 Diseño experimental

Se realizará un diseño experimental a fin de evaluar el efecto que sobre la formación de biomasa celular de *Lactobacillus plantarum* ejercen los siguientes factores: incorporación del plasma bovino al medio, concentración de la fuente de carbono seleccionada y tratamiento de las proteínas del plasma (hidrolizadas enzimáticamente o no). Para ello, se sustituirán las fuentes de nitrógeno en el caldo MRS (peptona, extracto de carne y extracto de levadura) por plasma sanguíneo bovino a dos concentraciones (50 y 75% en volumen) y se les adicionará como fuente de carbono la que presente mejor desempeño en los ensayos iniciales de fermentación (glucosa o sacarosa) considerando dos niveles de concentración. Los demás micronutrientes serán adicionados de acuerdo con las recomendaciones de Morishita *et al.* (1974) siendo su concentración constante a través de los diferentes tratamientos (ver Tabla 7). Las proteínas del plasma serán hidrolizadas enzimáticamente como se describió en la sección 5.1.3. La variable de respuesta para este estudio será el crecimiento celular medido como UFC/mL o como peso seco (en g/L). Cada tratamiento se realizará por triplicado y corresponderá a un medio de cultivo basado en plasma sanguíneo bovino que será inoculado con el microorganismo correspondiente. Los resultados experimentales se analizarán mediante análisis de varianza (ANOVA) empleando el paquete estadístico Statgraphics. A fin de determinar las mejores concentraciones de carbono y nitrógeno del MBPSB para maximizar el crecimiento celular de los lactobacilos, los resultados del diseño experimental se analizarán mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM).

A continuación se hace una enumeración de los factores del diseño experimental factorial:

- Factor 1: % incorporación del PSB al medio con 2 niveles.
- Factor 2: Dosificación de la enzima en el medio PSB hidrolizado con tres niveles
- Factor 3: Concentración de la fuente de carbono con tres niveles
- Número de Tratamientos : 18, con 3 repeticiones
- Variable de respuesta: Producción de biomasa celular.

Se realizará el ANOVA para la evaluación de las posibles interacciones entre los factores y se determinarán los valores óptimos de los factores por el análisis de superficie de respuesta que maximicen la biomasa celular.

Tabla 7. Composición inicial del medio a base de plasma bovino sanguíneo para 1 litro.

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad</i>
Plasma sanguíneo bovino	250 mL
Glucosa o sacarosa	10 g
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,02 g
Acetato de sodio	6 g
Citrato de amonio	1 g
KH <sub>2</sub> P O <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,5 g
MnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.05 g
Agua destilada	750 mL

## 5.2 Estudio cinético del cultivo sumergido de *Lactobacillus plantarum* en medio a base de plasma sanguíneo bovino

### 5.2.1 Condiciones de fermentación

Se partirá de los resultados preliminares de fermentación para determinar las condiciones iniciales del medio de cultivo tales como pH, temperatura, necesidad de agitación, que influyen sobre la producción de biomasa de una cepa de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Asimismo, se tendrá en cuenta los resultados de los diseños experimentales descritos en la sección 5.1.6. Se determinará experimentalmente la cinética del proceso de producción de biomasa celular a nivel de laboratorio mediante fermentación sumergida por lotes. Se utilizará un biorreactor de banco de 3 L de capacidad ubicado en la Planta de Bioprocesos del Instituto de Biotecnología Agropecuaria de la Universidad de Caldas. El seguimiento de la fermentación se realizará tomando muestras periódicas en intervalos definidos de tiempo. De esta manera se obtendrán los perfiles en el tiempo de las concentraciones de sustrato (fuente de carbono) y biomasa celular medida como peso seco (Arnaiz *et al.*, 2000). El sustrato se evaluará por el método de determinación de azúcares reductores por DNS (AOAC, 1965) en el caso de la glucosa y para la sacarosa por el método fenolsulfúrico.

### 5.2.2 Modelamiento de la cinética de fermentación

Con los datos experimentales obtenidos, se aplicarán un modelo matemático no estructurado no segregado a fin de describir la cinética de fermentación del sistema estudiado (Cardona *et al.*, 2010). La velocidad de crecimiento celular ( $dx/dt$ ) se obtendrá de la derivada del polinomio que mejor se adapte al conjunto de datos experimentales. La velocidad específica de crecimiento celular ( $\mu_x$ ) se calculará dividiendo la velocidad de crecimiento entre la concentración celular. Los valores de los parámetros del modelo se obtendrán por regresión no lineal usando el software Matlab (The MathWorks Inc., EUA).

