

Evaluación de la hidrólisis de sangre bovina empleando Gelzyme L 500 para la obtención de
hierro hemo

Cristian Jhoany Parra Jaimes y Harold Johan Prada Morales

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico

Directora

Viviana Sánchez Torres

Ing. Química, Ph. D.

Codirectora

María Angélica Angarita Rangel

Ing. Química, Mg.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Ingeniería Química

Bucaramanga

2024

Dedicatoria

A Dios, por ser la fuente de mi sabiduría y esperanza, por darme la fortaleza necesaria para culminar esta meta.

A mi nona, por su amor incondicional, su apoyo constante y dedicación hacia mí. Gracias por todos sus abrazos cuando se derrumbaba mi mundo, sin ellos no hubiese sido igual.

A mi familia, por ser mi roca y mi inspiración, cada uno de sus consejos han sido claves en mi toma de decisiones. Cada éxito y meta cumplida se lo debo a ustedes, por formar personas comprometidas y responsables con un solo fin.

A mi compañero de trabajo, Cristian, por su colaboración, esfuerzo y disposición en la realización de este proyecto. Por todas las veces que me animó, en los momentos que quería desistir.

A mis amigos, los compañeros de vida que tengo, por su aliento en los momentos de estrés, por cada alegría celebrada, por cada abrazo de apoyo que compartimos. Gracias por hacer parte de mi vida y hacerme parte de la suya.

A la codirectora de este proyecto, María Angélica, por su amabilidad, paciencia, orientación y apoyo para culminar este proceso académico.

A la profesora Viviana, directora de este proyecto, por regalarme la oportunidad de ser parte de este trabajo de grado, con el cual finalizo mi etapa universitaria.

Harold Johan Prada Morales

A Dios, por ser la luz que guía mis pasos, por infundir en mí la sabiduría y la esperanza necesarias para alcanzar este logro.

A la vida, por las oportunidades y desafíos que me han permitido crecer y aprender. Agradezco cada experiencia que ha moldeado mi carácter y mis habilidades.

A mi familia, el pilar fundamental de mi existencia. Gracias por su amor incondicional, su apoyo constante y por ser mi fuente de inspiración. Sus enseñanzas y valores han sido cruciales en mi formación.

A mi mamá, por su amor infinito, su sacrificio y por ser mi ejemplo de fortaleza y dedicación. Sin su paciencia y su guía, este logro no habría sido posible.

A mis hermanos, por su compañerismo y apoyo inquebrantable. Sus palabras de ánimo y su fe en mí me han dado la fuerza para seguir adelante.

A mi novia, por su amor y comprensión, y por estar siempre a mi lado, celebrando mis victorias y brindándome consuelo en los momentos difíciles. Su apoyo ha sido fundamental en este camino.

A mi codirectora de tesis, Angélica Angarita, por su invaluable guía, su paciencia y su dedicación. Gracias por ser una mentora excepcional y por su apoyo constante en el laboratorio. Su orientación ha sido clave para la culminación de este proyecto.

A la Universidad Industrial de Santander, por proporcionarme una formación integral y por ser el espacio donde he podido crecer tanto académica como personalmente. Agradezco a los profesores y compañeros que han sido parte de esta enriquecedora experiencia.

Cristian Jhoany Parra Jaimes

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	10
1. Objetivos	12
1.1 Objetivo general	12
1.2 Objetivos específicos	12
2. Marco teórico y estado del arte	13
3. Metodología	17
3.1. Etapa 1. Elección del pH y la temperatura de hidrólisis.	17
3.2. Etapa 2. Determinación de la relación enzima:sustrato y el tiempo de hidrólisis.	20
4. Resultados y análisis	21
4.1. Hidrólisis enzimática utilizando Gelzyme L 500.....	21
4.1.1 Cálculo de la masa de proteína en 500 mL de sangre.....	21
4.1.2 Grado de hidrólisis.....	22
4.1.3 Análisis estadístico ANOVA.	24
4.2. Cuantificación de hierro hemo en las muestras con diferente relación enzima:sustrato.....	28
4.2.1 Grado de hidrólisis.....	28
4.2.2 Determinación de hierro hemo.....	29
4.2.3 Análisis estadístico ANOVA.	30
6. Conclusiones	33
7. Recomendaciones	34
Referencias bibliográficas.....	35

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 Diseño factorial de tratamientos considerando los distintos niveles de pH y temperatura	19
Tabla 2 Diseño factorial de tratamientos considerando los distintos niveles de relación enzima:sustrato y tiempo	20
Tabla 3 Resultados del análisis bromatológico de la sangre bovina realizado por el CICTA.....	22
Tabla 4 Análisis de varianza ($p < 0.05$) para la interacción temperatura y pH.....	25
Tabla 5 Análisis de varianza ($p < 0.05$) para la interacción entre la relación enzima:sustrato y tiempo	31

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 Diagrama de flujo por bloques del trabajo de grado	17
Figura 2 Diagrama del montaje de hidrólisis sangre bovina.....	18
Figura 3 Resultados del grado de hidrólisis en función de temperatura (45, 55 y 60 °C) y pH (8, 9 y 10) en 500 mL de sangre bovina utilizando una concentración 0.7 % p/p de enzima Gelzyme L 500.....	23
Figura 4 Gráfico ANOVA para temperatura	26
Figura 5 Gráfico ANOVA para pH.....	27
Figura 6 Resultados del grado de hidrólisis en función de relación enzima:sustrato (0.75, 1.25 y 1.75 %p/p) y tiempo (30, 60 y 90 minutos) en 500 mL de sangre bovina utilizando pH 10 a 55 °C	28
Figura 7 Concentración de hierro hemo con diferentes cantidades enzima:sustrato (0.75, 1.25 y 1.75 %p/p) en distintos tiempos de hidrólisis (30, 60 y 90 minutos) con pH 10 a 55 °C.....	30
Figura 8 Gráfico ANOVA para relación enzima:sustrato (E/S)	32
Figura 9 Gráfico ANOVA de tiempo vs contenido de hierro hemo con influencia de relación enzima:sustrato (E/S)	33

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Ficha técnica Gelzyme L 500.	40
Apéndice B. Curva de calibración para la medición de hierro hemo.....	40
Apéndice C. Protocolo cuantificación de contenido de hierro hemo.....	43
Apéndice D. Resultados de los distintos tratamientos con relación a pH y temperatura con Gelzyme L 500 para la hidrólisis de sangre bovina.	48
Apéndice E. Resultados de los diferentes tratamientos relación E/S con Gelzyme L 500 y tiempo para contenido de hierro hemo en sangre bovina.....	54

Resumen

Título: Evaluación de la hidrólisis de sangre bovina empleando Gelzyme L 500 para la obtención de hierro hemo*

Autor: Cristian Jhoany Parra Jaimes y Harold Johan Prada Morales.**

Palabras Clave: Grado de hidrólisis, concentración hierro hemo, hidrólisis enzimática, sangre bovina.

Descripción: Entre las insuficiencias nutricionales en los niños, la deficiencia de hierro es una de las más comunes. La hidrólisis enzimática es una alternativa para obtener hierro hemo contenido en la sangre bovina, subproducto cárnico que es producido en grandes cantidades dentro del país. Por tal razón, este trabajo de grado evaluó la hidrólisis de sangre bovina empleando la proteasa alcalina líquida Gelzyme L 500 para la obtención de hierro hemo. En primer lugar, se seleccionaron las condiciones de pH y temperatura necesarios para obtener el mayor grado de hidrólisis, para esto, se trabajó un volumen de reacción de 500 mL considerando distintos niveles de pH (8, 9 y 10) y de temperatura (45, 55 y 60 °C) y una concentración de enzima:substrato al 0.7 %p/p en un tiempo de reacción de 120 minutos. Como resultado se obtuvo, un grado de hidrólisis de 10.03% a 55 °C con pH 10. Luego, se determinó la influencia de la relación enzima:substrato empleando tres niveles distintos (0.75, 1.25 y 1.75 %p/p) y tiempo de hidrólisis (30, 60 y 90 minutos) en el grado de hidrólisis y contenido de hierro hemo en los hidrolizados con las condiciones seleccionadas de pH y temperatura. Finalmente se encontró que, el mayor grado de hidrólisis fue de 16.55% utilizando concentración enzima:substrato al 1.75 %p/p a los 90 minutos. Por otro lado, la mayor concentración de hierro hemo fue de 5191.8 mg/L con una concentración enzima:substrato al 1.25 %p/p a los 60 minutos.

*Trabajo de grado.

**Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Director: Viviana Sánchez Torres, Ingeniera Química, Ph.D. Codirectora: María Angélica Angarita Rangel, Ingeniera Química, Mg.

Abstract

Title: Assessment of bovine blood hydrolysis using Gelzyme L 500 for heme iron extraction*

Author(s): Cristian Jhoany Parra Jaimes y Harold Johan Prada Morales**

Key Words: Degree of hydrolysis, heme iron concentration, enzymatic hydrolysis, bovine blood.

Description: Among the nutritional deficiencies in children, iron deficiency is one of the most common. Enzymatic hydrolysis is an alternative for obtaining heme iron contained in bovine blood, a byproduct of the meat industry produced in large quantities in the country. For this reason, this thesis evaluated the hydrolysis of bovine blood using the liquid alkaline protease Gelzyme L 500 to obtain heme iron. Firstly, the necessary pH and temperature conditions were selected to achieve the highest degree of hydrolysis. For this purpose, a reaction volume of 500 mL was used, considering different pH levels (8, 9, and 10) and temperatures (45, 55, and 60 °C), and an enzyme-to-substrate ratio of 0.7% w/w over a reaction time of 120 minutes. As a result, a hydrolysis degree of 10.03% was obtained at 55 °C with a pH of 10. Subsequently, the influence of the enzyme-to-substrate ratio was determined using three different levels (0.75, 1.25, and 1.75% w/w) and the hydrolysis time (30, 60, and 90 minutes) on the heme iron content in the hydrolysates under the selected pH and temperature conditions. Finally, it was found that the highest degree of hydrolysis was 16.55% using an enzyme-to-substrate concentration of 1.75% w/w at 90 minutes. On the other hand, the highest concentration of heme iron was 5191.811 mg/L with an enzyme-to-substrate concentration of 1.25% w/w at 60 minutes.

*Degree Work

**Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Food Science and Technology Research Group. Director: Viviana Sánchez Torres, Chemical Engineer, Ph.D. Co-director: María Angélica Angarita Rangel, Chemical Engineer, Mg.

Introducción

Las insuficiencias nutricionales en la población infantil representan un desafío significativo para la salud pública, tanto a escala mundial como nacional (Quevedo Bolívar, 2019). Entre estas, la deficiencia de hierro es particularmente notable por su gran prevalencia, contribuyendo al 50% de los casos de anemia (Abril et al., 2017). Este fenómeno afecta principalmente a grupos demográficos que experimentan una ingesta y/o absorción inadecuada de hierro a partir de los alimentos. Tal situación se atribuye, en gran medida, a la presencia predominante de formas poco solubles del mineral y a una baja biodisponibilidad en los alimentos consumidos (Durán et al., 2017), lo que limita su aprovechamiento por parte del organismo.

