

CIÈNCIA

# Desenvolupament d'**ingredients alimentaris** a partir de sang d'escorxador: aplicació de les noves tecnologies

**RESUM:** *L'obtenció d'ingredients alimentaris funcionals i/o nutricionals amb valor afegit a partir de la sang procedent del sacrifici de porcs en escorxadors industrials és una de les línies de recerca del grup de Tecnologia Alimentària de l'Institut de Tecnologia Alimentària (INTEA) de la Universitat de Girona.*

*En el marc d'aquesta línia s'han desenvolupat diferents projectes d'investigació i s'han dut a terme alguns estudis per determinar el potencial d'algunes noves tecnologies per aconseguir la millora de la qualitat microbiològica o modificacions de les propietats funcionals de les fraccions de la sang, que permetin incrementar el valor afegit dels derivats d'aquest subproducte alimentari.*

*En aquest article comentem, a tall d'exemple, alguns dels estudis realitzats en aquest camp pel nostre grup de recerca. L'article se centra en tres treballs concrets, que són: 1) determinar l'eficàcia de tractaments per alta pressió hidrostàtica com a tecnologia d'higienització de les fraccions de la sang pel seu efecte en la reducció de viabilitat de microorganismes contaminants; 2) la modificació d'algunes propietats funcionals de les proteïnes plasmàtiques mitjançant tractaments enzimàtics o induïda per l'aplicació d'alta pressió hidrostàtica, i 3) la millora del procés d'obtenció d'hidrolitzats proteics de la fracció cel·lular de la sang mitjançant tractaments de pressurització.*

*Els resultats d'aquests tres estudis confirmen l'elevat potencial d'aplicació de les altes pressions, soles o combinades amb tractaments enzimàtics, en els processos de desenvolupament d'ingredients alimentaris i en la millora de la qualitat dels productes.*

**PARAULES CLAU:** *Sang d'escorxador, alta pressió hidrostàtica.*

**SUMMARY:** *Developing added-value nutritional or functional food ingredients from blood coming from the slaughtering of pigs in industrial abattoirs is one of the research lines conducted by the group of Food Technology of the Institut de Tecnologia Alimentària (INTEA) at the University of Girona.*

*In this context, we have developed different research projects that included investigations aimed at assessing the potential of emerging technologies for improving the microbiological quality or for inducing functional modifications on blood derivatives, which contribute to increase the value of this food by-product.*

**D. PARÉS, E. SAGUER, M. TOLDRÀ,  
N. FORT, E. DÀVILA I C. CARRETERO**  
Institut de Tecnologia Agroalimentària -  
CERTA, Universitat de Girona

*In this article, we briefly present several examples of the work we have been carrying out on the application of high pressure treatments in the development of food ingredients from blood proteins. The present article is focused on three particular studies: 1) the determination of the efficiency of high hydrostatic pressure as a method to reduce microbial contamination of porcine blood fractions; 2) the modification of functional properties of plasma proteins by means of enzymatic treatments or induced by high pressure processing, and 3) the high-pressure-induced improvement of the process to obtain protein hydrolysates from the porcine red blood cells.*

*The results from these studies confirm the high potential of the application of high pressure processing, alone or combined with enzymatic treatments, on the development of food ingredients and the improvement of their quality.*

## INTRODUCCIÓ

La quantitat de sang de porc produïda en un any en els escorxadors de l'Estat espanyol és molt important, representa aproximadament el 64 % de la sang generada en el sacrifici del conjunt de bestiar (boví, oví, caprí i porcí) i l'any 2003 es van superar amb escreix les cent mil tones.

La sang és un dels subproductes d'escorxadors amb major poder contaminant. Això fa que la seva recuperació sigui una de les mesures internes importants per reduir la càrrega orgànica en els efluents dels escorxadors industrials i, òbviament, una activitat essencial per garantir el bon funcionament de les depuradores.

Tanmateix, la sang de porc, que pot arribar a suposar fins al 5 % del pes viu de l'animal, té un contingut en proteïna de l'ordre del 18 %, gairebé tanta com la carn magra, i per aquest motiu té moltes possibilitats d'utilització en la indústria, no només per a l'alimentació humana o animal, sinó també en la indústria mèdica, química, farmacèutica, com a fertilitzant o, fins i tot, com a material de construcció.

Així doncs, és molt més racional considerar la sang com una font important de proteïna amb aplicacions potencials dins la mateixa indústria alimentària i que, convenientment manipulada, permetrà obtenir productes amb valor afegit que ajudaran a rendibilitzar la inversió que requereixen els processos de recollida i transformació, que no pas com un residu que suposa una despesa afegida al procés productiu a

causa de la inversió que requereixen els tractaments d'eliminació i/o disminució del seu impacte ambiental.

El marc legal que regula el processament de la sang ha estat condicionat en els darrers anys pels esdeveniments que han tingut lloc en matèria de sanitat animal. Malalties com les encefalopaties han provocat canvis importants en la normativa vigent i han conduït la legislació dels productes derivats de sang cap a una situació complexa.

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

La sang que prové d'animals que no han superat la inspecció *ante mortem* es considera material de risc i, en conseqüència, és un residu que s'ha de destruir obligatòriament perquè la normativa no en permet cap aprofitament posterior.

La sang dels animals que superen la inspecció *ante mortem*, però que no superen o no se sotmeten a cap inspecció posterior al sacrifici, després de deixar-la coagular i assecar (s'ha de sotmetre a un tractament d'esterilització d'una durada mínima de vint minuts a 133 °C i 3 bars de pressió) es transforma en «farina de sang». Aquest producte està sotmès a diverses restriccions i, tot i poder ser destinada a alimentació animal, no pot ser utilitzada per nodrir animals de granja, ni es pot emprar com a fertilitzant de sòls on aquests pasturin.

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

## FRACCIONAMENT DE LA SANG

La sang es pot separar, per centrifugació, en dues fraccions: el plasma (que en representa el 60-70 %) i la fracció cel·lular (30-40 %).

El plasma obtingut de la sang és un líquid amb el 6-8 % de proteïna d'elevat valor nutritiu i amb aplicacions en la indústria càrnia com a enriquidor proteic. Segons Young *et al.* (1973), l'índex d'eficàcia proteica del plasma boví desmineralitzat i atomitzat (2,15) és superior al de la caseïna (1,9).

La fracció cel·lular separada del plasma conté un 28-38 % de proteïna, de la qual el 90 % es troba en forma d'hemoglobina. Aquesta proteïna té un valor nutricional afegit al del seu contingut en aminoàcids essencials, a causa de la presència de ferro hemínic, que s'absorbeix a nivell intestinal entre dues i tres vegades millor que el ferro lliure (Reizenstein, 1980) i es considera la forma biològica millor utilitzable del ferro.

## PROPIETATS FUNCIONALS

A més de l'elevat valor nutricional, les proteïnes de la sang tenen propietats funcionals potencialment útils en la formulació d'aliments. El

plasma sanguini en escalfar-se forma un gel associat a la desnaturització de les molècules proteiques (Harper *et al.*, 1978; Howell i Lawrie, 1984; Cheftel *et al.*, 1989; Real del Sol i Martín, 1991; Parés *et al.*, 1998a i 2000). La capacitat d'originar aquest tipus d'estructures és interessant en aliments degut al fet que els gels proporcionen textura, consistència i un medi que permet retenir aigua, nutrients i aromes.

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

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

### **APLICACIONS DE LES NOVES TECNOLOGIES EN EL DESENVOLUPAMENT D'INGREDIENTS ALIMENTARIS A PARTIR DE SANG PORCINA**

Els estudis d'aquesta línia d'investigació es van iniciar amb la caracterització de la sang d'escorxadors des del punt de vista fisicoquímic i microbiològic i l'estudi de les propietats funcionals de les dues fraccions, plasma i fracció cel·lular. La caracterització es va dur a terme tant en les fraccions líquides com en els productes en pols, després de ser deshidratats per atomització (Parés *et al.*, 1998a, 1998b, 2000; Parés i Ledward, 2001; Parés *et al.*, 2001; Saguer *et al.*, 2003, 2004 i 2005; Toldrà *et al.*, 2002a i 2002b, i 2004).

És obvi que les possibilitats d'aprofitament de qualsevol subproducte en la indústria d'aliments destinats al consum humà estan

exposada a múltiples fonts de contaminació.

