

**VALORIZACIÓN DE RESIDUOS DE SANGRE DE BOVINO MEDIANTE
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA INTEGRANDO PROCESOS CON MEMBRANAS**

RAFAEL AUGUSTO MONROY RODRÍGUEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2013**

**VALORIZACIÓN DE RESIDUOS DE SANGRE DE BOVINO MEDIANTE
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA INTEGRANDO PROCESOS CON MEMBRANAS**

RAFAEL AUGUSTO MONROY

Trabajo de grado para optar el título de Magister en Química Ambiental

Director

Ph.D CARLOS JESUS MUVDI

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

MAESTRÍA QUÍMICA AMBIENTAL

BUCARAMANGA

2013

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. PROBLEMÁTICA Y JUSTIFICACIÓN	16
2. OBJETIVO GENERAL	20
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MARCO REFERENCIAL	21
3.1 ESTADO DEL ARTE	21
3.2 MARCO TEÓRICO	22
3.2.1. La sangre	22
3.2.2. Las proteínas	23
3.2.3. Las enzimas	23
3.2.4. Hidrólisis enzimática	25
3.2.5. Estabilización de la sangre con anticoagulantes	27
4. DISEÑO METODOLÓGICO	29
4.1 ASEGURAMIENTO DE MATERIA PRIMA DEL PROCESO	29
4.2 PROCESO DE TRANSFORMACIÓN	30
4.3 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO OBTENIDO	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1 ASEGURAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA	34
5.2. DETERMINACIÓN DEL PH Y TEMPERATURAS ÓPTIMAS TOMANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENZIMA	34
5.3. CINÉTICA ENZIMÁTICA DE ALCALASA 2,4L EN 40 ML, 200 ML Y 8,5 L DE SANGRE.	37
5.3.1. Escalonamiento de hidrólisis enzimática a 8,5 L	39
5.4. CLARIFICACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS UTILIZANDO MEMBRANAS DE 1,4 μ m Y 50 kDa.	42

5.5. PROPUESTA DE ESQUEMA DE VALORIZACIÓN DE SANGRE BOVINA.	49
6. CONCLUSIONES	51
7. RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS	58

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mecanismo catalítico de una proteasa.	26
Figura 2. Diagrama metodológico de la propuesta de investigación planteada en este estudio.	29
Figura 3. Equipo titulador automático Mettler Toledo DL50 utilizado para la realización de la hidrólisis de muestras de sangre de 40ml y 200ml.	31
Figura 4. Diagrama de Pareto estandarizado para el análisis del grado de hidrólisis.	35
Figura 5. Cinética para la hidrólisis enzimática obtenida utilizando tres concentraciones de alcalasa 2,4L (0,76%p/p; 0,96% p/p y 2% p/p) en 40 mL de sangre bovina a 53°C y pH 8,3.	36
Figura 6. Cinética enzimática obtenida para los volúmenes de 40 mL y 200 mL de sangre. Concentración enzima de 0,76%p/p a 53°C y pH 8,3.	38
Figura 7. Análisis de SDS page de los hidrolizados obtenidos para muestra de 200mL de sangre (150 V y 1,5 h). Donde, Pat= patrón; T:0= tiempo cero (sin enzima), hasta T:110= 110 min de hidrólisis.	38
Figura 8. Comparación de la cinética de alcalasa 2,4L obtenida utilizando 40 mL, 200 mL y 8,5 L de sustrato. Concentración enzima 0,76% p/p a 53°C y pH 8,34.	40
Figura 9. Caracterización por SDS page (150 V y 1,5h) del hidrolizado de 8,5 L de sangre a 25 min de hidrólisis, concentración enzima 0,76%p/p, 53 °C y pH 8,34. Donde, Pat= patrón, EDTA= muestra inicial sin ajustar pH (sin enzima), pH 8,3= muestra después de ajustar pH con NaOH (sin enzima), T5= al cabo de 5 min de hidrólisis.	41
Figura 10. Piloto con membranas utilizado para filtración. A) piloto de filtración; B) hidrolizado durante filtración con membrana de 1,4 µm (T: 53°C, presión transmembranaria: 3 bar y 50 Hz de frecuencia); C) durante filtración con	

membrana de 50kDa del filtrado obtenido a 1,4 μm (T: 53°C, presión transmembranaria: 3 bar y 50Hz de frecuencia). 43

Figura 11. Soluciones obtenidas durante las distintas etapas de valorización de sangre bovina. A: hidrolizado; B: filtrado con membrana 1,4 μm y C: ultrafiltrado con membrana 50 kDa. 44

Figura 12. Caracterización de filtrados por el método SDS page para péptidos. Donde, Pat= patrón; T:0= tiempo cero (sin enzima), F:1,4= filtrado con membrana de 1,4 μm y F:50 kDa= filtrado con membrana de 50 kDa. 45

Figura 13. Muestras secas de A: hidrolizado, B: filtrado con membrana de 1,4 μm , C: filtrado con membrana de 50 kDa. 47

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clases de mataderos y su capacidad instalada según el artículo 33 del Decreto 1036 de 1991 del Ministerio de Salud.	17
Tabla 2. Tipos, tamaños, cantidades y proteínas en encontradas en la sangre de mamíferos.	23
Tabla 3. Variables óptimas de temperatura, concentración de enzima y pH para alcanzar el mayor grado de hidrólisis. Según diseño experimental, utilizando la herramienta Statgraphics Centurion XV.	36
Tabla 4. Porcentaje de materia seca y humedad de las tres muestras obtenidas del proceso de valorización.	45
Tabla 5. Hierro total en hidrolizado y filtrados obtenidos por el método UV-Vis.	46
Tabla 6. Relación de sabor, aroma y olor de las muestras de hidrolizado sin filtrar, filtrado con membrana de 1,4 μm y filtrado con membrana de 50 kDa.	48

LISTA DE ANEXOS

Pág.

ANEXO A. Cuadro 1. Grado de hidrólisis y mililitros adicionados de Na(OH) 1N
totales para determinación de la temperatura, pH y concentración de enzima. 58

RESUMEN

TITULO. “VALORIZACION DE RESIDUOS DE SANGRE DE BOVINO MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA INTEGRANDO PROCESOS CON MEMBRANAS”.*

AUTOR. RAFAEL AUGUSTO MONROY RODRÍGUEZ**

PALABRAS CLAVE. Hidrólisis, Enzimas, Proteínas, Membranas.

DESCRIPCION. En Colombia la legislación no estipula que hacer con la sangre en las plantas de tratamiento tipo II, III, VI y de condiciones mínimas. Las plantas de sacrificio bovino producen unos 40.300 m³ de sangre al año, impactando ambientalmente una buena parte de la población. Además no se encontraron registros ni cifras de la utilización de dicho residuo en el país.

Este proyecto desea plantear el estudio de una estrategia para la obtención de péptidos de alto valor nutricional que permita la valorización de la sangre bovina, desde su colecta y estabilización en la planta de sacrificio, hasta su hidrólisis enzimática con alcalasa 2,4L de tipo alimenticio y la clarificación por fraccionamiento de hidrolizados usando membranas cerámicas Tami®.

Como resultados de la hidrólisis se obtuvo que las mejores condiciones de hidrólisis de la alcalasa 2,4L, fueron temperatura de 53 °C, pH de 8,3 y concentración de enzima de 0,76%p/p. La caracterización por SDS page para péptidos reveló que los péptidos pequeños se producen en mayor proporción después de los 25 minutos de hidrólisis. El proceso de fraccionamiento y clarificación con membranas cerámicas Tami®, se realizó en dos etapas, una de premicrofiltración con membrana de 1,4 µm y una segunda etapa de ultrafiltración de 50 kDa, en la cual se obtuvo un producto claro con buenas características sensoriales, tanto de color como de aroma, olor y sabor. En ambos procesos las condiciones fueron: presión 3 bar y temperatura 53 °C. La materia seca obtenida del hidrolizado fue del 19% y de los filtrados fue del 8%, recuperándose el 42%.

La concentración de hierro total medido por el método UV-Vis, mostro que no hubo diferencias entre el hidrolizado y los filtrados obtenidos a partir del mismo.

* Trabajo de grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Carlos Jesús Muvdi Nova. Ph.D.

ABSTRACT

TITLE. "RECOVERY OF WASTE BOVINE BLOOD BY ENZYMATIC HYDROLYSIS INTEGRATING MEMBRANE PROCESSES."*

AUTHOR. RAFAEL AUGUSTO MONROY RODRÍGUEZ**

KEYWORDS. Hydrolysis, enzymes, proteins, membranes.

DESCRIPTION. In Colombia the law does not stipulate to do with the blood in the treatment plants type II, III, VI and minimum. Bovine slaughter plants produced about 40,300 m³ of blood each year, environmentally impacting a large part of the population. In addition there were no records or figures using such waste in the country.

This project wants to bring the study of a strategy for obtaining peptides with high nutritional value that allows recovery of bovine blood from his collection and stabilization in the slaughter plant until its enzymatic hydrolysis with Alcalase 2.4 L food grade and clarifying hydrolysed by fractionation using ceramic membranes Tami ®.

As a result of the hydrolysis is obtained that the best conditions for the hydrolysis of alcalase 2.4 L were temperature of 53 °C, pH 8.3 and enzyme concentration of 0.76% w / w. Characterization by SDS page for peptides revealed that small peptides are produced in greater proportion after 25 minutes of hydrolysis. The fractionation process and clarification Tami ® ceramic membranes was performed in two stages, one of premicrofiltración membrane of 1.4 microns and a second ultrafiltration step of 50 kDa, which gave a clear product with good sensory characteristics , both color and flavor, smell and taste. In both processes, the conditions were: 3 bar pressure and 53 °C temperature. The dry matter of the hydrolyzate obtained was 19% and the filtrates was 8%, 42% recovered.

The total iron concentration measured by UV-Vis method, showed no differences between the hydrolyzate and the filtrates obtained from it.

* Work degree.

** Faculty Science. School of Chemistry. Director: Carlos Jesus Muvdi Nova. Ph.D.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento ininterrumpido de la población mundial que actualmente pasó la barrera de los 7 mil millones de habitantes, incrementa de manera significativa la demanda de alimentos. Su consumo y disponibilidad diarios permiten definir el grado de nutrición o malnutrición de los habitantes de un país, su nivel de desarrollo y la seguridad alimentaria del mismo.

Debido a la creciente demanda del suministro nacional, de carne y leche bovinas, FEDEGAN desea pasar de 23 millones de cabezas de ganado en el 2005 a 48 millones en el 2019, corroborando así, el papel insustituible que hoy tienen dentro de la dieta nacional, el consumo de carne.

Si tenemos en cuenta que por cada tonelada de carne obtenida en las plantas de sacrificio bovino, se obtienen 50 L de sangre, entonces en el país se obtienen aproximadamente 40 300 m³ por las 806 000 Ton de carne obtenidas anualmente en las plantas de sacrificio del país (Fedegan, 2006).

Según el Artículo 33 del Decreto Ley 1036 de 1991 del Ministerio de Salud, únicamente las plantas de sacrificio de mayor capacidad y dotación (clase I) deben tener establecida etapas de procesamiento de este subproducto; sin embargo, este decreto no estipula ningún tipo de tratamiento para las plantas de sacrificio II, III, IV y mínimos, siendo estas últimas las más comunes. Adicionalmente, en este decreto, no hay claridad acerca de los procesos para el tratamiento de la sangre bovina como residuo en las plantas de sacrificio clase I. Esto genera incertidumbre sobre el verdadero destino de los desechos obtenidos en dichas plantas, los cuales son fuente potencial de contaminación en suelos y aguas, generando así graves consecuencias ambientales como el aumento en la demanda de oxígeno en el agua y la proliferación de patógenos en estas áreas (Gómez *et al.*, 1999).

