

Evaluación del proceso de diafiltración para la producción de hidrolizados clarificados a partir de  
sangre bovina

Juan Pablo González Herrera y Simón Alejandro Santiago Villar

Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Químico

Modalidad Investigación

Director:

Carlos Jesús Muvdi Nova

Ingeniero Químico M.Sc., Ph.D.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingeniería Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2025

### **Dedicatoria**

*A mis padres, Gladys y Luis Eduardo, que, a través de sus distintas maneras de expresar cariño, siempre he sentido su amor. Incluso en la distancia, su acompañamiento y apoyo han significado mucho en este proceso.*

*A Katty y Elisa, por regalarme buenos momentos de mi vida cuando más los necesitaba. Su compañía desde el colegio y a lo largo de este tiempo ha hecho mi vida un lugar mejor y lleno de lindos recuerdos.*

*A Julián, Melissa, Daniela, Camilo, Marcela y Harver, por ser un apoyo fundamental durante este tiempo. Sus palabras y su compañía en los momentos difíciles han sido un motor que me ha motivado a seguir adelante y cumplir este objetivo. La alegría, la felicidad y el amor que me han hecho sentir son recuerdos que siempre atesoraré con cariño.*

*A Camille, mi gata, porque ser lo primero que veo al despertar y lo último antes de dormir hace cada día más lindo.*

*Y a ti, Juan Pablo del pasado, porque, aunque a veces sentiste que no era la carrera que querías, gracias a tus decisiones pude vivir momentos que siempre soñaste. Todo ese esfuerzo que alguna vez hiciste hoy da sus frutos. Por eso, a todos, gracias.*

Juan Pablo González Herrera

**Tabla de contenido**

	<b>Pag.</b>
Introducción .....	8
1_Objetivos .....	10
1.1 Objetivo general.....	10
1.2 Objetivos específicos .....	10
2. Marco teórico y estado del arte .....	10
3. Metodología .....	16
3.1 Fase 1: Evaluación del proceso de diafiltración.....	17
3.2 Fase 2: Comparación del proceso de hidrólisis con sangre diafiltrada y su impacto para la obtención de hidrolizados clarificados .....	18
3.3 Métodos de análisis y cuantificación .....	19
4. Análisis y discusión de resultados .....	21
4.1 Impacto del proceso de diafiltración .....	21
4.2 Comparación del proceso de hidrólisis enzimática usando sangre diafiltrada.....	30
4.3 Clarificación con membranas.....	34
5. Conclusiones .....	42
Referencias bibliográficas.....	44

**Lista de tablas**

	<b>Pag.</b>
<b>Tabla 1.</b> Tipos de separación con membranas.....	16
<b>Tabla 2.</b> Métodos y normas utilizadas para la cuantificación de macroelementos en sangre de bovino ...	19
<b>Tabla 3.</b> Parámetros fisicoquímicos de la sangre (sin diafiltrar), retenido (diafiltrado) y permeado .....	29
<b>Tabla 4.</b> Parámetros fisicoquímicos de la hidrólisis de sangre normal y diafiltrada.....	30
<b>Tabla 5.</b> Caracterización de retenidos y clarificados de hidrolizados de sangre bovina diafiltrada .....	39
<b>Tabla 6.</b> Caracterización de Retenido y Clarificados hidrolizados de sangre bovina sin diafiltrar .....	40

**Lista de figuras**

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1.</b> Esquema de la separación con membranas.....	15
<b>Figura 2.</b> Diagrama metodológico del proyecto .....	17
<b>Figura 3.</b> Módulo membranario .....	18
<b>Figura 4.</b> Reactor de hidrólisis enzimática de acero inoxidable .....	19
<b>Figura 5.</b> Glóbulos rojos analizados por medio del microscopio electrónico de barrido. Muestra de sangre con dilución (a) del 10%. (b) del 20%. (c) del 30%. (d) del 40%.....	22
<b>Figura 6.</b> pH, conductividad, turbidez y materia seca de permeados (sangre sin hidrolizar) obtenidos durante la prueba de escalado de la diafiltración, a 2 bar de presión transmembrana y 40°C, utilizando 6 membranas de 1m de largo para cada prueba. ....	23
<b>Figura 7.</b> pH, conductividad, turbidez y materia seca de retenidos (sangre sin hidrolizar) obtenidos durante la prueba de escalado de la diafiltración, a 2 bar de presión transmembrana y 40°C, utilizando 6 membranas de 1m de largo para cada prueba.....	25
<b>Figura 8.</b> Permeabilidad de membranas durante la diafiltración de sangre en el escalado, a 2 bar de presión transmembrana y 40 °C, utilizando 6 membranas de 1m de largo para cada prueba.....	27
<b>Figura 9.</b> Permeabilidad membranas en el proceso de clarificación de sangre hidrolizada sin diafiltrar, a 2 bar de presión transmembrana, a 60 °C de temperatura, utilizando 6 membranas de 1m de largo para cada prueba.....	35
<b>Figura 10.</b> Permeabilidad membranas en el proceso de clarificación de sangre Diafiltrada hidrolizada, a 2 bar de presión transmembrana, a 60 °C de temperatura, utilizando 6 membranas de 1m de largo para cada prueba.....	36

## Resumen

**Título:** Evaluación del proceso de diafiltración para la producción de hidrolizados clarificados a partir de sangre bovina\*

**Autores:** Juan Pablo González Herrera, Simón Alejandro Santiago Villar\*\*

**Palabras Clave:** Diafiltración, Hidrolizado de sangre, Clarificación con membranas

**Descripción:** En Colombia, el aprovechamiento de los subproductos cárnicos es limitado, lo que genera impactos ambientales y desaprovecha recursos de alto valor como la sangre bovina, rica en proteínas y hierro hemo. Estos componentes representan una oportunidad para el desarrollo de ingredientes funcionales y alimentos fortificados. Sin embargo, los hidrolizados clarificados suelen presentar pérdidas de compuestos de interés durante el procesamiento, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas que mejoren la eficiencia y el aprovechamiento de este subproducto. Con este propósito, el presente trabajo evaluó la diafiltración como pretratamiento en la producción de hidrolizados clarificados de sangre bovina. La metodología se desarrolló en dos fases: en la Fase 1, se evaluó el proceso de diafiltración considerando 20% de dilución, para dos umbrales de corte 30 nm y 200 nm, una presión transmembranal de 2 bar y un criterio de parada definido por la permeabilidad. En la Fase 2, se comparó la hidrólisis enzimática de sangre diafiltrada y sin diafiltrar, empleando la enzima GELZYME L-500 a una concentración del 1,25 % p/p, con condiciones de  $\text{pH} \approx 10$ , temperatura de 55 °C y tiempo de reacción de 1 h. Posteriormente, los hidrolizados obtenidos fueron sometidos a un proceso de clarificación por microfiltración, bajo condiciones de 53 °C,  $\Delta\text{PTM} = 1,5$  bar. Los resultados mostraron que la diafiltración no generó cambios en la composición final de los hidrolizados; sin embargo, aportó mejoras sustanciales en la productividad, al favorecer la permeabilidad de las membranas y disminuir la colmatación. Esto permitió un manejo más eficiente del proceso de hidrólisis y clarificación, con rendimientos superiores en comparación con el tratamiento sin prefiltración.

---

\*Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director Carlos Jesús Muvdi Nova

### Abstract

**Title:** Evaluation of the Diafiltration Process to Produce Clarified Hydrolysates from Bovine Blood\*

**Authors:** Juan Pablo González Herrera, Simón Alejandro Santiago Villar\*\*

**Keywords:** Diafiltration, Blood Hydrolysate, Membrane Clarification

**Description:** In Colombia, the utilization of meat by-products is limited, which generates environmental impacts and leads to the underuse of high-value resources such as bovine blood, which is rich in proteins and heme iron. These components represent an opportunity for the development of functional ingredients and fortified foods. However, clarified hydrolysates often present losses of compounds of interest during processing, which has driven the search for alternatives that improve efficiency and the utilization of this by-product. With this purpose, the present work evaluated diafiltration as a pretreatment in the production of clarified hydrolysates from bovine blood. The methodology was developed in two phases: in Phase 1, the diafiltration process was evaluated considering 20% dilution, for two cut-off thresholds of 30 nm and 200 nm, a transmembrane pressure of 2 bar, and a stopping criterion defined by permeability. In Phase 2, enzymatic hydrolysis of diafiltered and non-diafiltered blood was compared, using the enzyme GELZYME L-500 at a concentration of 1.25% w/w, under conditions of pH  $\approx$  10, temperature of 55 °C, and a reaction time of 1 h. Subsequently, the obtained hydrolysates were subjected to a clarification process by microfiltration, under conditions of 53 °C and  $\Delta$ P<sub>TM</sub> = 1.5 bar. The results showed that diafiltration did not generate changes in the final composition of the hydrolysates; however, it provided substantial improvements in productivity, by favoring membrane permeability and reducing fouling. This allowed a more efficient management of the hydrolysis and clarification process, with higher yields compared to the treatment without prefiltration.

---

\*Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director Carlos Jesús Muvdi Nova

### **Introducción**

En Colombia, el tratamiento de los subproductos cárnicos es escaso y en la mayoría de situaciones no se aprovecha de la mejor manera, generando así grandes cantidades de residuos, que si no se gestionan correctamente pueden tener un alto impacto en el medio ambiente (CONtextoganadero, 2023). A partir de esto, la industria cárnica en los últimos años ha comenzado a reconocer el valor de sus subproductos, como la sangre de bovino. Esto se debe a que la sangre de los bovinos es una rica fuente de proteínas y hierro hemo, el cual tiene un alto valor biológico debido a su alta capacidad de absorción en el intestino humano (de las Heras, 2022). Según reportan organizaciones internacionales como la FAO, OMS, UNICEF, NIH E ICBF, el uso del grupo hemo como fuente nutricional de hierro se considera una alternativa integral para la población mundial deficiente de este micronutriente (CONtextoganadero, 2019).

Esta tendencia no solo busca responder a la urgencia de reducir el impacto ambiental, sino también apuesta por la evolución hacia un modelo de economía circular y reutilización de los residuos, buscando la oportunidad de crear productos de alto valor añadido (Tierra, 2022). Una aplicación destacada es la producción de hidrolizados clarificados, que son ricos en proteínas y hierro hemo (Monroy, 2013). Estos productos tienen el potencial de convertirse en alimentos enriquecidos, ofreciendo beneficios significativos en la prevención y tratamiento de problemas nutricionales, como la anemia (Villegas y Amado, 2021). En este contexto, el propósito de este trabajo es apoyar el proyecto de MinCiencias denominado “Desarrollo de una harina vegetal fortificada con hierro obtenido del procesamiento enzimático controlado de la sangre de bovino, como futura estrategia para aumentar la disponibilidad de hierro hemínico en la dieta de las familias con niños menores de 5 años del departamento de Boyacá”.

A pesar de los avances en la producción de hidrolizados a partir de sangre bovina, estudios previos han revelado que los hidrolizados clarificados presentan una notable disminución en la

concentración de hierro y proteínas respecto a los hidrolizados retenidos, con niveles de hierro aproximadamente 52 veces menores y una cantidad de proteínas 1,8 veces inferior (Castillo y Ortiz, 2023). Estas pérdidas comprometen su valor nutricional y funcionalidad, lo que dificulta su aplicación en la producción de alimentos fortificados. Este problema resalta la necesidad de mejorar el proceso de clarificación para aumentar el rendimiento y conservar los componentes clave en los hidrolizados clarificados.