La presència de microorganismes indesitjables a la sang és preocupant tant des del punt de vista de qualitat com de seguretat dels productes derivats. A més, el fet que la sang sigui un substrat ric en elements nutritius fa que es tracti d'un entorn adequat perquè aquests microorganismes s'hi desenvolupin ràpidament (Carretero i Parés, 2000). Amb tot això, i al marge de la càrrega microbiana inicial, el temps i la temperatura d'emmagatzematge resulten dues variables clau per disposar d'un producte amb una qualitat més o menys acceptable.

Existeix un interès creixent en la indústria alimentària pel processament per altes pressions com a tecnologia per obtenir aliments tradicionals o productes nous d'alta qualitat (Mertens i Knorr, 1992, a; Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998). Les pressions utilitzades en tractament d'aliments (100-1000 MPa) provoquen una varietat de canvis que inclouen destrucció de microorganismes, alteracions d'activitat enzimàtica, control de canvis de fase i alteració de la conformació de biopolímers que comporten canvis en les seves propietats funcionals, que poden ser beneficiosos per la qualitat dels productes (Galazka i Ledward, 1998).

A continuació exposarem alguns dels estudis que hem realitzat per tal d'avaluar les possibilitats d'aplicació de les altes pressions en productes derivats de sang d'escorxadors.

#### **Alta pressió hidrostàtica com a tecnologia d'higienització de les fraccions de sang**

La conservació dels aliments mitjançant els tractaments HHP està basada en diferents efectes de la pressió sobre els sistemes biològics, com per exemple: la permeabilitat i la funcionalitat de la membrana de les cèl·lules, la morfologia cel·lular, les reaccions bioquímiques i els mecanismes genètics dels microorganismes (Hoover *et al.*, 1989; Hoover, 1993). La membrana cel·lular és la part dels microorganismes que es veu afectada en primer terme

## **L'efecte de l'alta pressió sobre els microorganismes del plasma és fortament dependent de la temperatura de procés**

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

El color vermell de la sang fa que també es pugui plantejar el seu aprofitament com a colorant natural, amb moltes menys limitacions d'utilització que les que afecten els colorants artificials.

condicionades per la qualitat de la matèria que pretenem aprofitar. El sistema de recollida de la sang en els escorxadors en determina la qualitat microbiològica. Si bé els sistemes que utilitzen un ganivet higiènic per extreure la sang directament del torrent sanguini permeten una recollida amb una contaminació bacteriològica reduïda, en sistemes oberts, que són els més àmpliament utilitzats, la sang està

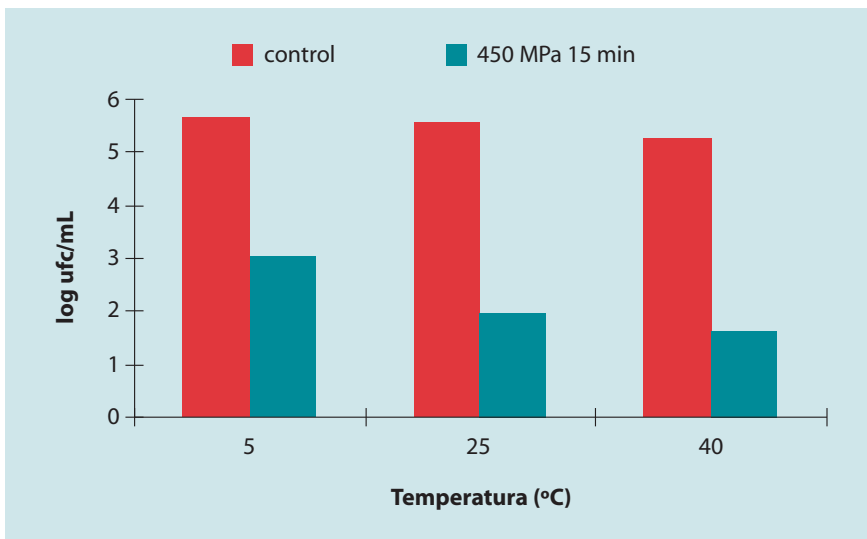


FIGURA 1. Recomptes de microorganismes mesòfils del plasma no tractat (control), i pressuritzat a 450 MPa, a 5, 20 i 40 °C durant 15 minuts.

(Morita, 1975). Aquesta, després de la pressurització, normalment mostra alterada la seva permeabilitat en modificar-se la capa de fosfolípids, fet que provoca des de danys subletals a les cèl·lules supervivents fins a la lisi cel·lular.

Hem dut a terme estudis per determinar l'aplicació de l'alta pressió hidrostàtica com a possible alternativa de conservació per tal d'obtenir plasma i fracció cel·lular de

bona qualitat microbiològica, sense perjudicar les seves propietats funcionals. A continuació es presenten algunes de les conclusions més rellevants d'aquests estudis.

El tractament de pressurització més adequat per higienitzar la fracció plasmàtica va ser de 450 MPa durant quinze minuts (Parés *et al.*, 2001). Es va observar que l'efecte de l'alta pressió sobre els microorganismes del plasma és fortament

dependent de la temperatura de procés. Tractaments de quinze minuts a 450 MPa aplicats a 5 °C conduïen a reduccions de l'ordre del 90 % en els recomptes microbiològics. A 25 °C i 40 °C augmenta l'eficàcia del tractament i s'aconsegueixen reduccions en els recomptes de 99,82 % i 99,97 %, respectivament (figura 1).

A més, també es va observar una reducció molt important en la capacitat de creixement de la població supervivent al tractament de pressurització. Aquesta disminució, que es pot veure en la figura 2, era del 50 % a 25 °C i superior al 80 % a 40 °C. Es va comprovar que el tractament més efectiu (450 MPa, durant quinze minuts a 40 °C) no provocava efectes negatius apreciables en la capacitat gelificant de la fracció plasmàtica.

Pel que fa a l'aplicació de l'alta pressió sobre la fracció cel·lular, es va observar que tractaments per sobre de 400 MPa comportaven un increment de viscositat que provocava un espesseïment indesitjable en el producte i es va considerar més adequat aplicar tractaments de 400 MPa (Toldrà *et al.*, 2002a). Es van aconseguir disminucions significatives dels recomptes d'aerobis mesòfils (figura 3). Els tractaments realitzats a 400 MPa, a 20 i 40 °C durant quinze minuts van ser els més efectius quant a la capacitat higienitzant, i van permetre passar de recomptes de l'ordre de  $10^6$  ufc·mL<sup>-1</sup> a les mostres control a recomptes de  $10^2$  ufc·mL<sup>-1</sup> a les pressuritzades. No es va aconseguir incrementar significativament l'eficàcia del procés allargant el temps de tractament trenta minuts.

Igual que s'havia observat en el plasma, les corbes de creixement dels microorganismes supervivents als tractaments van mostrar que l'alta pressió produeix una inactivació considerable de la capacitat de creixement de la microbiota contaminant amb temps de pressurització de quinze i trenta minuts, si es compara amb la corba de creixement mitjana dels microorganismes presents a la FC no tractada (figura 4).

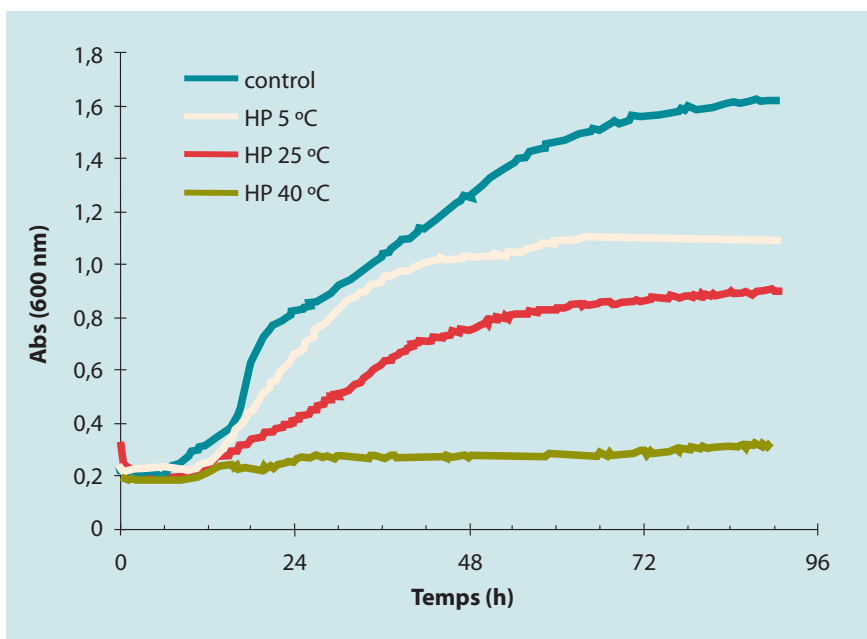


FIGURA 2. Corbes de creixement a 31 °C dels microorganismes del plasma no tractat (control) i del plasma sotmès a tractaments de pressurització (HP) a 450 MPa durant 15 minuts i a temperatures de 5, 25 i 40 °C.