La extracción y utilización del hierro hemo es aprovechado en la industria alimentaria, así como en el ámbito de la suplementación nutricional y farmacéutica, ya que es un componente con alta biodisponibilidad biológica (Muñoz et al., 2019). El hierro hemo, se puede obtener de manera controlada mediante un proceso enzimático a partir de la sangre bovina, un subproducto de la industria cárnica que se produce en cantidades notables en el país. Según la Encuesta de Sacrificio de Ganado (ESAG), en el primer trimestre del año 2023 se registró un crecimiento del 1,7% en el sacrificio de ganado vacuno (DANE, 2023), generando un aumento en la disponibilidad de sangre bovina como fuente potencial de hierro hemo. Los eritrocitos contienen la hemoglobina en la cual está presente el hierro hemo (Monroy et al., 2013), cuya hidrólisis da lugar a hidrolizados de alto valor añadido por su fuente dietética de hierro, el cual es absorbido con mucha mayor facilidad por el intestino (Soto Méndez & Caballero Pérez, 2011) (Benítez et al., 2008) (Pérez Gálvez, 2006).

Durante esta investigación se empleó la proteasa Gelzyme L 500, una enzima que se usó para fragmentar las proteínas presentes en la sangre bovina en cadenas de aminoácidos más reducidas, conocidas como proteínas hidrolizadas, lo que resulta en la liberación del hierro hemo y, por consiguiente, facilita su extracción (Muñoz et al., 2019). Sin embargo, la actividad de la enzima está condicionada por múltiples factores como la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de hidrólisis y las condiciones fisicoquímicas como el pH y la temperatura (Figuroa et al., 2023).

El propósito de esta investigación consistió en analizar las mejores condiciones de hidrólisis enzimática para la obtención de hierro hemo mediante una evaluación de los efectos del pH y temperatura sobre el grado de hidrólisis y la concentración enzima:sustrato y tiempo sobre el grado de hidrólisis y contenido de hierro hemo en los hidrolizados de sangre bovina.

Este trabajo de grado apoya al proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (MINCIENCIAS): “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 hemo en la dieta de las familias con niños menores de 5 años del departamento de Boyacá”, el cual está siendo desarrollado por el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) para el fortalecimiento de capacidades regionales de investigación en salud.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar la hidrólisis de sangre bovina empleando Gelzyme L 500 para la obtención de hierro hemo.

1.2 Objetivos específicos

Seleccionar las condiciones de pH y temperatura necesarios para obtener el mayor grado de hidrólisis de Gelzyme L 500 con sangre bovina como sustrato.

Determinar la influencia de la relación enzima:sustrato y el tiempo en el grado de hidrólisis y contenido de hierro hemo en los hidrolizados.

2. Marco teórico y estado del arte

La sangre bovina se destaca como fuente nutricional debido su alto contenido proteico y propiedades funcionales en la industria de alimentos (Morales et al., 2017), está compuesta en promedio por 80.9% de agua, 17.3% de proteínas, 0.62% de minerales, 0.23% de grasas y 0.07% de carbohidratos (Montanero Zambrano et al., 2022). Ésta puede dividirse en dos fases, la fase sólida donde se encuentra el paquete celular: glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas (Acosta Camacho & Rios Morales, 2013), y la fase líquida denominada plasma que contiene entre 15 y 20% de proteína, con varios nutrientes esenciales como aminoácidos, minerales, vitaminas y ácidos grasos (Isaza Rengifo et al., 2010). Por tal razón, la sangre bovina junto a su contenido de hierro hemo, se le otorgan varios usos importantes: consumo humano (alimenticio y farmacéutico), animal e industrial (Rodríguez Furlán et al., 2010).

En primer lugar, estructuralmente el grupo hemo está compuesto por un átomo de hierro y un anillo heterocíclico llamado porfirina. La porfirina es un tetrapirrol cíclico, donde cuatro anillos de pirrol están unidos por enlaces metileno ($=CH-$), con el átomo de hierro en el centro de esta estructura (Villavicencio-Queijeiro, 2012). El hierro es un elemento fundamental en sistemas biológicos que desempeña un rol importante en una variedad de procesos biológicos. Se utiliza en el transporte de oxígeno, almacenamiento de oxígeno a corto plazo, la producción de energía, entre otros procesos (Winter et al., 2014). El hierro se presenta en dos formas: hemo (orgánico), se encuentra principalmente en las carnes (mioglobina) y la sangre (hemoglobina) y el hierro no hemo, proviene de fuentes vegetales y algunos alimentos de origen animal (Sermini et al., 2017).

El hierro hemo, obtenido por fuentes alimenticias de origen animal, se caracteriza por su mayor capacidad de absorción por el organismo humano (Tostado et al., 2015), lo que facilita su incorporación en una gran variedad de alimentos.

El uso de las proteínas de la sangre bovina junto a su contenido de hierro hemo ha sido propuesto para su incorporación en diversos productos alimenticios, como carnes tradicionales (morcillas y salchichas), y productos horneados (galletas, panes, pasteles y pastas) (Janiszewska, 2014). Sin embargo, la sangre bovina no está siendo aprovechada debido a la falta de alternativas de uso como subproducto cárnico, por lo anterior, diferentes investigaciones se han centrado en la forma de aprovechar los hidrolizados de sangre de diferentes animales, para evaluar la capacidad antioxidante y antihipertensiva (Gómez et al., 2013).

La hidrólisis consiste en una reacción que implica la ruptura de moléculas mediante la acción del agua (Flores et al., 2008). Este proceso puede llevarse a cabo de manera química o enzimática. La hidrólisis enzimática de proteínas se utiliza especialmente para extraer fragmentos de proteína de subproductos cárnicos como la sangre, y obtener ingredientes de alto valor agregado, manteniendo así el valor nutricional del producto final, conocido como hidrolizado (Lafarga & Hayes, 2017). Las enzimas utilizadas en el proceso de hidrólisis se conocen como proteasas y actúan como catalizadores biológicos, más eficaces que los catalizadores inorgánicos (Cardona Serrate, n.d.) y de bajo costo en comparación con otros catalizadores.

Las proteasas se pueden clasificar según 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) (Monroy et al., 2013).

En cuanto a los hidrolizados de sangre bovina, se ha buscado mejorar las propiedades del producto encontrando la mejor relación enzima sustrato, por tal razón en esta investigación se

evaluará la enzima Gelzyme L 500, una proteasa producida por Proenzymas S.A (Cali, Valle del Cauca) y obtenida por fermentación controlada de una cepa de *Bacillus* spp. Esta enzima hidroliza en forma efectiva diversas proteínas (hemoglobina, caseína, albúmina, gelatina, proteína de pescado, soya y otras) según las especificaciones de la ficha técnica (Proenzymas S.A, 2024) la cual ofrece una vía prometedora para la liberación de hierro hemo a partir de sangre bovina. Además, el costo de Gelzyme L 500, es más bajo que el de otras proteasas de grado alimenticio por ser una enzima comercial nacional.

Ahora bien, el grado de hidrólisis está determinado por una serie de condiciones, incluyendo la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de incubación y las condiciones fisicoquímicas tales como el pH y la temperatura (Benítez et al., 2008).

En Colombia se reportan investigaciones previas relacionadas con el aprovechamiento de la sangre bovina, por ejemplo, en la Universidad Industrial de Santander, se llevó a cabo una estrategia para la obtención de péptidos de alto valor nutricional que permita la valorización de la sangre bovina. El estudio encontró las condiciones óptimas de operación con una concentración de enzima de 0.76 %p/p, a una temperatura de 53°C y un pH de 8.34, utilizando la enzima Alcalasa 2.4 L (Monroy et al., 2013).

Asimismo, años posteriores un estudio se encargó de evaluar la hidrólisis enzimática de sangre bovina para la obtención de hierro hemo. Como resultado obtuvieron 28.48% como mayor grado de hidrólisis a 1.0% de concentración de enzima utilizando la enzima Gelzyme L 500 (Bacca & Herreño, 2024).

Una publicación realizada por la Universidad Popular del César en conjunto con la Universidad de la Guajira y la Universidad de Antioquia optimizaron la reacción de hidrólisis enzimática de proteínas de la fracción globular de sangre bovina. La enzima utilizada fue Acalase

2.4 L, la arrojó un grado de hidrólisis de 38.08 % para pH a 8.16, sustrato inicial al 6.6 % y relación enzima:sustrato al 14.7 %p/p en un reactor batch a temperatura de 55° C por 2 horas (Morales et al., 2017).

Otro estudio utilizó diferentes mezclas de enzimas para investigar la relación entre el grado de hidrólisis, la distribución del peso molecular, la especificidad de la enzima y las características sensoriales de los hidrolizados. La concentración fue de 0.5% (p/p), con un pH 7 a 55 °C con papaína durante 5 horas. Los valores más altos del grado de hidrólisis fueron 26.3 y 19.6% que se observaron fácilmente después de 5 horas de hidrólisis en cada material de partida (Fu et al., 2018).

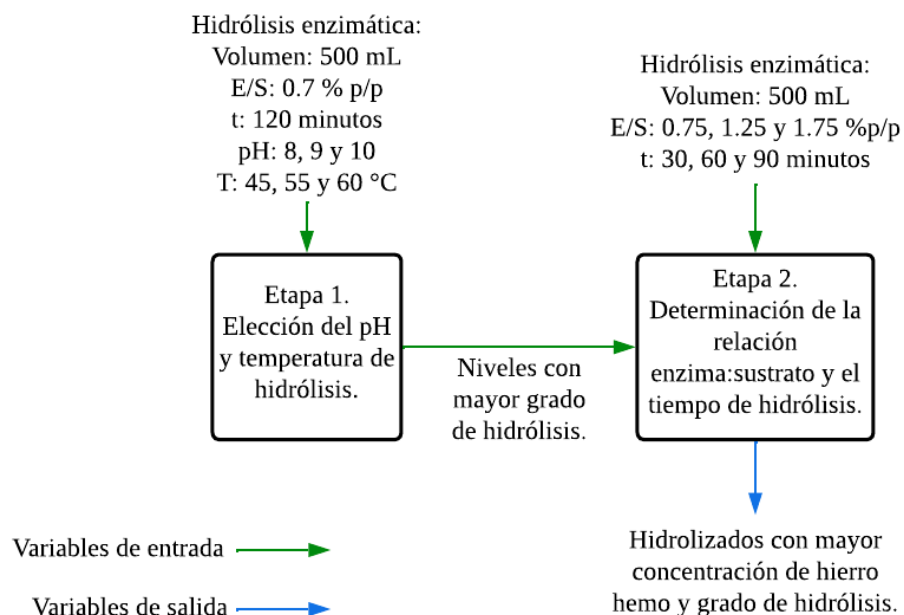
Por otro lado, investigaciones cuyo sustrato no es la sangre bovina, como la que presentada por el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) en la que se evaluó una estrategia para el aprovechamiento y la valorización de las proteínas del lactosuero utilizando Gelzyme L 500, encontraron las mejores condiciones de pH y temperatura en la hidrólisis, 10 y 60 °C respectivamente. Bajo estas condiciones, se alcanzó un grado máximo de hidrólisis del 22%, y se observó que el tamaño molecular de los hidrolizados resultantes era inferior a 6.5 kDa.(Duarte-Manchego et al., 2019).

3. Metodología

La Figura 1 ilustra el diagrama de flujo, destacando las etapas llevadas a cabo con el propósito de lograr los objetivos establecidos en este proyecto.