La sangre bovina a pesar de ser eliminada como un desecho posee un gran potencial alimenticio tanto para humanos como para animales; debido a su alta concentración de proteínas (80% aprox. de la fracción celular) (Froidevaux *et al.*, 1998). Esta puede ser utilizada como insumo para la producción de aminoácidos o péptidos pequeños a partir de sus proteínas (Gómez *et al.*, 1999) utilizando procesos químicos (variación del pH) o biológicos (hidrólisis con enzimas). Estos últimos tienen mayor interés, debido que permiten conservar aminoácidos esenciales (Guadix, 2000), como el caso de la hidrólisis trípica (Silva y Silvestre, 2003).

Dichos productos pueden ser separados utilizando técnicas de filtración con membranas y de esta forma incrementar el valor de los productos obtenidos (Mokrane *et al.*, 2006).

Dentro de la apremiante demanda nutricional del país, utilizar los péptidos obtenidos a partir de este subproducto como suministro de nutrientes a más de 500.000 niños colombianos disminuiría considerablemente la desnutrición infantil en Colombia (Gaviria, 2008).

Es por esto que este trabajo plantea el estudio de una estrategia que permita la valorización de este subproducto (sangre bovina) para su posible aplicación en la elaboración de productos enriquecidos en proteínas. El proceso estará fundamentado en dos etapas claves para la obtención de un producto con características sensoriales favorables al consumo humano, estas son: la etapa de hidrólisis (enzimática) y de fraccionamiento proteico (con membranas).

1. PROBLEMÁTICA Y JUSTIFICACIÓN

La explotación ganadera en el país ocupa un importante 3,5% en el PIB nacional posicionándose en un 64% del total pecuario según el DANE. En el año 2005 se sacrificaron 3 754 000 cabezas de ganado, para un total aproximado de 40,3 millones de litros de sangre (Fedegan, 2006).

En Colombia existen 557 plantas de beneficio de especies bovinas y bufalinas inscritas en el INVIMA y 74 de régimen especial. En Santander existen 66 plantas de beneficio y 13 de régimen especial de cumplimiento, para un total de 79 (INVIMA, 2008). Santander ocupa un importante quinto lugar con el 6,6% de la producción ganadera del país (Fedegan, 2006). De las 79 plantas de sacrificio existentes en Santander, la gran mayoría son plantas de sacrificio de clase IV y micro plantas de requerimientos mínimos. La sangre obtenida en estas plantas de sacrificio podría superar los 2,6 millones de litros al año; de los cuales, una parte, estaría siendo desechada sin tratamiento alguno, contaminando suelos y aguas.

Según el Decreto Ley 1036 de 1991 del Ministerio de Salud se organizan las plantas de sacrificio, diferentes a las de aves, en 5 clases (I, II, III, IV y mínimos) según el número de animales que se sacrifican en turnos de 8 h, la capacidad de las instalaciones y los equipos; siendo las más grandes y avanzadas las de clase I (ver Tabla 1). Sin embargo este decreto no especifica la disposición, transporte, acondicionamiento, almacenamiento, ni el uso de la sangre, salvo en las plantas de sacrificio de clase I (Artículo 33 del mencionado decreto). Para las demás clases no existe ningún tipo de tratamiento ambiental para este residuo.

Tabla 1. Clases de mataderos y su capacidad instalada según el artículo 33 del Decreto 1036 de 1991 del Ministerio de Salud.

Clase	Sacrificio vacuno	Sacrificio cerdos	Tiempo
I	480 o más	400 o más	Turnos de 8 horas
II	320 o más	240 o más	Turnos de 8 horas
III	160 o más	120 o más	Turnos de 8 horas
IV	40	40	Turnos de 8 horas
Mínimos	2	2	Cada hora

Fuente. Ministerio de Salud. Decreto Ley 1036 de 1991 – Artículo 33.

La producción de sangre bovina en Colombia podría alcanzar los 40,3 millones de litros al año. La sangre bovina es un residuo altamente contaminante en términos biológicos, si se toman en cuenta los volúmenes vertidos en las fuentes de agua y el suelo. Este subproducto es un contaminante orgánico que aumenta los niveles de DBO y DQO - cantidad de oxígeno necesario para oxidar la materia orgánica por medios químicos y biológicos, y convertirla en dióxido de carbono y agua- (Gómez *et al.*, 1999), además que es un medio ideal para la proliferación de microorganismos patógenos (Fernández *et al.*, 2003).

La sangre bovina, a pesar de ser eliminada como un desecho, posee un gran potencial como insumo para alimentación humana y animal. Este residuo posee hasta un no despreciable 80% de concentración de proteínas en la fracción celular (Froidevaux *et al.*, 1998). Según Adler–Nissen, (1986), estas proteínas son de gran calidad alimenticia debido a su alto grado de asimilación.

Se resalta que actualmente la sangre bovina de la plantas de sacrificio clase I se usa básicamente para la fabricación de concentrado para perros y otras especies (Gómez *et al.*, 1999).

Según la FAO (2011) el consumo general de alimentos en Colombia refleja un desequilibrio entre la ingesta de calorías y la de proteínas. El consumo diario de calorías per cápita al día es de 2 662 kCal/persona, de las cuales solo el 9% corresponde al consumo de proteínas. La subnutrición alcanza el 18% de la población; unos 8 millones de habitantes (FAO, 2011). En la población infantil la desnutrición alcanza el 13%; unos 500 000 niños colombianos sufren de desnutrición crónica (Gaviria, 2008).

Para poder utilizar la sangre como insumo para la producción de aminoácidos o péptidos de bajo peso molecular a partir de sus proteínas, es necesario realizar procesos químicos o biológicos (Silva y Silvestre, 2003). El uso de hidrólisis química para la desnaturalización de proteínas, a pesar de ser más ampliamente conocida, inhabilita algunos aminoácidos. La hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina, perdiendo valor nutricional (Guadix *et al.*, 2000).

También es posible realizar la hidrólisis con procedimientos biológicos utilizando enzimas. Este proceso se caracteriza por mantener el valor nutritivo del hidrolizado, ya que no produce degradación de aminoácidos (Guadix *et al.*, 2000). La hidrólisis enzimática aumenta el valor agregado del hidrolizado, gracias a que las enzimas son de bajo costo además de ser eficientes en bajas cantidades (Gómez *et al.*, 1999 y Silva y Silvestre, 2003).

En países como México (Gómez *et al.*, 1999) y Brasil (Silva y Silvestre, 2003) los hidrolizados de sangre bovina se utilizan como emulsionantes y coagulantes en la industria de alimentos, mientras que en Argentina (Rodríguez *et al.*, 2010) los hidrolizados son usados para enriquecer con péptidos las hamburguesas.

En Francia utilizaban el hidrolizado de proteínas sanguíneas como insumo en la industria farmacéutica y cosmética (Cemagref, 1985); lastimosamente su desarrollo se vio truncado debido al contexto político y social acontecido durante la década de los 90 con la aparición de la enfermedad de las vacas locas. Sin embargo, su uso y estudio no ha sido restringido completamente. Trabajos recientes hacen referencia a péptidos de bajo peso molecular, obtenidos de hidrolizados de proteínas sanguíneas, y su aplicación como opioides, analgésicos, antibióticos, entre otros (Rachid *et al.*, 2005).

Igualmente este proyecto plantea el uso de técnicas con membranas (micofiltración y ultrafiltración) para la separación y fraccionamiento de los hidrolizados de sangre bovina. Estas técnicas de filtración, son utilizadas mayoritariamente por la industria láctea que comenzó a utilizarlas con éxito en los años sesenta (Twi-Ford, 2004, citado por Chacón, 2006). Como sistema de separación-fraccionamiento, ha adquirido un desarrollo considerable desde los años 90 hasta nuestros días. Dentro de las ventajas como sistemas de separación se encuentra que: son sistemas de fácil operación y mantenimiento, son considerados respetuosos del medio ambiente, y su escalado es cuasi-lineal, encontrándose membranas de muchos materiales y diámetros de poro (Chacón, 2006). Gracias a estas características las membranas son una opción interesante para su aplicación en el fraccionamiento y separación de hidrolizados de sangre (Perea, 1991).

Este trabajo plantea el estudio de una estrategia que permita la valorización de este subproducto (sangre bovina). El proceso estará fundamentado en dos etapas claves para la obtención de un producto con características sensoriales favorables al consumo humano, estas son: la etapa de hidrólisis (enzimática) y de fraccionamiento proteico (con membranas).

2. OBJETIVO GENERAL

Plantear un proceso de valorización de la sangre bovina, proveniente de plantas de sacrificio, basado en hidrólisis enzimática y tecnología con membranas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Plantear las etapas para la valorización de sangre bovina obtenida de plantas de sacrificio.
- Establecer las condiciones de operación que permitan la obtención de un producto (hidrolizado) con características sensoriales y nutricionales favorables.
- Caracterizar el producto obtenido desde el punto de vista sensorial y fisicoquímico.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 ESTADO DEL ARTE

La valorización de la sangre utilizando etapas de hidrólisis apareció en los años 70 (Graham, 1978), y el tratamiento de la sangre con anti-coagulante usando citrato de sodio se dio al año siguiente (Wismer-Pedersen, 1979). Tres años más tarde en Europa se sistematizó la colecta masiva de este residuo de las plantas de sacrificio (Ranken, 1982).

Este subproducto de la industria de carnes tiene un interés particular. Por ejemplo, el plasma sanguíneo (8% de proteína aprox.) posee excelentes propiedades emulsificantes y coagulantes. Por otra parte la fracción de glóbulos rojos es rica en proteínas. Ella posee el 70-75% de las proteínas de la sangre (Adler – Nissen, 1986); sin embargo esta fracción es poco usada debido a su intenso color (Wismer-Pedersen, 1979).

En Brasil, los hidrolizados se utilizan ampliamente en la tecnología alimentaria por sus propiedades nutricionales y funcionales, como solubilidad, poder emulsificante, capacidad espumante, entre otros (Silva y Silvestre, 2003).

En países como México, el 15% de los residuos generados por la industria ganadera son utilizados en alimentación animal. La sangre es valorizada a través de procesos de hidrólisis enzimática de glóbulos rojos utilizando papaína; obteniendo buena cantidad de aminoácidos (Gómez *et al.*, 1999). En Argentina utilizan el plasma sanguíneo bovino para alimentación humana, tomando las proteínas de este y concentrándolas para la elaboración de hamburguesas (Rodríguez *et al.*, 2010).

Entre otros usos (más especializados) encontrados para los productos obtenidos por hidrólisis enzimática se encuentran: obtención de opioides (Nyberg *et al.*, 1997), analgésicos (Takagi *et al.*, 1982), estimulantes para medios de cultivo microbiológicos (Zhao *et al.*, 1996) y antibióticos (Froideyaux, 2001; Liepke *et al.*, 2003 y Paris, 2001).

Es importante mencionar que el desarrollo científico y tecnológico en esta área fue enormemente afectado por el contexto político y social creado por la aparición de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) o «enfermedad de las vacas locas» sucedido durante la década de los 90. Esta enfermedad se declaró oficialmente en el Reino Unido en 1986. En 1996 se detectó en el hombre una nueva enfermedad, una variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, que se relacionó con EEB. Se cree que la causa de esa enfermedad es el consumo de carne de vacuno y de otros productos derivados del vacuno como las vísceras y tejido neurológico contaminados con EEB (OMS, 2009). Según el informe del 2009 de la Organización Mundial de la Salud, la EEB se originó a partir de la alimentación de herbívoros con harina de carne, cerebro, médula y huesos, obtenida a partir de animales contaminados. La OMS también asegura que si no se alimenta al ganado bovino con proteínas derivadas de la canal de rumiantes (vacunos, ovinos y caprinos), el riesgo de EEB es prácticamente inexistente. Si la proteína derivada de rumiantes sólo se utiliza para alimentar a las aves y al ganado porcino, sin permitir que esas harinas contaminen las destinadas al ganado vacuno en las fábricas de piensos y en las explotaciones ganaderas, el riesgo de EEB en el país será insignificante (OMS, 2009).