### 5.2.3 Evaluación de la capacidad fermentativa de la biomasa obtenida

Se recolectará la biomasa producida en el biorreactor de banco de la cepa de *Lactobacillus* sp., se centrifugará con agua destilada estéril para su separación y se inoculará en una pasta cárnica para la elaboración de un embutido madurado tipo salami. La preparación de la pasta base de salami se elaborará en la unidad de cárnicos con los equipos de (emulsificación, embutido hidráulico, mezclado, cámara termizada y refrigerador) de la Unidad Tecnológica de Alimentos (UTA) del Departamento de Ingeniería de la Universidad de Calda. El proceso comprenderá la etapa de preparación de la pasta con carnes a -2°C picadas por placa de 5 mm.,

mezclado de ingredientes sólidos y líquidos, inoculación de biomasa celular de los *Lactobacillus* sp., reposo de la pasta por 24 h a 2°C, embutido en funda de celulosa permeable al oxígeno y vapor de agua, fermentación a 25°C y humedad relativa 80% hasta alcanzar un pH menor a 5,5 y finalmente secado por un mes a temperatura promedio de 12°C y humedad relativa de 75 a 80%.

Para el seguimiento del curso de la maduración se realizará el seguimiento de pH, y acidez (expresada en mg de ácido láctico/ g de muestra) desde la etapa de fermentación y durante el secado con el fin de conocer su actividad fermentativa. Se tomarán pH a acidez a intervalos de tiempo de 72 h.

### **5.3 Estudio de las propiedades funcionales del plasma sanguíneo bovino con proteínas sin hidrolizar e hidrolizadas en sistemas alimentarios**

Para el estudio de las propiedades funcionales en sistemas alimentarios se trabajará en este estudio con proteínas del plasma sanguíneo bovino hidrolizado y sin hidrolizar.

#### **5.3.1 Hidrólisis enzimática de proteínas de plasma sanguíneo bovino**

Las condiciones de la hidrólisis se describen en la sección 5.1.3. El plasma de la sangre y su hidrolizado enzimático se solubilizará en una solución tampón (0,02 mol / L fosfato de sodio y 0,01 mol/L de ácido cítrico), para ajustar el pH entre 3,0 y 8,0 a una concentración de 1,0 g de proteína/100 mL solución y manteniéndola durante 30 minutos en un baño de agua a 35°C. Las soluciones de plasma se centrifugarán a 6500 rpm por 10 minutos y después se filtrará usando papel de filtro (Quanty, Brasil). El filtrado se almacenará a -18°C hasta el momento de su uso.

#### **5.3.2 Determinación del contenido de proteína y de solubilidad**

El contenido de proteína del plasma entero y de proteína soluble de su hidrolizado enzimático se determinará de acuerdo a Lowry *et al.* (1951) modificado por Hartree (1972), utilizando albúmina de suero bovino como estándar. Se utilizarán alícuotas de filtrado de plasma de 200 mL. La absorbancia se leerá a 650 nm en un espectrofotómetro (Perkin- Elmer Lambda xls, UA) y la solubilidad se calculará en términos de porcentaje de nitrógeno total y se expresará en gramos de proteína soluble por 100 mL de solución.

#### **5.3.3 Determinación de la capacidad emulsionante**

Se realizará la determinación de la capacidad emulsificante (CE) para el plasma sin proteína hidrolizada y para el plasma con proteína hidrolizada, se utilizará el método de Vuilleumard, Gauthier, Richard, y Paquin (1990), con la modificación presentada por Duarte *et al.* (1988). Para este fin se homogeneizarán 50 mL de solución de plasma utilizando un mezclador (Fisher, Alemania) en la más alta velocidad. Luego se incorporará continuamente durante el proceso de emulsificación aceite vegetal de maíz a las soluciones de plasma a una tasa de 25mL/min. Durante la emulsificación, la temperatura se mantendrá a 25± 3°C por inmersión del recipiente de reacción en un baño de hielo. La CE será calculada usando la siguiente ecuación:

$$EC = \frac{EO (g) - BO (g)}{\text{Proteína (mg)}} \quad (1)$$

donde EO y BO son la cantidad de aceite emulsionado en la muestra y en el blanco, respectivamente. El blanco es una solución amortiguadora sin agente emulsionante.