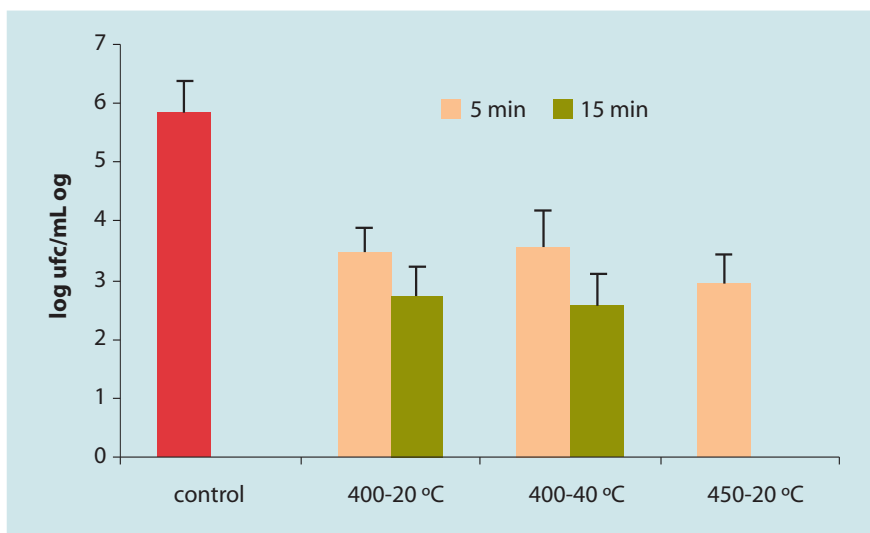


FIGURA 3. Recomptes de microorganismes aeròbics mesòfils de la FC no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa, a 20 i 40 °C durant 5 i 15 minuts i a 450 MPa a 20 °C durant 5 minuts. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes (P = 95 %).

### Modificacions de funcionalitat de les proteïnes plasmàtiques

Una de les propietats més interessants del plasma és que en escalfar-se forma gels (Harper *et al.*, 1978). Un gel es pot descriure com un estadi intermedi entre una solució i un precipitat amb el balanç just d'interaccions proteïna-proteïna i proteïna-solvent perquè es formi una xarxa estructurada (Hermanson, 1978). Les característiques dels gels que s'obtenen amb el plasma san-

guini són comparables a les dels que s'obtenen amb la clara d'ou, ingredient molt utilitzat com a agent gelificant en la formulació de productes de pastisseria. La gelificació proteica no tan sols s'aplica per a l'obtenció de gels sòlids viscoelàstics, sinó també per millorar la retenció d'aigua (Torres *et al.*, 1997). Les propietats gelificants de les proteïnes es poden modificar aplicant-hi determinats tractaments físics, químics i/o enzimàtics.

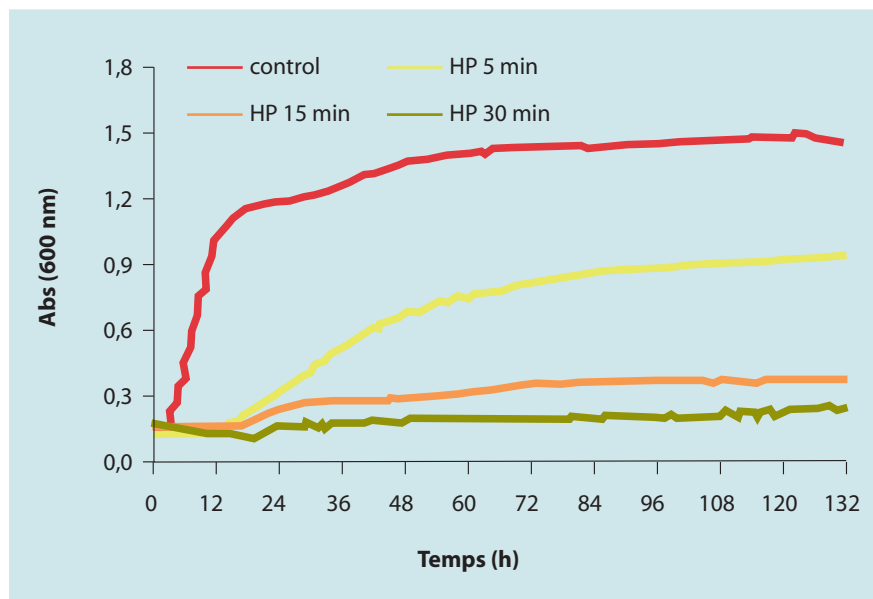


FIGURA 4. Corbes de creixement a 31 °C dels microorganismes de la FC hemolitzada no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa i a 20 °C durant 5, 15 i 30 minuts. Les dades corresponen a les mitjanes de les repeticions realitzades individualment per quadruplicat sobre tres mostres.

Les característiques físiques dels gels proteics són determinades pel tipus i nombre d'interaccions proteïna-proteïna. El balanç d'interaccions atractives i forces de repulsió que es donen entre les diferents molècules de proteïna prèviament desnaturalitzades determina el procés de gelificació (Kinsella, 1984; Mulvihill i Kinsella, 1987). Aquestes interaccions depenen del pH i de la força iònica (Van Kleef, 1986; Mulvihill i Kinsella, 1987; Xiong, 1992), ja que provoquen canvis en la càrrega elèctrica de les molècules, de la temperatura d'escalfament (Foegeding *et al.*, 1986a i 1986b) i de la concentració proteica, de la composició aminoacídica i del pes molecular (Shimada i Matsushita, 1980; Kohnhorst i Mangino, 1985).

La màxima duresa dels gels s'obté quan el pH del medi difereix del *pI* de la proteïna en diverses unitats (Dalgleish i Hunt, 1995). En valors de pH propers al *pI* es dona un elevat nombre d'interaccions proteïna-proteïna; en valors de pH allunyats del *pI* les repulsions electrostàtiques augmenten i les interaccions intermoleculares disminueixen. El valor de pH també afecta la concentració crítica d'algunes proteïnes per tal que es doni gelificació. Un altre aspecte a considerar és l'efecte del pH sobre la desnaturalització; les proteïnes són més sensibles a la temperatura quan el pH és similar al seu *pI* (Wit, 1981), desplegant-se i exposant més fàcilment zones reactives a les interaccions intermoleculares. El pH també afecta la reactivitat dels grups tiol i la taxa d'oxidació dels grups —SH (per formar enllaços S-S) (Xiong i Kinsella, 1990).

Les proteïnes plasmàtiques són un ingredient útil per formar gels a pH neutre o lleugerament àcid, però la capacitat gelificant disminueix a mesura que s'acidifica el medi (Parés *et al.*, 1998a). Si es considera que les proteïnes plasmàtiques són àmpliament utilitzades per a l'elaboració de productes carnis, els quals tenen un pH àcid, millorar les propietats gelificants del plasma a valors àcids de pH és un repte interessant, que el

nostre grup ha abordat a partir de dues estratègies diferents: tractaments enzimàtics i tractaments per alta pressió hidrostàtica.

### Tractaments enzimàtics

Al llarg de la història de la indústria alimentària s'han aplicat molts enzims diferents per tal de modificar les proteïnes. Entre els més utilitzats s'hi troben les proteases (que fragmenten les proteïnes en polipèptids), les peptidoglutaminases (que desamiden proteïnes), i les proteïnes quinases (que fosforilen proteïnes). No obstant això, l'ús de la transglutaminasa (que transfereix grups acil) és cada vegada més freqüent a causa de les seves possibilitats. La transglutaminasa pot reduir la quantitat requerida de sal i fosfat gràcies a les seves propietats lligants (Wijngaards i Paardekooper, 1988; Nielsen *et al.*, 1995; Kuraishi *et al.*, 1997), de manera que es poden obtenir productes reestructurats amb una bona textura. Recentment s'ha proposat la tirosinasa com un enzim alternatiu a la transglutaminasa per millorar les propietats funcionals de proteïnes que no li són un bon substrat, com les proteïnes del sèrum de llet (Thalman i Lötzbeyer, 2002).