En este contexto, el proceso de diafiltración se plantea como una alternativa para mejorar la separación y la retención de proteínas y hierro en hidrolizados clarificados, abordando un área poco explorada en la investigación actual. Este estudio se enfoca en analizar las condiciones operacionales de la diafiltración, con el propósito de minimizar problemas como la colmatación de membranas y la pérdida de permeabilidad, mejorando la eficiencia del proceso y el aprovechamiento de los componentes clave.

Frente a esta situación, surge la pregunta que guía este trabajo: ¿Cómo afecta el proceso de diafiltración de sangre bovina al rendimiento de los hidrolizados clarificados obtenidos? Buscando responder esta pregunta, se espera desarrollar estrategias que favorezcan dicho rendimiento y potencien la aplicabilidad de los hidrolizados clarificados en la industria alimentaria.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo general

Analizar el rendimiento de los hidrolizados clarificados obtenidos a partir de la diafiltración de sangre de bovino.

### 1.2 Objetivos específicos

- Evaluar el proceso de diafiltración de sangre de bovino para la producción de hidrolizados clarificados.
- Comparar el proceso de hidrólisis con sangre diafiltrada y su impacto en la obtención de hidrolizados clarificados.

## 2. Marco teórico y estado del arte

Uno de los principales desafíos que la agroindustria enfrenta radica en la gestión de sus residuos, vertimientos y emisiones, los cuales conllevan altos niveles de contaminación. A menudo, las estrategias empleadas para abordar este problema son básicas y carecen de un valor económico y ambiental significativo. Sin embargo, es importante destacar que los desechos alimentarios poseen una diversidad de compuestos químicos con potenciales aplicaciones comerciales, lo que permite la generación de valor añadido y la revalorización de estos materiales (García et al., 2019). La industria del ganado bovino es destacada globalmente debido al amplio consumo de sus productos y subproductos, que se clasifican en cuatro categorías principales. En primer lugar, se encuentran los componentes de alto valor, como la carne. Le siguen los destinados a la industria no alimentaria, como pieles, huesos, pezuñas y sangre. También se incluyen componentes de bajo valor, como despojos y harina de carne. Por último, existen elementos sin

utilidad comercial, como la barbotina de lana y el contenido del tracto digestivo, eliminados como residuos (Parrón et al., 2018).

La sangre es un subproducto inevitable de la industria cárnica que representa hasta el 4% del peso del animal vivo o del 6 al 7 % del contenido de carne magra, con un 80,9 % peso de agua, un 17,3 % de proteínas, 0,23 % de lípidos, 0,07 % de carbohidratos y 0,62 % de minerales. Además, contiene un alto nivel de hierro de 36,3 mg/100 g, que es tres veces mayor que el contenido presente en la carne. El plasma que es la parte líquida presenta un porcentaje de proteínas de alrededor de 8,58% (Sampedro, 2013). Por consiguiente, la sangre de bovino representa una valiosa fuente de hierro para complementar una dieta que carezca de este micronutriente (Duarte et al., 1999).

Se conoce que la sangre es una fuente abundante de proteínas de alta calidad, sin embargo, su valor en el mercado es subestimado. Por esta razón, diversas investigaciones se han centrado en estudiar los hidrolizados de sangre de varios animales de consumo, con el propósito de analizar la capacidad biológica de los péptidos obtenidos a partir de sus fracciones (Barragan, 2013)

En cuanto al hierro, éste se presenta en la naturaleza como hierro hemínico y hierro no hemínico. El hierro hemínico forma parte exclusivamente de alimentos de origen animal, ya sea como hemoglobina y/o mioglobina (Rocío, s. f.). Además, se conoce que el hierro hemínico es mejor absorbido por el cuerpo humano (Tostado et al., 2015); este es el principal motivo por el cual se busca incorporar en otros alimentos.

En el año 2021, el grupo CICTA obtuvo un resultado favorable en la Convocatoria MinCiencias 896-2021, que se enfoca en el fortalecimiento de las capacidades regionales de investigación en salud. La presente propuesta de Trabajo de grado se alinea con el Objetivo específico 4 de los 7 planteados en el proyecto, el cual consiste en implementar las etapas de

postratamiento de los hidrolizados obtenidos a través del escalado del proceso de filtración con membranas y la implementación de las etapas de la evaporación de película y de desalado. En particular, este trabajo busca analizar el rendimiento del proceso de hidrólisis si se le induce una diafiltración por membranas a la sangre de bovino cruda.

La hidrólisis consiste en una reacción donde se da el rompimiento de una molécula por la acción del agua. La hidrólisis puede ser efectuada ya sea químicamente (mediante ácido o álcali) o biológicamente utilizando enzimas (Pasupuleti & Braun, 2010). La hidrólisis enzimática es la de interés para el proyecto MinCiencias. Esta se puede ver afectada por ciertos factores los cuales pueden inhibir su proceso, como los son los inhibidores de proteasas. Estos son compuestos que pueden entorpecer la acción de las enzimas proteolíticas, las cuales catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas. Estos inhibidores pueden estar presentes naturalmente en la sangre o ser generados durante su procesamiento (Figuroa et al., 2012). Su presencia puede disminuir la efectividad de la hidrólisis enzimática, lo que significa que se reduce la velocidad y la cantidad de péptidos y aminoácidos liberados. Por ello, es crucial controlar y reducir la presencia de estos inhibidores en la sangre bovina antes de realizar la hidrólisis enzimática, para lograr una mayor eficiencia y rendimiento en la producción de hidrolizados proteicos (Figuroa et al., 2012).

La diafiltración es una técnica membranaria útil para mejorar la eficiencia y el rendimiento de la hidrólisis de la sangre bovina. Esta consiste en un proceso de separación en la que se añade un volumen de líquido a la muestra (generalmente agua desmineralizada) para lavar y eliminar los componentes no deseados, mientras que se retiene la fracción de interés, como las proteínas globulares como el caso de la hemoglobina. Esta técnica también puede mejorar las propiedades funcionales de los hidrolizados, como la capacidad de formar espuma y la solubilidad, lo que los hace más adecuados para su uso en diferentes aplicaciones (Simonetti, 2016). En la actualidad, la

diafiltración se emplea para fabricar WPC (concentrado de proteína de suero de leche) con niveles de contenido elevados, que van desde un 25% hasta un 90%, al combinarla con diversas técnicas de filtración como microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa (Baldaso et al., 2011). Una de las aplicaciones más utilizadas a nivel mundial es para producir proteínas de suero concentradas, que pueden obtener niveles muy altos de contenido de proteína, si se combinan correctamente las técnicas de filtración, para remover las partículas solubles y obtener una proteína de mayor pureza y por ende mayor valor comercial (Kelly, 2002).

La hemólisis osmótica es un fenómeno que ocurre debido a las diferencias en las presiones osmóticas entre el interior de la célula y el medio externo. Los glóbulos rojos, por ejemplo, contienen una elevada concentración de solutos en su citoplasma; cuando se colocan en un medio hipotónico, como el agua destilada, el agua ingresa a la célula por ósmosis, lo que provoca su hinchazón y eventual ruptura de la membrana celular. Este principio, basado en el movimiento de agua a través de una barrera semipermeable por diferencias de concentración, guarda relación con el proceso de diafiltración, en el cual también se emplea una membrana selectiva para generar un gradiente que permite remover solutos no deseados y obtener una fracción más purificada.

La hemólisis osmótica garantiza la liberación completa de la hemoglobina y otras proteínas intracelulares en el medio acuoso. Esto es crucial para la producción de hidrolizados ricos en proteínas, debido a que la hemoglobina contiene hierro hemínico, que es de particular interés en la fortificación de alimentos. La ruptura de los glóbulos rojos aumenta la disponibilidad para el proceso de hidrólisis (Koseoglu et al., 2011).

Se ha estudiado la optimización de la hidrólisis enzimática de la fracción globular de la sangre bovina analizando la cinética enzimática con respecto a las variables más importantes del proceso, como el pH, la concentración inicial del sustrato y la relación enzima/sustrato. Los

hidrolizados enzimáticos de proteínas son ampliamente empleados en diversos procesos alimentarios debido a sus propiedades funcionales, como una mayor capacidad de agitación, dispersión y solubilidad mejorada (Ramos et al., 2006; Dàvila et al., 2007).

Desde una perspectiva nutricional, las proteínas y péptidos derivados de subproductos están siendo utilizados para potenciar funciones biológicas (Möller et al., 2008), ya que los péptidos resultantes de la hidrólisis tienen la capacidad de ejercer efectos biológicos específicos (Martínez y Martínez, 2006).

Un péptido es una cadena corta de aminoácidos (habitualmente de 2 a 50) vinculados por uniones químicas (denominados enlaces peptídicos). Una cadena más larga de aminoácidos unidos (51 o más) es un polipéptido (*National Human Genome Research Institute Home / NHGRI*, s. f.). Los péptidos bioactivos de diferentes fuentes han encontrado aplicación en la industria nutracéutica y farmacéutica, principalmente para la elaboración de alimentos funcionales. Por ejemplo, se ha observado que los hidrolizados de plasma poseen actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), actividad antígenotóxica (reduciendo daños en el ADN) (Hyun y Park, 2002) y actividad antioxidante. Asimismo, se han identificado péptidos de hemoglobina bovina con propiedades antimicrobianas (Daoud, Dubois-Delval y Bors-Dodita, 2005). Así se nota la hidrólisis enzimática como un método eficaz para extraer proteínas hidrolizadas y hierro como subproductos, permitiendo obtener ingredientes de alto valor añadido (Lafarga & Hayes, 2017).

Los hidrolizados de sangre bovino son sometidos a procesos baromembranarios los cuales son técnicas de separación que utilizan la diferencia de presión para impulsar el transporte de moléculas a través de una membrana semipermeable. Esta membrana permite el paso de moléculas de menor tamaño o con mayor afinidad por la membrana, mientras que retiene moléculas de mayor tamaño o con menor afinidad. Las tecnologías basadas en membranas tienen un impacto

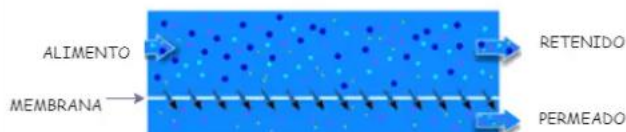
significativo en el desarrollo de productos nuevos y mejorados. Su aplicación se ha destacado en diversas industrias, como la industria alimentaria, la desalinización del agua de mar, el tratamiento de aguas residuales y la clarificación de jugos. (Solís et al., 2017).

En la Figura 1 se ilustra un esquema representativo del proceso de separación mediante membranas. Este proceso se fundamenta en la presencia de una barrera semipermeable o selectiva que discrimina entre diferentes componentes de una mezcla en función de propiedades como el tamaño molecular, la forma, o la afinidad química con la membrana. De esta manera, ciertos compuestos logran atravesar la membrana constituyendo el permeado, corriente caracterizada por una menor concentración de los solutos retenidos, mientras que otros son rechazados y se concentran en la corriente denominada retenido. Esta diferenciación en la distribución de los componentes genera un gradiente de concentración entre ambas fases, el cual resulta esencial para comprender la eficiencia del proceso y las aplicaciones posteriores del material tratado.