### 5.3.4 *Determinación del índice de actividad emulsionante*

El método de Pearce y Kinsella (1978), con la modificaciones descritas por Duarte *et al.* (1988), será usado para la determinación del índice de actividad emulsificante (EAI, por sus siglas en inglés) del plasma sanguíneo bovino hidrolizado enzimáticamente y sin hidrolizar. Para la preparación de la emulsiones de los plasmas, un volumen de 30 mL de estas soluciones y 10 mL de aceite de aceite vegetal de maíz se homogenizarán en la misma mezcladora citada anteriormente, en la más alta velocidad durante 1 min. La temperatura se mantendrá a 20<sup>0</sup> C. Luego alícuotas de 1 mL de la emulsión se diluirán (1/100) en una solución que contiene 0,1% de docecil sulfato de sodio (SDS) y NaCl al 0,1 M, se homogenizará y se leerá la absorbancia a 550 nm y se calculará el EAI usando la ecuación. (2) propuesta por Cameron *et al.* (1991).

$$EAI = 2T / (1 - \theta) C \quad (2)$$

donde T es la turbidez,  $\theta$  es la fracción de volumen del aceite, y C es la concentración de proteína inicial (0,1 g / 100 mL).

La turbidez se calcula multiplicando la absorbancia por 2,203 y por el factor de dilución (100) y luego dividiendo el resultado por la longitud del camino óptico de la cubeta (0,01 m).

### 5.3.5 *Determinación de la estabilidad de la emulsión*

Para el plasma hidrolizado y sin hidrolizar se utilizará el método de modificado por Duarte *et al.* (1988), para determinar la estabilidad de la emulsión (ES). Las emulsiones de plasma preparadas anteriormente se mantendrán a 20 ° C durante 24 h. Después de agitar las alícuotas se diluirán al 0,1% SDS y se medirá la turbidez como se ha descrito anteriormente. A las 24 h las emulsiones se calentarán a 80<sup>0</sup>C por 30 min. Después las alícuotas se enfriarán a temperatura ambiente y se agitarán, se medirá de nuevo la turbidez como se describió en la Sección 5.3.5. El diferencial del índice de actividad emulsificante en porcentaje ( $\Delta EAI$ ) se calculará mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta EAI \% = (EAI_{\text{máx}} - EAI_{\text{min}}) 100 / EAI_{\text{max}} \quad (3)$$

donde EAI max es el valor máximo que se obtiene inmediatamente después de formación de la emulsión y EAI min es el valor más bajo obtenido para las alícuotas después de 24 h de almacenamiento a 80<sup>0</sup> C de calentamiento. Los valores de ES se calcularán utilizando la siguiente ecuación:

$$ES = 1 / \Delta EAI\% \quad (4)$$

### 5.3.6 *Retención de agua*

Para la determinación de la cantidad de agua retenida por el plasma hidrolizado y sin hidrolizar, se aplicará el método de centrifugación descrito por Villegas (2009). Para lo cual se prepararán muestras por duplicado de 5mL de los diferentes plasmas ya mencionados anteriormente y se introducirán en tubo de centrífuga, con 8 mL de solución 0,6 M de NaCl y se someterán a agitación durante 1 minuto. Posteriormente se bajará la temperatura de las muestras en baño de hielo hasta 2 °C o por 30 minutos para agitarse nuevamente por un minuto más. Luego centrifugar a 10.000 rpm por 15 minutos. Decantar el sobrenadante en probeta y medir el volumen no retenido Se reportará la cantidad de mL de solución no retenida por 100 mL de muestra.

### **5.3.7 Determinación de viscosidad**

Se realizará la determinación de viscosidad (g / cm s) o poise para las pastas emulsionadas del jamón de conejo y el batido de helado con la incorporación en ambos de plasma sanguíneo bovino hidrolizado enzimáticamente y sin hidrolizar. Para ello se empleará un viscosímetro Fungilab (España) ubicado en la Planta de Bioprocesos de la Universidad de Caldas. Para el aderezo se determinará la viscosidad en la fase líquida del mismo o de cobertura con la incorporación de plasma sanguíneo bovino con proteína hidrolizada y sin hidrolizar.

### **5.3.8 Formulación de los productos con incorporación de plasma**

Con la finalidad de estudiar algunas propiedades funcionales del plasma bovino sanguíneo hidrolizado y sin hidrolizar como sustituto o complemento de la proteína, se formularán tres sistemas alimentarios con la ayuda de una hoja de cálculo desarrollada por la empresa Tecnas S.A. (Colombia) en el software MS Excel (Microsoft Corp., EUA). Los productos a tratar son los siguientes: un jamón emulsionado de conejo, un aderezo y un helado. A estos productos se les incorporará el plasma bovino con proteína hidrolizada o sin hidrolizar con dosis entre el 10% y 20% de la masa total del producto.

