

Estudio de la hidrólisis enzimática de sangre bovina y la estabilidad del hierro hemo obtenido

Adriana Marcela Gutiérrez Sarabia y Yamile Ardila Larrahondo

Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero Químico

Modalidad de Trabajo de Investigación

Directora

Viviana Sánchez Torres

Ing. Química, Ph. D.

Codirectora

María Angélica Angarita Rangel

Ing. Química, Mg.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2026

### **Dedicatoria**

A Dios, por ser mi refugio y fortaleza, por iluminar mi camino y darme la sabiduría necesaria para culminar esta etapa importante de mi vida.

A mi madre, mi mayor ejemplo de fortaleza, amor y entrega, a quien debo cada uno de los logros que hoy puedo celebrar. Por ser el pilar que sostuvo cada paso de este camino y la fuerza que nunca permitió que me rindiera. Este logro no habría sido posible sin su presencia y apoyo.

A Manuel Francisco Lara, por su apoyo incondicional y compañía a lo largo de mi vida.

A Ana Dolores Villegas, quien desde el cielo continúa acompañándome; gracias por creer en mí y por dejar una huella imborrable en mi vida.

A mi familia y amigos, por su respaldo, comprensión y palabras de aliento durante este camino.

A mi compañera de tesis, Yamile Ardila, por su apoyo constante durante el desarrollo de este trabajo y en la universidad, por su amistad, compromiso y por hacer este camino más fácil.

A Yuli Rojas, por su apoyo y colaboración durante el desarrollo del proyecto.

A la codirectora de este proyecto, María Angelica Angarita, por su disposición, paciencia y valiosa orientación para la culminación exitosa de este trabajo.

A la profesora Viviana Sánchez, directora de este proyecto, por confiar en mí, por brindarme la oportunidad de formar parte de este trabajo de grado y por su guía académica, con la cual doy cierre a mi etapa universitaria.

Finalmente, a la Universidad Industrial de Santander, por ser el espacio de formación académica y crecimiento personal que hizo posible este logro.

Adriana Marcela Gutiérrez Sarabia

### **Dedicatoria**

A mis padres, cuyo esfuerzo, sacrificio y amor incondicional hicieron posible culminar esta etapa tan importante de mi vida. Gracias por ser mi luz, mi motivación y la razón de cada uno de mis esfuerzos y dedicación.

A mis hermanos, por ser mi guía y mi ejemplo a seguir, por su apoyo constante y por creer siempre en mí.

A Adriana, por ser la persona con quien compartí cada paso de este camino, por tu amistad sincera, por tu dedicación y por acompañarme durante todo este proyecto y nuestro recorrido universitario.

A María Angélica Angarita, Viviana Sánchez y Yuli Rojas, por todo el apoyo brindado, por su tiempo, dedicación, ayuda y paciencia, que hicieron posible desarrollar este proyecto de la mejor manera.

A mis amigos Stephanie y Deivys, quienes han estado conmigo desde el primer día. Gracias por su compañía, consejos, apoyo incondicional y por impulsarme siempre a convertirme en una gran profesional.

Yamile Ardila Larrahondo.

**Lista de contenido**

Introducción .....	12
1. Objetivos .....	14
1.1 Objetivo general.....	14
1.2 Objetivo específico .....	14
2. Marco conceptual.....	15
2.1 Sangre bovina.....	15
2.2 Proteínas.....	16
2.2.1 Enzima .....	16
2.2.2 Hemoglobina.....	17
2.3 Hierro .....	18
2.3.1 Hierro hemo .....	19
2.3.2 Hierro no hemo .....	19
2.4 Análisis del tamaño de proteínas mediante SDS-PAGE.....	19
3. Estado del arte.....	21
4. Metodología.....	24
4.1 Etapa I. Determinación del efecto del tipo de enzima sobre el grado de hidrolisis .....	24
4.2 Etapa II. Evaluación del efecto de la relación enzima/sustrato y tiempo de hidrolisis durante la reacción de hidrólisis sobre la estabilidad del hierro hemo en los hidrolizados, contenido de hierro hemo y la distribución de tamaño.....	27

4.2.1 Cuantificación de hierro hemo .....	27
4.2.2 Análisis estadístico.....	28
4.2.3 Estabilidad del hierro hemo .....	29
4.2.4 Distribución de tamaño .....	30
5. Resultados .....	31
5.1 Hidrolisis enzimática .....	31
5.1.1 Grado de hidrólisis .....	31
5.2 Efecto de la relación enzima/sustrato y del tiempo de hidrólisis.....	32
5.2.1 Cuantificación de hierro hemo .....	32
5.2.2 Análisis estadístico ANOVA .....	34
5.2.2.1Metodo Tukey .....	38
5.3 Estabilidad de hierro hemo .....	39
5.4 Distribución del tamaño.....	41
6. Conclusiones .....	44
Referencias bibliográficas.....	45
Apéndices .....	53