### Figura 1.

*Esquema de la separación con membranas*

*Nota.* Tomado de Alfa Laval (2020)



Los procesos con membranas se pueden clasificar con base en el umbral de corte de la membrana y la presión transmembrana ( $\Delta P_{TM}$ ) necesaria para que ocurra la separación (Benito et al., 2004). De la siguiente manera:

**Tabla 1.***Tipos de separación con membranas*

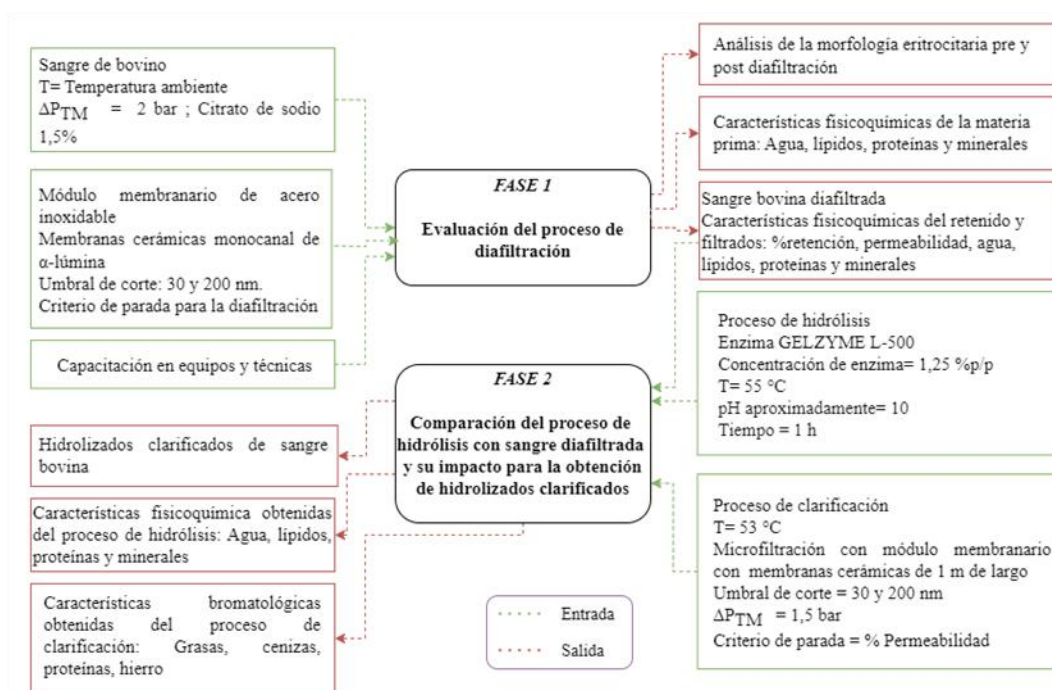
Tipo de separación con Membranas	Umbral de corte [kDa]	Intervalo $\Delta P_{TM}$ [bar]
<b>Nanofiltración (NF)</b>	0,1-0,5	10-30
<b>Ultrafiltración (UF)</b>	0,5-100	1-10
<b>Microfiltración (MF)</b>	>100	1-10

En todos los tipos de separación por membranas se debe tener en cuenta el manejo de variables como la presión transmembrana, la temperatura y la velocidad de flujo de la alimentación (Benito et al., 2004). Esto debido a fenómenos que podrían afectar este proceso como lo es la colmatación; definida como la disminución del flux de permeado debido a la acumulación de partículas en la superficie de la membrana (Ortiz et al., 2008).

A través de la separación con membranas se ha logrado separar la fracción celular del plasma bovino. Esto se realizó por medio de microfiltración y ultrafiltración (Kokkora et al., 2012). La microfiltración resultó en una proporción de 10:14 entre plasma de sangre (permeado) y fracción de glóbulos rojos (retenido). La ultrafiltración concentró tanto la fracción de glóbulos rojos como las proteínas en el retenido, obteniendo un permeado libre de proteínas.

### 3. Metodología

La Figura 2 presenta el diagrama metodológico, resaltando las fases que se desarrollaron para alcanzar los objetivos plantados en este proyecto. En este se definieron dos fases, la primera consistió en la evaluación del proceso de diafiltración, y la segunda, en la cual se comparó el proceso de hidrólisis con sangre diafiltrada y el impacto que este tiene para la obtención de hidrolizados clarificados.

**Figura 2.***Diagrama metodológico del proyecto*

### 3.1 Fase 1: evaluación del proceso de diafiltración

La sangre bovina utilizada como materia prima fue suministrada por Colbeef S.A.S a la cual se le adicionó citrato de sodio al 1,5% v/v, como anticoagulante. Se replicaron las condiciones operacionales para la sangre de bovino y la obtención de los hidrolizados clarificados descritas por Acosta y Ríos (2013), y Castillo y Ortiz (2023). Además, se realizaron capacitaciones en el manejo de equipos y técnicas de caracterización, asegurando así las competencias necesarias para el desarrollo adecuado de los experimentos.

La sangre bovina fue sometida a un proceso de diafiltración a temperatura ambiente, aplicando una presión transmembrana de 2 bar. Para ello, se utilizó agua desmineralizada con una conductividad eléctrica inferior a 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , realizándose diluciones al 20% de la sangre trabajada, con el objetivo de retirar este porcentaje por medio del filtrado. El proceso se llevó a cabo

utilizando un módulo membranario de acero inoxidable equipado con membranas cerámicas monocanal de  $\alpha$ -lúmina, de 1 m de largo y un área de 0,0659 m<sup>2</sup>, empleando umbrales de corte de 30 y 200 nm.

**Figura 3.**

*Módulo membranario*



**3.2 Fase 2: comparación del proceso de hidrólisis con sangre diafiltrada y su impacto para la obtención de hidrolizados clarificados**

La sangre diafiltrada, obtenida en la Fase 1, atravesó dos procesos adicionales: hidrólisis y posteriormente clarificación.

El proceso de hidrólisis se llevó a cabo utilizando la enzima GELZYME L500, a una temperatura de 55°C y un pH inicial de 10, con una concentración de enzima del 1,25% p/p, durante aproximadamente 60 min. Este procedimiento se realizó tanto con sangre diafiltrada como con sangre sin tratar. La sangre sin tratar fue utilizada inicialmente en pruebas piloto, lo que permitió la capacitación en la técnica del proceso para proceder a realizar escalados los cuales fueron necesarios para llevar a cabo la hidrólisis. Para esta actividad fue necesario realizar disoluciones del 20% con agua desmineralizada antes del proceso para facilitar el manejo de la sangre hidrolizada.

**Figura 4.***Reactor de hidrólisis enzimática de acero inoxidable*

Posteriormente, la clarificación se realizó utilizando un módulo con membranas cerámicas monocanal de  $\alpha$ -lúmina de 1 m de largo ( $0,0659 \text{ m}^2$ ) y umbral de corte de 30 y 200 nm, a  $53^\circ\text{C}$  y 2 bar de presión transmembrana.

La prueba se desarrolló utilizando seis membranas para cada umbral de corte, aplicándose tanto a la sangre hidrolizada normal como a la sangre hidrolizada diafiltrada. Se empleó una dilución al 5% con agua desmineralizada como parte del protocolo experimental. El parámetro de parada seleccionado fue el tiempo, estipulado en 5h para cada proceso.

**3.3 Métodos de análisis y cuantificación**

Para el análisis de las muestras que se obtuvieron durante el desarrollo del trabajo, se utilizaron los siguientes métodos experimentales:

**Tabla 2.***Métodos y normas utilizadas para la cuantificación de macroelementos en sangre de bovino*

Macroelementos	Método	Norma
Proteínas	Método Kjeldahl	NTC 4657:2022
Cenizas	Gravimétrico	NTC 4648; 2022
Lípidos	Extracción Soxhlet	NTC 1662: 2008
Hierro hemo	Absorción atómica	

Permeabilidad: Se midió volumétricamente, relacionando los caudales de permeado en un tiempo determinado de 10 s o 20 s, según el caso. Se determinó para todas las filtraciones y después de cada proceso de lavado, permitiendo caracterizar la membrana en términos de productividad y limpieza, respectivamente (Benavente et al., 2000).

Humedad: El contenido de humedad se determinó mediante una balanza de humedad precisa modelo XM 60-HR.

Hemólisis osmótica: Se tomaron muestras de sangre bovina cruda y se diluyeron en diferentes cantidades de agua desmineralizada, generando una lisis celular a una temperatura ambiente. Posteriormente, con ayuda de un microscopio se caracterizaron las muestras obtenidas (Cibic Laboratorios, 2018).

Determinación grado de hidrólisis: Se tomaron muestras de la sangre hidrolizada y se ajustó su pH hasta 10 con NaOH 5N. Por medio de estas muestras se hizo un estimado para el GH del volumen total obtenido del proceso.

$$GH = \frac{BN_B}{M_p} \frac{1}{\alpha} \frac{1}{h_t} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1+10^{pH-pK}} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$pK = 7,8 + \frac{298-T}{298 \cdot T} \cdot 240 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde B es el volumen de NaOH consumido (L), NB es la normalidad de la base,  $\alpha$  es el grado medio de disociación de los grupos  $\alpha\text{-NH}_2$  liberados en la reacción, el cual depende del pK, que a su vez está asociado con la temperatura, MP (kg) es la cantidad de proteína en la mezcla de reacción. MP se calculó con la siguiente ecuación:

$$M_p = m_{\text{sangre}} \cdot C_{\text{prot}} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde  $m_{\text{sangre}}$  es la masa de sangre en 500mL (kg) y  $C_{\text{prot}}$  es el contenido de proteína en la sangre (g proteína / 100g sangre). El parámetro  $h_t$  (Eqv/kg) es el número de enlaces peptídicos

totales en la proteína (Morales et al., 2017), para este caso se utilizó un ht de 8.3 Eqv/kg, que ha sido reportado para proteínas de la sangre (Gómez et al., 2013).

#### **4. Análisis y discusión de resultados**

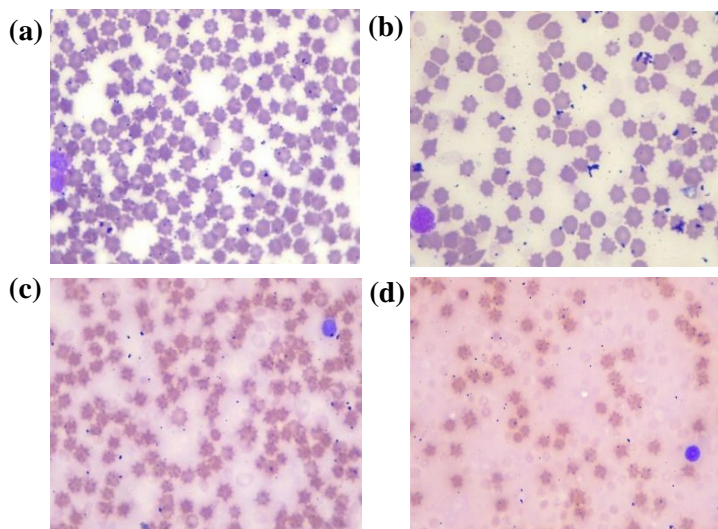
##### **4.1 Impacto del proceso de diafiltración**

La Figura 5 muestra las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido al realizar 4 diluciones diferentes. Esto se realizó para evaluar la hemólisis osmótica a diferentes diluciones, con el objetivo de determinar el parámetro de parada en el proceso de diafiltración.

Al realizar las diluciones se observó que, a partir de la dilución del 30%, la población de glóbulos rojos comenzó a disminuir. Esto se debe a que la capacidad de los glóbulos rojos para retener agua había superado su punto crítico, lo que provocó que las células se hincharan más allá del límite de elasticidad de su membrana (Alonso et al., 2015). Como resultado, ocurrió hemólisis debido a la presión osmótica ejercida sobre ellas. Por esta razón, se eligió trabajar con diluciones al 20% porque, a esta concentración, los glóbulos rojos mostraban un mayor volumen celular sin haber alcanzado aún la hemólisis.