3.2 MARCO TEÓRICO

3.2.1. La sangre. La sangre es un fluido compuesto por 2 elementos fundamentales: la fracción celular y el plasma.

- a) Fracción celular: Corresponde a las células sanguíneas, que son componentes unicelulares que poseen diferentes funciones según sus proteínas de membrana. La Tabla 2 relaciona los tamaños celulares y concentraciones promedio en la sangre de mamíferos.

Tabla 2. Tipos, tamaños, cantidades y proteínas encontradas en la sangre de mamíferos.

Tipo de célula	Tamaño	Cantidad	Proteínas representativa	Función
Eritrocitos, o hematíes	7 μm de diámetro y 2 μm de espesor	4,5 a 5,5 millones/ mm^3	Hemoglobina	Transporte de gases
Linfocitos	6 a 18 μm de diámetro	2500 mm^3	Antígenos	Defensiva
Leucocitos	6 a 8 μm de diámetro	Según condiciones	Antígenos	Defensiva
Plaquetas	2 a 4 μm	1,5 $\times 10^5$ a 3×10^5 mm^3	Proteínas de coagulación	Coagulación
Fuente: Junqueira y Carneiro, 1996.				

- b) El plasma: El plasma sanguíneo contiene agua, electrolitos, metabolitos, nutrientes, proteínas y hormonas. La proteína más abundante es la albumina con un 50%. En la actualidad se han aislado y caracterizado alrededor de 100 proteínas del plasma, sin embargo las funciones de una gran parte de ellas permanecen aún desconocidas (Brandan *et al.*, 2008).

3.2.2. Las proteínas. Son polímeros nitrogenados constituidos por muchos aminoácidos, los cuales se encuentran unidos entre los grupos COOH y NH_2 por enlaces peptídicos.

3.2.3. Las enzimas. Actúan como catalizadores de reacciones de una gran variedad de sustratos que van desde grasas, carbohidratos, ácidos nucleídos y proteínas; descomponiéndolos en unidades más pequeñas. Todas las enzimas

actúan en condiciones especiales de pH, temperatura y concentración de sustrato. Industrialmente poseen una infinidad de funciones que van desde su uso en proceso de alimentos como quesos, cerveza y pan, hasta su uso en textiles y detergentes (Carrera, 2003).

Las enzimas responsables de la hidrólisis enzimática de las proteínas se conocen como proteasas. Actualmente se encuentran disponibles comercialmente muchas proteasas grado alimenticio. Estas proteasas pueden ser clasificadas por su origen (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción catalítica (endo- o exo-actividad) o con base en su sitio catalítico (serinproteasas, cisteinproteasas, aspartato proteasas) (Benítez *et al.*, 2008).

Las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos dentro de la cadena de la proteína. Las exoproteasas, por el contrario, eliminan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos. La naturaleza del centro catalítico de las proteasas difiere en función de los aminoácidos y otros ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima-sustrato. El centro activo de las enzimas contiene aminoácidos, o bien, cationes metálicos que promueven la catálisis, denominándose serinproteasas, cisteinproteasas, aspartato proteasas, según intervengan los aminoácidos serina, cisteína o ácido aspártico respectivamente. En las metalo-proteasas la actividad está promovida por un catión metálico, siendo el más frecuente el zinc (Adler-Nissen, 1993). Todas las serinproteasas tienen actividad endo. Contrariamente, las metalo-proteasas son principalmente exo-proteasas (Whitaker, 1994).

Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal, pero cada vez están adquiriendo mayor importancia las de origen bacteriano o fúngico. Los preparados enzimáticos suelen ser mezclas de estas enzimas y normalmente se comercializan en estado líquido o como polvo (Benítez *et al.*, 2008).

Este trabajo plantea el uso de la proteasa alcalasa. Esta enzima hidroliza eficiente y rápidamente la hemoglobina que se encuentra en los glóbulos rojos (Drepper *et al.*, 1979).

La alcalasa es una endopeptidasa del orden serinproteína de origen bacteriano que actúa sobre aminoácidos aromáticos *hidrofóbicos*. Según Adler-Nissen, (1986), la alcalasa trabaja óptimamente a un pH de 8,5 y temperatura de 50°C, obteniendo una hidrólisis sobre la hemoglobina de casi 16% en 3,5 h.

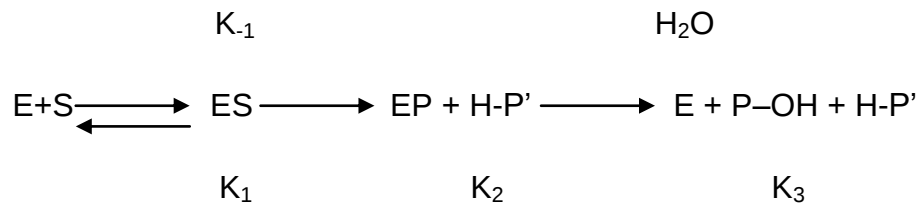
En estudios como el realizado por Perea, (1994), se obtuvieron hidrolizados de lacto-suero bovino después de 4 h de hidrólisis con una concentración de alcalasa del 2% p/p, 50 °C, pH de 8,5 y 75 rpm, con un grado de hidrólisis del 21%. En este trabajo se encontró que los péptidos menores a 1 kDa obtenidos correspondían al 83% del total del hidrolizado, los mayores de 10 kDa al 3,9% y los aminoácidos alcanzaron el 8,1%. El 3,9% de péptidos por encima de 10 kDa se presentaron debido a los puentes di-sulfuros que interfieren estructuralmente en la unión enzima sustrato (Jost y Monti, 1987).

3.2.4. Hidrólisis enzimática. Es el proceso por el cual se utilizan enzimas para romper proteínas. A medida que la hidrólisis progresa se produce una disminución del pH debido a la rotura de los enlaces peptídicos. El resultado es la obtención de un gran número de especies peptídicas; aumentando la complejidad de este tipo de procesos.

Benítez *et al.*, (2008), proponen un mecanismo de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas. Primero, la formación de un complejo enzima-sustrato (proteína), y después la ruptura del enlace amídico dando como resultado la liberación de un péptido. Finalmente, el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede

reiniciarse sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno solo de ellos. Estos tres pasos se representan esquemáticamente en la Figura 1.

Figura 1. Mecanismo catalítico de una proteasa.



E: enzima, **S:** sustrato, **P,P':** péptidos resultantes, **K_x:** constante de velocidad de reacción.

Para la hidrólisis de proteínas, la unión sustrato-enzima es esencial. En el caso de proteínas globulares, la mayoría de los enlaces peptídicos están localizados en el interior de la proteína y no son accesibles para la enzima. Debido a esto, se considera, en el caso de proteínas globulares, efectuar la desnaturalización de la proteína antes de proceder a la hidrólisis; y así facilitar la accesibilidad de los sitios activos de la enzima. (Benítez *et al.*, 2008.)

a) Hidrólisis de suero sanguíneo: algunas proteínas de suero son difíciles de hidrolizar como las globulinas y albuminas debido a su estructura globular, por tal razón se recuperan precipitándolas con etanol frío y centrifugando la muestra a 300 g durante 20 min (Chang-Kee & Heuyn-Kil, 2000). Esta digestibilidad puede ser mejorada por una desnaturalización por calentamiento previo (Benítez *et al.*, 2008).

b) La hidrólisis de las proteínas de las células rojas: uno de los grandes desafíos que presenta la industria de alimentos es la utilización de las células rojas como fuente de aminoácidos o péptidos pequeños. Este concentrado celular podría llegar fácilmente hasta el 75% de proteína pura (Wismer-Pedersen, 1979).

Normalmente esta hidrólisis se realiza con Alcalasa a un pH de 8,5 y 50 °C, llegando a un grado de hidrólisis de la hemoglobina hasta del 16% (Adler–Nissen *et al.*, 1986).

El concentrado celular está compuesto, entre otros, por glóbulos rojos. Estas células son las encargadas del transporte gaseoso en los organismos, usando una proteína (hemoglobina), la cual posee un átomo de hierro en el centro de convergencia de 4 anillos pirrólicos.

Este grupo molecular se conoce como grupo hemo y es el responsable del sabor y color característicos del concentrado celular. El grupo hemo se puede eliminar o separar de la proteína madre gracias a básicamente a dos técnicas:

- Decoloración por acetona ácida (Tybor, 1973): el grupo hemo es precipitado después de una acidificación con HCl y adición de acetona, posteriormente la separación de dicho grupo puede hacerse por filtración o centrifugación.
- Decoloración por hidrólisis enzimática: la hemoglobina, previamente desnaturalizada por hemólisis, es hidrolizada utilizando principalmente la enzima alcalasa. La hidrólisis permite la separación del grupo hemo de la hemoglobina. Posteriormente dicho grupo se aísla por filtración.

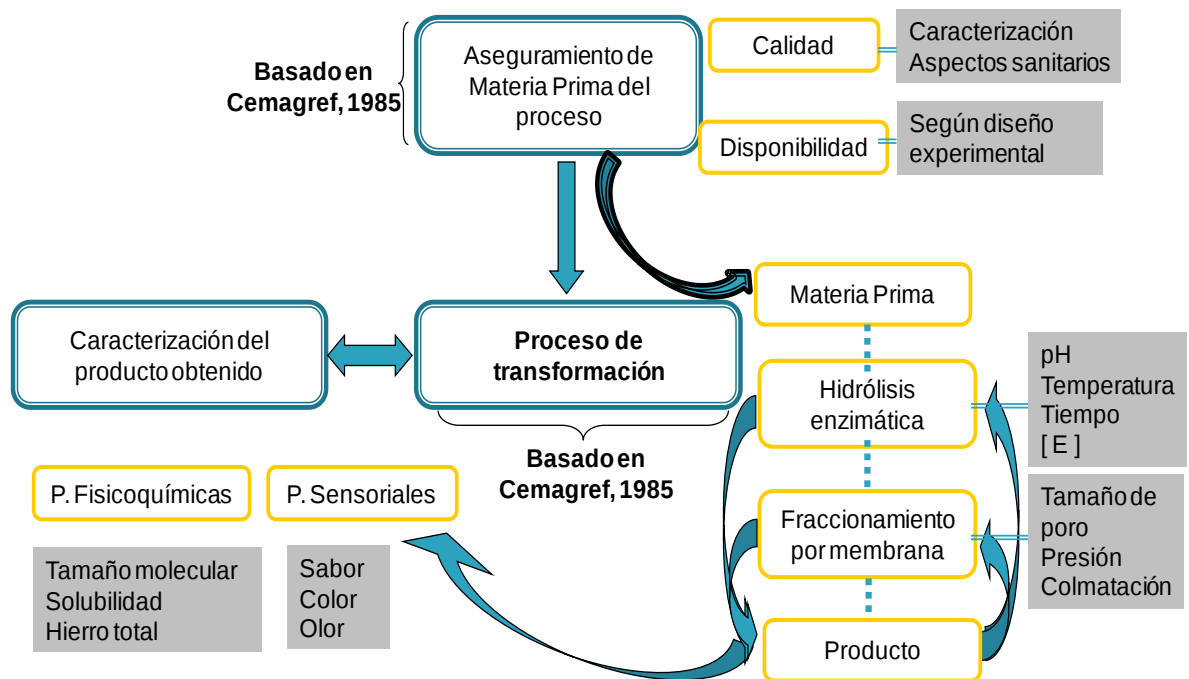
3.2.5. Estabilización de la sangre con anticoagulantes. Corresponde a la primera etapa de tratamiento, después de la recolección de la sangre. Los anticoagulantes evitan el inicio de las reacciones de degradación de la sangre (coagulación) llevados a cabo por agentes coagulantes naturalmente presentes en la sangre. Usualmente se usa citrato de sodio (Adler-Nissen, 1986) en concentración de 5 g/L para fines de alimentación animal; mientras que el polifostato acíclico de sodio en concentración de 10 g/L es el más utilizado en Francia en salsamentarías y charcuterías para alimentación humana. Otra sustancia también empleada es el ácido etilen di-amina tetra-acético (EDTA) al 2%

(Cemagref, 1985; Considinea *et al.*, 2003 y Viviane *et al.*, 2003). Todas actúan bloqueando el calcio responsable de la coagulación.