Para el caso del jamón emulsionado de conejo se elaborará inicialmente una pasta base de carne de conejo, en una cutter o emulsificador con la adición de condimento característico, proteína vegetal, hielo, NaCl, antioxidante, acelerador de curado y humo líquido a la cual se le adicionará dos concentraciones iguales de plasma sanguíneo bovino con proteína hidrolizada y sin hidrolizar como sustituto de una fracción de la pasta base obtenida. Posteriormente se someterá la pasta base a embutido y prensado a presión en funda de PVC (polivinilcloruro) para finalmente ser sometido a cocción en tanque de agua a 78°C. Estos procesos se realizarán con los equipos de la unidad de cárnicos (emulsificador, embutidora hidráulica y tanque cocción) de la Unidad Tecnológica de Alimentos (UTA) del Departamento de Ingeniería de la Universidad de Caldas. El mismo tratamiento con plasma sanguíneo bovino se realizará en el helado y el aderezo

El helado crema se elaborará en una batidora a escala piloto con camisa de refrigeración, control de temperatura o termostato y variación de tiempos de agitación para la obtención del batido de helado en la planta piloto de la unidad de lácteos de la UTA de Ingeniería de la Universidad de Caldas. Para el helado crema se utilizará leche en polvo, grasa vegetal hidrogenada, estabilizador, sabor a fresa, con la incorporación de plasma sanguíneo bovino con proteína hidrolizada y sin hidrolizar.

El aderezo tipo mayonesa se elaborará en la unidad de cárnicos de la Unidad Tecnológica de Alimentos (UTA) del Departamento de Ingeniería de la Universidad de Calda, en un emulsificador o picadora de alta velocidad, para la preparación de la emulsión y posteriormente se realizará el mezclado con los ingredientes sólidos o vegetales.

En los tres productos se utilizará un blanco sin la adición de ninguno de los dos tipos de plasma sanguíneo bovino descritos, pero con la adición del emulsificante comercial correspondiente con el fin de comparar propiedades funcionales mediante el método del Análisis del perfil de Textura TPA (Bourne, 1978) en texturómetro (Shimadzu, China)

Las propiedades funcionales a determinar en el estudio por evaluación sensorial serán olor, sabor, masticabilidad y cohesividad. Para dureza y fracturabilidad se usará el texturómetro descrito anteriormente según el tipo de producto.

### **5.3.9 Análisis sensorial**

Para evaluar la aceptabilidad de los productos será empleado un panel de degustación entrenado en el método y en las características que se van a analizar, constituido por 10 jueces quienes definirán por comparación y ordenamiento en una escala de 1 a 5 (1 peor, 5 mejor) los siguientes atributos: olor, sabor, masticabilidad y cohesividad. Los valores determinados por el



panel sensorial se tratarán mediante pruebas estadísticas no paramétricas empleando el software Statgraphics.

### 5.3.10 Análisis estadístico

Para los análisis de los productos formulados será empleado un diseño aleatorizado con cinco tratamientos (plasma bovino sanguíneo sin hidrolizar 10 y 20%; plasma bovino sanguíneo hidrolizado 10 y 20%; control) con tres repeticiones para un total de 15 observaciones. A estos resultados del diseño se le aplicará un análisis de varianza (ANOVA) realizándose la comparación de las medias por la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ). Para el análisis de los datos se utilizará el paquete estadístico Statgraphics. El mejor tratamiento se comparará con un producto formulado con emulsificante comercial (polifosfato de sodio o potasio).

## 6 Resultados esperados

Al finalizar la ejecución de la presente propuesta de tesis doctoral, se plantea lograr los siguientes resultados:

- Una metodología para formular un medio de cultivo líquido a fin de realizar el cultivo de microorganismos iniciadores en el caso de *Lactobacillus plantarum* empleando como base el plasma sanguíneo bovino.
- Un estudio cinético a nivel de banco del proceso de formación de biomasa celular de *Lactobacillus plantarum* en un medio a base de plasma sanguíneo bovino.
- Un modelo matemático que describa la cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* a nivel de banco.
- Demostración de la capacidad fermentativa ácido-láctica de la biomasa celular cultivada a nivel de banco en un producto madurado tipo salami.
- Determinación de las principales propiedades funcionales del plasma sanguíneo bovino con proteínas hidrolizadas y sin hidrolizar.
- Una metodología para la formulación de tres productos alimentarios (jamón de conejo, aderezo, helado cremoso) con incorporación de plasma sanguíneo bovino con proteínas hidrolizadas o sin hidrolizar.
- Al menos un artículo científico publicado en revista nacional o internacional indexada.
- Participación en al menos un evento científico de nivel nacional o internacional.
- Formación de un investigador a nivel de doctorado.