**Figura 5.**

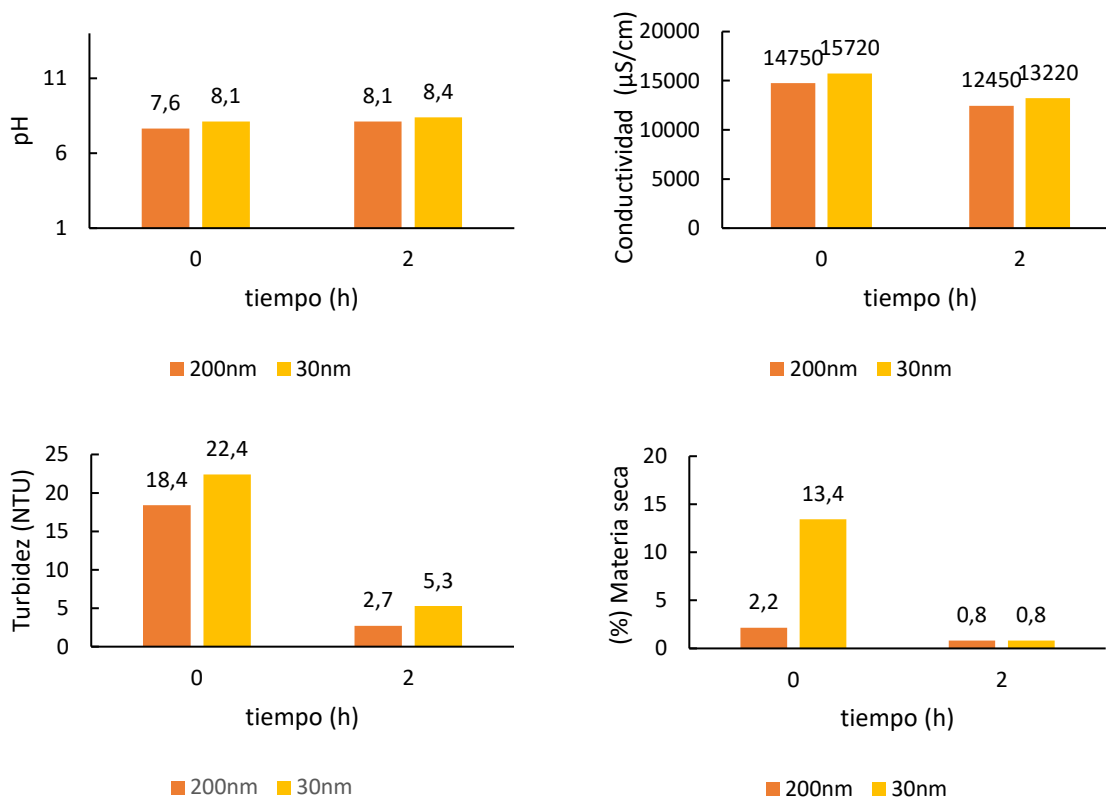
*Glóbulos rojos analizados por medio del microscopio electrónico de barrido. Muestra de sangre con dilución (a) del 10%. (b) del 20%. (c) del 30%. (d) del 40%.*



La Figura 6 muestra los resultados para pH, conductividad, turbidez y materia seca para los permeados obtenidos al inicio y al final de las 2 h del proceso de diafiltración. A diferencia del estudio realizado por Acosta y Ríos (2013), en el cual se empleó un proceso de filtración utilizando sangre bovina a una temperatura de 20 °C y una presión de operación de 1 bar, en este trabajo se implementó un proceso de diafiltración a 40 °C y 2 bar.

**Figura 6.**

*pH, conductividad, turbidez y materia seca de permeados (sangre sin hidrolizar) obtenidos durante la prueba de escalado de la diafiltración, a 2 bar de presión transmembrana y 40°C, utilizando 6 membranas de 1m de largo para cada prueba.*



Los valores de pH se mantuvieron estables durante el proceso, sin presentar variaciones entre los permeados obtenidos con ambos umbrales de corte. En cuanto a la conductividad, turbidez y materia seca, se observaron reducciones al finalizar el proceso de 15,6%, 85,3%, 61,9% para la membrana de 200nm, y de 15,9%, 76,4%, 93,9% para la de 30nm, respectivamente.

La disminución de la conductividad, cercana al 20% en ambos casos, es coherente con el comportamiento esperado en un proceso de diafiltración, donde el arrastre de solutos de bajo peso molecular por el solvente añadido (agua) favorece una disminución progresiva de la concentración

de los electrolitos. Este valor de reducción corresponde al porcentaje de dilución aplicado, indicando que la diafiltración permitió remover parte de los solutos iónicos presentes.

Durante el proceso de diafiltración, los permeados presentaron una disminución progresiva en su turbidez, pasando de 18,4 a 2,7 NTU para la membrana de 200 nm y de 22,4 a 5,28 NTU para la de 30 nm. Esta tendencia está asociada a la formación progresiva de una capa de ensuciamiento sobre la membrana la cual limitaba el paso de fracciones coloidales, actuando como una barrera adicional al mecanismo de exclusión por tamaño (Snir et al., 1996; She et al., 2009).

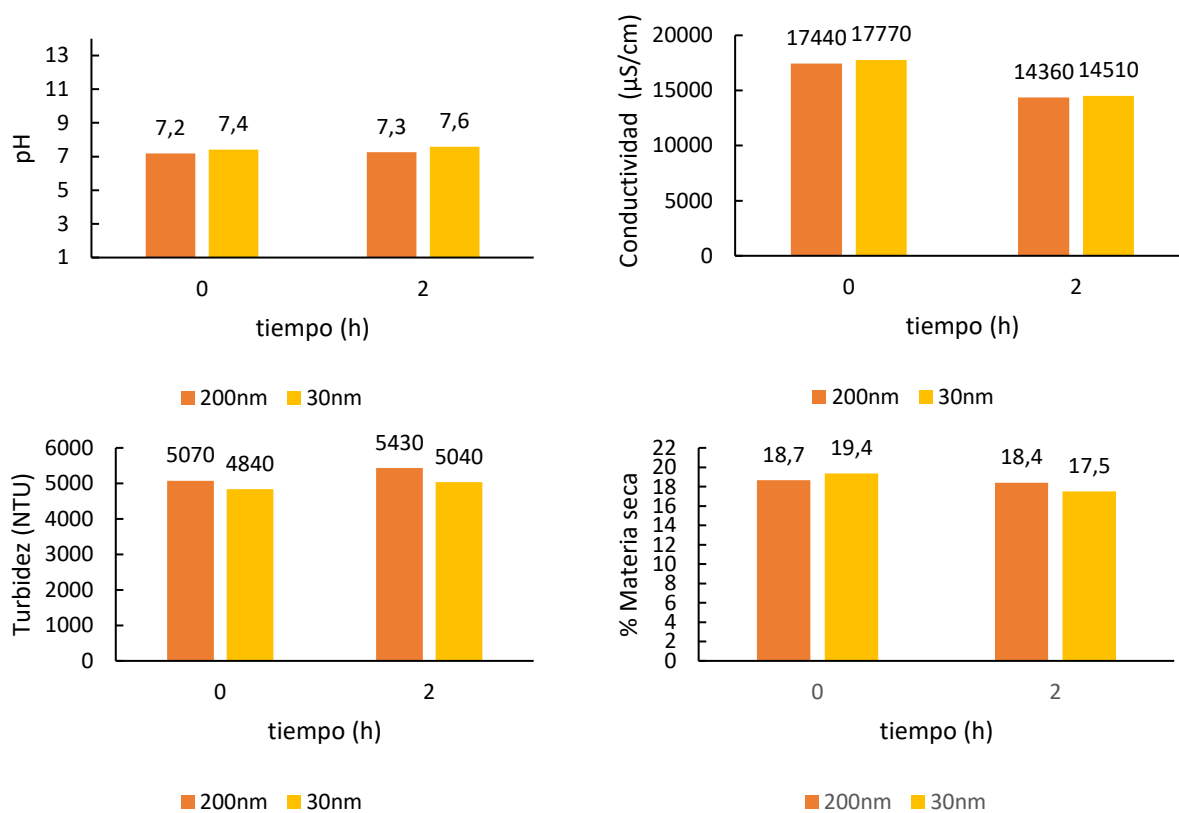
De forma similar, el contenido de materia seca en los permeados disminuyó de 2,1% a 0,8% para la membrana de 200 nm y de 13,4% a 0,8% para la de 30 nm. Esta reducción más allá del efecto del lavado por diafiltración, está relacionada a la evolución del sistema en el tiempo, donde el ensuciamiento genera una capa de ensuciamiento que limita el paso de sólidos solubles y coloidales (Van der Bruggen et al., 2003).

Por otra parte, Acosta y Ríos (2013) reportaron que una reducción en el umbral de corte disminuyó el porcentaje de materia seca en los permeados, debido a una mayor retención de proteínas en el retenido. En su estudio, la membrana de 200 nm se mantuvo constante empezando y terminando con un valor de 5,4%, mientras que la de 150kDa presentó una disminución del 10,7% (de 2,8% a 2,5%) y la de 300 kDa del 10,71% (del 2,8 al 2,5). En el presente estudio, no se observaron diferencias relevantes entre las membranas de 30 nm y 200 nm al final de la prueba. Sin embargo, la materia seca en los permeados se redujo un 93,9% para la membrana de 30nm (de 13,44% a 0,81%) y un 61,9% para la membrana de 200nm (de 2,16% a 0,82%). Este resultado sugiere que, bajo las condiciones operativas utilizadas, el umbral de corte no tuvo un efecto en la eliminación de sólidos disueltos, lo que refuerza el papel de la diafiltración como una estrategia para la reducción progresiva de sólidos disueltos.

La Figura 7 muestra los resultados para pH, conductividad, turbidez y materia seca para los retenidos obtenidos al inicio y al final de las dos horas de la prueba.

### Figura 7.

*pH, conductividad, turbidez y materia seca de retenidos (sangre sin hidrolizar) obtenidos durante la prueba de escalado de la diafiltración, a 2 bar de presión transmembrana y 40°C, utilizando 6 membranas de 1m de largo para cada prueba.*



Se pudo notar que durante la diafiltración no se presentó una variación en el pH y además de esto, no se observaron diferencias entre los umbrales de corte evaluados. Sin embargo, a lo largo del proceso, los retenidos mostraron una disminución en la conductividad del 17,7% para la membrana de 200nm y del 18,3% para la de 30nm. Esta reducción se atribuye a la diafiltración, la cual favorece la eliminación de compuestos de bajo peso molecular que se encuentran disueltos,

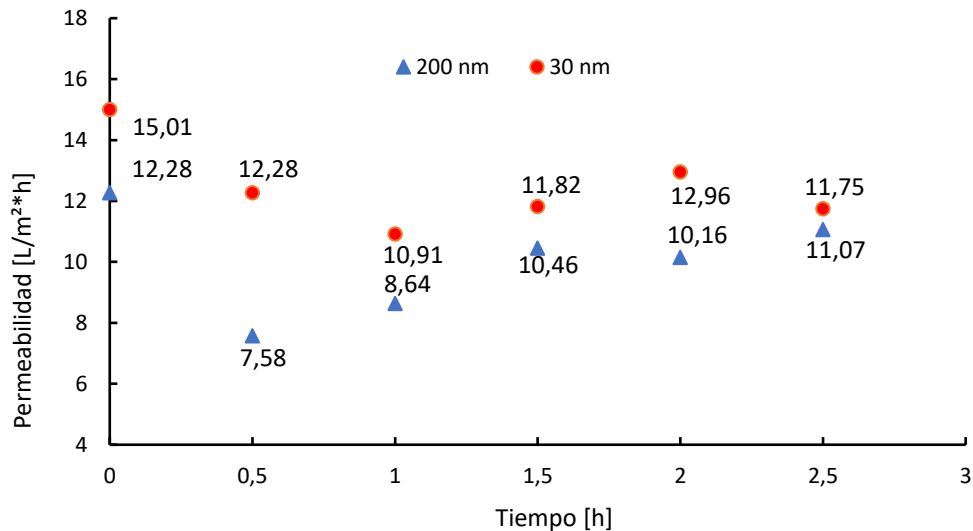
como iones. A medida que se añade el solvente, debido al proceso de diafiltración, se arrastran estos solutos a través de la membrana, disminuyendo la concentración de iones responsables de la conductividad en el retenido. Esta reducción en la conductividad está relacionada con el factor de dilución aplicado durante la diafiltración, la cual fue cercana al 20%. Este comportamiento evidencia la eficacia del proceso para remover electrolitos, sin comprometer las fracciones macromoleculares retenidas.