4. DISEÑO METODOLÓGICO

En la Figura 2 se muestra las etapas metodológicas del proyecto (cuadros azules), las cuales dependen de sub-etapas o criterios (cuadros amarillos) a tener en cuenta para cada una de ellas.

Figura 2. Diagrama metodológico de la propuesta de investigación planteada en este estudio.



4.1 ASEGURAMIENTO DE MATERIA PRIMA DEL PROCESO

Tiene como objetivo principal el establecimiento de las condiciones sanitarias y operacionales que permitan el buen desarrollo de este proyecto. Está íntimamente relacionada con la repetitividad de los experimentos y con el proceso de transformación. Se tendrán en cuenta 2 criterios:

- Calidad: es una condición importante para el desarrollo del proyecto, la sangre debe provenir de animales sanos, sin infecciones, ni parásitos, ni drogas, que podrían encontrarse en pequeñas trazas en la sangre, afectando el producto. Para ello se establecerán los parámetros que garanticen la calidad de la materia prima y se realizarán los protocolos de recolección, tratamiento y almacenamiento de la sangre recuperada; estos estarán basados en las metodologías propuestas por Cemagref, (1985).
- Disponibilidad: es un aspecto importante debido a que se tomará solo una muestra total, la cual será caracterizada, en cuanto a la concentración de proteínas. Esta será utilizada en la realización de todos los experimentos. Por tal razón la muestra total dependerá del diseño experimental.

4.2 PROCESO DE TRANSFORMACIÓN

Se establecieron los pasos necesarios para la transformación de la sangre recuperada (bajo las condiciones establecidas en la etapa anterior). Para tal propósito se realizaron experimentos, buscando determinar las mejores condiciones de operación en las dos subetapas claves:

- Subetapa de hidrólisis enzimática: en esta subetapa se estudió la influencia de las variables, temperatura, pH, concentración de enzima en una escala de 40mL de muestra, sobre el grado de hidrólisis en 30 min; el cual determina el tamaño de los péptidos obtenidos. El grado de hidrólisis se midió por el método pH stat con la siguiente fórmula: $\%GH = B \times NB \times 1/\alpha \times 1/MP \times 1/htot \times 100\%$.

Donde B es el volumen de NaOH consumido (ml), NB es la normalidad del NaOH, $1/\alpha$ es el grado medio de disociación de los grupos α -amino relacionada con el pK de grupos amino en particular de pH y de la temperatura, MP (g) es la cantidad de proteína en la mezcla de reacción, y $htot$ (meq / g) es la suma de los milimoles de

aminoácidos individuales por gramo de proteína asociada con la fuente de la proteína usada en el experimento. Tomado de Adler-Nissen, 1986).

Se trabajó con un diseño experimental factorial 2^2 +estrella central con duplicado. Los niveles escogidos para cada factor fueron: temperatura (40°C y 50°C), el pH (7 y 8) y la concentración de la enzima (0,3%p/p y 0,7%p/p). Según la ficha técnica de la alcalasa 2,4 provista por Novosymes®, a estas condiciones dicha enzima posee una actividad del 60% al 100%.

En la Figura 3 se muestra el equipo utilizado para la hidrólisis enzimática a una escala de 40mL.

Figura 3. Equipo titulador automático Mettler Toledo DL50 utilizado para la realización de la hidrólisis de muestras de sangre de 40ml y 200ml.



Posteriormente, se evaluó el escalonamiento para la hidrólisis a 200 mL y 8,5 L de sustrato (volumen requerido para la subetapa de filtrado con membranas). Este escalonamiento se realizó utilizando las condiciones más favorables para el control de la reacción de hidrólisis (mayor proporción de péptidos con tamaño superior a 1 kDa (según Otani *et al.*, 1990).

b) Subetapa de filtrado con membranas: el estudio de esta subetapa se realizó con membranas cerámicas tubulares Tami®. Se evaluó el desempeño del sistema de filtración con membranas durante el proceso de fraccionamiento de los

hidrolizados utilizando membranas de 1,4 μm y 50 kDa de tamaño de poro. Las condiciones de temperatura y de presión transmembranaria utilizadas fueron 53 °C y 4 bar. Estas condiciones fueron establecidas durante la realización de los distintos experimentos, buscando maximizar producción de filtrado.

El hidrolizado (8 L) utilizado para el estudio de fraccionamiento se preparó de acuerdo a las condiciones definidas en la etapa anterior (concentración de enzima 0,76%p/p, temperatura: 53 °C y pH de 8,34).

Para la determinación de las condiciones de operación del proceso de transformación de la materia prima se consideró siempre el aseguramiento de un producto (filtrado), en ausencia del grupo hemo (incolore) y con la mayor proporción de péptidos con tamaño superior a 1 kDa (Cemagref, (1985) y Otani *et al.*, (1990)).

4.3 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO OBTENIDO

Se basa en la caracterización físico-química y sensorial de los productos obtenidos (hidrolizado).

Caracterización por SDS page: Los hidrolizados obtenidos se caracterizaron por fraccionamiento con el método SDS page basado en la metodología de Cádiz *et al.*, (2006) y Fredes *et al.*, (1997). Este método permitió determinar cualitativamente el tamaño de los péptidos obtenidos en los hidrolizados.

Determinación de Hierro total: Inicialmente se realizó una digestión con ácido sulfúrico a 50°C durante 30 minutos. A 5 mL de cada muestra se le adicionó 1mL de buffer saturado de acetato de sodio pH 3-6 + 2,5 ml al 10% de cloruro de hidroxilamina para pasar el Fe^{3+} a Fe^{2+} . Posteriormente se adicionaron 3 mL de 1,10-fenantrolina (acomplejante) con hierro ferroso color salmón y se afora con

agua destilada a la parte superior del triángulo. Posteriormente se lee en el espectrofotómetro a 510 nm.

Humedad: se tomó una pequeña muestra húmeda (1g.) en caja de petri (previamente secada y pesada) en estufa a 105°C durante 24 h. Dicha muestra se deja enfriar en evaporador de porcelana durante 10 h al cabo de las cuales se pesa. Con dichos valores se determina el % de humedad y de materia seca.

Pruebas sensoriales: el hidrolizado y los filtrados fueron probados sensorialmente para determinar su sabor aroma y olor.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ASEGURAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

- Calidad: Este criterio fue determinado a través de pruebas de vacunación y de enfermedades realizado por el veterinario del matadero de Barbosa Santander, quien confirmó el buen estado de los animales.

La sangre fue colectada directamente de la aorta del animal vivo antes del sacrificio; con un catéter estéril. El área de punción para extracción fue desinfectada con alcohol etílico. Posteriormente la sangre fue colectada en una botella plástica de 2,5 L debidamente lavada, aforada y con la dosis de EDTA para estabilización de la sangre. La dosis de EDTA utilizada fue del 2% (Cemagref, 1985). Posteriormente se almacenó a -2 °C.

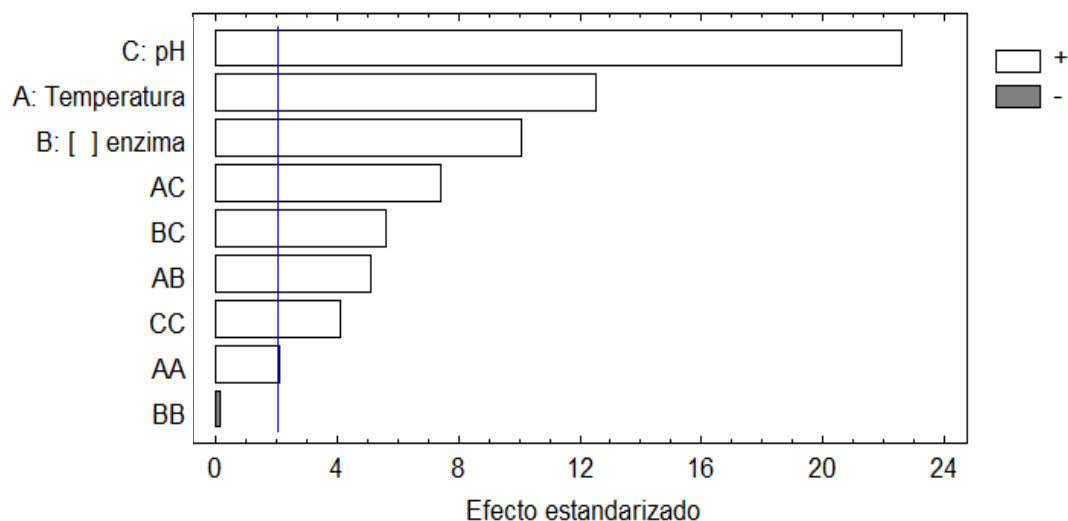
- Disponibilidad: para los 32 experimentos (40mL de sangre por experimento) planteados según diseño experimental para el estudio de la etapa de hidrólisis (volumen total de 1280 mL), se decidió coleccionar una muestra total de 2 L.

5.2. DETERMINACIÓN DEL PH Y TEMPERATURAS ÓPTIMAS TOMANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENZIMA

Se definió un diseño experimental 2^2 +estrella central con duplicado. Los factores estudiados fueron: la temperatura (40 °C y 50°C), el pH (7 y 8) y la concentración de la enzima (0,3%p/p y 0,7%p/p), el tiempo de hidrólisis fue constante, a 30 minutos por experimento.

La Figura 4 muestra el diagrama de Pareto de acuerdo a los resultados obtenidos según el diseño experimental planteado anteriormente, utilizando la herramienta Statgraphics Centurion XV.

Figura 4. Diagrama de Pareto estandarizado para el análisis del grado de hidrólisis.



De este diagrama de Pareto se puede observar que todas las variables estudiadas en el rango de valores escogidos tienen una influencia estadísticamente significativa sobre el grado de hidrólisis. El pH fue la variable que mostró tener más influencia sobre el grado de hidrólisis con 22,5 unidades, debido a que expone el sitio activo de la enzima causando un mejor desempeño de la misma, seguido por la temperatura con 12,5 unidades que aumenta la energía cinética de las moléculas causando un mayor número de encuentros con el sustrato y por último la concentración de la enzima que a pesar de ser la variable con menos influencia sobre el grado de hidrólisis, con 10 unidades, fue igualmente significativo para este, debido a que una mayor concentración de enzima aumenta la probabilidad de encuentros con el sustrato.