## 7 Impactos de la tesis

La ejecución de la presente propuesta de tesis doctoral generará varios impactos potenciales de índole académico, ambiental, económico y social. Entre los impactos académicos se destacan los siguientes:

- Contribución al desarrollo de procesos innovadores para el aprovechamiento de la sangre bovina generada en centrales de sacrificio.
- Formación de recurso humano a nivel de doctorado.
- Generación de conocimiento aplicado en el campo de aprovechamiento de subproductos y residuos de la industria cárnica, los cuales serán susceptibles de ser divulgados en revistas especializadas, congresos y eventos temáticos, entre otros.

- Consolidación de la Planta de Bioprocesos de la Universidad de Caldas como un centro de desarrollo de tecnologías para el aprovechamiento de una variedad de subproductos y residuos de las actividades pecuarias y agroindustriales de la región y el país.

Igualmente, desde el punto de vista socio-económico, la presente tesis tiene los siguientes impactos potenciales:

- Ofrecer diferentes alternativas de aprovechamiento de sangre bovina.
- Contribuir a la toma de decisiones para el desarrollo de la base agroindustrial del Departamento de Caldas, en particular en la industria cárnica.
- Contribuir al fortalecimiento y aumento de la competitividad de las empresas del sector cárnico de la región y el país, fomentado la creación de nuevos empleos potenciales o conservando los actuales.
- Creación de una base científico-tecnológica para el acompañamiento a la industria nacional en la adquisición, adaptación y transferencia de tecnología para el aprovechamiento de subproductos y residuos de la industria cárnica.

Finalmente, esta investigación permitirá explorar vías para la reducción del impacto ambiental negativo causado por los residuos generados en las plantas de beneficio animal.

## 8 Cronograma de actividades

<i>Actividades</i>	<i>Semestres</i>				
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Revisión bibliográfica	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX
Ensayos preliminares para evaluación de plasma sanguíneo entero y plasma comercial en fermentación sumergida	XXXXXX				
Evaluación de la eficiencia del plasma sanguíneo bovino como medio líquido de fermentación para cultivo de lactobacilos	XXX	XXXXXX	XXXXXX		
Realización de la cinética del cultivo sumergido de <i>Lactobacillus plantarum</i> a nivel de banco			XXXXXX	XXXXXX	XX
Evaluación de la capacidad fermentativa de la biomasa celular cultivada a nivel de banco				X	XX
Determinación de las propiedades funcionales del plasma sanguíneo con proteínas hidrolizadas y sin hidrolizar	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX		
Formulación y elaboración de tres sistemas alimentarios (aderezo, helado tipo crema y jamón de conejo), con plasma bovino con proteínas hidrolizadas y sin hidrolizar			XXXXXX	XXXXXX	
Elaboración del informe final					XXXXXX
Divulgación de resultados				XXXXXX	XXXXXX

## 9 Presupuesto

Rubro	Fuentes			Total
	Universidad de Caldas (Recurrente)	Universidad de Caldas (Solicitado)	Sistema General Regalías	
Investigadores: Director	45.360.000			<b>150.777.900</b>
Estudiante Doctorado	105.417.900			
Análisis de laboratorio		4.800.000	3.000.000	<b>7.800.000</b>
Equipos	43.008.000		12.000.000	<b>55.008.000</b>
Materiales y reactivos		2.000.000	8.000.000	<b>10.000.000</b>
Software		5.000.000		<b>5.000.000</b>
Pasantía		6.000.000		<b>6.000.000</b>
<b>Total</b>	<b>193.785.900</b>	<b>17.800.000</b>	<b>23.000.000</b>	<b>234.585.900</b>