Com s'ha descrit anteriorment, el plasma de la sang de porc és un molt bon agent gelificant, però aquesta propietat disminueix quan s'acidifica el medi. Hem determinat l'efecte del pH sobre les propietats gelificants del plasma i hem observat que a pH 5,5 els valors de duresa i capacitat de retenció d'aigua són el 53 % i el 14 % inferiors, respectivament, als obtinguts a pH 7,5. Per això, vam decidir realitzar diversos estudis amb l'objectiu principal de millorar la capacitat gelificant del plasma porcí a pH àcid mitjançant un tractament enzimàtic amb transglutaminasa microbiana (*MTGasa*).

La transglutaminasa és un enzim que millora les propietats gelificants de moltes proteïnes de tipus alimentari, però no hi havia referències prèvies sobre el tractament del plasma sencer amb aquest enzim. No obstant això, hi ha treballs que

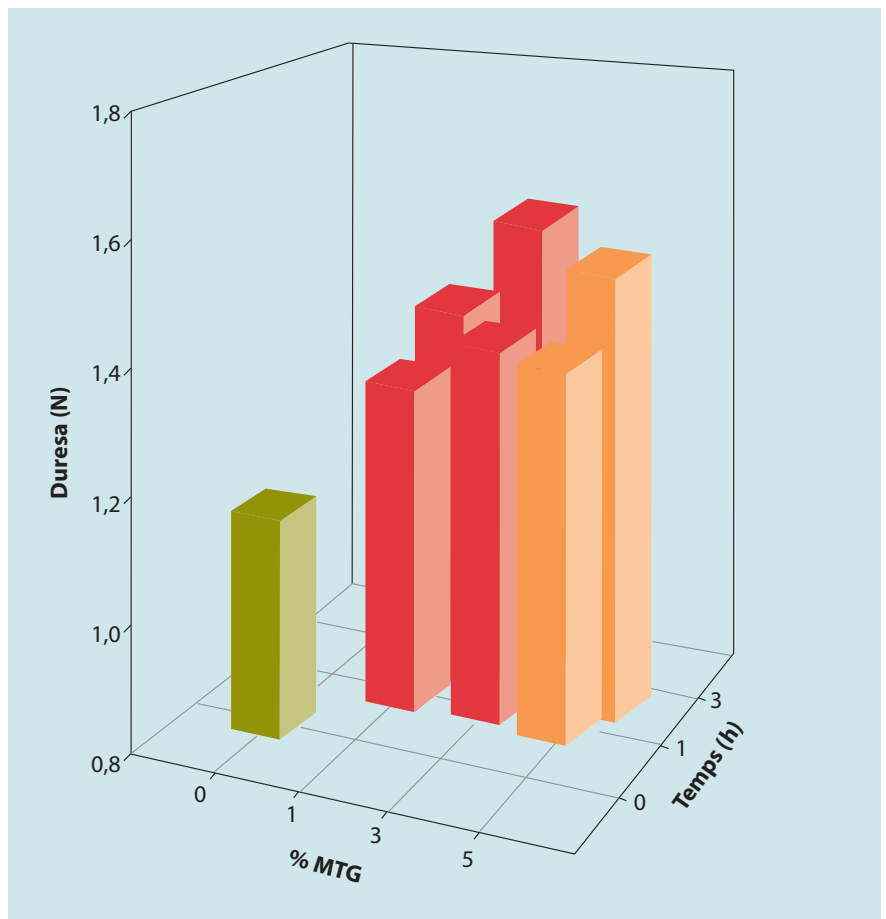


FIGURA 5. Duresa dels gels en funció de la concentració d'enzim, expressat com a % de MTG, i del temps d'incubació previ a la gelificació ( $n = 3$ ).

indiquen que la *MTGasa* permet millorar les propietats funcionals d'alguna de les seves fraccions proteïques, com la seroalbúmina en determinades condicions (Chanyongvorakul *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2003).

Es van realitzar una sèrie d'experiments per tal de determinar les condicions més adequades d'actuació de l'enzim (concentració d'enzim, pH, temps i temperatura d'incubació). Els resultats obtinguts indicaven que tant la concentració d'enzim assajada com el temps d'incubació afectaven significativament les propietats gelificants del plasma a pH 5,5; el tractament que comportava millores més importants sobre la duresa (figura 5) i la capacitat de retenció d'aigua (figura 6) era un 3 % MTG durant tres hores (a 30 °C de temperatura d'incubació i pH 7) (Saguer *et al.*, 2005).

Sembla que la millora en la duresa dels gels durant el tractament

enzimàtic pot ser atribuïda parcialment al fet de mantenir el plasma tres hores a 30 °C durant el període d'incubació; no obstant això, s'ha comprovat que aquest tractament tèrmic no té cap efecte sobre la capacitat de retenció d'aigua, ja que és l'efecte de l'enzim el que millora aquesta propietat.

Atès que en alguns estudis en proteïnes globulars s'havia observat que els agents reductors milloren l'activitat de la *MTGasa*, s'han assajat també tractaments combinats amb *MTGasa* i cisteïna, incubats conjuntament o bé addicionant la cisteïna després del tractament enzimàtic. Pel que fa a la duresa, s'ha observat que els dos tractaments milloren aquest paràmetre, sense que l'ordre d'addició dels dos productes alteri els resultats obtinguts; a més, els resultats indiquen que els efectes de l'enzim i de la cisteïna són aproximadament additius (Saguer *et al.*, 2004 i 2005). Tanma-

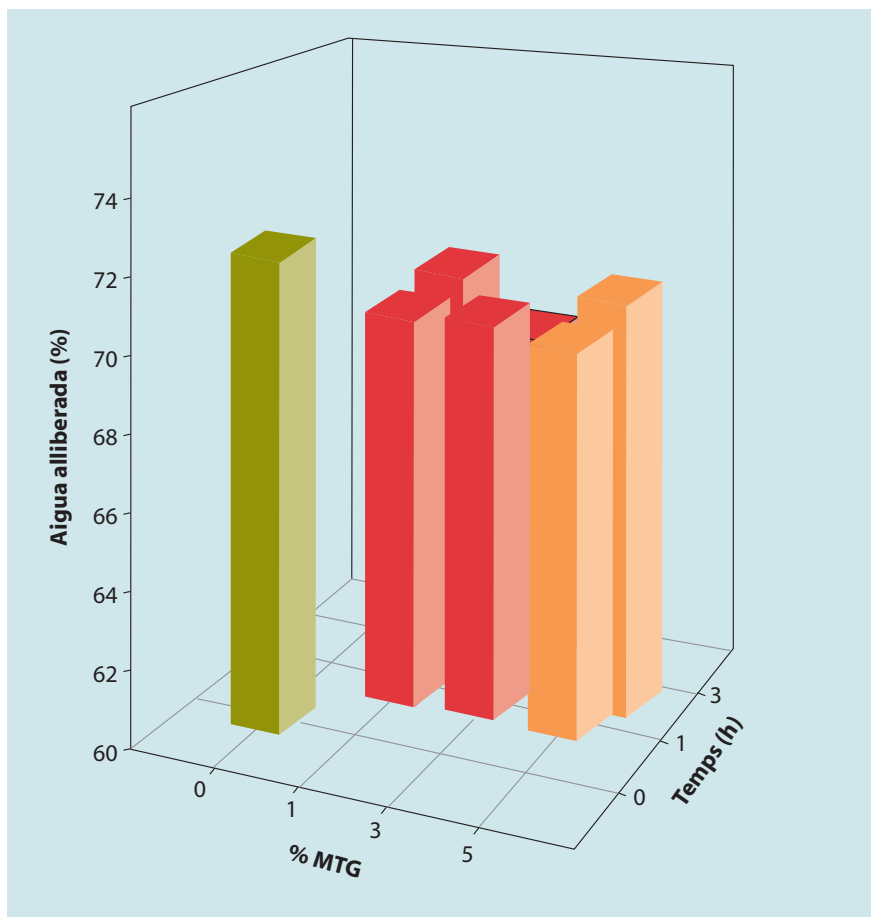


FIGURA 6. Percentatge d'aigua alliberada després de la centrifugació de gels de plasma a pH 5,5 en funció de la concentració d'enzim, expressada com a % de MTG, i del temps d'incubació previ a la gelificació ( $n = 3$ ).