A partir de estos resultados se pudo optimizar las condiciones de operación, para maximizar el grado de hidrólisis, utilizando la herramienta Statgraphics Centurion XV. Los valores óptimos obtenidos para los factores de temperatura y pH fueron los mismos obtenidos para los valores de alta influencia sobre el grado de hidrólisis, mientras que para la [] de enzima el óptimo estuvo por debajo del valor de alta influencia sobre el grado de hidrólisis, los resultados se encuentran

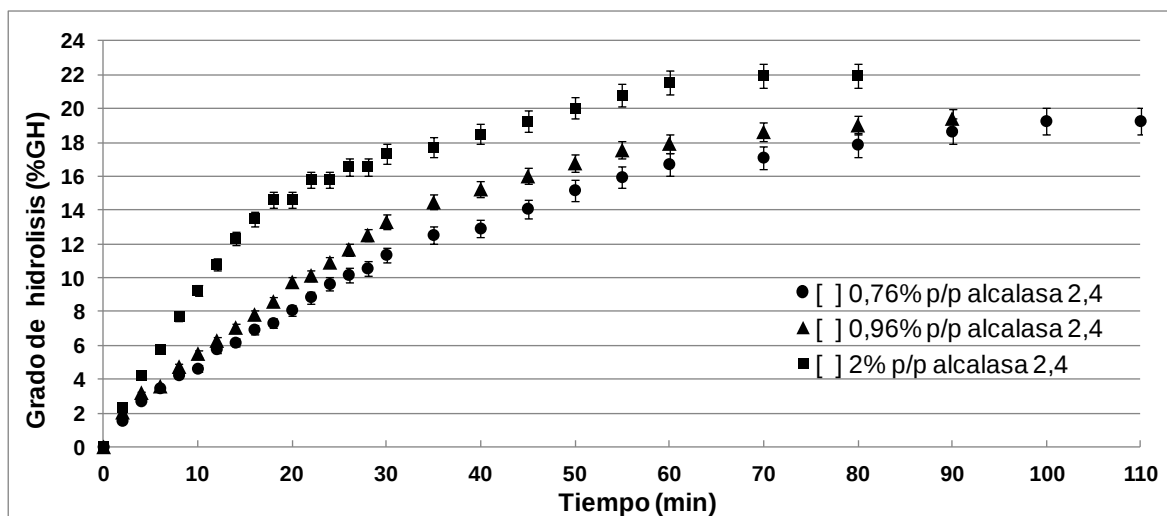
resumidos en la Tabla 3. Bajo estas condiciones es posible alcanzar un grado de hidrólisis de aproximadamente 6,7%.

Tabla 3. Variables óptimas de temperatura, concentración de enzima y pH para alcanzar el mayor grado de hidrólisis. Según diseño experimental, utilizando la herramienta Statgraphics Centurion XV.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
<i>Temperatura (°C)</i>	36,6	53,4	53,4
<i>[] enzima (%p/p)</i>	0,164	0,836	0,762
<i>pH</i>	6,7	8,3	8,3

Durante las pruebas presentadas anteriormente se dieron indicios de un posible aumento del grado de hidrólisis al aumentar el tiempo de reacción e incluso la concentración de enzima (por encima de los niveles estudiados). Debido a esto se decidió realizar otra serie de experimentos aumentando tanto el tiempo de reacción (125 min), como la concentración de enzima (0,96% p/p y 2 % p/p). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.

Figura 5. Cinética para la hidrólisis enzimática obtenida utilizando tres concentraciones de alcalasa 2,4L (0,76%p/p; 0,96% p/p y 2% p/p) en 40 mL de sangre bovina a 53°C y pH 8,3.



En la Figura 5 se observa que al trabajar con concentraciones superiores a 0,76%p/p no se producen cambios significativos en el grado de hidrólisis final; a 2%p/p solo se presenta una diferencia de aproximadamente 3% en el grado de hidrólisis (a los 90 min).

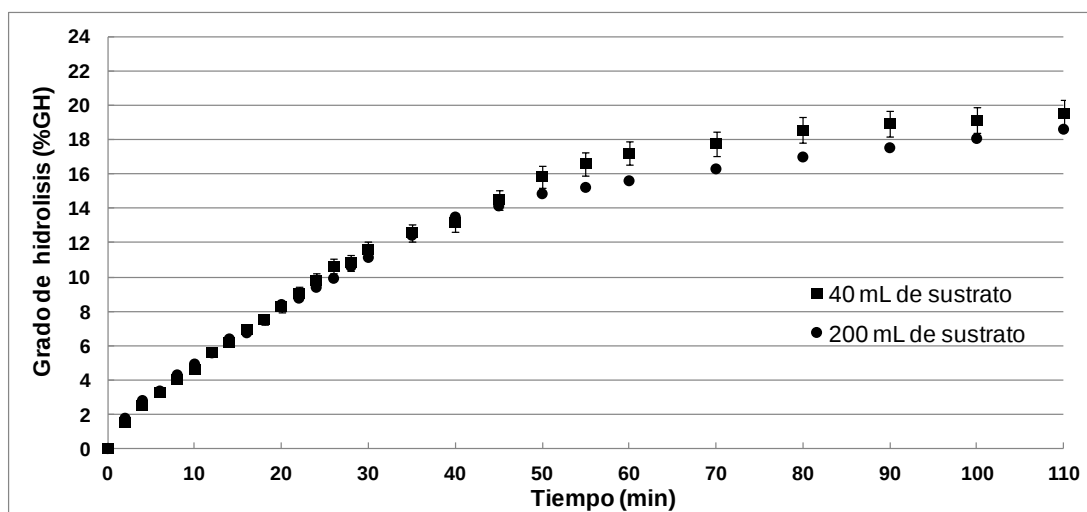
Además de lo anterior, la concentración de enzima de 2%p/p es casi 3 veces mayor la concentración 0,76%, haciendo más costoso el proceso; igualmente se evidenció dificultad para controlar el pH durante la hidrólisis, debido a que se tenía que adicionar mucho NaOH 1N haciendo fluctuar el pH y por consiguiente el %GH.

Por tales motivos, se escogió continuar a la menor concentración de enzima (0,76%p/p).

5.3. CINÉTICA ENZIMÁTICA DE ALCALASA 2,4L EN 40 ML, 200 ML Y 8,5 L DE SANGRE.

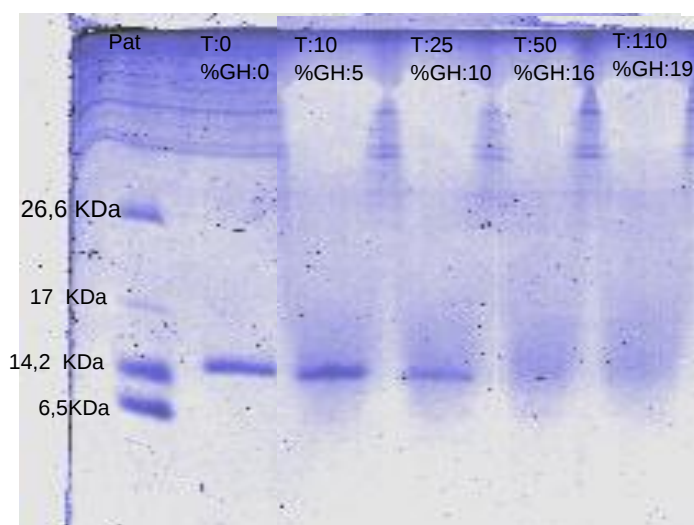
La Figura 6 compara la cinética enzimática de alcalasa 2,4L obtenida para los volúmenes de 40 mL y 200 mL de sangre hidrolizada. De esta figura se observa que la cinética obtenida para los 200 mL de sangre no tuvo mayores diferencias con la realizada en 40 mL. En ambos casos la hidrólisis a los 110 min alcanzó el 19% de grado de hidrólisis aprox.

**Figura 6. Cinética enzimática obtenida para los volúmenes de 40 mL y 200 mL de sangre.
Concentración enzima de 0,76%p/p a 53°C y pH 8,3.**



Para caracterizar cualitativamente los péptidos obtenidos en los diferentes tiempos de la hidrólisis en 200mL de sangre, se utilizó el método SDS page modificado para péptidos. La Figura 7 muestra los resultados obtenidos por dicho método.

Figura 7. Análisis de SDS page de los hidrolizados obtenidos para muestra de 200mL de sangre (150 V y 1,5 h). Donde, Pat= patrón; T:0= tiempo cero (sin enzima), hasta T:110= 110 min de hidrólisis.



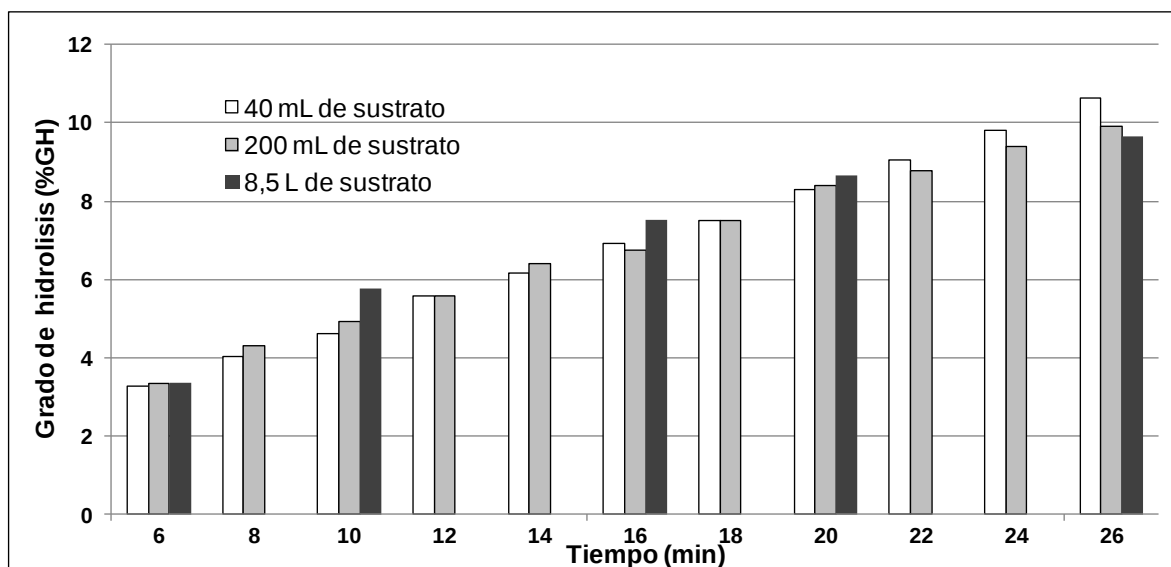
En el primer carril T:0 sin enzima, se observa una banda oscura en la parte más alta, la cual no se presentan en los otros carriles. Esta banda puede ser albumina (67 kDa) que al momento de la hidrólisis desaparece al ser esta hidrolizada. Igualmente, a la altura de los 15 kDa aprox. se presenta otra banda más oscura. Esta banda contendría los 4 monómeros de hemoglobina separados antes de adicionar la enzima, debido a la adición de NaOH para inicio de hidrólisis. Esta conclusión surge del hecho que la hemoglobina es la proteína más abundante (tamaño 60 kDa); compuesta por 4 monómeros, cada uno de ellos con un tamaño aproximado de 15kDa.

A partir de los 5 min de adición de la enzima se observa la presencia de péptidos por debajo de 14,2 kDa; los cuales se incrementan considerablemente después de los 25 min de hidrólisis.

En la banda T:50 en adelante hasta T:110 se observa una notable degradación de los monómeros de hemoglobina, y un aumento de los péptidos por debajo de 6,5 kDa. Razón por la cual el tiempo escogido para detener la hidrólisis fue de 25 min; tiempo en el cual se observa aún, una buena proporción de péptidos por encima de 14,2 kDa (entre ellos, fracciones de hemoglobina).