Figura 1

Diagrama de flujo por bloques del trabajo de grado

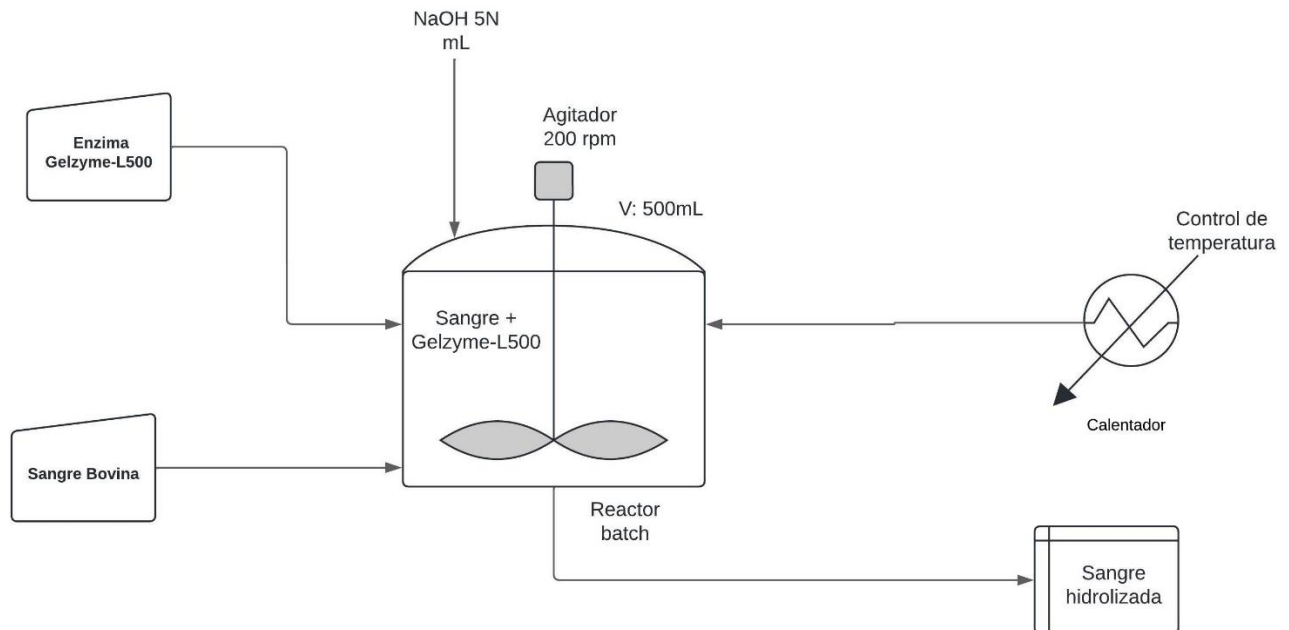


3.1. Etapa 1. Elección del pH y la temperatura de hidrólisis.

La sangre bovina fue recolectada en la empresa Colbeef S.A.S ubicada en Girón, Santander utilizando como anticoagulante citrato de sodio al 1.5%. Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática utilizando la enzima comercial Gelzyme L 500 (Proenzymas S.A) a una concentración 0.7 %p/p (0.63 g de enzima / 90.19 g proteína en sangre bovina) en un reactor batch con un volumen de 500 mL de sangre bovina, como se muestra en la Figura 2.

Figura 2

Diagrama del montaje de hidrólisis sangre bovina



Para evaluar las mejores condiciones de la enzima, se desarrolló un diseño factorial 3^2 considerando diferentes niveles de pH 8, 9, 10 y de temperatura 45, 55, 60 °C, la cual se ve detallada en la Tabla 1. La temperatura no excedió los 60 °C, ya que puede provocar la descomposición del grupo hemo presente en la sangre (Martínez Graciá et al., 2000). Además, también se establecieron estas condiciones de reacción teniendo en cuenta la ficha técnica de la enzima empleada (Apéndice A). Durante esta fase, la reacción de hidrólisis se llevó a cabo hasta que el pH de la muestra de sangre bovina permaneció constante. Una vez finalizado, se trasladó el producto hidrolizado al congelador para detener la reacción enzimática.

Tabla 1

Diseño factorial de tratamientos considerando los distintos niveles de pH y temperatura

Tratamiento	pH			Temperatura [°C]		
	8	9	10	45	55	60
1	X			X		
2	X				X	
3	X					X
4		X		X		
5		X			X	
6		X				X
7			X	X		
8			X		X	
9			X			X

El grado de hidrólisis se determinó por el método del pH-estático mediante una titulación con NaOH 5N. El cálculo del grado de hidrólisis se realizó utilizando las ecuaciones 1, 2 y 3 presentadas a continuación (Sánchez et al., 2016):

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

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

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 * T} * 2400 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde B es el volumen de NaOH consumido (L), NB es la normalidad de la base, α es el grado medio de disociación de los grupos α -NH₂ liberados en la reacción, el cual depende del pK, que a su vez está asociado con la temperatura, M_P (kg) es la cantidad de proteína en la mezcla de reacción. M_P se calculó con la siguiente ecuación:

$$M_p = \text{kg de proteína en 500 ml de sangre} * \text{contenido de proteína en la sangre} \left(\frac{\text{g proteína}}{100\text{g sangre}} \right) \quad (\text{Ec. 4})$$

El parámetro ht (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).

3.2. Etapa 2. Determinación de la relación enzima:sustrato y el tiempo de hidrólisis.

Se empleó el mismo montaje diseñado para la Etapa 1, que se observa en la Figura 2. Se utilizó un diseño experimental factorial 3^2 , teniendo como variables de entrada la relación enzima:sustrato y el tiempo de hidrólisis. Los niveles a evaluar se detallan en la Tabla 2, para la relación enzima:sustrato fueron 0.75, 1.25 y 1.75 % (p/p), teniendo en cuenta recomendaciones de estudios previos (Bacca & Herreño, 2024), mientras que para el tiempo de reacción se consideraron 30, 60, 90 min, fijando las condiciones de pH y temperatura seleccionadas en la etapa anterior.

Tabla 2

Diseño factorial de tratamientos considerando los distintos niveles de relación enzima:sustrato y tiempo

Tratamiento	Relación E/S			Tiempo		
	0.75	1.25	1.75	30	60	90
1	X			X		
2	X				X	
3	X					X
4		X		X		
5		X			X	
6		X				X
7			X	X		
8			X		X	
9			X			X

Se tomó una muestra de 4 mL antes y después de la hidrólisis, las variables de respuesta fueron el grado de hidrólisis y la concentración de hierro hemo en el hidrolizado. Para la cuantificación de hierro hemo las muestras de hidrolizado reaccionaron con metil isobutil cetona,

HCl y agua durante una hora en la oscuridad para luego pasar por un baño ultrasónico de 10 minutos (Quintero, 2009). Después de centrifugar a 2260 g y filtrar las muestras a través de un filtro PVDF 0.45 μm , se midió la absorbancia a una longitud de onda de 378 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Spectronic Cat. Espectrómetro visible 4001/4 Genesys 20), tal como se estableció en investigaciones previas (Monroy et al., 2013), empleando el patrón de hierro hemo (Hemin Chloride 3741-5GM) mediante una curva de calibración con soluciones de concentración entre 2.5 - 30 mg/L.

4. Resultados y análisis

4.1. Hidrólisis enzimática utilizando Gelzyme L 500.

4.1.1 Cálculo de la masa de proteína en 500 mL de sangre.

Para realizar el cálculo de la masa de proteína (M_p) en 500 mL de sangre bovina, se debía conocer la masa del sustrato (513 g), y la masa de la proteína en 100 g de sustrato (17.58 g) según resultados del análisis bromatológico realizado por el laboratorio de servicios del CICTA (Tabla 3).

Tabla 3

Resultados del análisis bromatológico de la sangre bovina realizado por el CICTA

Parámetros	Unidad	Resultado	Método de análisis / Normatividad
Humedad	g/ 100 g muestra (%)	80.75	Gravimétrico GOMESL.01 V06 2018-07-30
Ceniza	g/ 100 g muestra (%)	0.80	Gravimétrico GOMECH.01 V09 2019-04-01
Grasa	g/ 100 g muestra (%)	0.28	Gravimétrico – Soxhlet GOMEGC.01 V06 2019-04-01
Proteína	g/ 100 g muestra (%)	17.58	Volumétrico – Kjeldahl GOMEPL.01 V08 2019-04-01
Hierro	mg/ 100 g muestra (%)	47.27	Espectroscopía de absorción atómica asistida por digestión por microondas NTC-EN 140084:2021

Nota. Adaptado de Bacca & Herreño (2024, p. 28).

Una vez conocidos dichos valores, se calculó la cantidad de proteína en la mezcla de la reacción. Teniendo en cuenta lo anterior, se reportan dichos cálculos en las ecuaciones 5 y 6:

$$M_p = \frac{513 \text{ g} * 17.58 \text{ g}}{100 \text{ g}} \quad (\text{Ec. 5})$$

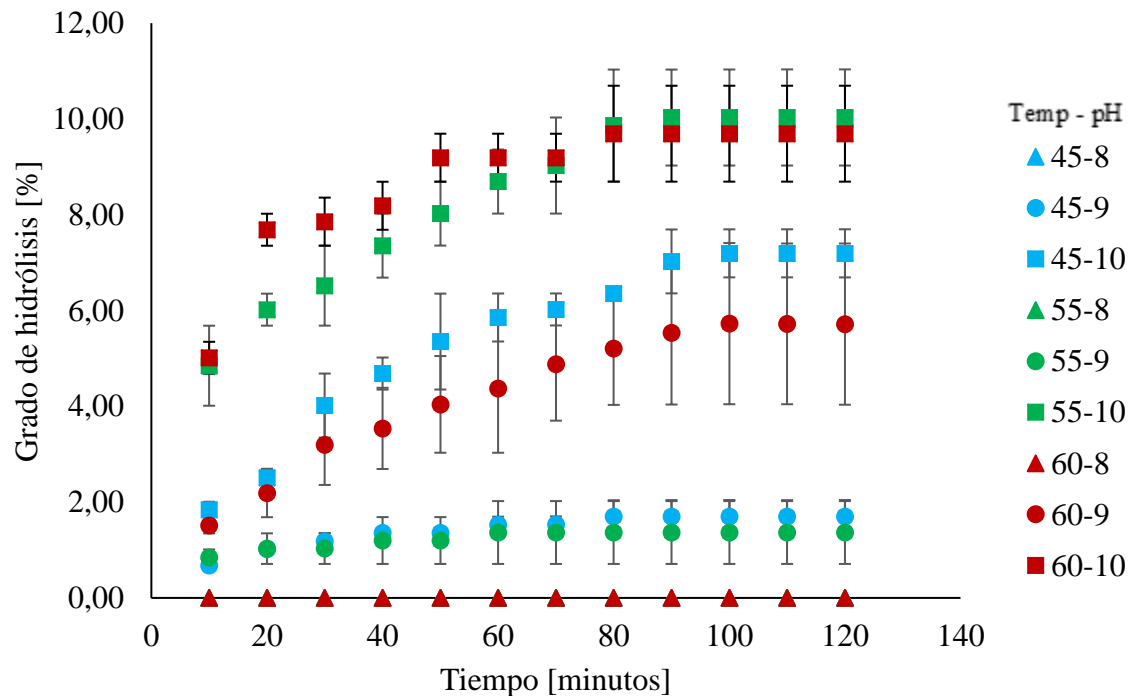
$$M_p = 90.19 \text{ g proteína} \quad (\text{Ec. 6})$$

4.1.2 Grado de hidrólisis.

La Figura 3 muestra el efecto de la temperatura y el pH en el grado de hidrólisis a lo largo del tiempo. Se observa que, a un pH de 8, la hidrólisis es nula independientemente de la temperatura. Además, se aprecia que el grado de hidrólisis aumenta con los niveles más altos de temperatura y pH.