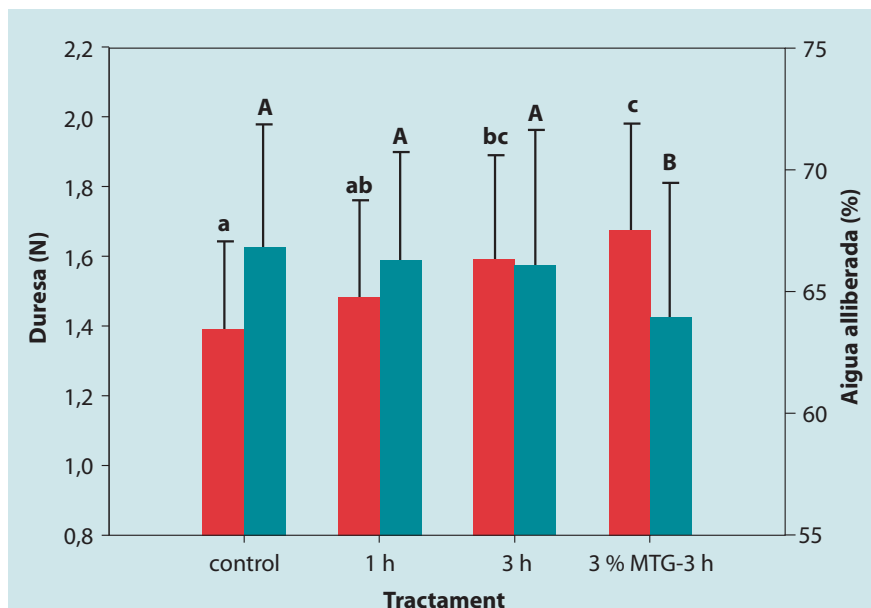


FIGURA 7. Efecte de diferents tractaments sobre la duresa (■) i la capacitat de retenció d'aigua (■) dels gels de plasma a pH 5,5: control; gelificació amb cisteïna (0,25 %); incubació amb MTG (3 %); incubació conjunta de MTG (3 %) i cisteïna (0,25 %) (MTG+Cys), i incubació de MTG (3 %) i posterior addició de cisteïna (0,25 %) (MTG//Cys). Valors mitjans  $\pm$  SD ( $n = 3$ ;  $\alpha = 0,05$ ).

teix, cap dels dos tractaments combinats va tenir efectes significatius sobre la capacitat de retenció d'aigua respecte a les mostres control (figura 7).

### Tractaments per alta pressió hidrostàtica

Molts autors han publicat els efectes de l'alta pressió sobre les proteïnes. La desnaturalització de proteïnes induïda per l'alta pressió és un fenomen complex que depèn de l'estructura de la proteïna, la pressió, la temperatura, el pH, la força iònica i la composició del medi on es trobin en solució o suspensió (Masson, 1992). Diversos estudis sobre els canvis de volum de proteïnes han mostrat que les interaccions responsables de l'estabilització de les estructures terciària i quaternària, com les interaccions hidrofòbiques o electrostàtiques, són les més sensibles a la pressurització (Balny i Masson, 1993; Heremans, 1982 i 1992; Galazka i Ledward, 1998). Els ponts d'hidrogen, que estabilitzen les estructures en  $\alpha$ -hèlix i fulla plegada  $\beta$  de les proteïnes, i els enllaços covalents es veuen poc afectats per la pressió. Els enllaços covalents es mantenen estables fins que la seva formació provoca un canvi negatiu de volum ( $-10 \text{ mL}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), i valors gairebé zero d'intercanvi entre unions covalents (Mozahev, Heremans i Frank, 1994). Tanmateix, a pressions al voltant de 300 MPa, els grups sulfhidril poden oxidar-se per formar ponts disulfur (Galazka i Ledward, 1998).

La seroalbúmina nativa experimenta un desplegament i una agregació importants en ser sotmesa a un tractament de pressurització (Galazka, Summer i Ledward, 1996) i pèrdua de la seva estructura secundària depenent de la magnitud de la pressió aplicada (Hayakawa *et al.*, 1992; Hayakawa *et al.*, 1994). Com que la seroalbúmina és el component principal de les proteïnes del plasma (55-64 %), es pot esperar un canvi en les propietats funcionals en el plasma pressuritzat.

S'han dut a terme estudis per tal de determinar la influència dels tractaments per alta pressió en la funcionalitat de les proteïnes del plasma amb l'objectiu de comprovar l'efecte sobre la seva capacitat gelificant i l'eficàcia del plasma pressuritzat com a agent dispersant de la fase lipídica quan s'utilitza com a emulgent, així com l'estabilitat de les emulsions que se n'obtenen (Parés i Ledward, 2001).

Amb aquest objectiu, es van determinar les propietats emulsionants i les característiques dels gels (textura i capacitat de retenció d'aigua) preparats a partir de solucions de plasma pressuritzat a diferents pH (5,5 a 7,5).

Es va poder observar que la duresa dels gels disminuïa significativament quan s'incrementava la pressió per sobre de 400 MPa i que aquest efecte era més evident a mesura que es disminuïa el pH (figura 8). Tanmateix, malgrat que a 600 MPa la pressurització provocava una disminució molt forta de la fermesa dels gels a pH 6,5 i 7,5, aquesta s'incrementava en gels a pH 5,5. Per a tractaments de fins a 500 MPa, l'elasticitat més elevada va correspondre als gels a pH 7,5. També es va poder observar que els gels de plasma a pH 6,5 tractat a pressions superiors als 400 MPa milloraven la seva capacitat de retenció d'aigua (figura 9).

Per altra banda, es van observar canvis en el comportament del plasma com a agent emulsionant provocats pel tractament amb altes pressions (figura 10). L'activitat emulsionant més elevada es va aconseguir en mostres tractades a 400 MPa. A pressions superiors a 400 MPa, a mesura que s'incrementava la pressió, disminuïa tant l'activitat emulsionant com l'estabilitat de les emulsions per a qualsevol dels valors de pH estudiats.

Actualment s'estan duent a terme estudis que combinen el tractament enzimàtic i les altes pressions per determinar l'efecte del tractament combinat sobre la funcionalitat de les proteïnes plasmàtiques.

## La duresa dels gels disminuïa significativament quan s'incrementava la pressió per sobre de 400 MPa i aquest efecte era més evident a mesura que es disminuïa el pH

### Efecte de les altes pressions en el procés d'obtenció d'hidrolitzats decolorats de la fracció cel·lular (FC)

El principal factor limitant per a la utilització de la fracció cel·lular en molts productes alimentaris és la seva pigmentació vermella fosca. Conseqüentment, si es vol emprar l'Hb com un ingredient alimentari, és necessari sotmetre-la a algun procés de decoloració o a alguna manipulació tecnològica per tal d'emascarar el color fosc que proporciona la presència del grup hemo. En aquest context, diversos autors han proposat diferents procediments de decoloració de la FC, basats en la ruptura de la unió entre els dos components de l'Hb, per poder utilitzar la globina decolorada com a additiu alimentari.

Entre els diferents mètodes d'obtenció de globina sense color, la hidròlisi enzimàtica sembla la millor opció quant a l'aplicació pràctica a escala industrial (Houlier, 1986; a: Uchman *et al.*, 1994). Els enzims presenten l'avantatge d'una rapidesa de reacció en condicions suaus de temperatura i pH, i la seva especificitat per a un tipus determinat d'enllaç. En canvi, els tractaments químics no són tan indicats per a les aplicacions alimentàries atès que les condicions de reacció són més agressives i les reaccions químiques no són tan específiques, i a causa de les dificultats relacionades amb l'eliminació de reactius residuals presents al producte acabat (Biotimes, 2002, Novozymes, Novo A/S).