5.3.1. Escalonamiento de hidrólisis enzimática a 8,5 L. La hidrólisis de los 8,5 L de sangre se detuvo a los 25 min con 500 mL de HCl 2N, hasta un pH de 4 y bajando la temperatura hasta 20°C. Al cabo de este tiempo se obtuvo una sustancia muy viscosa tipo gel de color marrón oscuro (Figura 10B). En la Figura 8 se comparan las cinéticas de las 3 escalas de hidrólisis planteadas bajo las mismas condiciones.

Figura 8. Comparación de la cinética de alcalasa 2,4L obtenida utilizando 40 mL, 200 mL y 8,5 L de sustrato. Concentración enzima 0,76% p/p a 53°C y pH 8,34.

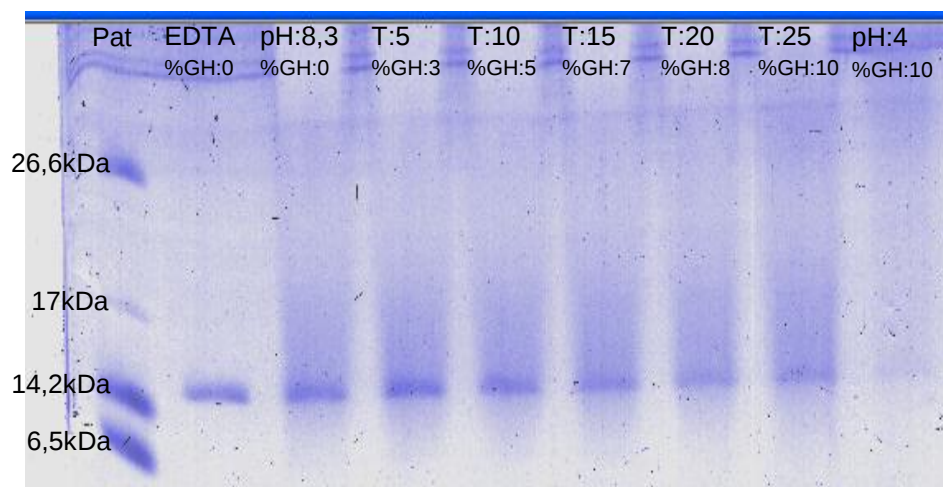


A pesar de las grandes diferencias en la cantidad de la muestra, la cinética se mantuvo en las tres escalas planteadas para la hidrólisis.

Debido a su alta viscosidad y carga del hidrolizado obtenido, se decidió centrifugar una muestra de 200mL a 3 500 rpm durante 15 min, la cual al final del procedimiento no presentó ningún tipo de separación.

La caracterización cualitativa del hidrolizado en 8,5L de sangre, se realizó por SDS page. Los resultados aparecen en la Figura 9. De esta figura se observa el progreso de la hidrólisis en la concentración de los monómeros de hemoglobina en la banda de 14,2 kDa.

Figura 9. Caracterización por SDS page (150 V y 1,5h) del hidrolizado de 8,5 L de sangre a 25 min de hidrólisis, concentración enzima 0,76%p/p, 53 °C y pH 8,34. Donde, Pat= patrón, EDTA= muestra inicial sin ajustar pH (sin enzima), pH 8,3= muestra después de ajustar pH con NaOH (sin enzima), T5= al cabo de 5 min de hidrólisis.



Por otra parte se observa que en el primer carril con EDTA (muestra inicial sin ajustar pH y sin adición de enzima) ya hay una separación de los monómeros que constituyen la hemoglobina; causado por el EDTA o por el proceso de descongelación lenta (Cemagref, 1985). Sin embargo, por la limpieza del carril se deduce que el EDTA solo separa dichos monómeros, sin afectar las demás proteínas sanguíneas como se aprecia en la parte superior del mismo, donde no se evidencia presencia de otros péptidos.

El segundo carril pH:8,3 (que corresponde a la muestra al pH fijado para la hidrólisis con NaOH 2N y sin enzima) se observa la presencia de compuestos de tamaños variados (por encima de los 14,2 kDa), lo que permite concluir la presencia previa de un proceso de hidrólisis antes de la adición de la enzima. Estas bandas pueden ser generadas debido a la hidrólisis de la albumina y de las otras proteínas plasmáticas. Es a señalar que la banda a 14,2 kDa sigue siendo parecida a la del carril EDTA (debida a la presencia de los monómeros de la hemoglobina).

De los carriles T:5 a T:25 se observa la disminución gradual de la intensidad de la banda a 14 kDa resultado de la acción de la enzima sobre los péptidos durante la hidrólisis.

El último carril muestra el análisis del hidrolizado final (25 min de hidrólisis) cuando se ha adicionado HCl 2N y se ha alcanzado el pH 4 para detener el proceso de hidrólisis (desactivación de la enzima). En este carril se observa la desaparición de las bandas anteriormente presentes durante toda la hidrólisis, debido al cambio del pH de 8,4 a 4. Es importante señalar que este pH final, fijado como mecanismo para detener la hidrólisis enzimática, es reportado por otros autores (Cemagref, 1985 y Guadix *et al.*, 2000).

5.4. CLARIFICACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS UTILIZANDO MEMBRANAS DE 1,4 μ m Y 50 kDa.

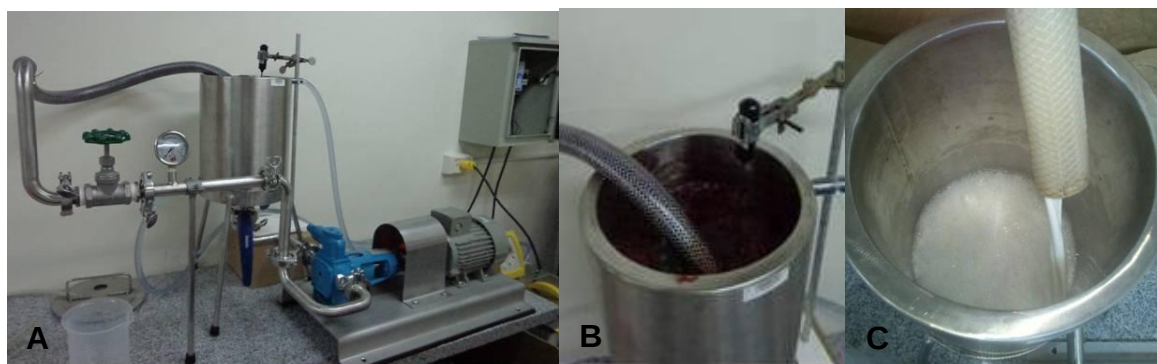
Después de detener la hidrólisis a los 25 min se procedió a filtrar el hidrolizado obtenido y estabilizado a pH 4, con dos membranas de 1,4 μ m de tamaño de poro, a 3 bar de presión transmembranaria, 50 Hz de frecuencia bomba y temperatura de filtración de 53°C. En la Figura10A se observa el piloto de filtración utilizado.

La filtración se realizó durante 24 h (este tiempo no incluye el requerido para el lavado de las membranas) al cabo de las cuales se obtuvieron 1,5 L de filtrado de color ambar y de menor viscosidad con relación al primer hidrolizado. La Figura 10B muestra la apariencia del hidrolizado durante la filtración de esta solución con la membrana de 1,4 μ m.

El filtrado obtenido de esta etapa de microfiltración se decidió someterla a ultrafiltración con membrana de 50 kDa, utilizando el mismo piloto pero cambiando las membranas cerámicas en su interior. Las condiciones de operación utilizadas fueron pH 4; 3 bar de presión transmembranaria; 50 Hz de frecuencia bomba y

temperatura de 53°C. La Figura 10C muestra la apariencia de la solución (filtrado obtenido con membrana de 1,4 μm) durante el proceso de ultrafiltración con membrana de 50kDa. De esta etapa se obtuvieron 100 mL de ultrafiltrado en 3 h.

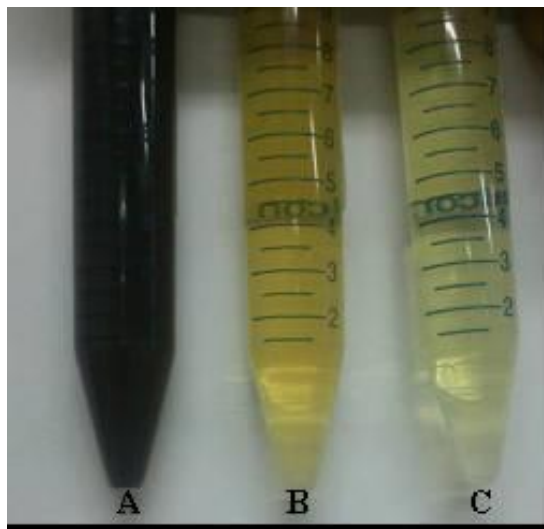
Figura 10. Piloto con membranas utilizado para filtración. A) piloto de filtración; B) hidrolizado durante filtración con membrana de 1,4 μm (T: 53°C, presión transmembranaria: 3 bar y 50 Hz de frecuencia); C) durante filtración con membrana de 50kDa del filtrado obtenido a 1,4 μm (T: 53°C, presión transmembranaria: 3 bar y 50Hz de frecuencia).



La Figura 11 muestra las tres soluciones obtenidas durante el proceso de valorización de la sangre bovina. La Figura 11A corresponde al hidrolizado de sangre bovina obtenido según las condiciones enunciadas anteriormente. La Figura 11B corresponde al filtrado obtenido con membrana de 1,4 μm y la Figura 11C muestra el filtrado obtenido con membrana de 50 kDa.

Esta Figura muestra la clarificación que se lleva a cabo al realizar estas dos etapas de filtración. Se pasa de un color chocolate intenso a una solución cristalina amarillo claro.

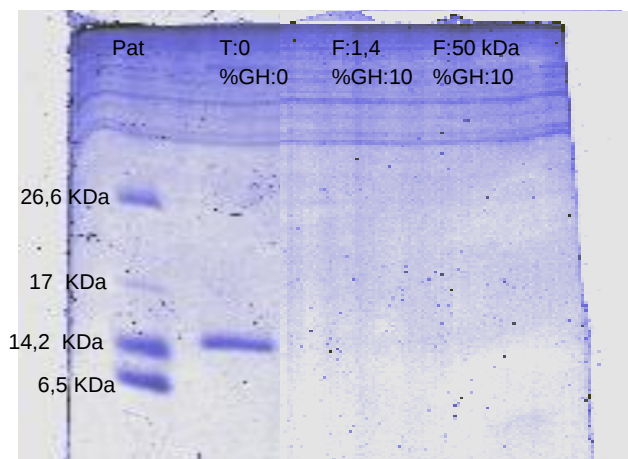
Figura 11. Soluciones obtenidas durante las distintas etapas de valorización de sangre bovina. A: hidrolizado; B: filtrado con membrana 1,4 μm y C: ultrafiltrado con membrana 50 kDa.



La diferencia de color puede deberse a la concentración de hierro y/o de proteínas o péptidos obtenidos en cada uno de los filtrados. Para poder establecer claramente las causas de este cambio de apariencia entre las muestras, se decidió caracterizar los filtrados por tamaño, contenido de hierro y % de materia seca.

En la Figura 12 se comparan los péptidos obtenidos en el filtrado con membrana 1,4 μm y ultrafiltrado con membrana de 50 kDa, con una muestra antes de comenzar la hidrólisis.

Figura 12. Caracterización de filtrados por el método SDS page para péptidos. Donde, Pat= patrón; T:0= tiempo cero (sin enzima), F:1,4= filtrado con membrana de 1,4 μ m y F:50 kDa= filtrado con membrana de 50 kDa.