## Referencias

- Álvarez J.L. (2001). *Bioquímica nutricional y metabólica del bovino en el trópico*, Universidad de Antioquia: Medellín. 202.
- AOAC. (1965). *Official methods of analysis*, Association of official analytical chemists Washington.
- AOAC. (1980). *Oficial Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists Washington.
- Arnaiz C., Isac L., Lebratos J. (2000). *Determinación de Biomasa en procesos Biológicos*. 205, 45-52
- Badui S. (1993). *Química de los alimentos*. Alhambra: México, D.F. 648 p.
- Barboza Y., Marquez E., Arias B., Faría J., Castejón O. (1994). Utilización del Plasma Sanguíneo de Bovino como fuente proteica en la formulación de un medio de cultivo para Lactobacilos. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad del Zulia*, 4(1): 55-59.
- Benítez B., Marquez S. E., Barboza Y., Izquierdo P., Arias B. (2000). Formulación y características de productos cárnicos elaborados con subproductos de la industria animal. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias- Universidad del Zulia*, 10(4): 321-327.
- Benítez B., Archile A., Rangel L., Bracho M., Hernández M., Márquez E. (2002). Calidad nutricional y aceptabilidad de un producto formulado con carne de pollo deshuesada mecánicamente, plasma y glóbulos rojos de bovino. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)*, 52(3): 307-312.
- Benítez B., Archile A., Rangel L., Ferrer K., Barboza Y., Márquez E. (2008). Composición proximal, evaluación microbiológica de una galleta formulada a base de harina de yuca y plasma bovino. *Interciencia*, 33(1): 61-65.
- Bourne M.C. (1978). Texture Profile Analysis *Food Technology*, 37: 62-66, 72.
- Cabeza E.A. (2006). *Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estériles para la industria láctea y cárnica*. 11
- Caldironi H.A., Ockerman H.W. (1982). Incorporation of blood proteins into sausages. *Food science*, 47: 405-408.
- Cameron D.R., Weber M.E., Idziak E.S., Neufeld R.J., Cooper D.G. (1991). Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: Correction of the formula for emulsifying activity index. *Agriculture and food chemistry*, 39(4): 655-659.
- Cardona C.A., Sánchez Ó.J., Gutiérrez L.F. (2010). *Process Synthesis for Fuel Ethanol Production*. CRC Press: Boca Raton, FL, EUA. 393 p.
- Castañeda B.R., Aguilar B.C., López L. E., Díaz A.O., Pérez M.R. (2007). *Evaluación de cultivos mínimos para la obtención de biomasa de un probiótico: Lactobacillus sp.*, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada CIBA-IPN Tlaxcala T.d.L., Tlaxcala, Editor: Tlaxcala Mexico.
- Castellano P., Belfiore C., Fadda S., Vignolo G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3): 483-499.
- Chobert J.M., Bertrand-Hard C., Nicolas M.G. (1988). Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *Agriculture and food chemistry*, 36: 883-892.
- Chong K.-M., Mun I.-S. (1988). *Process for preparing hyaluronic acid*. Patente de República de Corea KR880001949.
- Consejo Europeo. (2009). *Reglamento (CE) Número 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo*, Parlamento Europeo: Estrasburgo. 33.
- CPTS. (2009). *Guía Técnica de producción más limpia para mataderos de bovinos*, Centro de Promociones Tecnológicas Sostenibles (CPTS): La Paz 208.
- DANE. (2013). *Sacrificio de ganado IV trimestre de 2012*. 1 p.
- Del Hoyo P., Moure F., Rendueles M., Díaz M. (2007a). Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration. *Meat Science*, 76: 402-410.
- Del Hoyo P., Rendueles M., Díaz M. (2007b). Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science*, 78(2008): 522-528.
- Divarkaran S. (1980). *Animal Blood*. National Information National Center for Leather and Allied Industries. Madras India.
- Duarte A.J., Carreira R.L., Junqueira R.G., Coelho J.V., Silvestre M.P.C. (1988). Propiedades emulsionantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados trópicos:1. Efeito do pH e do tempo de hidrólise. *Ciencia Tecnologia Alimentos*, 18: 295-302.
- FAO. (1991). *Guidelines for slaughtering, meat cutting and further processing* FAO Animal Production and Health paper 91. FAO: Roma.
- Fennema O.R. (1993). *Química de los alimentos*. Editorial Acribia, S. A.: Zaragoza. 1094 p.
- Florentini Â.M., Sant'Anna E.S., Porto A.C.S., Mazo J.Z., Franco B.D.G.M. (2001). Influence of Bacteriocins produced by *Lactobacillus Plantarum* BN in the Shelf-Life of Refrigerated Bovine Meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 42-46.