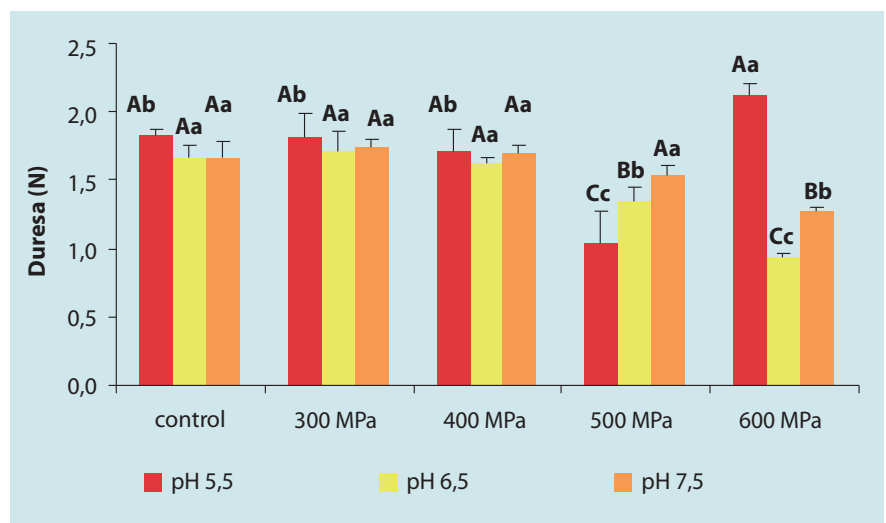


FIGURA 8. Duresa dels gels induïts per escalfament (45 minuts a 80 °C) de solucions (10 % p/v) de plasma a diferents pH, sotmeses a tractaments de pressurització de 15 minuts. Mitjanes de tres determinacions ± desv. std. Les lletres indiquen les diferències significatives entre pH (majúscules) i tractaments (minúscules).



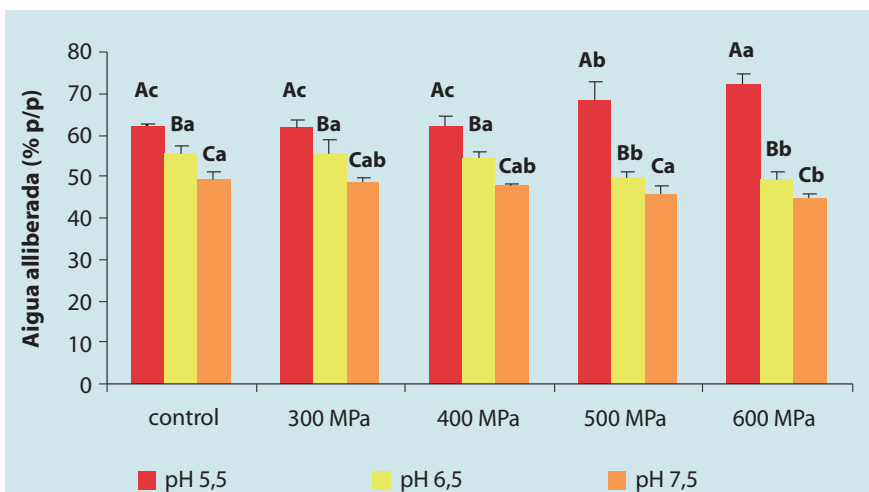


FIGURA 9. Percentatge d'aigua alliberada de gels induïts per escalfament (45 minuts a 80 °C) de solucions (10 % p/v) de plasma a diferents pH, sotmeses a tractaments de pressurització de 15 minuts, després d'una centrifugació a 4000 x g durant 10 minuts. Mitjanes de tres determinacions ± desv. std. Les lletres indiquen les diferències significatives entre pH (majúscules) i tractaments (minúscules).

condicions de tractament mantenen quasi intactes els aminoàcids i es pot regular el grau d'hidròlisi i, per tant, la composició i les propietats funcionals del producte final (Rodríguez, 1994).

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

Hem realitzat estudis per tal d'obtenir globina decolorada i hidrolitzats de l'hemoglobina amb la utilització de diferents enzims proteolítics (Toldrà, 2002). S'han seleccionat els enzims més eficaços pel que fa a la capacitat de descoloració de l'Hb. En la figura 11 es pot observar l'aspecte de la FC deshidratada abans i després de ser sotmesa al procés de descoloració.

També s'han determinat els efectes de l'aplicació de l'alta pressió hidrostàtica sobre el procés d'obtenció d'hidrolitzats proteics de l'Hb (Toldrà *et al.*, 2002b). El fet que les altes pressions indueixin fenòmens de desnaturalització en l'Hb i produeixin l'activació d'alguns enzims ens va portar a formular la hipòtesi que el tractament de pressurització podia afavorir el procés d'hidròlisi enzimàtica de la FC.

Els resultats d'aquest estudi van permetre establir que un tractament amb altes pressions hidrostàtiques incrementa l'activitat de la tripsina sobre l'Hb quan el substrat i l'enzim es tracten conjuntament (figura 12) i afavoreix el procés d'obtenció d'hidrolitzats decolorats a partir de la FC, la qual cosa permet assolir el mateix grau de des-

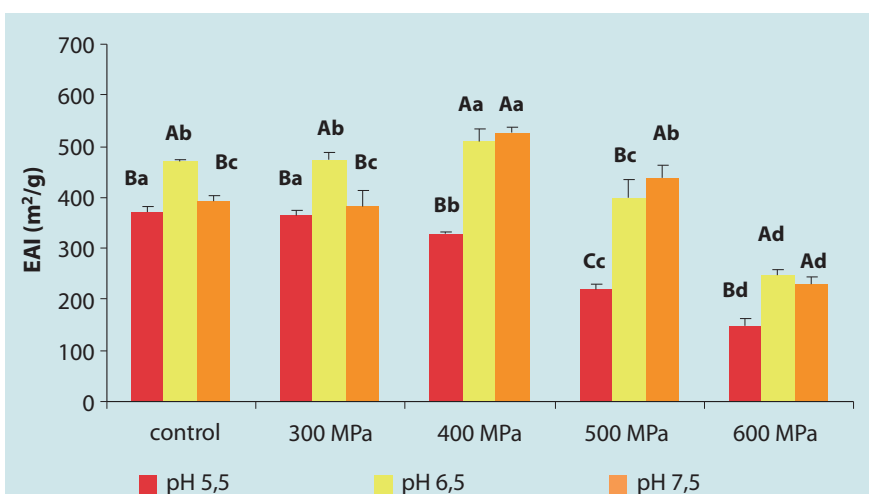


FIGURA 10. Índex d'activitat emulsionant (EAI) de solucions (10 % p/v) de plasma a diferents pH, sotmeses a tractaments de pressurització de 15 minuts (0,5 % w/v, fracció volumètrica d'oli = 0,25, dilució 1/2500 en 0,1 % SDS). Mitjanes de tres determinacions ± desv. std. Les lletres indiquen diferències significatives entre pH (majúscules) i tractaments (minúscules).

Hi ha alguns estudis centrats en procediments de decoloració de la FC mitjançant la hidròlisi enzimàtica de l'Hb amb l'objectiu d'eliminar el grup hemo per evitar el problema de l'enfosquiment. La hidròlisi enzimàtica consisteix a induir l'hemòlisi dels eritròcits mitjançant un xoc osmòtic, seguit d'un tractament amb proteases a pH i temperatura controlats. Posteriorment, l'enzim s'inactiva i s'obté una fracció inso-

luble que conté el grup hemo. La fracció soluble està composta pels pèptids de baix pes molecular i els aminoàcids lliures resultants, que es poden separar del grup hemo mitjançant ultrafiltració o centrifugació, per incorporar-los a productes carnis en forma d'hidrolitzats proteics (Ockerman i Hansen, 1994). Aquesta fracció soluble també es pot purificar més amb carbó actiu i, finalment, concentrar-la i assecar-la. Les

# Els resultats d'aquest estudi van permetre establir que un tractament amb altes pressions hidrostàtiques incrementa l'activitat de la tripsina sobre l'Hb quan el substrat i l'enzim es tracten conjuntament

que permetin fer més sostenible una activitat industrial tan important al nostre país com és el sacrifici de bestiar.

## BIBLIOGRAFIA

- BALNY, C.; MASSON, P. (1993). «Effects of high pressure on proteins». *Food Rev. Int.*, 9 (4), p. 611-628.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G.; POTHAKAMURY, U. R.; PALOU, E.; SWANSON, B. G. (1998). «Non-thermal preservation of foods». *Food Science and Technology Series* [Nova York: Marcel Dekker Inc], vol. 82. 276 p.

coloració amb una dosi d'enzim inferior. El tractament d'hidròlisi de la FC amb la utilització combinada de tripsina seguida d'un tractament amb pepsina permet l'obtenció d'un hidrolitzat proteic d'Hb descolorat i hidrolitza completament la globina, donant lloc a dos pèptids majoritaris, de 10,8 i 7,4 KDa. Val a dir que també produeix un 60-80 % de nitrogen soluble en TCA, constituït fonamentalment per pèptids petits i aminoàcids lliures.