Figura 3

Resultados del grado de hidrólisis en función de temperatura (45, 55 y 60 °C) y pH (8, 9 y 10) en 500 mL de sangre bovina utilizando una concentración 0.7 % p/p de enzima Gelzyme L 500



Luego del reporte del análisis bromatológico para la muestra de sangre bovina, cuya densidad fue de 1.0262 g/mL, con un valor de proteínas de 17.58 g, y al realizar el cálculo de M_p (90.19 g proteína) observado en las ecuaciones 5 y 6, se calculó el grado de hidrólisis correspondiente. Los resultados de los grados de hidrólisis cuando se completó el tiempo de reacción de 120 minutos con pH 10 a 55 °C, pH 10 a 60°C, pH 10 a 45 °C, pH 9 a 60 °C, pH 9 a 45 °C, pH 9 a 55 °C y pH 8 a 60 °C fueron de 10.03%, 9.69%, 7.19%, 5.72%, 1.70%, 1.37%, 0.00%. respectivamente. Estos resultados demuestran que parámetros como la temperatura y el

pH influyen significativamente en la hidrólisis enzimática, como se evidencia en este trabajo y en estudios previos (Montanero Zambrano et al., 2022).

En el Apéndice C se aprecian con detalle los resultados obtenidos en los 120 minutos de hidrólisis para las distintas condiciones de pH (8, 9 y 10) y temperatura (45, 55 y 60 °C) para la sangre bovina.

4.1.3 Análisis estadístico ANOVA.

Este análisis se llevó a cabo en el software estadístico Statistica (versión 9) disponible en el laboratorio de servicios del grupo CICTA.

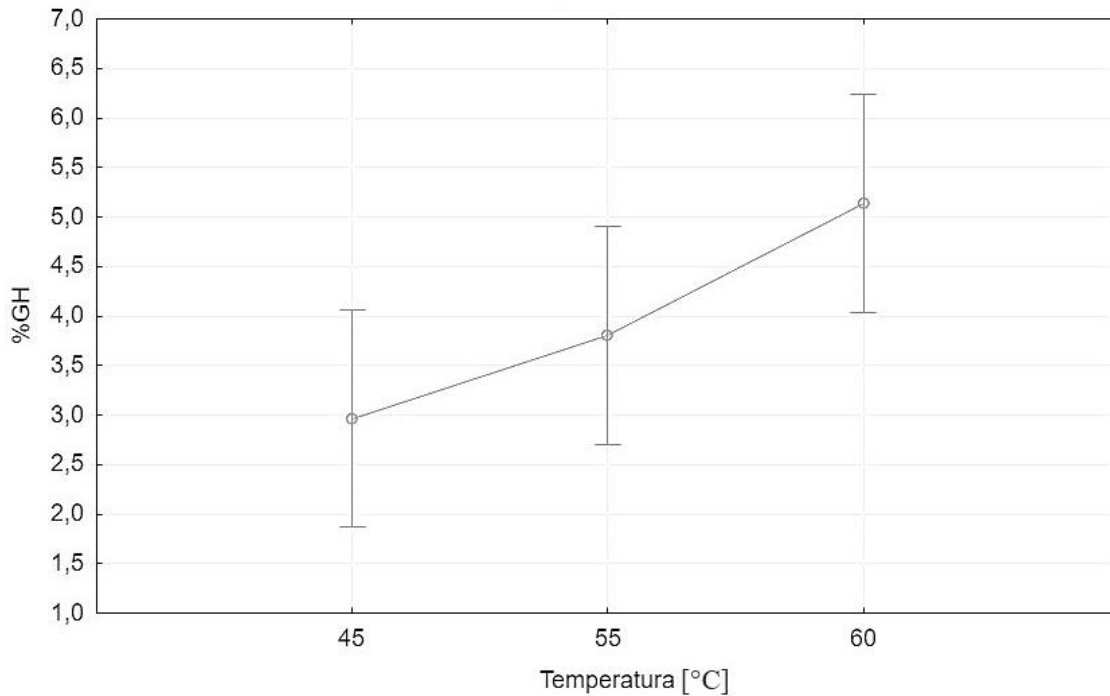
Si el valor p es menor que un nivel de significancia predefinido (comúnmente 0.05), se rechaza la hipótesis nula en favor de la hipótesis alternativa. Esto significa que hay evidencia suficiente para concluir que al menos uno de los grupos difiere significativamente de los demás en términos de la variable de interés. Por el contrario, si el valor p es mayor que el nivel de significancia, no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula. En este caso, no se puede concluir que existan diferencias significativas entre los grupos.

En la Tabla 4, se observó que el análisis de varianza ($p < 0.05$), indica que tanto la temperatura como el pH son variables significativas que tienen influencia en el grado de hidrólisis. Sin embargo, el efecto de la interacción T*pH no representa una diferencia significativa.

Tabla 4*Análisis de varianza ($p < 0.05$) para la interacción temperatura y pH*

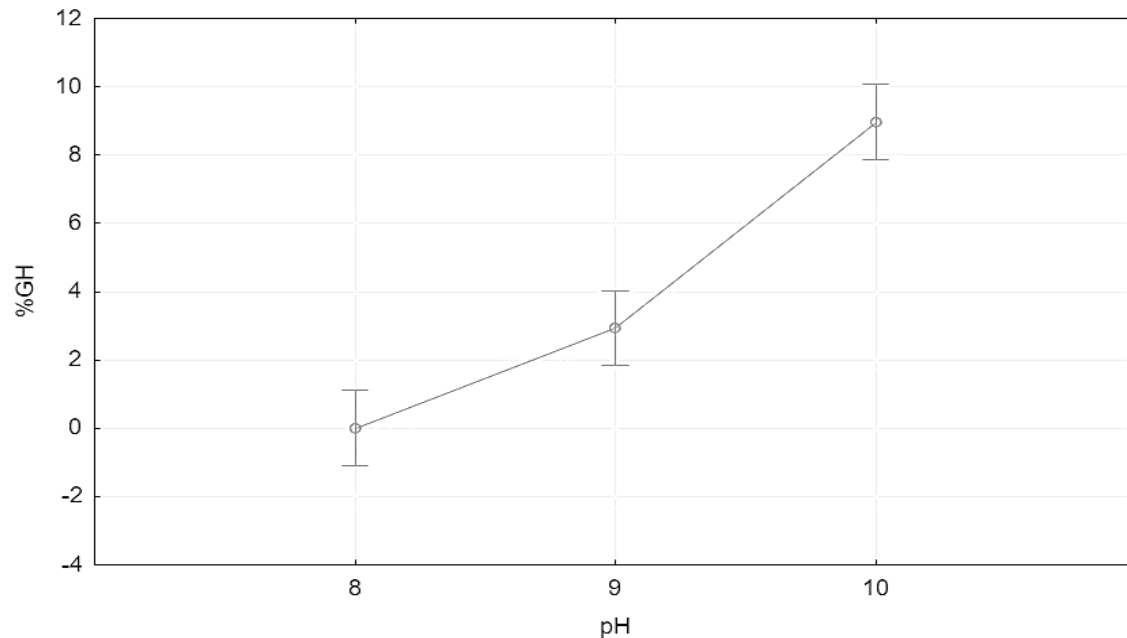
ANOVA						
Fuente	Pruebas univariadas de significancia para %GH. Parametrización restringida por Sigma. Descomposición efectiva de hipótesis.					
	Suma de cuadrados	Grado Libertad	Cuadrado medio	Valor F	p	
Intercepto	283.2200	1	283.2200	207.3085	0.000001	
Temperatura	14.4034	2	7.2017	5.2714	0.034646	Significativo
pH	251.1756	2	125.5878	91.9265	0.000003	Significativo
Temperatura*pH	18.6742	4	4.6686	3.4172	0.065456	No significativo
Réplicas	0.3147	1	0.3147	0.2303	0.644117	No significativo
Error	10.9294	8	1.3662			

La Figura 4, evidencia claramente la relación entre la temperatura y el grado de hidrólisis (%GH), la cual es directamente proporcional. A medida que aumenta la temperatura, se observa un incremento en el %GH, lo que indica que el proceso de hidrólisis se ve favorecido por condiciones térmicas elevadas.

Figura 4*Gráfico ANOVA para temperatura*

Nota. Temperatura; Medias LS
Efecto actual: $F(2,8) = 5.2714$, $p = 0.3465$
Descomposición de hipótesis efectiva
Las barras verticales denotan intervalos de confianza del 0.95

En la Figura 5, se aprecia la relación entre el pH y el %GH, la cual es directamente proporcional. A medida que se aumenta el pH, se observa un significativo incremento en el %GH, lo que indica que el proceso de hidrólisis se ve favorecido por los niveles más altos de pH.

Figura 5*Gráfico ANOVA para pH*

Nota. pH; Medias LS
Efecto actual: $F(2,8) = 91.927$, $p = 0.0000$
Descomposición de hipótesis efectiva
Las barras verticales denotan intervalos de confianza del 0.95

La finalidad de esta etapa, fue obtener hidrolizados con un grado de hidrólisis superior al 10%, para su uso en alimentación especializada (Benítez et al., 2008). Las condiciones más cercanas para cumplir con este propósito fueron pH 10 a 60 °C y pH 10 a 55°C, pero como anteriormente se mencionó, una temperatura que exceda los 60 °C puede provocar la descomposición del grupo hemo presente en la sangre (Martínez Graciá et al., 2000). Por tales motivos, se escogió continuar la Etapa 2 a las condiciones de pH y T (10 y 55 °C respectivamente) con que se obtuvo mayor grado de hidrólisis (10.03%).

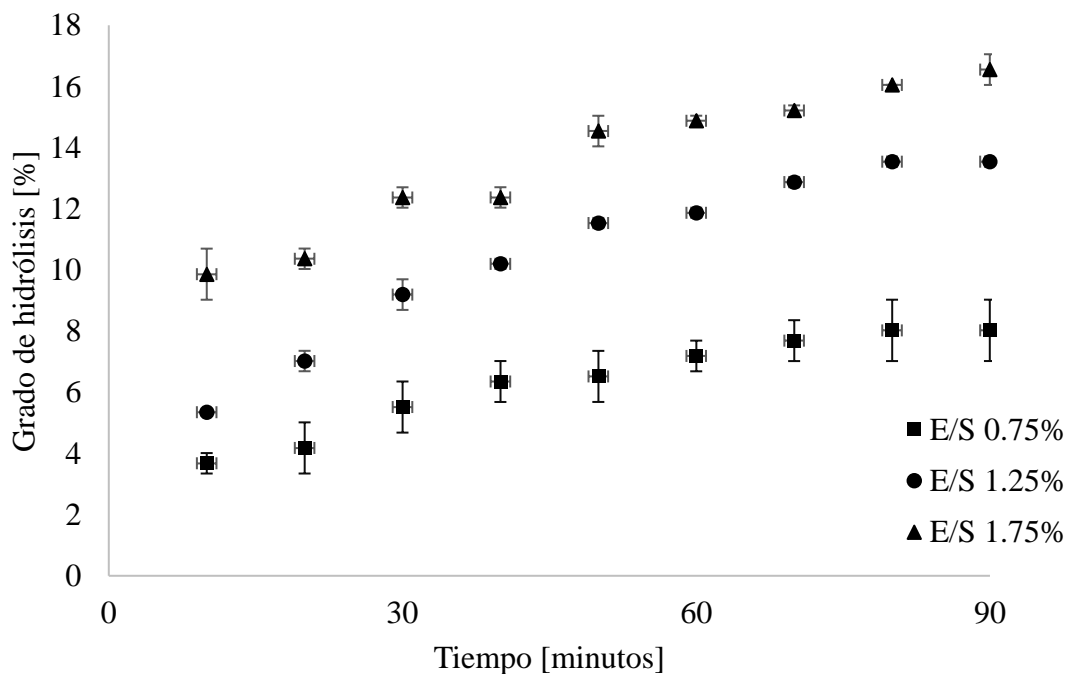
4.2. Cuantificación de hierro hemo en las muestras con diferente relación enzima:sustrato.