La Figura 12 muestra que los péptidos obtenidos en el filtrado de 1,4 μ m y ultrafiltrado de 50 kDa carecen de concentraciones altas de péptidos por encima de 6,5 kDa, observado también en el carril pH:4 en la Figura 9, resultado explicado en dicha página. Este resultado hace referencia a la desaparición de las bandas presentes a tamaños superiores a 6,5 kDa después de la adición de HCl al final de la etapa de hidrólisis; Debido al cambio de pH de 8,3 a 4 para detener la hidrolisis.

Sin embargo, las pruebas de humedad realizadas sobre los filtrados demuestran la presencia de una cantidad significativa de péptidos. En la Tabla 4 se compara la cantidad de materia seca de los filtrados obtenidos del proceso de filtración.

Tabla 4. Porcentaje de materia seca y humedad de las tres muestras obtenidas del proceso de valorización.

Muestra	Humedad (%)	Materia Seca (%)	Desviación
Hidrolizado	81%	19%	0,00552
Microfiltrado 1,4 μ m	92%	8%	0,00969
Ultrafiltrado 50 kDa	92%	8%	0,00983

En la Tabla 5 se observa una disminución de aprox. el 58% del contenido de materia seca en el primer filtrado con membrana de 1,4 μm y no se presentó diferencia significativa entre el primer y segundo filtrado. Es importante señalar la relación existente entre la disminución del color con la pérdida de materia seca.

Igualmente se realizaron pruebas de cuantificación de hierro para verificar si existe alguna relación entre el color de los filtrados y el contenido de hierro presente en ellos. La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos para el hierro contenido en las tres soluciones evaluadas (hidrolizado; filtrado 1,4 μm ; filtrado a 50 kDa).

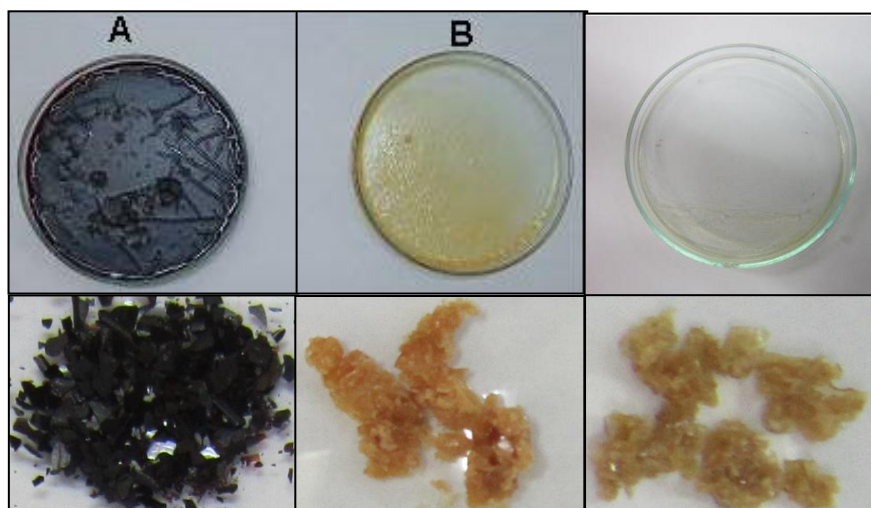
Tabla 5. Hierro total en hidrolizado y filtrados obtenidos por el método UV-Vis.

Muestra	Hierro total
Hidrolizado	39,4 mg/L
Microfiltrado 1,4 μm	41,0 mg/L
Ultrafiltrado 50KDa	41,7 mg/L

De esta tabla se puede apreciar que el contenido de hierro (proveniente del grupo hemo) no presentó diferencia significativa con respecto al hidrolizado (sin filtrar).

En la Figura 13 se compara la apariencia de las tres muestras obtenidas después del proceso de transformación.

Figura 13. Muestras secas de A: hidrolizado, B: filtrado con membrana de 1,4 μ m, C: filtrado con membrana de 50 kDa.



De esta Figura se observa un primer paso en el camino de valorización de esta materia prima. Este está en la disminución del color (chocolate intenso) del hidrolizado a un color caramelo claro. Esto permitiría su aplicación en una mayor variedad de productos; antes limitada por el color del hidrolizado sin filtrar.

Para evaluar la capacidad de estos productos a disolverse nuevamente en agua se tomó 1 gr de cada muestra y se adicionó 9 gr de agua a temperatura ambiente. Tanto para el filtrado a 1,4 μ m como para el filtrado a 50 kDa se presentó disolución rápida y total de los cristales. Mientras que para el hidrolizado (no filtrado) esta disolución fue parcial, presentando gran cantidad de cristales en la solución (después de 24h). Incluso en baño de maría a 50°C la mezcla seguía presentando gran cantidad de cristales después de 1h de calentamiento. Esto evidencia una característica importante al momento de considerar el producto en estado sólido.

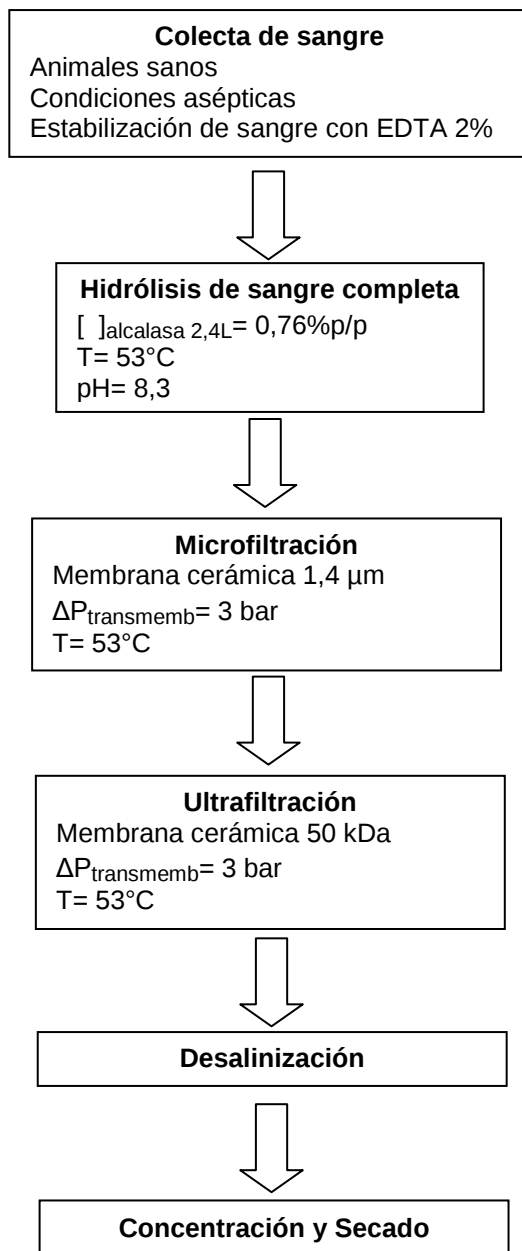
Estas soluciones presentaron igualmente características sensoriales (sabor, olor y aroma) particulares. La Tabla 6 resume estos resultados.

Tabla 6. Relación de sabor, aroma y olor de las muestras de hidrolizado sin filtrar, filtrado con membrana de 1,4 μm y filtrado con membrana de 50 kDa.

Muestra	Sabor	Aroma	Olor
Hidrolizado	Amargo, salado y metálico	Fuerte	Característico
Microfiltrado 1,4 μm	Amargo, salado y metálico	Fuerte	No perceptible
Ultrafiltrado 50KDa	Ligeramente amargo y salado	Moderado	No perceptible

Es importante mencionar que el sabor salado de las tres muestras se presentó resultado de la variación del pH de la solución durante las distintas etapas de la hidrólisis (pH de hidrólisis de 8,3 y pH de finalización de hidrólisis 4) y la neutralización de las soluciones para realizar la prueba de sabor. Esto generó la presencia de NaCl en las muestras. Igualmente no hay que olvidar el contenido de sales en la sangre que normalmente se encuentra alrededor del 3%. Este contenido podría disminuirse aplicando un lavado de la solución mediante la técnica de diafiltración con membrana de 1kDa o utilizando la electrodiálisis.

5.5. PROPUESTA DE ESQUEMA DE VALORIZACIÓN DE SANGRE BOVINA.



En el diagrama se propone como primera medida la colecta de sangre bajo condiciones asépticas para evitar la contaminación de la sangre. Además es indispensable que esta provenga de animales sanos, revisados previamente por el veterinario de la planta de sacrificio.

La coagulación de la sangre se evita con la adición de EDTA al 2% depositado en el recipiente de almacenamiento, que debe estar previamente desinfectado.

El proceso plantea una hidrólisis con alcalasa 2,4L a una concentración de enzima de 0,76%p/p, a un pH de 8,3 elevado con NaOH 2N y a una temperatura de 53°C; estos parámetros son eficientes en la cinética enzimática. La hidrólisis se mantendrá durante 25 min. Transcurrido este tiempo se detendrá el proceso de hidrólisis (asegura la obtención de péptidos con tamaño superiores a 6,5 kDa). Debido a los resultados obtenidos en el presente estudio, es necesario buscar otras alternativas para detener el proceso de hidrólisis que la aplicada en este trabajo, que puedan disminuir o evitar a su vez la acumulación de sal por detención del proceso de hidrólisis.

El hidrolizado seguido requiere de un proceso de clarificación y fraccionamiento con membranas. Estas etapas son realizadas por microfiltración y ultrafiltración con membranas cerámicas de 1,4 μm y 50 kDa respectivamente a 3 bar de presión transmembranaria y 53°C.

El filtrado final obtenido deberá someterse a una etapa de desalado para retirar las sales generadas durante el proceso de hidrólisis (su estudio está fuera de los alcances del presente trabajo). Podría plantearse como método la diafiltración (lavado de soluciones con membranas), la electrodiálisis (técnica con membranas) o el intercambio iónico en columna.

Por último, se plantea una etapa de concentración y de secado del producto (su estudio está fuera de los alcances del presente trabajo). Como técnicas podrían plantearse la evaporación en vacío, la liofilización y la atomización ("Spray drying").

6. CONCLUSIONES

- Se planteó un esquema de valorización de sangre bovina utilizando hidrólisis enzimática y técnicas con membranas, desde su colecta en la planta de sacrificio hasta la clarificación y separación del hidrolizado obtenido.
- Se realizó un análisis experimental que permitió establecer las mejores condiciones de operación de las dos etapas claves en el esquema de valorización de la sangre bovina. Para la etapa de hidrólisis enzimática las mejores condiciones de operación son: concentración alcalasa 2,4L de 0,76%p/p, a 53°C y pH 8,34. Para la etapa de clarificación y fraccionamiento las mejores condiciones son: microfiltración con membrana cerámica Tami® de 1,4 µm, seguida por ultrafiltración con membrana de 50 kDa; ambas filtraciones a 53°C y 3 bar de presión transmembranaria. Bajo estas condiciones se obtiene un producto clarificado con características físicas y sensoriales aceptables.
- El método SDS page mostró que el detener la hidrólisis enzimática disminuyendo el pH a 4 con HCl causó degradación de péptidos con tamaños superiores a 6,5 kDa.
- Los filtrados obtenidos por este trabajo fueron caracterizados en los niveles fisicoquímico y sensorial a través de la evaluación de características como: %materia seca, hierro total, distribución de péptidos por tamaño, solubilidad, sabor, olor y color. Encontrándose una relación entre el contenido de materia seca sobre características como color, sabor y aroma entre el hidrolizado y el microfiltrado. El filtrado final obtenido (después de filtración con membrana de 50 kDa) es un producto cristalino, de baja pigmentación, ligeramente amargo, con un contenido de hierro de 41,7 mg/L y 8% de materia seca.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios para modificar el método utilizado para detener la hidrólisis enzimática; con el objetivo de evitar la pérdida de péptidos de mayor peso molecular e igualmente disminuir la carga final de sales en el filtrado final.
- Es necesario estudiar metodologías de desalinización para disminuir la concentración de sales en el filtrado final. Se recomienda estudiar las técnicas de diafiltración (lavado de soluciones con membranas), la electrodiálisis (técnica con membranas) y el intercambio iónico en columna.
- Finalmente es necesario realizar estudios sobre técnicas para la concentración y secado del filtrado final. Se propone estudiar las técnicas de evaporación en vacío, la liofilización y la atomización (“spray drying”).