FIGURA 11. Mostres de FC no hidrolitzada (control) (A) i de l'hidrolitzat proteic de Hb mitjançant tripsina + pepsina (B) deshidratades per atomització.

## CONCLUSIÓ

La justificació de la nostra línia de recerca es basa en el convenciment que la millor manera d'evitar que els impactes associats al consum excedeixin la capacitat de càrrega del medi ambient és disminuir els costos de la gestió de residus. Una via per aconseguir-ho és la revaloració de residus en forma de subproductes. La sang procedent d'escorxadors representa un residu altament contaminant que es genera en grans quantitats i que, com s'ha explicat en aquest treball, té interessants vies d'aprofitament.

L'aplicació de noves tecnologies a la millora de la qualitat de la sang dels escorxadors i els productes que se'n deriven obre interessants expectatives per a l'aprofitament d'aquest residu. Cal continuar treballant en l'aplicació d'aquestes i altres alternatives per tal de trobar sistemes

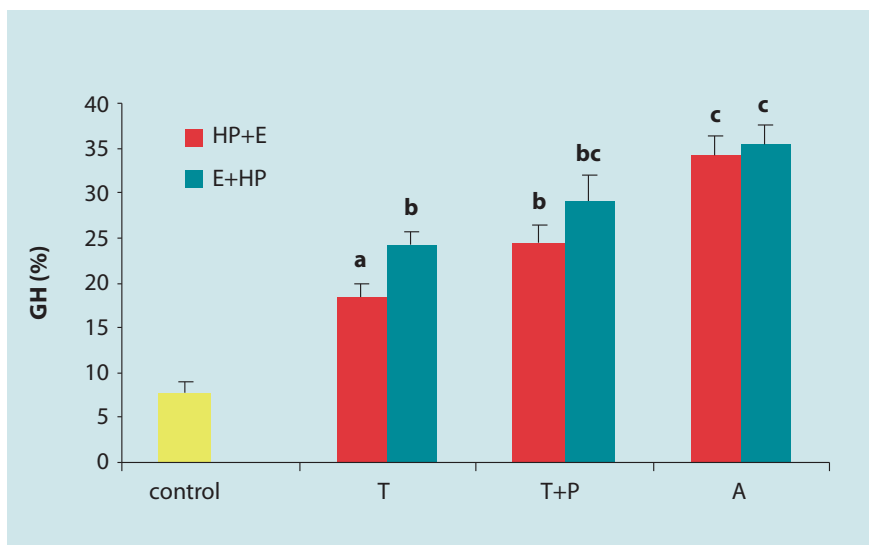


FIGURA 12. Grau d'hidròlisi (%) de la FC no tractada (control) i dels hidrolitzats de FC sotmesa al tractament HHP abans (HP + E) i després (E + HP) de l'addició dels enzims. T: tripsina, T + P: tripsina seguida de pepsina, i A: alcalasa. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes (P = 95 %). Les lletres mostren diferències significatives (P < 0,05) entre els hidrolitzats.

- CALDIRONI, H. A.; OCKERMAN, H. W. (1982). «Incorporation of blood proteins into sausage». *J. Food Sci.*, 47 (2), p. 405-408.
- CARRTERO, C.; PARÉS, D. (2000). «Improvement of the microbiological quality of blood plasma for human consumption purposes». *Recent Res. Develop. Agric. Food Chem.*, 4, p. 203-216.
- CHANYONGVORAKUL, Y.; MATSUMURA, Y.; SAWA, A.; NIO, N.; MORI, T. (1997). «Polymerization of beta-lactoglobulin and bovine serum albumin at oil-water interfaces in emulsions by transglutaminase». *Food Hydrocol.*, 11 (4), p. 449-455.
- CHEFTEL, J. C.; CUO, J. L.; LORIENT, D. (1989). *Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutricional. Modificaciones químicas*. Saragossa: Acribia.
- DALGLEISH, D. G.; HUNT, J. A. (1995). «Protein-protein interactions in food materials». A: GAONKAR, A. G.; MARCEL DEKKER, INC. [ed.]. *Ingredient interactions: Effects on food quality*. Nova York, p. 199-234.
- DE VUONO, M.; PENTEADO, C.; LALOJO, F. M.; PEREIRE DOS SANTOS, N. (1979). «Functional and nutritional properties of isolated bovine blood proteins». *J. Sci. Food Agric.*, 30, p. 809-815.
- ETHERIDGE, P. A.; HICKSON, D. W.; YOUNG, C. R.; LANDMANN, W. A.; DILL, C. W. (1981). «Functional and chemical characteristics of bovine plasma proteins isolated as a metaphosphate complex». *J. Food Sci.*, 46, p. 1782-1784.
- FOEGEDING, E. A.; ALLEN, C. E.; DAYTON, W. R. (1986a). «Effect of heating rate on thermally formed myosin, fibrinogen and albumin gels». *J. Food Sci.*, 51 (1), p. 104-108, 112.
- (1986b). «Interaction of myosin-albumin and myosin-fibrinogen to form protein gels». *J. Food Sci.*, 51 (1), p. 109-112.
- GALAZKA, V. B.; LEDWARD, D. A. (1998). «High pressure effect on biopolymers». A: HILL, S. E.; LEDWARD, D. A.; MITCHELL, J. R. [ed.]. *Functional properties of food macromolecules*. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc., p. 278-301.
- GALAZKA, V. B.; SUMMER, I. G.; LEDWARD, D. A. (1996). «Changes in protein-protein and protein-polysaccharide interactions induced by high pressure». *Food Chem.*, 45, p. 3465-3471.
- HARPER, J. P.; SUTER, D. A.; DILL, C. W.; JONES, E. R. (1978). «Effects of heat-treatment and protein concentration on rheology of bovine plasma-protein suspensions». *J. Food Sci.*, 43 (4), p. 1204-1209.
- HAYAKAWA, I.; KAJIHARA, J.; MORIKAWA, K.; ODA, M.; FUJIO, Y. (1992). «Denaturation of bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin by high pressure, heat and chemicals». *J. Food Sci.*, 57 (2), p. 288-292.
- HAYAKAWA, I.; KANNO, T.; TOMITA, M.; FUJIO, Y. (1994). «Application of high-pressure for spore inactivation and protein denaturation». *J. Food Sci.*, 59 (1), p. 159-163.
- HEREMANS, K. (1982). «High pressure effects on proteins and other biomolecules». *Ann. Rev. Biophys. Bioengin.*, 11, p. 1-21.
- (1992). «From living systems to biomolecules». A: BALNY, R.; HAYASHI, K.; HEREMANS, K.; MASSON, P. [ed.]. *High pressure and biotechnology. Colloque INSERM*. Vol. 224. Montrouge: John Libbery Eurotex Ltd., p. 37-44.
- HERMANSSON, A. M. (1978). «Physicochemical aspects of soy proteins structure formation». *J. Texture Studies*, 9 (1-2), p. 33-58.
- HOOVER, D. G. (1993). «Pressure effects on biological systems». *Food Technol.*, 47 (6), p. 150-155.
- HOOVER, D. G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A. M.; FARKAS, D. E.; KNORR, D. (1989). «Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms». *Food Technol.*, 43 (3), p. 99-107.
- HOWELL, N. K.; LAWRIE, R. A. (1984). «Functional aspects of blood plasma proteins. 2. Gelling properties». *J. Food Technol.*, 19 (3), p. 289-295.
- KANG, Y. N.; KIM, H.; SHIN, W. S.; WOO, G.; MOON, T. W. (2003). «Effect of disulfide bond reduction on bovine serum albumin stabilized emulsion gel formed by microbial transglutaminase». *J. Food Sci.*, 68 (7), p. 2215-2220.
- KINSELLA, J. E. (1984). «Milk proteins. Physicochemical and functional properties». *Crc. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 21 (3), p. 197-262.
- KLEEF, F. S. M. van (1986). «Thermally induced protein gelation: gelation and rheological characterization of highly concentrated ovalbumin and soybean protein gels». *Biopolymers*, 25, p. 31-59.
- KOHNHORST, A. L.; MANGINO, M. E. (1985). «Prediction of the strength of whey protein gels based on composition». *J. Food Sci.*, 50 (5), p. 1403-1405.
- KURASHI, C.; SAKAMOTO, J.; YAMAZAKI, K.; SUSA, Y.; KUHARA, C.; SOEDA, T. (1997). «Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking». *J. Food Sci.*, 62 (3), p. 488-490, 515.
- MASSON, P. (1992). «Pressure denaturation of proteins». A: BALNY, R.; HEREMANS, R.; HEREMANS, K.; MASSON, P. [ed.]. *High pressure and biotechnology. Colloque INSERM*. Vol. 224. Montrouge: John Libbery Eurotex Ltd., p. 89-99.
- MORITA, R. Y. (1975). «Psychrophilic Bacteria». *Bact. Rev.*, 39 (2), p. 144-167.
- MOZAHEV, V. V.; HEREMANS, K.; FRANK, J. (1994). «Exploiting the effect of high hydrostatic pressure in biotechnological applications». *Trends Biotechnol.*, 12, p. 493-501.
- MULVIHILL, D. M.; KINSELLA, J. E. (1987). «Gelation characteristics of whey proteins and  $\beta$ -lactoglobulin». *Food Technol.*, 41 (9), p. 102, 104, 106, 108, 110-111.
- NAKAMURA, R.; HAYAKAWA, S.; YASUDA, K.; SATO, Y. (1984). «Emulsifying properties of bovine blood globin. A comparison with some proteins and their improvement». *J. Food Sci.*, 49 (1), p. 102-104.
- NIELSEN, G. S.; PETERSEN, B. R.; MOLLER, A. J. (1995). «Impact of salt, phosphate and temperature on the effect of a transglutaminase (F-XIII) on the texture of restructured meat». *Meat Sci.*, 41 (3), p. 293-299.
- OCKERMAN, H. W.; HANSEN, C. L. (1994). *Industrialización de subproductos de origen animal*. Saragossa: Acribia.
- PARÉS, D.; LEDWARD, D. A. (2001). «Emulsifying and gelling properties of porcine blood plasma as influenced by high-pressure processing». *Food Chem.*, 74 (2), p. 139-145.
- PARÉS, D.; SAGUER, E.; SAURINA, J.; SUÑOL, J. J.; CARRTERO, C. (1998a). «Functional properties of heat induced gels from liquid and spray dried porcine blood plasma as influenced by pH». *J. Food Sci.*, 63, p. 958-961.
- PARÉS, D.; SAGUER, E.; SAURINA, J.; SUÑOL, J. J.; TOLDRA, M.; CARRTERO, C. (1998b). «DSC study of the effects of high pressure and spray-drying treatment on porcine plasma». *J. Therm. Anal. Cal.*, 52 (3), p. 837-844.
- PARÉS, D.; SAGUER, E.; TOLDRA, M.; CARRTERO, C. (2000). «Effect of high pressure processing at different temperatures on protein functionality of porcine blood plasma». *J. Food Sci.*, 65 (3), p. 486-490.
- (2001). «High hydrostatic pressure as a method to reduce microbial contamination of porcine blood plasma». *Food Sci. Tech. Int.*, 74 (2), p. 117-121.
- RAËKER, M. O.; JOHNSON, L. A. (1995). «Thermal and functional properties of bovine blood plasma and egg white proteins». *J. Food Sci.*, 60 (4), p. 685-690, 706.
- REAL DEL SOL, E.; MARTÍN, M. (1991). «Empleo de la ultrafiltración en la obtención de concentrados de plasma sanguíneo». *Alimentaria*, 21, p. 21-23.
- REIZENSTEIN, P. (1980). «Hemoglobin fortification of food and prevention of iron deficiency with heme iron». *Acta Medica Sacnd.*, supl., p. 629.
- RODRÍGUEZ, I. (1994). «Aprovechamiento de subproductos de la industria cárnica». *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 94, p. 69-73.