4.2.1 Grado de hidrólisis.

La Figura 6 muestra el efecto de la concentración de la enzima sobre el grado de hidrólisis a lo largo del tiempo. Se observa que, a una mayor relación de enzima:sustrato aumenta el grado de hidrólisis.

Figura 6

Resultados del grado de hidrólisis en función de relación enzima:sustrato (0.75, 1.25 y 1.75 %p/p) y tiempo (30, 60 y 90 minutos) en 500 mL de sangre bovina utilizando pH 10 a 55 °C



Los resultados de los grados de hidrólisis cuando se completó el tiempo de reacción de 90 minutos con concentraciones enzima:sustrato al 0.75, 1.25 y 1.75 %p/p fueron de 8.02, 13.5 y 16.6% respectivamente. Cabe destacar que el valor de 16.6% representa el mayor grado de hidrólisis alcanzado entre todos los tratamientos efectuados en este estudio. Este grado de

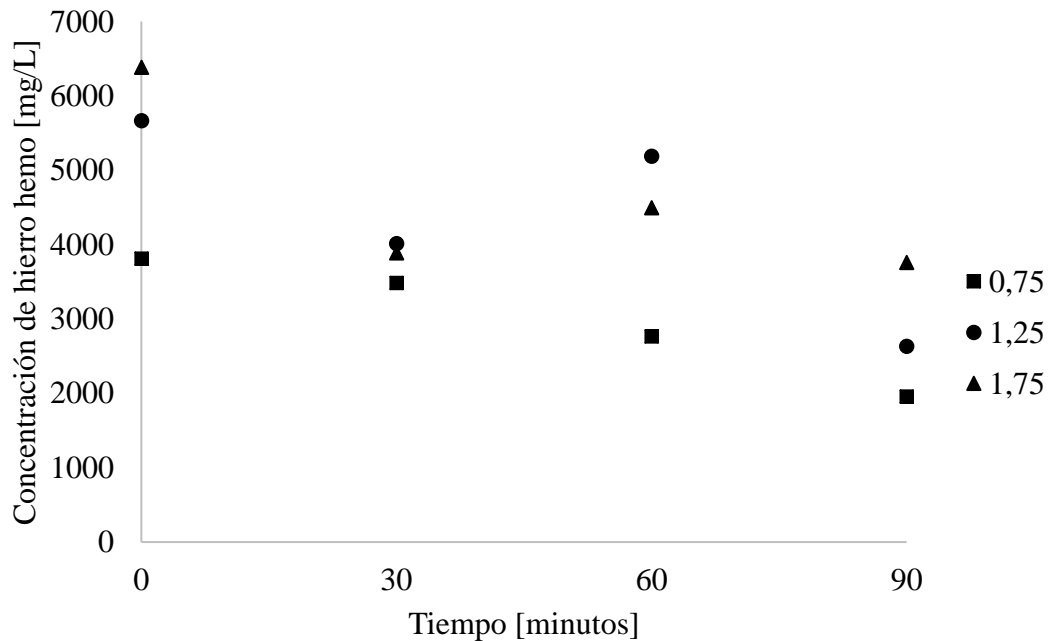
hidrólisis permite que el organismo pueda absorber mayor cantidad de hierro hemo (Vaghefi et al., 2002).

4.2.2 Determinación de hierro hemo.

Teniendo en cuenta las cantidades de hierro hemo a pH 10 y temperatura de 55 °C a los 60 minutos, se aprecia en la Figura 7, con las concentraciones enzima:sutrato de 0.75, 1.25 y 1.75 %p/p fueron 2768.1, 5191.8 y 4497.5 mg/L respectivamente. Ahora bien, comparándose con el contenido de hierro hemo en el tiempo cero de sangre bovina entera (sin enzima) que fueron de 3814.7, 5668.1 y 6385.3 mg/L en las tres corridas, se evidencia la disminución de contenido de hierro hemo a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis. Este resultado es ocasionado por la cocción de la sangre bovina, ya que un horneado por tiempo prolongado reduce la absorción de hierro hemo (González Urrutia, 2005).

Figura 7

Concentración de hierro hemo con diferentes cantidades enzima:sustrato (0.75, 1.25 y 1.75 %p/p) en distintos tiempos de hidrólisis (30, 60 y 90 minutos) con pH 10 a 55 °C



4.2.3 Análisis estadístico ANOVA.

El análisis ANOVA se realizó para determinar la influencia de los factores y sus interacciones sobre el contenido de hierro hemo. Los factores considerados en el análisis fueron relación enzima:sustrato (E/S), tiempo, interacción de E/S*tiempo y réplica. Según la Tabla 5, tanto la relación enzima:sustrato (E/S) como el tiempo mostraron efectos significativos sobre el contenido de hierro hemo. La interacción entre estos factores no es significativa, lo que implica que sus efectos son independientes y no se combinan. La consistencia de las mediciones se confirma por la no significancia del factor réplica.

Tabla 5

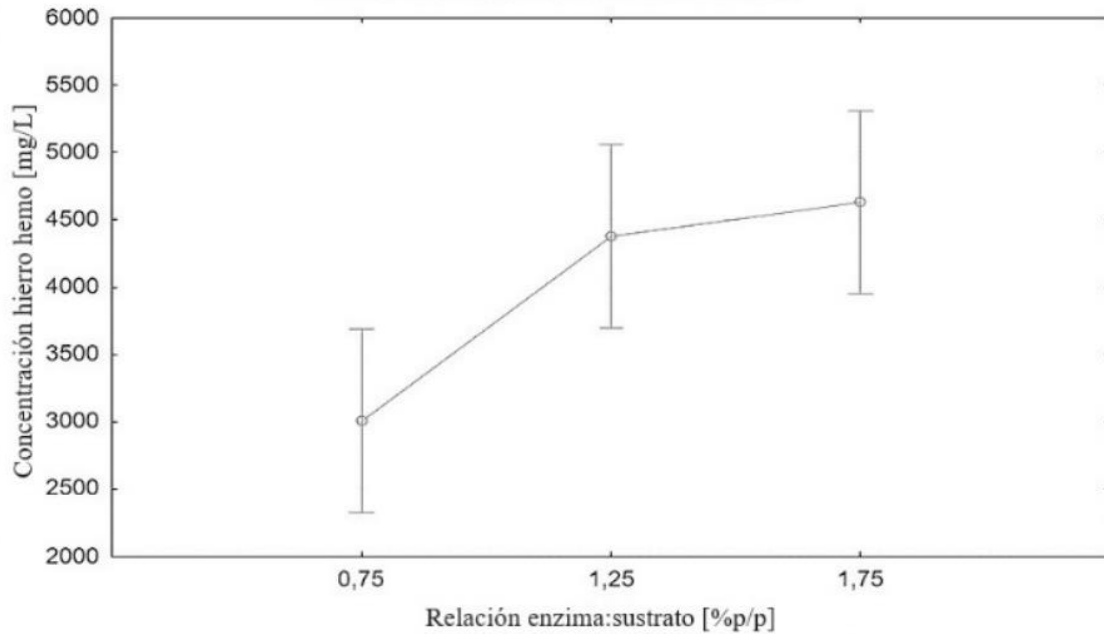
Análisis de varianza ($p < 0.05$) para la interacción entre la relación enzima:sustrato y tiempo

Fuente	Pruebas Univariadas de Significancia para el contenido de hierro hemo Parametrización restringida por Sigma Descomposición efectiva de la hipótesis					
	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Cuadrado medio	Valor F	p	
Intercepto	385094771	1	385094771	501.9979	0.000000	Significativo
E/S	12250311	2	6125155	7.9846	0.007209	Significativo
Tiempo	19225582	3	6408527	8.3540	0.003544	Significativo
E/S*Tiempo	4655007	6	775835	1.0114	0.465446	No significativo
Réplica	3343541	1	3343541	4.3585	0.060881	No significativo
Error	8438367	11	767124			

El gráfico presentado (Figura 8), muestra que la relación enzima:sustrato (E/S) tiene un efecto significativo sobre el contenido de hierro hemo, que indica que un aumento en la proporción de enzima mejora la liberación de hierro hemo.

Figura 8

Gráfico ANOVA para relación enzima:sustrato (E/S)



Nota. E/S; Medias LS

Efecto actual: $F(2,11) = 7.9846$, $p = 0.00721$

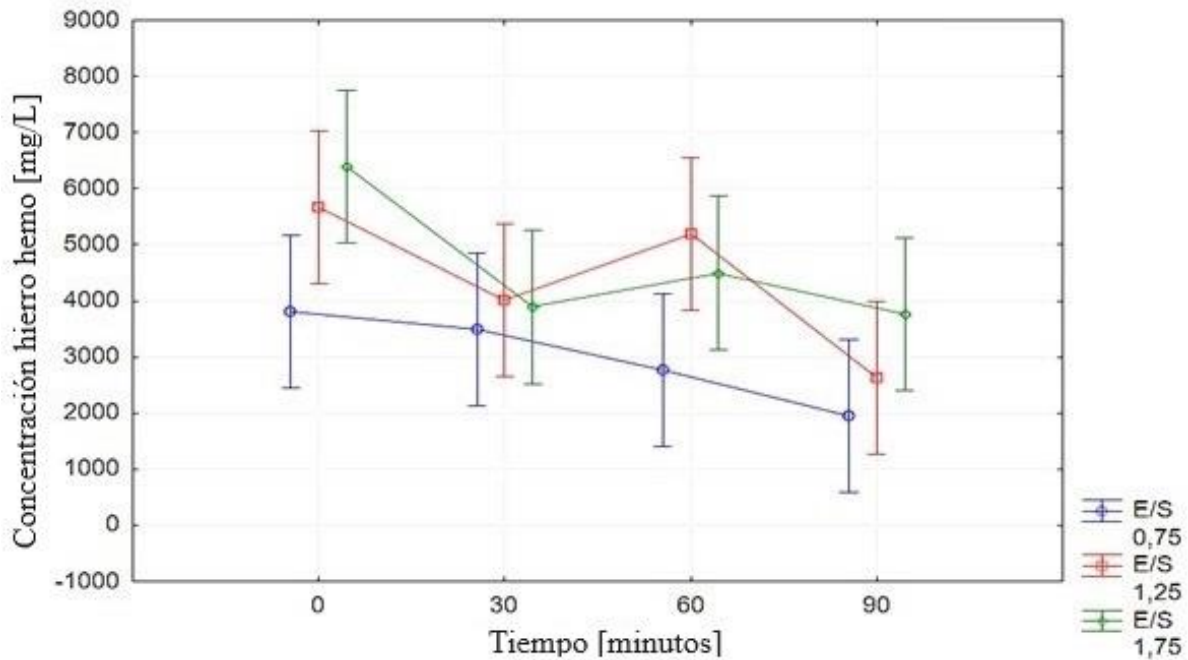
Descomposición de hipótesis efectiva

Las barras verticales denotan intervalos de confianza del 0.95

Teniendo en cuenta las cantidades de hierro hemo en el tiempo cero como referencia de sangre entera (sin enzima), se puede apreciar en la Figura 9 la disminución de contenido de hierro hemo para cada una de las relaciones enzima:sustrato (E/S) a lo largo del tiempo.

Figura 9

Gráfico ANOVA de tiempo vs contenido de hierro hemo con influencia de relación enzima:sustrato (E/S)



Nota. E/S*Tiempo; Medias LS
 Efecto actual: $F(6,11) = 1.0114$, $p = 0.46545$
 Descomposición de hipótesis efectiva
 Las barras verticales denotan intervalos de confianza del 0.95

6. Conclusiones

Las condiciones de pH y temperatura necesarios para obtener el mayor grado de hidrólisis de sangre bovina utilizando Gelzyme L 500, son 55 °C y pH 10 para un grado de hidrólisis de 10.03% con una concentración fija de enzima:sustrato al 0.7 %p/p a 120 minutos.