- González L.F., Acuña M.T., Lara J., Villalobos D., Peña I. (1985). *Producción de albúmina bovina-Evaluación de dos métodos*. 6, 105-114
- Grosch W., Belitz H.D. (1997). *Química de los alimentos*. 2a ed Editorial Acribia, S. A.: Zaragoza. 1087 p.
- Hernández P.E., Rodríguez J.M., Cintas L.M., Moreira W.L., Sobrino O.J., Fernández M.E., Sanz B. (1993). *Microbiología Volumen Monográfico de los alimentos*, in *Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos* Microbiología S.E.d., Editor: Madrid. 108.
- Hyun C.K., Shin H.K. (1998). Utilization of Bovine Blood Plasma Obtained from a Slaughterhouse for Economic Production of Probiotics. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(1): 34-37.
- Isaza Rengifo J.M., Londoño Ramírez L.M., Restrepo Molina D.A., Cortes Rodriguez M., Suárez Mahecha H. (2010). Producción y propiedades funcionales de plasma bovino hidratado en embutido tipo salchichón. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23: 199-206.
- Jiménez Vera R., González Cortés N., Contreras A.M., Chab García C.L., Zetina Moreno Z.K. (2008). *Crecimiento de biomasa probiótica en sustratos naturales*. 864-869
- Kazuo I., Masashi S., Naoki M. (1991). *Medium additive for animal cell culture, production and its use*. Patente de Japón JPH0330669.
- Larrotta S., Ortega C. (2007). Diseño experimental para la construcción de un prototipo deshidratador de sangre bovina. *Avances Investigación en Ingeniería Universidad Libre sede Bogotá*, (6): 78-89.
- León Á.M., Montoya C. O.I., Motato K.E., Granda D.M., Caro C.A., Restrepo J.M., Echeverri S., Valencia J., Quinchía L. (2006). Bacterias acidolácticas (BAL) silvestres Colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa ácida. *Revista de la Facultad de Química Farmaceutica Universidad de Antioquia, Medellín*, 13(2): 26-35.
- Linden G., Lorient D. (1997). *Bioquímica agroindustrial: Revalorización alimentaria de la producción agrícola*. Editorial Acribia S.A.: Zaragoza (España). 454 p.
- Liu D.-C. (2002). *Better utilization of by-products from the meat industry*.
- López R., Casp A. (2004). *Tecnología de Mataderos*. Ediciones Mundi- Prensa: Madrid (España). 430 p.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Lewis Farr A., Randal R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Madrid A. (1999). *Aprovechamiento de los Subproductos Cárnicos*. 1a edición ed Ediciones Mundi-Prensa: Madrid ( España).
- Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130-135.
- Márquez E., Izquierdo P., Arias B., Torres G. (1995). Efecto de la adición de plasma sanguíneo de bovino sobre la estabilidad de la emulsión y contenido proteico de productos cárnicos emulsificados. *Revista de Facultad de Agronomía - Universidad del Zulia*, 12: 511-522.
- Márquez E., Arévalo E., Barboza Y., Benítez B., Rangel L., Archile A. (2006). Formulación de un embutido con agregado de piel de pollo emulsificada con sangre de bovino. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad del Zulia*, 16(4): 438-444.
- Márquez E., Arévalo E., Barboza Y., Benítez B., Rangel L., Archile A. (2008). Estabilidad de productos cárnicos reestructurados crudos con agregado de transglutaminasa y plasma bovino. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad del Zulia*, 18(5): 618-623.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2009). *Agenda Prospectiva de Investigación y Desarrollo Tecnológico para la Cadena Cárnica Bovina en Colombia*. Bogotá. 200 p.
- Ministerio de la Protección Social. (2007). *Decreto 1500 de 2007*, Ministerio de la Protección Social: Bogotá. 41.
- Ministerio del Medio Ambiente. (2002). *Guía Ambiental para las Plantas de Beneficio del Ganado*. Bogotá. 108 p Disponible en: <http://www.docstoc.com/docs/3170341/GU%C3%8DA-AMBIENTAL-PARA-LAS-PLANTAS-DE-BENEFICIO-DEL-GANADO-Mayo>.
- Morishita T., Fukada T., Shiota M., Yura T. (1974). Genetic Basis of Nutritional Requirements in *Lactobacillus casei*. *Bacteriology*, 120(3): 1079.
- Morishita T., Deguchi Y., Yajima M., Sakura T., Yura T. (1981). *Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways*, in *Journal of bacteriology*. 64-71.
- Nagoya T., Saiono S. (1988). *Production of anticoagulant substance*. Patente de Japón JPS63258593.
- Ockerman H., Hansen C.L. (2000). *Blood utilization*. En: *Ingredients in Meat Products - Properties, Functionality and Applications*. Tarté R. (Ed.). Madison, Wisconsin, USA.
- Ockerman H.W., Hansen C.L. (1994). *Industrialización de subproductos de origen animal*. En: *Aprovechamiento de la sangre*. Acribia: Zaragoza. pp. 239-262.
- Oficina Nacional de Normalización H.C. (2009). *Norma Cubana 681 Carne y Productos Cárnicos Subproductos del Ganado Bovino Especificaciones de Calidad*. 9 p.