En cuanto a la turbidez y la materia seca, los resultados evidencian un comportamiento distinto. La turbidez aumentó levemente para ambas membranas al finalizar la diafiltración, pasando de 5070 a 5430 NTU en la de 200nm y de 4840 a 5040 NTU en la de 30nm. Este incremento sugiere un efecto de concentración inducido por la temperatura mantenida durante el proceso (40 °C). Por otro lado, la materia seca mostró una ligera reducción, siendo más evidente con la membrana de 30nm (de 19,36% a 17,49%) en comparación con la de 200nm (de 18,66% a 18,4%). Esta diferencia puede atribuirse a la mayor retención interna en membranas de mayor umbral de corte, donde el material colmatante puede quedar parcialmente atrapado en el interior. En cambio, en la membrana de 30nm, el ensuciamiento es mayormente superficial, permitiendo un arrastre más eficiente de solutos finos (Snir et al., 1996; She et al., 2009).

A diferencia de la conductividad, cuya disminución reflejó la remoción de fracciones solubles, los cambios en turbidez y materia seca están más relacionados con componentes insolubles o coloidales, que son menos removidos por el proceso de diafiltración. La Figura 8 muestra la evolución de la permeabilidad durante el proceso de diafiltración utilizando membranas de 200 nm y 30 nm.

**Figura 8.**

*Permeabilidad de membranas durante la diafiltración de sangre en el escalado, a 2 bar de presión transmembrana y 40 °C, utilizando 6 membranas de 1m de largo para cada prueba.*



Ambas membranas presentaron una tendencia decreciente inicial en la permeabilidad, asociada al ensuciamiento progresivo de la superficie (Snir et al., 1996; She et al., 2009). Sin embargo, la membrana de 200 nm mostró una variación particular en su comportamiento, con una caída pronunciada durante los primeros 30 min (de 8,64 a 7,58 L/m<sup>2</sup>·h), seguida de una recuperación progresiva hasta alcanzar 11,07 L/m<sup>2</sup>·h al final del proceso. Este comportamiento sugiere la ocurrencia de un taponamiento transitorio a la entrada del módulo para algunas membranas, posiblemente asociado a la acumulación inicial de sólidos suspendidos o formación de coágulos, los cuales, bajo condiciones estables de temperatura (40 °C) y presión (2 bar), podrían haberse redistribuido o liberado con el paso del tiempo, permitiendo una recuperación parcial del flujo.

Esta hipótesis se refuerza con la inspección final del módulo, en la que se encontraron algunas membranas obstruidas en la zona de ingreso de la alimentación al módulo. Esto respalda la idea de que el sistema experimentó un bloqueo parcial seguido de una reconfiguración dinámica del ensuciamiento, posiblemente influenciada por pequeños cambios de viscosidad o distribución del caudal.

Por su parte, la membrana de 30nm presentó una disminución progresiva y más uniforme en la permeabilidad, de 15,01 a 11,75 L/m<sup>2</sup>·h. Este comportamiento más estable sugiere una menor propensión a eventos de colmatación abrupta, probablemente, debido a que su umbral de corte menor promovió un ensuciamiento superficial, reduciendo el riesgo de taponamiento interno por partículas cercanas al tamaño de poro.

Al comparar los resultados obtenidos con los reportados por Acosta y Ríos (2013), se observa un comportamiento diferente en la evolución de la permeabilidad. En su estudio, la membrana de 200nm presentó una disminución progresiva de 81,2 a 35,9 L/m<sup>2</sup>·h, mientras que, en el presente trabajo, dicha membrana mostró una caída inicial de 12,28 a 7,58 L/m<sup>2</sup>·h, seguida de una recuperación parcial hasta 11,07 L/m<sup>2</sup>·h.

A diferencia del estudio de referencia, el presente experimento operó con un número de Reynolds bajo (de aproximadamente 2,48 para 200nm y 3,08 para 30nm), lo que indica un régimen laminar. En contraste, Acosta y Ríos (2013) trabajaron bajo condiciones turbulentas ( $Re \sim 31850$ ). Este cambio en el régimen hidrodinámico, sumado a la configuración de ocho tubos de mayor longitud, implicó una menor velocidad lineal por canal, mayor superficie disponible y una mayor susceptibilidad a la formación de capas colmatantes (*fouling*) de mayor espesor (Ortiz et al., 2008).

Sin embargo, un aspecto destacable del presente trabajo es que, a pesar de operar con menor turbulencia y mayor exigencia de operación (mayor volumen permeado), fue posible mantener

permeabilidades estables a lo largo del tiempo, particularmente gracias al efecto diluyente de la diafiltración, que contribuyó a reducir la viscosidad y la concentración de solutos acumulados sobre la membrana (Mardal et al., 2024).

La Tabla 3 muestra la composición de la sangre sin tratar, el retenido diafiltrado y el permeado obtenido durante la diafiltración.

**Tabla 3.**

*Parámetros fisicoquímicos de la sangre (sin diafiltrar), retenido (diafiltrado) y permeado.*

<b>Parámetros</b>	<b>Unidades</b>	<b>Sangre (sin diafiltrar)</b>	<b>Retenido diafiltrado</b>	<b>Permeado diafiltrado</b>
<b>Proteína cruda</b>	g/100g	15,81	16,31	0,30
<b>Sodio</b>	mg de Na/100g	254,46	189,73	160,38
<b>Hierro</b>	mg/100g	39,22	40,07	0,43
<b>Hiero hemo</b>	mg de Fe/100g	37,21	39,87	-

Se observó que la proteína total disminuyó notablemente en el permeado de la sangre diafiltrada, pasando de 15,81 g/100 g en la sangre (sin diafiltrar) a 0,30 g/100 g. Este comportamiento es coherente con lo esperado en procesos de clarificación baromembranarios, en donde se busca retener macromoléculas proteicas con alto peso molecular, como por ejemplo, la hemoglobina (Van der Bruggen et al., 2003). En el retenido diafiltrado al finalizar el proceso se registró un valor de 16,31 g/100 g, ligeramente superior al de la sangre (sin diafiltrar). Este incremento puede atribuirse a un fenómeno de concentración progresiva, que resulta de la pérdida de agua durante la filtración a temperaturas superiores a la temperatura ambiente y en condiciones de operación prolongadas, favoreciendo una ligera evaporación del agua presente (Rincón, 2019). Esto conlleva a la concentración de sólidos en el retenido, entre los cuales se encuentran las proteínas.

Respecto al contenido de sodio, se observó una disminución progresiva en el retenido, pasando de 254,46 mg de Na/100 g a 189,73 mg de Na/100 g (reducción del 25%) a lo largo del proceso de diafiltración. Esta reducción está asociada al efecto de lavado provocado por la incorporación de agua, que diluye el sistema y arrastra los sólidos disueltos. Como resultado, el permeado final presentó un contenido de sodio de 160,38 mg/100 g, es decir, un 37% menos respecto a la muestra inicial, reflejando así la eficacia del lavado y su impacto directo en ambas fracciones.

En cuanto al hierro total, se observó que permaneció en el retenido (40,07 mg/100 g), lo que refleja que la mayoría del hierro en la sangre está asociada a proteínas como la hemoglobina, retenidas por la membrana durante el proceso (Boccio et al., 2003). Asimismo, mostró un valor similar en el retenido (39,87 mg de Fe/100 g), lo que indica que la diafiltración permitió conservar este componente junto a las proteínas.

#### 4.2 Comparación del proceso de hidrólisis enzimática usando sangre diafiltrada.

La Tabla 4 muestra la composición fisicoquímica de las soluciones utilizadas en la evaluación de la hidrólisis enzimática, comparando sangre sin diafiltrar y sangre diafiltrada.

**Tabla 4.**

*Parámetros fisicoquímicos de la hidrólisis de sangre normal y diafiltrada.*

Parámetros	Unidades	Hidrolizado de sangre (sin diafiltrar)	Hidrolizado de sangre diafiltrada
pH		8,36	8,20
Conductividad	μS/cm	12460	10770
Turbidez	NTU	1240	1000
Materia seca	%	19,47	16,39
Hierro	mg/100 g	40,35	35,71
Hierro hemo	mg de Fe/100 g	32,55	26,45
Sodio	mg Na/100 g	521,97	411,71
Proteína cruda	g/100 g	17,07	13,20

En cuanto a la conductividad eléctrica, relacionada directamente con la presencia de sales disueltas, se redujo en un 13,56% (de 12.460 a 10.770  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), lo que indica una remoción parcial de especies iónicas durante la diafiltración, además relacionándose con el factor de dilución durante la diafiltración que fue de aproximadamente 20%. En cuanto a la turbidez, se observó una disminución del 19,35% (de 1240 a 1000 NTU), valor que se aproxima al nivel de dilución aplicado, lo cual refleja una eliminación proporcional de partículas suspendidas de menor tamaño. Además, esta disminución se puede atribuir a la eliminación de compuestos de bajo peso molecular, como hemoglobina libre, lípidos y restos celulares, durante el proceso de diafiltración. Estos componentes son conocidos por contribuir a la formación de agregados insolubles que aumentan la turbidez en soluciones proteicas (Soto-Sierra et al., 2022). Asimismo, desde el punto de vista composicional, la materia seca mostró una disminución del 15,8% (de 19,47% a 16,39%), lo que evidencia una pérdida de sólidos totales asociada al efecto de lavado provocado por la diafiltración.

En relación con el contenido de hierro hemo, se observó una reducción del 18,50% tras el proceso de diafiltración, al pasar de 32,55 mg a 26,45 mg de Fe/100 g. Esta disminución se aproxima al nivel de dilución inducido durante el proceso (20%), lo cual sugiere que parte de la pérdida puede atribuirse a un efecto de dilución general del sistema. Sin embargo, es importante considerar que el hierro hemo no se encuentra en forma libre, sino que está unido a proteínas, principalmente a la hemoglobina y otras hemoproteínas presentes en la sangre. Estas macromoléculas, debido a su tamaño, no deberían atravesar fácilmente la membrana si esta posee un umbral de corte molecular adecuado.

La reducción observada, por tanto, podría estar influenciada no solo por la dilución volumétrica, sino también por otros factores asociados al proceso. Entre ellos se encuentra el

posible arrastre de fragmentos proteicos que contienen hierro hemo, resultado de una hidrólisis parcial de las proteínas durante la obtención del hidrolizado. Asimismo, la dinámica del sistema durante la diafiltración puede favorecer el paso de fracciones hemo más pequeñas o la liberación de hierro desde las proteínas, afectando su retención. (Tenhunen, Marver, & Schmid, 1968)

El contenido de sodio también fue menor en la sangre diafiltrada (411,71 mg de Na/100 g) frente a la sangre sin diafiltrar (521,97 mg de Na/100 g), lo que refleja una eliminación previa de un 21,12% de sales durante el proceso, valor relacionado al porcentaje de dilución inducido durante la diafiltración.