BIBLIOGRAFÍA

1. ADLER – Nissen, Jens. Enzymic hydrolysis of food proteins, Elsevier Library cataloguing in publication date, 1986.
2. ADLER-Nissen J, OLSEN HS. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. 1979 ACS Symp Ser; 92: 125-46.
3. ADLER-Nissen Jens. Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures. In: Feeney RE, Whitaker JR, Eds. Protein tailoring for food and medical uses 1986. New York: M Dekker; p. 97-122.
4. ADLER-Nissen Jens. Proteases. In: Nagodawithana T, Reed G, Eds. Enzymes in food processing. 1993. San Diego (USA): Academic Press; p. 159-203.
5. BENÍTEZ Ricardo., Ibarz Albert., Pagan Jordi. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones Protein hydrolysates: processes and applications; Acta bioquímica clínica latinoamericana versión 2008 On-line ISSN 1851-6114.
6. BRANDAN, Nora. LLANOS, Cristina. BARRIOS, María Belén. Escalante Marassi, Andrea P. RUÍZ DÍAZ, Daniel A. N.. PROTEÍNAS PLASMÁTICAS 2008. Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste
7. CÁDIZ L. Armando, MOYA T. Aniel, VELANDER William, LIMONTA V. Manuel, Joo S. Lázaro, RODRÍGUEZ R. Alexandro, SOLARANA T. Laritza, DÍAZ C. Alina, CAUNEDO A. Patricia, Castillo G. DUNIA y ALMAGRO V. Delfina. Purificación del factor ix recombinante expresado en leche de cerdas transgénicas instituto “finlay”, la habana 2006. rev. Cubana hematol inmunol hemoter; 22(2)
8. CARRERA Jorge Eliecer. Producción y aplicación de enzimas industriales. Facultad de Ciencias Agropecuarias 2003. Vol 1 No.1.
9. CEMAGREF. Procèdes de recolte et de traitement du sang des abattoirs. 1985 Groupement de clermonts-ferrand, France.

10. CHACÓN-Villalobos Alejandro. Tecnologías de membranas en la agroindustria láctea. revisión bibliográfica agronomía mesoamericana 2006. 17(2): 243-264. ISSN: 1021-7444
11. CHANG-Kee Hyun and Heuyn-Kil Shin. Utilization of Bovine Blood Plasma Obtained from a Slaughterhouse for Economic Production of Probiotics School of Bioscience and Food Technology, 1998. Handong University, Pohang, Kyungbuk 791-940, Korea.
12. CONSIDINEA, A. Healyb, A.L. Kellya, P.L.H. Mc-Sweeneya. Hydrolysis of bovine caseins by cathepsin B, a cysteine proteinase indigenous to milk T. Department of Food and Nutritional Sciences, Ireland b National Food Biotechnology Centre, 2003. University College, Cork.
13. DREPPER, g., DREPPER, k., LUDWING-BUSCHP, h. a method of manufacturing new protein products from animal blood for use in food and feed. 1979. 59, 1310-1311.
14. FAO (a). Información esencial del país Colombia. 20 de octubre 2011 <http://www.fao.org/countries/55528/es/col/>.
15. FAO (b) LA FAO EN ACCIÓN Boletín No 8/ Octubre 2011 Representación en Colombia 2011. <http://coin.fao.org/cms/media/3/13210396035580/octubre>.
16. FEDEGAN Plan estratégico de la ganadería colombiana 2019. Bogotá D.C., noviembre de 2006.
17. FERNÁNDEZ de B. LOZA, Elena. PLANES R. RODRÍGUEZ Ana. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedad Infecciosas y Microbiología Clínica. .2003 SBN: 84-609-2289-8.
18. FREDES F., GORMAN T., SILVA. M., ALCAINO h. 1997 Evaluación diagnóstica de fracciones cromatográficas de Fasciola hepatica mediante Western Blot y ELISA en animales infectados Archivos de medicina veterinaria versión impresa ISSN 0301-732X Arch. med. vet. v.29 n.2 Valdivia.

19. FROIDEVAUX R, Krier F, NEDJAR-ARROUME N, VERCAIGNE-MARKO D, KOSCIARZ ERUCKEBUSCH C., antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. 2001 *febs lett*; 491:159–63.
20. FROIDEVAUX Renato. hidrólise de l'hémoglobine bovine par la pepsine en solvants organiques biphasiques : études préliminaires sur la préparation de peptides opioïdes dans un réacteur ouvert. université des sciences et techniques de lille. 1998 mémoire de diplôme d'études approfondies. pp 6-32.
21. GAVIRIA Alejandro 2008. Estudio del Centro de Investigaciones de la Facultad de Economía de la Universidad de los Andes. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (Dane). www.lukor.com/not-por/0604/29150620.htm
22. GOMEZ-JUÁREZ, C. CASTELLANOSA, R. PONCE-NOYOLA, T. CALDERÓN, V. FIGUEROA J. Protein recovery from slaughterhouse wastes a departamento de biotecnología y bioingeniería cinvestav-ipn. av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Zacatenco 07300 DF, México (1999). Departamento de Bioquímica, CINVESTAV-IPN.
23. GUADIX, A.; GUADIX, E. M.; PÁEZ-DUEÑAS, M. P.; GONZÁLEZ-TELLO, P. y CAMACHO, F. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. 2000 Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada. 18071 Granada. España *Ars Pharmaceutica*, 41:1; 79-89.
24. INVIMA Resolución 2008031445 del 4 de noviembre del 2008.
25. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.C. Histología básica, Texto y Atlas Capítulo 12: Células de la sangre. (1996) En: Barcelona, Ed. Masson, p. 213-228.
26. LIEPKE C, BAXMANN S, HEINE C, BREITHAUPT N, STÄNDKER L, FORSSMANN WG. human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. 2003. *chromatography b* 791:345–56.
27. MINISTERIO DE SALUD artículo 124 Por el cual se reglamenta parcialmente el título V de la ley 09 de 1979 en cuanto al sacrificio de animales de abasto público o9 para consumo humano y el procesamiento, transporte y comercialización de carne (2 DE AGOSTO DE 1982)

28. MINISTERIO DE SALUD decreto número 103.6 Por el cual se subroga el Capítulo 1 del Título 1 del Decreto Número 2278 de agosto 2 de 1982.
29. MOKRANE H., Belhocine D., Mamer N. Comparison and efficiency of two membranes (modified MF and UF) during enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a membrane bioreactor *Journal of Membrane Science* 2006. 281 p.170–176.
30. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Informe sobre Encefalopatía espongiforme bovina. 2009.
31. OTANI H., DONG X.Y. y HOSONO A. Preparation of low-inmunogenic peptide fragments from milk casein. 1990. *Milchwissenschaft.*,45(4):217-220.
32. PARISH Ca, JIANG H, TOKIWA y, BEROVA N, NAKANISHI K, Mc CABE D. Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. 2001 *bioorg med chem*;9:377–82.
33. PEREA VILLAMIL Aide Janeth. Estudio aplicado de la hidrólisis enzimática de las proteínas del lactosuero. Tesis doctoral departamento de química aplicada. 1994. Universidad del país Vasco.
34. RACHID Daoud, Veronique DUBOIS, Loredana BORS-DODITA, Naima NEDJAR-ARROUME, Francois KRIER, Nour-Eddine CHIHIB, Patrice Mary, Mostafa KOUACH, Gilbert BRIAND, Didier GUILLOCHON. New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *laboratoire de technologie des substances naturelles*, 2004. iut “a” lille i, bp 179, 59653 villeneuve d’ascq cedex, faculté de médecine h. warembourg, pôle recherche, place de verdun, lille ii, france.
35. RODRIGUEZ Furlán L.T., PÉREZ PADILLA A. and CAMPDERRÓS M.E. (2010). Functional and Physical Properties of Bovine Plasma Proteins as a Function of Processing and pH, Application in a Food Formulation *Advance Journal of Food Science and Technology* 2(5): 256-267.
36. SILVA Viviane D.M., SILVESTRE Marialice P.C. Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food *Laboratorio de Bromatologia, Departamento de Alimentos, Faculdade de*

Farmacia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Olegario Maciel, 2360-Lourdes Belo Horizonte, MG, CEP 30180-112, accepted 10 March 2003

37. TAKAGI H, Shiomi H, HAYASHI K, KISO Y, KITAGAWA K. Isolation of a novel analgesic pentapeptide, neo-kyotorphin, from bovine. 1982. *brain.life sci*;31:1733–6.
38. TYBOR PT. The properties of proteins isolates prepared from slaughter animal blood animal blood. 1973 PH. D Thesis – Texas AM University.
39. TYBOR, P. T., DILL, C. W., & LANDMANN, W. A. Functional properties of proteins isolated from bovine blood by a continuous pilot process. 1975. *Journal of Food Science*, 40, 155–159.
40. WHITAKER JR. Principles of enzymology for the food sciences. 1994 2nd. ed. New York: Marcel Dekker.
41. WISMER-Pedersen, J Utilization of animal blood in meat products. 1979. *Food technol.* August 79, 76-80.
42. ZHAO Q. Y, PIOT J. M, GAUTIER V, COTTENCEAU G. peptic peptide mapping by hplc, on line with photodiode array detection, of a hemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale from an ultrafiltration process. 1996. *appl microbiol biotechnol*;45:778–84.

ANEXOS

ANEXO A. Cuadro 1. Grado de hidrólisis y mililitros adicionados de Na(OH) 1N totales para determinación de la temperatura, pH y concentración de enzima.

	BLOQUE	Temperatura	ml de enzima	[] enzima	pH	grado de hidro
No experi		°C	ml	%p/p		
1	1	53,409	0,19	0,5	7,5	1,9
2	1	40	0,26	0,7	7	0,1
3	1	45	0,19	0,5	7,5	0,1
4	1	36,591	0,19	0,5	7,5	0,2
5	1	45	0,06	0,163641	7,5	0,1
6	1	45	0,19	0,5	7,5	0,8
7	1	45	0,19	0,5	6,6591	0,1
8	1	40	0,11	0,3	7	0,1
9	1	45	0,19	0,5	8,3409	2,6
10	1	50	0,11	0,3	7	0,04
11	1	50	0,26	0,7	8	3,7
12	1	50	0,11	0,3	8	2,0
13	1	50	0,26	0,7	7	0,5
14	1	40	0,11	0,3	8	1,1
15	1	40	0,26	0,7	8	1,5
16	1	45	0,32	0,836359	7,5	1,4
17	2	53,409	0,19	0,5	7,5	2,1
18	2	40	0,26	0,7	7	0,1
19	2	45	0,19	0,5	7,5	1,0
20	2	36,591	0,19	0,5	7,5	0,2
21	2	45	0,06	0,163641	7,5	0,1
22	2	45	0,19	0,5	7,5	0,7
23	2	45	0,19	0,5	6,6591	0,1
24	2	40	0,11	0,3	7	0,3
25	2	45	0,19	0,5	8,3409	2,8
26	2	50	0,11	0,3	7	0,1
27	2	50	0,26	0,7	8	4,2
28	2	50	0,11	0,3	8	1,7
29	2	50	0,26	0,7	7	0,5
30	2	40	0,11	0,3	8	1,0
31	2	40	0,26	0,7	8	1,6
32	2	45	0,32	0,836359	7,5	1,6