- Ornellas C.B., Junqueira R., Silvestre M.P. (2001). Efeito do pH e da Hidrólise Trípica Sobre as Propiedades Emulsionantes da Globina Bovina. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 21(1): 51-56.
- Ossa J.A., Vanegas M.C., Badillo Á.M. (2010). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento del *Lactobacillus plantarum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica-Universidad de los Andes*, 13(1): 97-104.
- Paltrinieri G. (2001). *Subproductos animales*. En: *Subproductos animales*. Trillas E. (Ed.). Mexico. pp. 35.
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (2001). *Reglamento (CE) No 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de mayo de 2001*, in *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* Diario Oficial de las Comunidades Europeas: Unión Europea. 147.
- Parra R.A. (2010). Bacterias acidolácticas: papel funcional en los alimentos *Facultad de Ciencias Agropecuarias - Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia*, 8(1): 93-105.
- Pearce K.N., Kinsella J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Agriculture and food chemistry*, 26: 716-723.
- Procuraduría Delegada para Asuntos Ambientales y Agrarios. (2007). *Seguimiento a Plantas de Sacrificio Bovino y Porcino en Colombia*, Procuraduría General de la Nación: Bogotá. 127.
- Quaglia G.B., Massacci A. (1982). Proteolysates from slaughter-house blood. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(7): 634-638.
- Ramírez J.C., Rosas U. P., Velázquez G. M.Y., Ulloa J.A., Arce r. F. (2011). Bacterias Lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente año2*, (7): 1-15.
- Rangel L., Archile A., Castejón O., Izquierdo P., Márquez E. (1995). Utilización de Tripolifosfato como anticoagulante y su efecto sobre las propiedades emulsificantes del plasma. *Revista científica facultad de ciencias veterinarias- universidad del zulia*, 5(2): 11-116.
- Rocha Sánchez B. (2006). *Alternativas de Utilización del Plasma y la Globina de la Sangre de Bovino*. Pregrado. Facultad de Química, UNAM.
- Rodas A., Leal M., Muñoz B., Huerta N. (1998). Adición de Plasma y Paquete Globular en la Formulación de Jamones Cocidos. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad del Zulia*, 13(1): 35-39.
- Rodríguez Furlán L., Rinaldoni A.N., Padilla A.P., Campderrós M.E. (2011). Assessment of functional properties bovine plasma proteins compared with other protein concentrates, application in hamburger formulation. *American Journal of Food Technology*, 6(9): 717-729.
- Rodriguez Furlán L.T., Lecot J., Pérez Padilla A., Campderrós M.E., Zaritzky N. (2012). Stabilizing effect of saccharides on bovine plasma protein: A calorimetric study. *Meat Science*, 91(4): 478-485.
- Rodríguez P.F. (1986). *Obtención de globina de bovino: posibles alternativas de uso como aditivo alimentario*. Pregrado. Facultad de Química, UNAM.
- Satterlee L.D., Free B., Leven B. (1973). Utilization of high protein tissue powder as binders and extenders in meat emulsion. *Food science*, 38: 306.
- Selmane D., Christophe V., Gholamreza D. (2008). Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties. *Meat Science*, 79: 640-647.
- Signorini M. (2007). Evaluación de Riesgos de los Rastros y Mataderos Municipales. *Nacameh*, 1(2): 118-141.
- Silva V.D.M., Silvestre M.P.C. (2003). Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *LWT - Food Science and Technology*, 36(7): 709-718.
- Silveira Rodríguez M.B., Monereo Megías S., Molina Baena B. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o Lejos? *Revista Española de Salud Pública*, 77(3): 317-331.
- Vásquez M. S.M., Suárez M. H., Zapata B. S. (2009). Utilización de Sustancias Antimicrobianas Producidas por Bacterias Acido Lácticas en la Conservación de la Carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1): 64-71.
- Veall F. (1993). *Estructura y funcionamiento de mataderos medianos en países en desarrollo Estudio FAO Producción y Sanidad Animal 97*, FAO: Roma.
- Viana F.R., Silva V.D.M., Delvivo F.M., Bizzotto C.S., Silvestre M.P.C. (2005). Quality of ham pâté containing bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat Science*, 70(1): 153-160.
- Villegas A. (2009). *Tecnología de los alimentos de origen animal- Manual de prácticas*. 2a ed Editorial Trillas: Ciudad de México.
- Waldroup P.W. (1985). *Importancia de la lisina como aminoácido esencial en la alimentación de los pollos en crecimiento*. Barcelona. 218-224 p.
- Yousif A.M., Cranston P., Deeth H.C. (2002). Incorporation of bovine dry blood plasma into biscuit flour for the production of pasta. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 36: 295-302.