- SAGUER, E.; ALTARRIBA, S.; LORCA, C.; PARÉS, D.; TOLDRÀ, M.; CARRETERO, C. (2003). «Colours stabilization of spray-dried porcine red blood cells using nicotinic and nicotinamida». *Food Sci. Tech. Int.*, 9, p. 301-307.
- SAGUER, E.; FORT, N.; MOMPIÓ, M.; CARRETERO, C. (2004). «Efecto de la adición de cisteína sobre las propiedades gelificantes del plasma porcino a pH ácido». *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 189, p. 86-91.
- SAGUER, E.; FORT, N.; TOLDRÀ, M.; PARÉS, D.; CARRETERO, C. (2005). «Improvement of gelling properties of porcine blood plasma using microbial transglutaminase». *Food Chem.* [En revisió]
- SHIMADA, K.; MATSUSHITA, S. (1980). «Relationship between thermocoagulation of proteins and aminoacid compositions». *J. Agric. Food Chem.*, 28 (2), p. 413-417.
- THALMAN, C. R.; LÖTZBEYER, T. (2002). «Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase». *Eur. Food Res. Technol.*, 214, p. 276-281.
- TOLDRÀ, M. (2002). *Revaloració de la sang de porc procedent d'escorxadors industrials*. Universitat de Girona. 246 p. [Tesi doctoral]
- TOLDRÀ, M.; BUSQUETS, A.; SAGUER, E.; PARÉS, D.; CARRETERO, C. (2002a). «Effects of high hydrostatic pressure treatment on porcine blood red cells fraction». *Food Sci. Technol. Int.*, 8 (1), p. 41-48.
- TOLDRÀ, M.; ELIAS, A.; PARÉS, D.; SAGUER, E.; CARRETERO, C. (2004). «Functional properties of a spray-dried porcine red blood cell fraction treated by high hydrostatic pressure». *Food Chem.*, 88 (3), p. 461-468.
- TOLDRÀ, M.; JIMÉNEZ, R.; SAGUER, E.; PARÉS, D.; CARRETERO, C. (2002b). «Efectos de la alta presión hidrostática sobre la obtención de hidrolizados de la fracción celular de sangre de cerdo». *Libro de resúmenes y comunicaciones del Simposio sobre Tecnologías Emergentes de Interés para la Industria Alimentaria*. Madrid: EmerTec, p. 89-90.
- TORRES, M. R.; RAMOS, A. J.; SORIANO, E. (1997). «Aspectos funcionales y nutricionales de las proteínas sanguíneas: Empleo en la industria cárnica». *Alimentaria*, p. 63-68.
- TYBOR, P. T.; DILL, C. W.; LANDMANN, W. A. (1973). «Effect of decolorization and lactose incorporation on emulsification capacity of spray dried blood protein concentrates». *J. Food Sci.*, 38 (1), p. 4-6.
- (1975). «Functional properties of proteins isolated from bovine blood by a continuous pilot process». *J. Food Sci.*, 40 (1), p. 155-159.
- UCHMAN, W.; KONIECZNY, P.; KRYSZTOFIK, K. (1994). «Some properties of the globin preparation obtained by enzymatic decolouration of red cells fraction». *40<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology*, l'Haia.
- WIJNGAARDS, G.; PAARDEKOOPEL, E. J. C. (1988). «Preparation of a composite by means of an enzymatically formed protein gel». A: KROL, B.; ROON, P. S. van; HOUBEN, J. H. [ed.]. *Trends in modern meat technology II*. Wageningen, p. 125-130.
- WISMER-PEDERSEN, J. (1988). «Use of haemoglobine in foods - a review». *Meat Sci.*, 24, p. 31-45.
- WIT, J. N. D. (1981). «Structure and functional behaviour of whey proteins». *Netherlands Milk & Dairy Journal*, 35 (1), p. 47-64.
- XIONG, Y. L. (1992). «Influence of pH and ionic environment on thermal aggregation of whey proteins». *J. Agric. Food Chem.*, 40 (3), p. 380-384.
- XIONG, Y. L.; KINSELLA, J. E. (1990). «Mechanism of urea induced whey protein gelation». *J. Agric. Food Chem.*, 38 (10), p. 1887-1891.
- YOUNG, C. R.; LEWIS, R. W.; LANDMANN, W. A.; DILL, C. W. (1973). «Nutritive value of globin and plasma protein fractions from bovine blood». *Nutrition Reports Int.*, 8, p. 211-217.