A diferencia del sodio, la proteína cruda y la turbidez, cuyos valores disminuyeron en proporciones similares al nivel de dilución inducido (aproximadamente 20%), otras variables como la materia seca (15,8%), la conductividad (13,56%), el hierro total (11,49%) y el hierro hemo (18,50%) presentaron reducciones inferiores o no directamente proporcionales a la dilución aplicada. Esta diferencia puede atribuirse a factores fisicoquímicos y estructurales propios de cada componente, así como a su interacción con la membrana y el medio de diafiltración.

En el caso del sodio, su alta solubilidad y bajo peso molecular permiten que sea fácilmente eliminado por arrastre con el agua durante la diafiltración (Gésan-Guiziu, 2010). Por otro lado, el hierro total y el hierro hemo se encuentran mayoritariamente ligados a proteínas como la hemoglobina o la mioglobina, lo que dificulta su paso a través de membranas con cortes moleculares superiores (Brunet et al., 2010). Esto explica por qué la reducción de estas fracciones metálicas no es directamente proporcional al nivel de dilución, ya que su eliminación no depende únicamente del volumen de agua adicionada, sino también de su asociación estructural.

La materia seca agrupa componentes tanto solubles como insolubles, incluyendo péptidos, proteínas de alto peso molecular, compuestos orgánicos e inorgánicos. Muchas de estas fracciones

presentan baja movilidad o forman estructuras coloidales que dificultan su remoción mediante membranas (Zydney & Ho, 2003). De forma similar, la conductividad eléctrica depende de la totalidad de especies iónicas presentes, no únicamente del sodio. Si bien algunas sales se eliminan eficientemente, otras pueden mantenerse en el sistema dependiendo de su carga, tamaño y afinidad con la membrana, resultando en una disminución menor al 20% (Cheryan, 1998)

Los resultados obtenidos confirman que la diafiltración impacta la composición del hidrolizado, especialmente en la reducción de sales, sólidos totales y proteínas. La menor conductividad y el menor contenido de sodio indican que la diafiltración facilitó la remoción de minerales, lo que puede ser beneficioso en aplicaciones que requieren productos con bajo contenido iónico (Nasri, 2016). Además, la disminución en turbidez y materia seca sugiere que la diafiltración favoreció la eliminación de proteínas y compuestos en suspensión, mejorando la claridad del hidrolizado (Toldrá et al., 2016).

Según lo reportado por Bah et al. (2016), quienes documentaron un incremento en la liberación de hierro hemo como resultado de una mayor relación enzima/sustrato. En sus estudios, una mayor carga enzimática facilitó la ruptura de la cadena globina, permitiendo la liberación efectiva del grupo hemo y su hierro asociado. De manera similar, Toldrá et al. (2016) destacan que la eficiencia en la liberación de compuestos bioactivos puede potenciarse al optimizar condiciones como el pH, la temperatura y la concentración enzimática. En contraste, nuestros resultados sugieren que no solo las condiciones de hidrólisis influyen en la liberación de hierro hemo, sino también los pretratamientos aplicados al sustrato, como la diafiltración, que modifica la composición inicial de la muestra y afecta directamente el contenido final de hierro disponible.

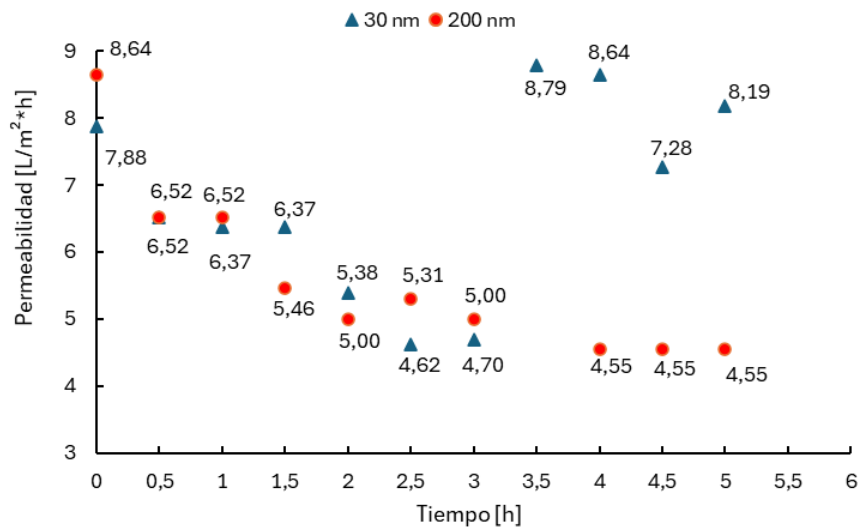
### 4.3 Clarificación con membranas

La Figura 9 muestra la evolución de la permeabilidad de membranas de dos diferentes umbrales de corte (30 nm y 200 nm) en el proceso de clarificación de sangre hidrolizada (sin diafiltrar).

Durante el proceso de clarificación de sangre hidrolizada sin diafiltrar en la membrana de 30 nm, la permeabilidad comienza en valores superiores, alrededor de  $9 \text{ L/m}^2\cdot\text{h}$ , pero experimenta un descenso progresivo en las primeras tres horas, alcanzando valores aproximados a  $5 \text{ L/m}^2\cdot\text{h}$ . Este comportamiento sugiere un ensuciamiento, posiblemente debido al bloqueo de poros o la acumulación de material en la superficie de la membrana esto debido a que el hidrolizado proviene de sangre sin diafiltrar, lo que implica la presencia de una mayor carga coloidal, hemoglobina libre, células lisadas y otras macromoléculas no eliminadas previamente (Toldrá et al., 2016). Sin embargo, después de aproximadamente cuatro horas la permeabilidad se recupera, llegando nuevamente a valores cercanos a  $8,64 \text{ [L/m}^2\cdot\text{h]}$ . Esta puede deberse a la redistribución de los sólidos retenidos o efectos de turbulencia en el flujo (Najarian y Bellhouse, 1996). La pérdida de permeabilidad total para la membrana de 30 nm se estima en un 5,21%.

**Figura 9.**

*Permeabilidad membranas en el proceso de clarificación de sangre hidrolizada sin diafiltrar, a 2 bar de presión transmembrana, a 60 °C de temperatura, utilizando 6 membranas de 1m de largo para cada prueba.*



En la membrana de 200 nm, la permeabilidad inicial es menor en comparación con la de 30 nm, comenzando en 6,52 [L/m²·h]. El descenso en la permeabilidad ocurre de manera más gradual y sin una recuperación posterior, estabilizándose en valores cercanos a 4,55 [L/m²·h] después de cuatro horas. La pérdida total de permeabilidad para la membrana de 200 nm es de 47,34%, este siendo consistente con la retención en profundidad que ocurre en membranas de mayor umbral de corte, donde las partículas penetran más fácilmente en la matriz de la membrana y no pueden ser eliminadas por efectos de flujo o turbulencia superficial. Esta hipótesis se refuerza con la inspección final del módulo, en la que al igual que en la prueba de diafiltración de sangre sin hidrolizar se encontraron algunas membranas obstruidas en la zona de ingreso de la alimentación al módulo. Esto respalda la idea de que el sistema experimentó un bloqueo parcial

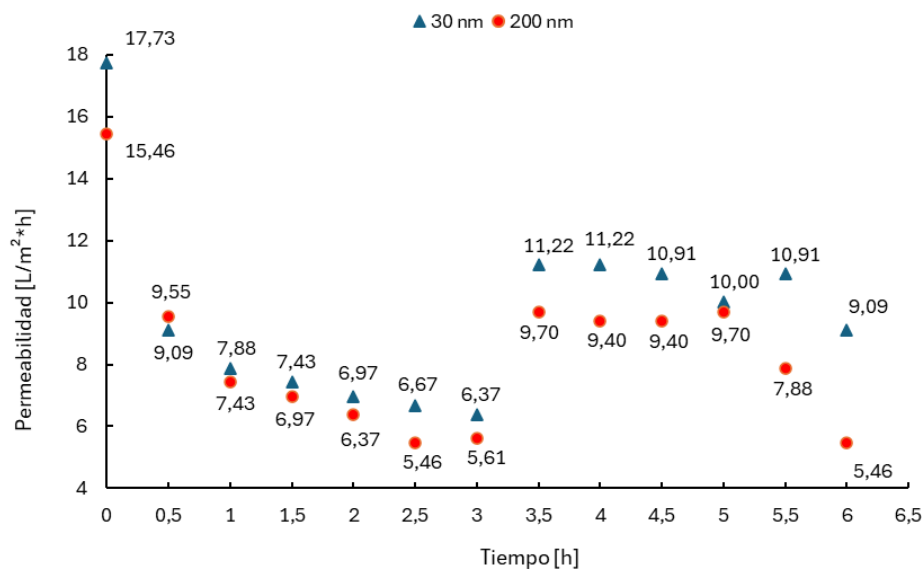
seguido de una reconfiguración dinámica del ensuciamiento, posiblemente influenciada por pequeños cambios de viscosidad o distribución del caudal.

Esto convierte a la membrana de 200 nm en una opción menos adecuada para la clarificación de soluciones con alto contenido de sólidos finos o coloides, como es el caso de la sangre hidrolizada. (Mulder, 1996; Field et al., 1995).

La Figura 10 corresponde a la evolución de la permeabilidad de membranas de dos diferentes umbrales de corte (30 nm y 200 nm) en el proceso de clarificación de sangre diafiltrada hidrolizada.

### Figura 10.

*Permeabilidad membranas en el proceso de clarificación de sangre Diafiltrada hidrolizada, a 2 bar de presión transmembrana, a 60 °C de temperatura, utilizando 6 membranas de 1m de largo para cada prueba.*



En la membrana de 30 nm, la permeabilidad inicia en un valor de 17,73 L/m²·h. Sin embargo, en la primera hora se observa un descenso pronunciado hasta aproximadamente 7,43 L/m²·h. A partir de la tercera hora, se produce una recuperación parcial de la permeabilidad,

alcanzando valores de 11,22 L/m<sup>2</sup>·h. Posteriormente, la permeabilidad vuelve a descender, aunque de manera menos pronunciada, hasta valores cercanos a 7,88 L/m<sup>2</sup>·h al final del proceso. La pérdida global de permeabilidad para esta membrana es del 64%. Es importante destacar que esta recuperación no se atribuye a un fenómeno de autolimpieza de la membrana, ya que el ensuciamiento superficial (*fouling*) tiende a ser progresivo y acumulativo, y no se revierte espontáneamente en este tipo de membranas, las cuales no permiten técnicas de *backflushing*.

Es importante destacar que este comportamiento fue directamente evidenciado en al menos un caso, lo que limita la generalización de la hipótesis. Sin embargo, los resultados pueden explicarse a partir de dos mecanismos posibles: (i) la reorganización temporal de la capa depositada sobre la membrana, que bajo condiciones variables de flujo o concentración de partículas puede inducir cambios transitorios en la permeabilidad (Zydney & Ho, 2003), o (ii) el taponamiento localizado de la entrada de la membrana. Este último fenómeno parece haber tenido un papel determinante en el caso de las pruebas con poro de 200 nm, donde se evidenció un bloqueo directo, y no puede descartarse que situaciones similares hayan ocurrido también en otras condiciones experimentales. Por lo tanto, aunque la hipótesis inicial de reorganización explica parte del comportamiento observado, el taponamiento localizado debe considerarse como un factor adicional en el análisis de los resultados.