Fijando las condiciones de pH y T (10 y 55 °C) la concentración enzima:sustrato necesaria para obtener el grado de hidrólisis mayor de sangre bovina empleando Gelzyme L 500 fue de 1.75 %p/p a los 90 minutos. Cabe mencionar que, a estas mismas condiciones se obtuvo el mayor grado de hidrólisis de este trabajo (16.6 %).

La concentración de enzima:sustrato necesario para obtener la mayor cantidad de hierro hemo utilizando Gelzyme L 500 fue de 1.25 % a 60 minutos con pH 10 y a 55 °C. La concentración de hierro hemo que se obtuvo fue de 5191.8 mg/L.

Tanto la relación enzima:sustrato como el tiempo influyen en el contenido de hierro hemo. El contenido de hierro hemo aumenta con la relación enzima:sustrato, pero disminuye a lo largo del tiempo.

7. Recomendaciones

Se recomienda descongelar únicamente la cantidad de sangre que se planea utilizar en el momento. Repetidos ciclos de congelación y descongelación pueden deteriorar la calidad de la sangre bovina, llevándola a su descomposición.

Para trabajar hidrólisis enzimática se recomienda emplear un pH superior a 7, ya que si el pH es inferior, indica que la sangre bovina está descompuesta.

Referencias bibliográficas

- Abril Florez, A. L., Alvarez Avellaneda, S. L., Romero Tabares, E. D., Romero Tovar, A. L., Sabogal Benavides, M. D., & Serrano Medina, L. S. (2017). *Anemia por deficiencia de hierro, una breve mirada*.
- Acosta Camacho, J. S., & Rios Morales, S. N. (2013). *Aplicaciones de las técnicas con membranas de microfiltración y ultrafiltración para la clarificación y fraccionamiento de sangre de bovino cruda e hidrolizada*.
- Bacca, J. Y., & Herreño, A. (2024). *Hidrólisis enzimática de la sangre de bovino para la obtención de hierro hemínico*.
- Benítez, R., Ibarz, A., Pagan, J., Bioquímica, A., & Latinoamericana, C. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 42(2), 227–263.
- Cardona Serrate, F. (n.d.). *Los enzimas. Introducción a la enzimología*. Retrieved May 18, 2024, from <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/146362/Cardona%20-%20LOS%20ENZIMAS.%20INTRODUCCI%C3%93N%20A%20LA%20ENZIMOLOG%C3%8DA..pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- DANE. (2023). *Boletín técnico encuesta de sacrificio de ganado (ESAG) Primer trimestre de 2023*.
- Duarte-Manchego, P. A., González-Téllez, J. C., & Muvdi-Nova, C. J. (2019). Evaluación de las proteínas hidrolizadas del lactosuero como fuente de nitrógeno en la fermentación láctica de la lactosa. *Revista ION*, 32(2), 15–27. <https://doi.org/10.18273/revion.v32n2-2019002>
- Durán, E., Villalobo, C., Churio, O., Pizarro, F., & Valenzuela, C. (2017). Encapsulación de hierro: Otra estrategia para la prevención o tratamiento de la anemia por deficiencia de

- hierro. *Revista Chilena de Nutrición*, 44(3), 234–243. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182017000300234>
- Figuroa, O. A., Alean, J. D., Marcet, I., Rendueles, M., & Zapata, J. E. (2023). Kinetic-conceptual model of the hydrolysis of bovine plasma proteins - ALCALASE® 2.9L: The role of inhibition by product. *Heliyon*, 9(10), e21002. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E21002>
- Flores, J., Caballero, C., & Moreira, M. A. (2008). *Una interpretación aproximativa del concepto de hidrólisis en estructuras peptídicas en un curso de bioquímica del IPC en el contexto de la teoría de los campos conceptuales de Vergnaud*. 32(64).
- Fu, Y., Liu, J., Hansen, E. T., Bredie, W. L. P., & Lametsch, R. (2018). Structural characteristics of low bitter and high umami protein hydrolysates prepared from bovine muscle and porcine plasma. *Food Chemistry*, 257, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.159>
- Gómez, L. J., Figuroa, 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>
- González Urrutia, R. (2005). Biodisponibilidad del hierro. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 14(26). https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292005000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Isaza Rengifo, J., Londoño Ramírez, L. M., Restrepo Molina, D. A., Cortes Rodríguez, M., & Suárez Mahecha, H. (2010). Producción y propiedades funcionales de plasma bovino hidratado en embutido tipo salchichón. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23,

- 199–206. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-06902010000200009&script=sci_arttext
- Janiszewska, E. (2014). Microencapsulated beetroot juice as a potential source of betalain. *Powder Technology*, 264, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.05.032>
- Lafarga, T., & Hayes, M. (2017). Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: Overcoming current challenges. *Food Reviews International*, 33(3), 217–246. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175013>
- Martínez Graciá, C., López Martínez, G., Ros Berruezo, G., Vidal Guevara, M. L., & Abellán Ballesta, P. (2000). Use of Heme Iron Concentrate in the Fortification of Weaning Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2930–2936. <https://doi.org/10.1021/jf991091q>
- Monroy, R. A., Universidad, R., De, I., Facultad, S., Ciencias, D. E., & De Química, E. (2013). *Valorización de residuos de sangre de bovino mediante hidrólisis enzimática integrando procesos con membranas*.
- Montanero Zambrano, R. M., Moreira-Bravo, G. D., & Rosero-Delgado, E. A. (2022). Hidrólisis enzimática de la sangre bovino generada del faenamiento para la obtención de concentrado proteico. *Revista Bases de La Ciencia*, 7(1), 17–36. <https://doi.org/10.33936/revbasdelaciencia.v7i1.4183>
- 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>

- Muñoz, J. P., Zambrano, M. I., Párraga, R. C., & Verduga, C. D. (2019). *Uso de papaína y bromelina y su efecto en las características organolépticas y bromatológicas de chuletas de cerdo ahumadas*.
- Pérez Gálvez, R. (2006). *Optimización de las condiciones de operación en la hidrólisis enzimática de proteínas para la obtención de abonos orgánicos*.
https://www.ugr.es/~rperezga/DEA_RAUL.pdf
- Proenzimas S.A.S. (2024). *Gelzyme L 500 Proteasa Alcalina Líquida*.
<https://www.proenzimas.com/pdf/Gelzyme%20L%20500%20NFT.pdf>
- Quevedo Bolívar, P. A. (2019). La malnutrición: más allá de las deficiencias nutricionales. *Trabajo Social*, 21(1), 219–239. <https://doi.org/10.15446/ts.v21n1.71425>
- Quintero A., A. J. (2009). *Validación interna de los métodos analíticos para la cuantificación de hierro total, hierro no hemo e implementación del método para la determinación de hierro hemo en alimentos*. Universidad Industrial de Santander.
- Rodríguez Furlán, L. T., Pérez Padilla, A., & Campderros, M. (2010). *Functional and physical properties of bovine plasma proteins as a function of processing and pH, application in a food formulation*. <https://www.researchgate.net/publication/49582912>
- Sánchez, O. J., Montoya, S., & Barragan, P. (2016). *Modeling of the hydrolysis kinetics of the proteins from bovine blood plasma using bacterial alkaline endoprotease*.
<https://www.researchgate.net/publication/300926647>
- Sermini, C. G., Acevedo, M. J., & Arredondo, M. (2017). Biomarcadores del metabolismo y nutrición de hierro. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(4), 690. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.344.3182>

- Soto Méndez, A., & Caballero Pérez, L. A. (2011). Adición de hierro hemo, proveniente de hemoglobina bovina a un chocolate de consumo directo. *Bistua*, 9(1), 21–31.
- Tostado, T., Benítez, I., Pinzón, A., Bautista, M., & Ramírez, J. A. (2015). *Actualidades de las características del hierro y su uso en pediatría*. <https://www.scielo.org.mx/pdf/apm/v36n3/v36n3a8.pdf>
- Vaghefi, N., Nedjaoum, F., Guillochon, D., Bureau, F., Arhan, P., & Bouglé, D. (2002). Influence of the Extent of Hemoglobin Hydrolysis on the Digestive Absorption of Heme Iron. An In Vitro Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4969–4973. <https://doi.org/10.1021/jf0109165>
- Villavicencio-Queijeiro, A. (2012). La mitocondria como fábrica de cofactores: biosíntesis de grupo hemo, centros Fe-S y nucleótidos de flavina (FMN/FAD). In D.R. © TIP *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* (Vol. 116, Issue 2). <https://www.scielo.org.mx/pdf/tip/v15n2/v15n2a5.pdf>
- Winter, W. E., Bazydlo, L. A. L., & Harris, N. S. (2014). The molecular biology of human iron metabolism. *Laboratory Medicine*, 45(2), 92–102. <https://doi.org/10.1309/LMF28S2GIMXNWHMM>

Apéndices

Apéndice A. Ficha técnica Gelzyme L 500.

SN – CHEMICAL CO LTD.

GELZYME L 500 ©
Proteasa Alcalina Líquida

Gelzyme L 500, es una proteasa obtenida por fermentación controlada de una cepa de *Bacillus spp.*, que posee actividad endo y exo peptidasa, capaz de hidrolizar los enlaces pépticos de las moléculas de proteínas.

Gelzyme L 500 hidroliza en forma efectiva la mayoría de las proteínas, tanto de origen animal como de origen vegetal. La **Gelzyme L 500** es útil sobre proteínas tales como: hemoglobina, caseína, albúmina, gelatina, proteína de soya, pescado y otras.

Aplicaciones.

- ✓ Producción de hidrolizados de proteínas animal y vegetal.
- ✓ Excelente para formular en ablandadores líquidos para carnes.
- ✓ Alta Estabilidad.
- ✓ Se usa en formulación de detergentes.

Dosis

Las dosis de **Gelzyme L 500** están en función de las condiciones de proceso, de la materia prima, del pH, la temperatura y grado de transformación deseados. Deben conducirse ensayos previos para aplicar el producto en la obtención de hidrolizados o modificación de proteínas, sugiriéndose un nivel de aplicación de 0,04 a 0,1 % sobre el contenido de proteína.

Para otras aplicaciones, es necesario hacer evaluación previa, con el fin de definir la dosis óptima que dé el mejor resultado final.

Propiedades

Color	Ámbar oscuro brillante a café
Olor	Típico de la enzima
Solubilidad	Fácilmente soluble
Actividad	500,000 DU/ g --- (833KMDU/g)
Fuente	<i>Bacillus spp.</i>

Enzymes for industry.

PROENZIMAS
ENZIMAS PARA PROCESOS INDUSTRIALES

PROENZIMAS S.A
Calle 56 No. 5N - 65
PBX: 447 6028
FAX: 446 6442
Cali - Colombia
dirtecnica@proenzimas.com
www.proenzimas.com

Ingredientes

Enzima – Vehículo.

Para la completa actividad de la Enzima **Gelzyme L 500** no es requerido ningún activador o cofactor.

Actividad

Una unidad DU es una unidad arbitraria que define la extensión de la hidrólisis enzimática del sustrato caseína bajo condiciones de pH 8.5 y temperatura 40 ° C durante 40 minutos.

Valores - Efectos	del pH	Temperatura.
Óptimos	9.0 a 10.0	60 ° C
Efectivos	4.0 a 10.0	Hasta 65 ° C
Estabilidad	4.0 a 10.0	Hasta 70 ° C

Gelzyme L 500 es inactivada cuando la temperatura se eleva a 80 – 85 ° C durante 5 a 10 minutos, también la enzima puede inactivarse ajustando el pH abajo de 4.0 durante 30 minutos a una temperatura de 50 ° C o ajustándolo arriba de pH 11.0 a 60 ° C por 60 minutos.