En la membrana de 200 nm, la permeabilidad inicial es menor, comenzando en 15,46 L/m<sup>2</sup>·h, y también sufre un descenso progresivo, aunque de forma más moderada que en la membrana de 30 nm. Durante la prueba, los valores se estabilizan entre 9,40 y 9,70 L/m<sup>2</sup>·h sin mostrar una recuperación, teniendo una pérdida de permeabilidad total del 64,68%. Aunque la diafiltración elimina una parte importante de solutos de bajo peso molecular (sales, péptidos cortos, hemoglobina libre), no elimina completamente todos los sólidos presentes en la sangre hidrolizada.

De hecho, las macromoléculas parcialmente hidrolizadas, lípidos residuales, agregados proteicos y restos celulares aún pueden permanecer en la solución (Benavides & Rito-Palomares, 2008).

Al comparar la sangre hidrolizada sin diafiltrar con la diafiltrada, se observó que esta última presentó una mejor permeabilidad promedio tanto en membranas de 30 nm (11,46 vs 7,77 L/m<sup>2</sup>·h) como de 200 nm (9,69 vs 5,23 L/m<sup>2</sup>·h), lo que representa incrementos del 47% y 85% respectivamente. En ambas membranas, la diafiltración previa permitió una menor caída inicial del flujo y mejor recuperación en horas posteriores.

En particular, la membrana de 30 nm mostró un comportamiento más favorable, con recuperaciones parciales de hasta 50% tras caídas iniciales, atribuibles no a autolimpieza, sino a desplazamiento de cúmulos.

Por otro lado, la membrana de 200 nm presentó descensos más abruptos y sin recuperación, lo que limita su uso en procesos de clarificación. En conjunto, los datos indican que la membrana de 30 nm es la más adecuada para clarificar sangre hidrolizada, especialmente, si ha sido diafiltrada, ya que ofrece mayor eficiencia de filtración, mejor estabilidad operativa y control de la colmatación, lo cual es fundamental para asegurar la calidad del producto final.

En la Tabla 5 se presentan los datos del retenido y clarificados de la clarificación de sangre bovina hidrolizada para la membrana de 30 nm. Para este punto se decidió continuar con las caracterizaciones solo con las membranas de 30 nm debido a que durante la ultrafiltración tuvo mejor desempeño y mayor producción de clarificados. La caracterización del hidrolizado de sangre bovina diafiltrada evidencia una separación entre las fracciones de retenido y clarificado tras la etapa de clarificación.

**Tabla 5.**

*Caracterización de retenidos y clarificados de hidrolizados de sangre bovina diafiltrada.*

<b>Parámetros</b>	<b>Unidades</b>	<b>Retenido Hidrolizado (diafiltrado)</b>	<b>Clarificado Hidrolizado (diafiltrado)</b>
<b>pH</b>		7,88	8,13
<b>Conductividad</b>	μS/cm	16020	16000
<b>Turbidez</b>	NTU	4700	8
<b>Materia seca</b>	%	17,84	9,73
<b>Hierro</b>	mg/100 g	41,75	0,28
<b>Sodio</b>	mg Na/100 g	344,88	368,89
<b>Proteína cruda</b>	g/100 g	15,47	6,91

El retenido mostró un contenido mayor de materia seca 17,84 % proteína cruda 15,47 g/100 g y hierro total 41,75 mg/100 g, lo cual indica una acumulación predominante de macromoléculas, péptidos de alto peso molecular y compuestos metálicos asociados a estructuras insolubles, producto de la hidrólisis. En contraste, el clarificado presentó menores valores en proteína 6,91 g/100 g, materia seca 9,73 % y una concentración mínima de hierro total 0,28 mg/100 g, lo que sugiere una retención casi completa del hierro en la fracción concentrada.

Esta diferencia en hierro puede explicarse por la naturaleza química del hierro hemo, el cual, tras la desnaturalización y ruptura proteica durante la hidrólisis térmica, forma agregados coloidales o se mantiene unido a fragmentos insolubles de hemoglobina. Estos complejos son fácilmente retenidos por membranas con porosidad nanométrica, mientras que el paso al permeado se limita a formas libres o queladas con péptidos pequeños, cuya presencia es mínima luego de la diafiltración (Picard et al., 2014; Hurrell, 1997; Tenhunen et al., 1968).

La turbidez en el retenido 4700 NTU confirma la acumulación de partículas suspendidas, mientras que su valor mínimo en el clarificado 8 NTU respalda la eficiencia de separación. La conductividad similar en ambas fracciones 16000 μS/cm indica que los iones solubles no fueron

retenidos, lo cual concuerda con lo reportado por Cheryan (1998), quien señala que los solutos de bajo peso molecular atraviesan libremente las membranas en ausencia de ligandos.

Por otro lado, la Tabla 6 presenta los datos de retenidos y clarificados de la clarificación de hidrolizados de sangre bovina sin diafiltrar.

**Tabla 6.**

*Caracterización de Retenido y Clarificados hidrolizados de sangre bovina sin diafiltrar.*

<b>Parámetros</b>	<b>Unidades</b>	<b>Retenido Hidrolizado (sin diafiltrar)</b>	<b>Clarificado Hidrolizado (sin diafiltrar)</b>
<b>pH</b>		8,11	7,67
<b>Conductividad</b>	μS/cm	9300	13930
<b>Turbidez</b>	NTU	3710	2,17
<b>Materia seca</b>	%	14,54	9,10
<b>Hierro</b>	mg/100 g	50,28	0,43
<b>Sodio</b>	mg Na/100 g	412,44	368,33
<b>Proteína cruda</b>	g/100 g	14,15	7,06

En términos de turbidez, se observa una diferencia entre ambos clarificados: 2,17 NTU sin diafiltrar frente a 8 NTU con diafiltración. A pesar de que ambos valores indican una buena remoción de sólidos suspendidos, el clarificado obtenido sin diafiltrar muestra una mayor transparencia. Esto puede explicarse porque, en la sangre sin diafiltrar, durante la hidrólisis permanecen en el medio proteínas de alto peso molecular que tienden a formar agregados o complejos insolubles; estos son posteriormente separados en la etapa de clarificación, lo que reduce la turbidez. En contraste, cuando se aplica diafiltración previa, parte de esas fracciones macromoleculares se eliminan antes de la hidrólisis, dando lugar a un hidrolizado con mayor proporción de péptidos y partículas coloidales finas, las cuales atraviesan parcialmente los procesos de clarificación y generan un ligero aumento de la turbidez final (Ghosh & Pal, 2000).

La materia seca en el permeado obtenido de la clarificación del hidrolizado diafiltrado fue ligeramente mayor (9,73%) en comparación con el permeado obtenido de la clarificación del

hidrolizado sin diafiltración (9,10%). Este resultado sugiere que la diafiltración, al eliminar previamente compuestos que podrían interferir con el proceso, facilita una hidrólisis más eficiente. Esta mayor eficiencia podría estar asociada a una matriz más limpia y libre de inhibidores o material particulado, lo cual no solo favorece la generación de solutos de bajo peso molecular, sino que también reduce el ensuciamiento de la membrana en la etapa de clarificación. Al disminuirse la formación de la capa de ensuciamiento superficial, mejora la permeabilidad del sistema y, con ello, se altera de forma indirecta la capacidad de retención de ciertos compuestos. Esto coincide con lo planteado por Almécija, Guadix, Calvo y Guadix (2017), quienes demostraron que la diafiltración, al mantener las membranas libres de fouling mediante la eliminación de compuestos interferentes y limpieza adecuada, permite conservar la permeabilidad y la eficiencia del sistema de separación, lo que respalda la idea de que un pretratamiento de este tipo favorece procesos posteriores como la hidrólisis y la clarificación. En cuanto al contenido de proteína en el clarificado, se observó que este se mantuvo relativamente constante entre ambos casos (6,91 g/100 g con diafiltración y 7,06 g/100 g sin diafiltrar), lo que indica que los péptidos generados por la hidrólisis, al tener bajo peso molecular, no son retenidos durante la clarificación. En ambos tratamientos, estos compuestos migran fácilmente a la fracción clarificada, como también ha sido reportado en estudios previos (Santos et al., 2020).

Para el hierro total en el clarificado sin diafiltrar se encontró un valor de 0,43 mg/100 g, mientras que en el clarificado con diafiltración fue de solo 0,28 mg/100 g. Esta diferencia sugiere que la diafiltración previa eliminó una porción de hemoproteínas o estructuras celulares que, tras la hidrólisis, liberarían hierro. Así, al hidrolizar una matriz depurada, la cantidad de hierro disponible para solubilizarse en el clarificado disminuye. (Pérez-Baena et al., 2019).

En conjunto, los resultados obtenidos permiten establecer que la diafiltración previa a la hidrólisis y posterior clarificación incide principalmente en el comportamiento del proceso de filtración, entendido en términos de la permeabilidad y la facilidad de manejo del retenido, más que en modificaciones directas de las características fisicoquímicas de los productos finales. En este sentido, la diafiltración influye en la forma como la membrana responde al ensuciamiento y en la eficiencia de separación a lo largo de las distintas etapas, lo cual repercute en la estabilidad del flujo y en la continuidad operativa del sistema. Cabe señalar que, si bien este comportamiento puede reflejarse de manera indirecta en indicadores tales como la turbidez o el contenido de hierro del clarificado, dichos efectos derivan de la dinámica propia de la filtración y no de transformaciones intrínsecas en la composición del producto. De esta manera, la diafiltración constituye una estrategia que contribuye al control y estabilidad del proceso, aun cuando pueda asociarse con ligeras variaciones en la retención de determinados compuestos funcionales.

## 5. Conclusiones

La diafiltración de sangre bovina con el uso de membranas de 200 nm y 30 nm permitió obtener retenidos con menor carga de solutos iónicos, como el sodio, sin comprometer la retención de proteínas ni hierro hemo, componentes fundamentales para la posterior producción de hidrolizados clarificados. La reducción del 25% de sodio en el retenido, en concordancia con la disminución de la conductividad y el factor de dilución aplicado, evidencia un lavado progresivo de compuestos solubles. A su vez, las fracciones macromoleculares permanecieron retenidas, demostrando que la selectividad de las membranas fue adecuada para preservar la funcionalidad del sustrato. Sin embargo, las condiciones hidrodinámicas del sistema, caracterizada por un régimen laminar ( $Re < 5$ ), favorecieron fenómenos de ensuciamiento y la consecuente pérdida de permeabilidad (9,85%, 21,7% para las membranas de 200 y 30 nm, respectivamente).

La hidrólisis de sangre bovina, realizada con y sin un pretratamiento de diafiltración, evidenció diferencias importantes en la composición final de los hidrolizados. En el caso de la sangre diafiltrada, se obtuvo un producto con menor carga iónica y reducciones de hasta un 21% en sodio y 13,5% en conductividad, en concordancia con el factor de dilución aplicado, lo que refleja un lavado efectivo de sales y compuestos solubles. De forma paralela, la disminución de la turbidez  $\approx 19\%$  y de la materia seca  $\approx 15,8\%$  indicó una reducción de partículas suspendidas (restos celulares, agregados proteicos) y de sólidos totales, favoreciendo la claridad del hidrolizado.

No obstante, fracciones asociadas a proteínas, como el hierro total y el hierro hemo, presentaron reducciones menores  $\approx 11\%$  y  $\approx 18\%$ , respectivamente, lo que confirma que la selectividad de la membrana permitió preservar componentes macromoleculares esenciales. En contraste, la sangre sin diafiltrar mantuvo concentraciones más altas de sales, sólidos y proteínas. En conjunto, estos resultados muestran que la diafiltración previa ajustó la composición de la muestra, obteniéndose hidrolizados más claros y con menor carga iónica, sin comprometer la presencia de proteínas ni hierro hemo, fundamentales para aplicaciones posteriores.

Finalmente, la comparación entre los hidrolizados clarificados mostró ventajas claras del pretratamiento con diafiltración. Las membranas trabajadas con sangre diafiltrada alcanzaron mayores valores de permeabilidad (30 nm: 11,46 vs 7,77 L/m<sup>2</sup>·h; 200 nm: 9,69 vs 5,23 L/m<sup>2</sup>·h), con incrementos del 47% y 85%, respectivamente. Este mejor desempeño se reflejó en menor caída inicial de flujo y mayor estabilidad operativa.

**Referencias bibliográficas**

- Acosta, C. J. S., & Rios, M. S. N. (2013). Aplicación de las técnicas con membranas de microfiltración y ultrafiltración para la clarificación y fraccionamiento de sangre de bovino cruda e hidrolizada. universidad industrial de santander.
- Almécija, M. C., Guadix, A. M., Calvo, J. I., & Guadix, E. M. (2017). Changes in structure and performance during diafiltration of binary protein solutions due to repeated cycles of fouling/alkaline cleaning. *Food and Bioproducts Processing*, 105, 117–128. doi:10.1016/j.fbp.2017.07.003
- Alonso-Geli, Yamirka, Alonso-Moreno, Yamisleydi, Falcón-Diéguéz, José E, Lucambio-Miró, Liset, & Castro-Piñol, Mariana. (2015). Caracterización de la fragilidad osmótica de eritrocitos humanos en la anemia drepanocítica. *Revista Cubana de Química*, 27(2), 110-118. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S222454212015000200001&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S222454212015000200001&lng=es&tlng=es).
- Bah, C. S., Carne, A., McConnell, M. A., Mros, S., & Bekhit, A. E. A. (2016). Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. *Food Chemistry*, 202, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.020>
- Barragán, P. J. (2013). Estudio del plasma sanguíneo bovino para fermentación sumergida y sistemas alimentarios, Manizales: Universidad de Caldas.
- Benavente, J., Ariza, M. & Cañas, A. (2000). Evaluación de la colmatación de una membrana mediante medidas eléctricas y de la composición química de su superficie. *Bol. Soc. Esp. Cerám. Vidrio*.

- Bhaskar, N., Modi, V., Govindaraju, K., Radha, C., & Lalitha, R. (2006). Utilization of meat industry by products: Protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource Technology*, 98(2), 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.017>
- Boccio, Jose, Salgueiro, Jimena, Lysionek, Alexis, Zubillaga, Marcela, Goldman, Cinthia, Weill, Ricardo, & Caro, Ricardo. (2003). Metabolismo del hierro: conceptos actuales sobre un micronutriente esencial. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53(2), 119-132. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S000406222003000200002&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222003000200002&lng=es&tlng=es).
- Brunet, A., Thibault, R., & Durand, D. (2010). Iron and proteins: the essential relationship. *Biological Trace Element Research*, 134(1), 1–13.
- Castillo, H. L. A., & Ortiz, A. R. J. (2023). Evaluación de las etapas de evaporación de película descendente en vacío y secado por aspersión de hidrolizados clarificados de sangre de bovino para la obtención de pulverizados enriquecidos en hierro [Universidad Industrial de Santander]. <https://noesis.uis.edu.co/items/ed52f4d4-7f8b-42a8-86d0-7249c4ea36a4>
- Cheryan, M. (1998). *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. CRC Press.
- Colton, C. K. (1987). Analysis of Membrane Processes for Blood Purification. *Blood Purification*, 5(4), 202-251. <https://doi.org/10.1159/000169472>
- CONtextoganadero (2019, octubre 28). Aprovechamiento de la sangre como subproducto. <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/aprovechamiento-de-la-sangre-como-subproducto>
- CONtextoganadero (2023, Marzo 16). Cómo darle un mayor aprovechamiento a la sangre bovina. <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/como-darle-un-mayor-aprovechamiento-la-sangre-bovina>

- de las Heras, J. (2022, febrero 5). Hierro hemo y no hemo en la dieta: qué son, en qué se diferencian y por qué son importantes. *theobjective*. <https://theobjective.com/lifestyle/2022-05-02/hierro-dieta-hemo-vegetal-animal/>
- Duarte, R. T., Carvalho Simões, M. C., & Sgarbieri, V. C. (1999). Bovine blood components: fractionation, composition, and nutritive value. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 231–236. <https://doi.org/10.1021/jf9806255>
- Evaluación de Fragilidad Osmótica de los Hematíes por Citometría de Flujo - Cibic Laboratorios. (2018, 3 octubre). Cibic Laboratorios.
- Field, R., Wu, D., Howell, J., & Gupta, B. (1995). Critical flux concept for microfiltration fouling. *Journal of Membrane Science*, 100(3), 259–272. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(94\)00265-z](https://doi.org/10.1016/0376-7388(94)00265-z)
- Figueroa, O. A., Zapata, J. É., & Gutiérrez, G. A. (2012, julio). modelamiento de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas del plasma bovino. *Revista EIA*, ISSN 1794-1237 Número 17, 71–84.
- Gésan-Guiziu, G. (2010). Membrane technologies in milk processing. In *Processing and Impact on Active Components in Food* (pp. 463–471).
- Ghosh, R., & Pal, A. (2000). Protein purification by ultrafiltration with diafiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, 69(4), 399–406.
- Gómez, L. J., Figueroa, O. A., & Zapata, J. E. (2013). Actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de plasma bovino obtenidos por efecto de alcalasa® 2.4 L. *Información Tecnológica*, 24(1), 33–42. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000100005>
- Guerrero, G. A. (2010). Diseño de ingeniería básica de una planta para la elaboración de sangre deshidratada para alimentos balanceados. Escuela Politécnica Nacional. Facultad de

Ingeniería Química y Agroindustria. Recuperado de:  
<http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/1665>

Harel, S., & Kanner, J. (1985). Oxidative modification of muscle oxymyoglobin and metmyoglobin by hydrogen peroxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(6), 1186–1192.

Hurrell, R. F. (1997). Bioavailability of iron. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51(S1), S4–S8.

Kokkora, M., Petrotos, K., Gkoutos, P. & Mpoulmpos, C. (2012). Application of membrane technology to slaughterhouse blood to produce edible powdered protein mixture. *Journal of Membrane and Separation Technology* 1, 35- 42.

Lin JCT, Lee DJ, Huang C. Membrane fouling mitigation: membrane cleaning. *Separation Science and Technology*. 2010;45(7):858-872. doi:10.1080/01496391003666940

Mardal, F., Parjikoalaei, B. R., & Corredig, M. (2024). Effect of diafiltration media and filtration modes on fouling and performance in skim milk microfiltration: A comparative study. *Journal of Dairy Science*, 107, 10414–10425. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25107>

Monroy, R. R. A. (2013). Valorización de residuos de sangre de bovino mediante hidrólisis enzimática integrando procesos con membranas [universidad industrial de santander]. <https://noesis.uis.edu.co/server/api/core/bitstreams/7cb3ab83-37ef-4864-918f-de7369e3b41d/content>

Morales, J. A., Figueroa, O. A., & Zapata, J. E. (2017). Optimización de hidrólisis enzimática de la fracción globular de sangre bovina por metodología de superficie respuesta y evaluación de sus propiedades antioxidantes. *Información Tecnológica*, 28(2), 75–86. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000200009>

- Mulder, M. (1996). *Basic Principles of Membrane Technology* (2nd ed.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Nasri, M. (2016). Protein hydrolysates and biopeptides. *Advances in Food and Nutrition Research*, 109–159. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.003>
- Ortiz Jerez, M. J., Vélez Pasos, C. A., & Franco Mejía, E. (2008). Modelos matemáticos de la colmatación de membranas en microfiltración tangencial. *Ingeniería e Investigación*, 28(1), 123–132. Universidad Nacional de Colombia.
- Pabby, A. K., Rizvi, S. S. H., & Requena, A. M. (2015). *Handbook of Membrane Separations: Chemical, Pharmaceutical, Food, and Biotechnological Applications* (2nd ed.). CRC Press.
- Pérez-Baena, I., Rubio, M., & Pérez, L. (2019). Application of blood-derived protein hydrolysates: A review. *Food Science and Nutrition*, 7(8), 2681–2691.
- Picard, B., Gagaoua, M., & Gagaoua, M. (2014). Bovine serum proteins and individual variability: Physiological factors and their influence on protein concentration. *Animal*, 8(9), 1420–1428 DOI: 10.1021/jf501528s
- Reinoso, Z. S., Thibodeau, J., Said, L. B., Fliss, I., Bazinet, L., & Mikhaylin, S. (2022). Bioactive Peptide Production from Slaughterhouse Blood Proteins: Impact of Pulsed Electric Fields and Ph on Enzyme Inactivation, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Peptic Hydrolysates from Bovine and Porcine Hemoglobins. *Proceedings of 2022 AOCS Annual Meeting & Expo*. <https://doi.org/10.21748/fsht2150>
- Rincón García, D. J. (2019). Evaluación del proceso de diafiltración para la concentración de la proteína en el suero dulce de quesería. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Medellín.

- Santos, M. B., Orellana, J. D., & Romero, C. D. (2020). Hemoglobin-derived peptides: Characteristics and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 102, 90–102.
- She, Q., Tang, C. Y., Wang, Y.-N., & Zhang, Z. (2009). The role of hydrodynamic conditions and solution chemistry on protein fouling during ultrafiltration. *Desalination*, 249(3), 1079–1087.
- Sila, A., & Bougatef, A. (2016). Bioactive peptides from seafood by-products: a review. *Journal of Functional Foods*, 21, 309-322.
- Simonetti, G. A. (2016). Efectos de los procesos de ultrafiltración y de hidrólisis enzimática sobre las propiedades funcionales del plasma bovino deshidratado. <https://core.ac.uk/download/pdf/144232934.pdf>
- Snir, R., Wicker, L., Koehler, P. E., & Sims, K. A. (1996). Membrane fouling and molecular weight cutoff effects on the partitioning of pectinesterase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2091–2095.
- Soto-Sierra, P. P., Akaberi, S., & Geci, B. (2022). Feasibility of membrane ultrafiltration as a single-step clarification and fractionation of microalgal protein hydrolysates. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*.
- Tenhunen, R., Marver, H. S., & Schmid, R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61(2), 748–755. <https://doi.org/10.1073/pnas.61.2.748>
- Tierra (2022). Revalorización de residuos en la industria cárnica. <https://www.plataformatierra.es/innovacion/reutilizacion-de-residuos-en-la-industria-carnica>

Toldrá, F., Aristoy, M. C., Mora, L., & Reig, M. (2018). Innovations in the valorization of meat by-products. *Meat Science*, 144, 3-10.

Van der Bruggen, B., Vandecasteele, C., Van Gestel, T., Doyen, W., & Leysen, R. (2003). A review of pressure-driven membrane processes in wastewater treatment and drinking water production. *Environmental Progress*, 22(1), 46–56. <https://doi.org/10.1002/ep.670220116>

Villegas, S. I. P., & Amado, L. R. C. (2021). aprovechamiento del hierro proveniente de hemoglobina bovina en polvo en la fortificación de galletas de chocolate y néctar de mora [Universidad de la Salle] <https://ciencia.lasalle.edu.co/server/api/core/bitstreams/636fb200-48c1-49f4-b9dc-98ba9bf75d7e/content>