En procesamiento de pescado el uso de la enzima facilita las fases de evaporación, por la reducción de viscosidad por efecto del tratamiento, permite usar menos cantidad de agua en la evaporación, aumentar la concentración sin riesgos de obstrucciones, usar menos energía y aumentar la eficiencia de equipos.

Almacenamiento y Empaque

En recipiente cerrado y almacenamiento a temperatura y humedad bajas, **Gelzyme L 500** puede perder cerca del 5 % en 9 meses. La vida útil del producto puede extenderse si se refrigera a 5 - 8 ° C. La unidad de empaque estándar para la enzima es de 20 kilogramos.

Vida de anaquel.

La vida de anaquel es de un (1) año a partir de la fecha de manufactura.

La información técnica y sugerencias para su uso, contenidas en el presente documento, se cree que son confiables, pero no pueden construirse como garantías. Las especificaciones están sujetas a cambios basados en variaciones de las materias primas. Proenzimas S.A. no se hace responsable de los resultados obtenidos con el uso de la enzima, porque su manejo y control están fuera de nuestro alcance.

Apéndice B. Curva de calibración para la medición de hierro hemo.

Con base en los resultados de absorbancia de las muestras patrón reportados en la Tabla 1, se construyó la curva de calibración para la concentración de hierro hemo que se observa en la Figura 1.

Tabla 1

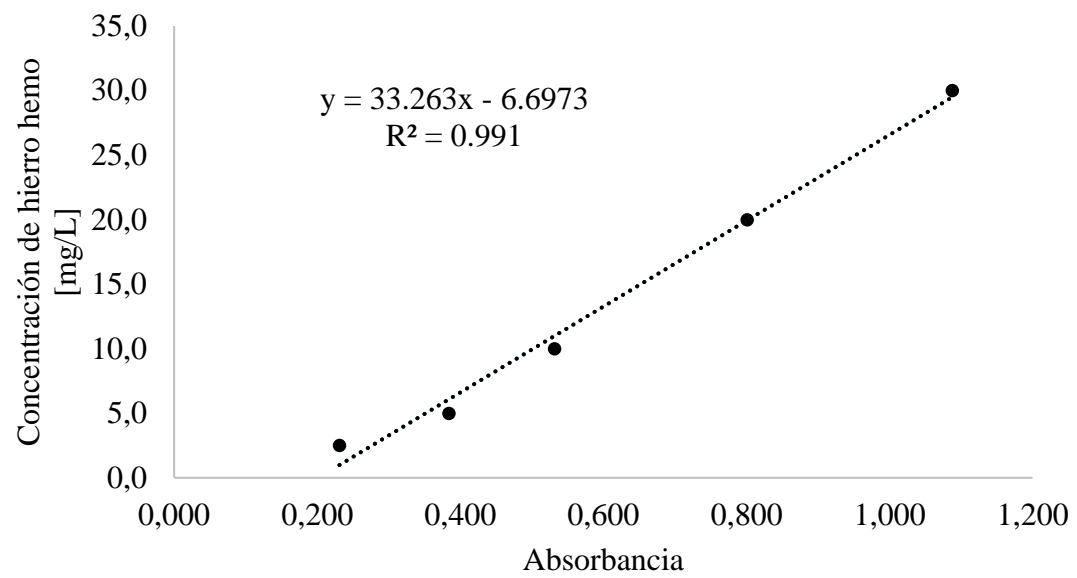
Lecturas de absorbancia de patrones de concentración de hierro hemo

Patrón Hemin Chloride	
Concentración de hierro hemo [mg/L]	Absorbancia
2.5	0.231
5	0.384
10	0.532
20	0.801
30	1.088

El valor obtenido en el coeficiente de correlación ($R^2 = 0.991$) evidenciado en la Figura 1, muestra que existe correlación lineal entre la absorbancia y la concentración de hierro hemo.

Figura 1

Curva de calibración de concentración de hierro hemo



Apéndice B. Protocolo cuantificación de contenido de hierro hemo.**Evaluación de la hidrólisis de sangre bovina empleando Gelzyme L 500 para la obtención de hierro hemo.**

Objetivo: Determinar la influencia de la relación enzima: sustrato y el tiempo de hidrólisis en el contenido de hierro hemo en los hidrolizados.

Equipos

Equipo	Justificación	Ubicación - Responsable
Reactor batch con agitación mecánica y un baño termostático.	Hidrólisis de la sangre.	Lab 210 – Prof. Carlos.
Baño ultrasónico.	Medición de hierro hemo.	Investigación-Grupo CICTA
Centrifuga.	Medición de hierro hemo.	Lab 405 – Prof. Luis Javier
Espectrofotómetro.	Medición de hierro hemo.	Investigación-Grupo CICTA

Materiales

Elemento	Cantidad	Justificación	Responsable
Vasos precipitados de 1000 mL	4	Ajustar el pH de la sangre.	Prof. Viviana.
Transferpipeta de 5 mL	1	Agregar enzima a la sangre.	Prof. Viviana.
Recipientes plásticos de 500 mL	4	Almacenar los hidrolizados finales.	Prof. Viviana.
Tubos eppendorff	24	Toma de muestras de los hidrolizados en t_0 , t_{30min} , t_{60min} y t_{90min} .	Prof. Viviana.
Tubos falcon de 15 mL	50	Diluciones y digestión.	Prof. Viviana.
pH metro portátil	1	Control del pH de la hidrólisis.	Lab 210 – Prof. Carlos.

Reactivos

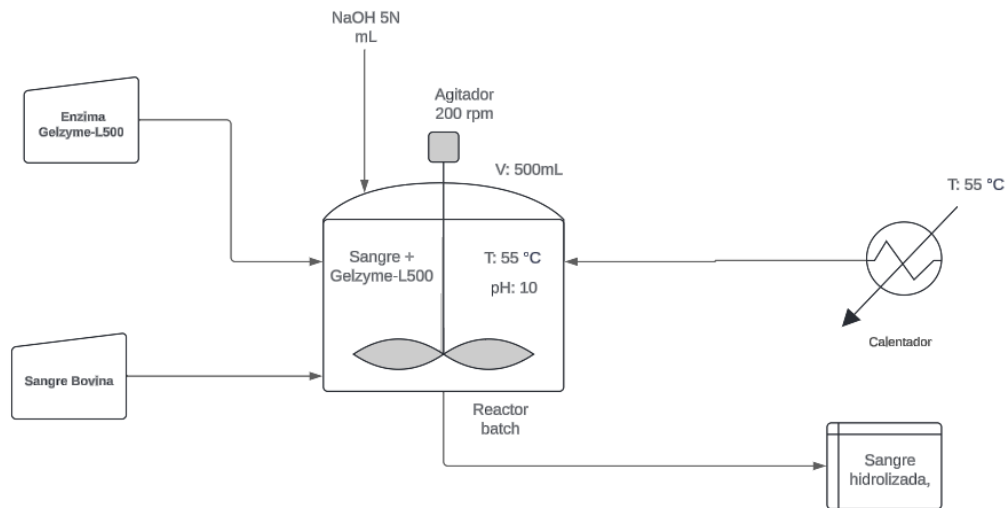
Sustancias	Justificación	Responsable
Gelzyme L 500	Enzima necesaria para la hidrólisis.	Prof. Viviana.
NaOH 5N, HCl 4N [1]	Control del pH.	Prof. Viviana.
HCl, metil-isobutil-cetona, NaOH, patrón de hierro Hemin Cloride	Medición de hierro hemo.	Prof. Viviana.

Diseño del experimento.

En la segunda etapa se empleará un sistema con un volumen de reacción de 500 mL en un reactor batch conectados a un regulador termostático. Se utilizará un diseño experimental factorial 3^2 , teniendo como variables de entrada la relación enzima:sustrato y el tiempo de hidrólisis. Los niveles a evaluar para la relación enzima:sustrato serán 0,75 , 1,25, 1,75 % (p/p), mientras que para el tiempo de reacción se considerarán 30, 60, 90 min, fijando las condiciones de pH y temperatura seleccionadas en la etapa anterior.

Tratamiento	Relación E/S			Tiempo		
	0,75	1,25	1,75	30	60	90
1	X			X		
2	X				X	
3	X					X
4		X		X		
5		X			X	
6		X				X
7			X	X		
8			X		X	
9			X			X

Tabla 1. Tratamientos del diseño experimental.

Protocolo:**Figura 1.** Diagrama del montaje del reactor batch.

1. Descongelar sangre bovina por lo menos 18 horas antes en la oscuridad.
2. Preparar 500 mL de sangre según cada tratamiento propuesto en la oscuridad.
3. Agregar cada tratamiento por separado en el numeral 2 en el reactor batch con agitación mecánica con un agitador de hélice y una chaqueta aislante para el control de la temperatura.
4. Ajustar el pH a 10 con una solución 5N de NaOH [4].
5. Una vez alcance la temperatura de 55 Celsius se agrega la enzima GELZYME-L500 en concentración 0,75, 1,25, 1,75 % p/p según el tratamiento que corresponda.
6. Medir el pH y temperatura cada 10 minutos. Ajustar el pH para cada tratamiento con NaOH 5N [6].
7. Depositar los hidrolizados en recipientes plásticos y congelar.
8. Calcular el grado de hidrólisis según el método del pH-stat. Se realizará utilizando las ecuaciones 1, 2 y 3 presentadas a continuación [6]:

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

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

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 * T} * 2400 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

B: Volumen de base consumida (mL).

N_B: Normalidad de la base (meq/mL).

α : Grado medio de disociación de los grupos α -NH₂ liberados en la reacción, el cual depende del pK, que a su vez está asociado con la temperatura.

M_p : Cantidad de proteína en la mezcla de la reacción (90.58 g).

T: Temperatura (K).

ht: Número de enlaces peptídicos totales en la proteína (8.3 Eqv/kg).

Cálculo de la masa de proteína en 500 mL de sangre.

Para realizar el cálculo de la masa de proteína en 500 mL de sangre bovina, se debe conocer la masa del sustrato (513 g), además de la masa de la proteína en 100 g de sustrato (17.58 g). Una vez conocidos dichos valores, se proceden a calcular la cantidad de proteína en la mezcla de la reacción. Teniendo en cuenta lo anterior, se reportan dichos cálculos de la siguiente manera:

$$M_p = \frac{513g * 17,58 g}{100 g}$$

$$M_p = 90.18g \text{ proteína}$$

9. Para la medición del hierro hemo las muestras de hidrolizado reaccionarán con metil isobutil cetona, HCl y agua.
10. Introducir la muestra en un baño ultrasónico durante 10 min.
11. Mantener la muestra una hora en la oscuridad.
12. Centrifugar a 2260 g y filtrar las muestras a través de un filtro PVDF 0.45 μ m.
13. Medir la absorbancia a una longitud de onda de 378 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS, empleando el patrón de hierro hemo (Hemin Chloride) mediante una curva de calibración con soluciones de concentración entre 2.5 - 30 mg/L.

Referencias:

[1] R. A. Monroy, «Valorización de residuos de sangre de bovino mediante hidrólisis enzimática integrando procesos con membranas», Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 2013.

[2] J. Herreño y A. Bacca, «Hidrólisis enzimática de la sangre de bovino para la obtención de hierro hemínico», Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 2023.

[3] C. Martínez Graciá, G. Lopez Martínez, G. Ros Berruezo, M. L. Vidal Guevara, y P. Abellán Ballesta, «Use of heme iron concentrate in the fortification of weaning foods», J Agric Food Chem, vol. 48, n.o 7, pp. 2930-2936, jul. 2000, doi: 10.1021/jf991091q.

[4] J. Herreño y A. Bacca, «Protocolo de cuantificación de hierro hemínico», 2022.

[5] L. Castillo y R. Ortiz, «Evaluación de las etapas de evaporación de película descendente en vacío y secado por aspersion de hidrolizados clarificados de sangre de bovino para la obtención de pulverizados enriquecidos en hierro», Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 2023.

[6] P. Barragán, O. Sánchez, y S. Montoya, «Modelamiento de la cinética de hidrólisis de las proteínas del plasma sanguíneo bovino con endoproteasa alcalina bacteriana», 2016. [En línea]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/300926647>

Revisó:	Firma:	Fecha de aprobación:
Aprobó:	Firma:	

Apéndice C. Resultados de los distintos tratamientos con relación a pH y temperatura con Gelzyme L 500 para la hidrólisis de sangre bovina.

Tabla 1.

Resultados del grado de hidrólisis de sangre bovina a 45 °C y pH 8 con una concentración de Gelzyme L 500 a 0.7 %p/p en 120 minutos.

t (min)	Promedio %GH	Desviación estándar	Error estándar
10	0.00	0	0
20	0.00	0	0
30	0.00	0	0
40	0.00	0	0
50	0.00	0	0
60	0.00	0	0
70	0.00	0	0
80	0.00	0	0
90	0.00	0	0
100	0.00	0	0
110	0.00	0	0
120	0.00	0	0

Tabla 2.

Resultados del grado de hidrólisis de sangre bovina a 45 °C y pH 9 con una concentración de Gelzyme L 500 a 0.7 %p/p en 120 minutos.

t (min)	Promedio %GH	Desviación estándar	Error estándar
10	0.68	0.00	0.00
20	1.02	0.00	0.00
30	1.19	0.24	0.17
40	1.36	0.00	0.00
50	1.36	0.00	0.00
60	1.53	0.24	0.17
70	1.53	0.24	0.17

80	1.70	0.48	0.34
90	1.70	0.48	0.34
100	1.70	0.48	0.34
110	1.70	0.48	0.34
120	1.70	0.48	0.34

Tabla 3.

Resultados del grado de hidrólisis de sangre bovina a 45 °C y pH 10 con una concentración de Gelzyme L 500 a 0.7 %p/p en 120 minutos.

t (min)	Promedio %GH	Desviación estándar	Error estándar
10	1.84	0.24	0.17
20	2.51	0.24	0.17
30	4.02	0.95	0.67
40	4.68	0.47	0.33
50	5.35	1.42	1.00
60	5.85	0.71	0.50
70	6.02	0.47	0.33
80	6.36	0.00	0.00
90	7.03	0.94	0.67
100	7.19	0.71	0.50
110	7.19	0.71	0.50
120	7.19	0.71	0.50

Tabla 4.

Resultados del grado de hidrólisis de sangre bovina a 55 °C y pH 8 con una concentración de Gelzyme L 500 a 0.7 %p/p en 120 minutos.

t (min)	Promedio %GH	Desviación estándar	Error estándar
10	0.00	0	0
20	0.00	0	0
30	0.00	0	0
40	0.00	0	0

50	0.00	0	0
60	0.00	0	0
70	0.00	0	0
80	0.00	0	0
90	0.00	0	0
100	0.00	0	0
110	0.00	0	0
120	0.00	0	0

Tabla 5.

Resultados del grado de hidrólisis de sangre bovina a 55 °C y pH 9 con una concentración de Gelzyme L 500 a 0.7 %p/p en 120 minutos.

t (min)	Promedio %GH	Desviación estándar	Error estándar
10	0.84	0.24	0.17
20	1.03	0.45	0.32
30	1.03	0.45	0.32
40	1.20	0.69	0.49
50	1.20	0.69	0.49
60	1.37	0.93	0.66
70	1.37	0.93	0.66
80	1.37	0.93	0.66
90	1.37	0.93	0.66
100	1.37	0.93	0.66
110	1.37	0.93	0.66
120	1.37	0.93	0.66

Tabla 6.

Resultados del grado de hidrólisis de sangre bovina a 55 °C y pH 10 con una concentración de Gelzyme L 500 a 0.7 %p/p en 120 minutos.

t (min)	Promedio %GH	Desviación estándar	Error estándar
10	4.85	1.18	0.84

20	6.02	0.47	0.33
30	6.52	1.18	0.84
40	7.36	0.95	0.67
50	8.02	0.95	0.67
60	8.69	0.95	0.67
70	9.03	1.42	1.00
80	9.86	1.65	1.17
90	10.03	1.42	1.00
100	10.03	1.42	1.00
110	10.03	1.42	1.00
120	10.03	1.42	1.00

Tabla 7.

Resultados del grado de hidrólisis de sangre bovina a 60 °C y pH 8 con una concentración de Gelzyme L 500 a 0.7 %p/p en 120 minutos.

t (min)	Promedio %GH	Desviación estándar	Error estándar
10	0.00	0	0
20	0.00	0	0
30	0.00	0	0
40	0.00	0	0
50	0.00	0	0
60	0.00	0	0
70	0.00	0	0
80	0.00	0	0
90	0.00	0	0
100	0.00	0	0
110	0.00	0	0
120	0.00	0	0

Tabla 8.

Resultados del grado de hidrólisis de sangre bovina a 60 °C y pH 9 con una concentración de Gelzyme L 500 a 0.7 %p/p en 120 minutos.

t (min)	Promedio %GH	Desviación estándar	Error estándar
10	1.52	0.24	0.17
20	2.19	0.72	0.51
30	3.20	1.18	0.84
40	3.54	1.20	0.85
50	4.04	1.43	1.01
60	4.37	1.90	1.34
70	4.88	1.66	1.18
80	5.21	1.67	1.18
90	5.54	2.12	1.50
100	5.73	2.38	1.68
110	5.72	2.37	1.68
120	5.72	2.38	1.68

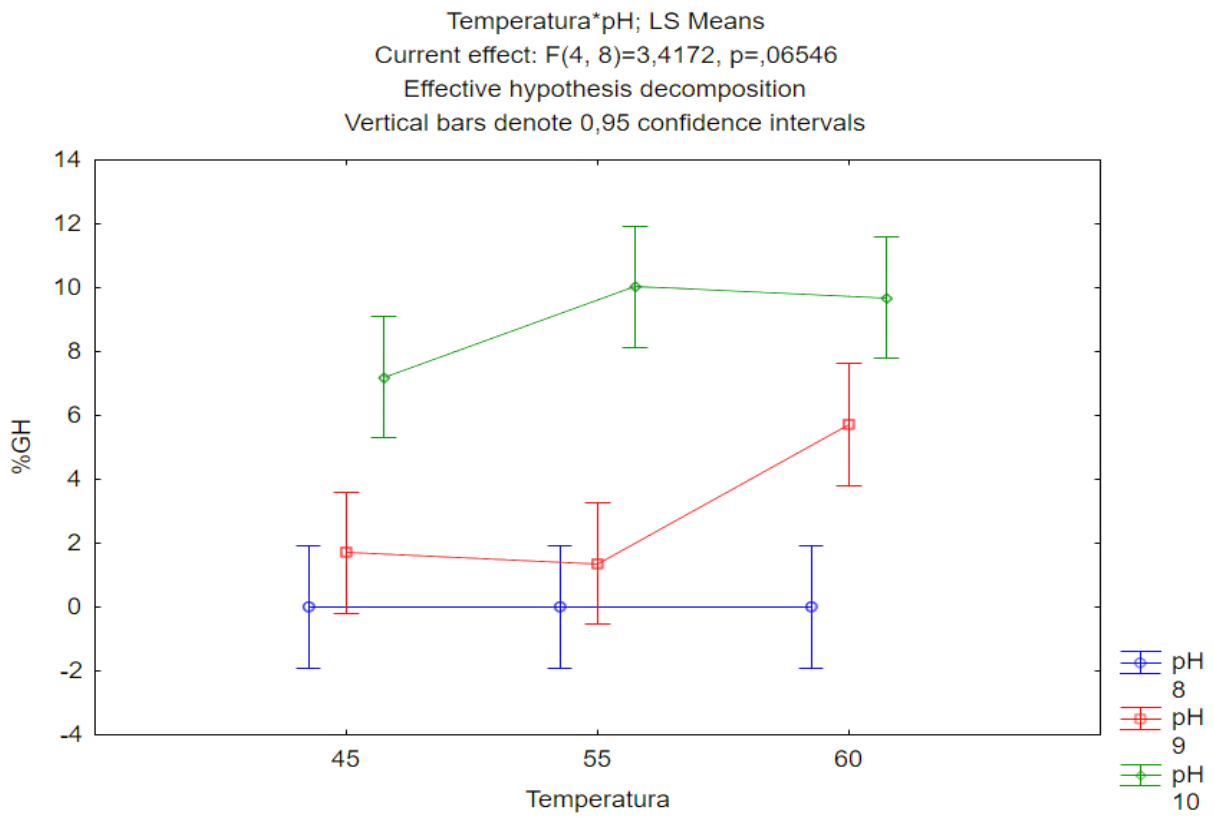
Tabla 9.

Resultados del grado de hidrólisis de sangre bovina a 60 °C y pH 10 con una concentración de Gelzyme L 500 a 0.7 %p/p en 120 minutos.

t (min)	Promedio %GH	Desviación estándar	Error estándar
10	5.01	0.47	0.33
20	7.69	0.47	0.33
30	7.86	0.71	0.50
40	8.19	0.71	0.50
50	9.19	0.71	0.50
60	9.19	0.71	0.50
70	9.19	0.71	0.50
80	9.69	1.42	1.00

90	9.69	1.42	1.00
100	9.69	1.42	1.00
110	9.69	1.42	1.00
120	9.69	1.42	1.00

Figura 1. Gráfico ANOVA para la interacción T*pH.



Apéndice D. Resultados de los diferentes tratamientos relación E/S con Gelzyme L 500 y tiempo para contenido de hierro hemo en sangre bovina.

Tabla 1.

Resultados del grado de hidrólisis de sangre bovina a 55 °C y pH 10 con una concentración de Gelzyme L 500 a 0.75 %p/p en 90 minutos.

t (min)	Promedio %GH	Desviación estándar	Error estándar
10	3.68	0.47	0.33
20	4.18	1.18	0.84
30	5.52	1.18	0.84
40	6.35	0.95	0.67
50	6.52	1.18	0.84
60	7.19	0.71	0.50
70	7.69	0.95	0.67
80	8.02	1.42	1.00
90	8.02	1.42	1.00

Tabla 2.

Resultados del grado de hidrólisis de sangre bovina a 55 °C y pH 10 con una concentración de Gelzyme L 500 a 1.25 %p/p en 90 minutos.

t (min)	Promedio %GH	Desviación estándar	Error estándar
10	5.35	0.00	0.00
20	7.02	0.47	0.33
30	9.19	0.71	0.50
40	10.20	0.24	0.17
50	11.53	0.24	0.17
60	11.87	0.23	0.17

70	12.87	0.24	0.17
80	13.54	0.24	0.17
90	13.54	0.24	0.17

Tabla 3.

Resultados del grado de hidrólisis de sangre bovina a 55 °C y pH 10 con una concentración de Gelzyme L 500 a 1.75 %p/p en 90 minutos.

t (min)	Promedio %GH	Desviación estándar	Error estándar
10	9.86	1.18	0.84
20	10.36	0.47	0.33
30	12.37	0.47	0.33
40	12.37	0.47	0.33
50	14.54	0.71	0.50
60	14.88	0.23	0.17
70	15.21	0.24	0.17
80	16.05	0.00	0.00
90	16.55	0.71	0.50