**Lista de Tablas**

<b>Tabla 1</b> Diseño factorial de los tratamientos aplicados con Gelzyme L-500 y Alcalasa 2,4L en función de los niveles de relación enzima/sustrato y del tiempo de hidrólisis .....	28
<b>Tabla 2</b> Análisis de varianza ( $p < 0,05$ ) para la interacción entre la relación enzima/sustrato y tiempo .....	35

### Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la estructura general de una proteína.....	16
<b>Figura 2.</b> Organización estructural de la hemoglobina .....	18
<b>Figura 3.</b> Esquema de la carga de muestras, aplicación del campo eléctrico y separación de proteínas por SDS-PAGE en función del peso molecular .....	20
<b>Figura 4.</b> Esquema general de la metodología desarrollada en el proyecto.....	24
<b>Figura 5.</b> Resultados del grado de hidrólisis utilizando las enzimas; Gelzyme L-500, Alcalasa 2,4L y Flavourzyme a una concentración de 1,25% p/p en función de temperatura (55, 53 y 50 °C) y pH (10, 8,3 y 10) en 500 mL de sangre bovina .....	31
<b>Figura 6.</b> Variación de la concentración de hierro hemo en función de la relación enzima/sustrato (0,75, 1,25, 1,75 y 2,25% p/p) y del tiempo de hidrólisis (0, 30, 60, 90 y 120 min) con Gelzyme L-500.....	33
<b>Figura 7.</b> Variación de la concentración de hierro hemo en función de la relación enzima/sustrato (0,75, 1,25, 1,75 y 2,25% p/p) y del tiempo de hidrólisis (0, 30, 60, 90 y 120 min) con Alcalasa 2,4L .....	34
<b>Figura 8.</b> Representación gráfica ANOVA para el efecto del factor enzima/sustrato en el contenido de hierro hemoRepresentación gráfica ANOVA para el efecto del factor enzima/sustrato en el contenido de hierro hemo.....	36
<b>Figura 9.</b> Representación gráfica ANOVA para el efecto del factor tiempo en el contenido de hierro hemo .....	37
<b>Figura 10.</b> Representación gráfica ANOVA del efecto entre la relación E/S, el tiempo y el tipo de enzima sobre el contenido de hierro hemo.....	38

<b>Figura 11.</b> Estabilidad del hierro hemo durante 7 días en refrigeración y congelación de los hidrolizados de la relación E/S 1,75% p/p de Alcalasa 2,4L .....	40
<b>Figura 12.</b> Efecto de la relación enzima/sustrato sobre la distribución del peso molecular de proteínas en hidrolizados de sangre bovina a 120 min, con referencia a la muestra sin hidrolizar .....	41
<b>Figura 13.</b> Perfil proteico de los hidrolizados de sangre bovina obtenidos con Alcalasa 2,4L (E/S 2,25% p/p) con respecto al tiempo.....	43

**Lista de Apéndices**

<b>Apéndice A</b>	Análisis bromatológico de la sangre bovina realizado por el CICTA .....	53
<b>Apéndice B</b>	Resultados del grado de hidrólisis para diferentes relaciones enzima/sustrato.....	54
<b>Apéndice C</b>	Curva de calibración para la medición de hierro hemo .....	55
<b>Apéndice D</b>	Resultados del Test Tukey para los tratamientos evaluado .....	58
<b>Apéndice E</b>	Curva de calibración para la cuantificación del peso molecular por SDS-PAGE ...	60

### Resumen

**Título:** Estudio de la hidrólisis enzimática de sangre bovina y la estabilidad del hierro hemo obtenido\*

**Autor:** Adriana Marcela Gutiérrez Sarabia, Yamile Ardila Larrahondo\*\*

**Palabras Clave:** Hidrólisis enzimática, hierro hemo, SDS-PAGE, grado de hidrólisis, sangre bovina.

**Descripción:** La producción cárnica en Colombia genera grandes volúmenes de sangre bovina que representan un riesgo ambiental significativo por su alta carga orgánica; sin embargo, este subproducto posee un alto valor nutricional debido a que se compone entre un 15 y 18% de proteínas. El presente estudio evaluó la hidrólisis enzimática como tecnología para transformar este residuo en una fuente de hierro hemo, el cual presenta una biodisponibilidad superior (15-35%) en comparación con el hierro inorgánico. Inicialmente, se comparó el efecto de las enzimas Gelzyme L-500, Alcalasa 2,4L y Flavourzyme sobre el grado de hidrólisis (GH). Posteriormente, las enzimas que presentaron los mayores valores de GH fueron evaluadas a diferentes relaciones enzima/sustrato con el fin de determinar su efecto sobre el contenido de hierro hemo. Los resultados indicaron que Gelzyme L-500 alcanzó el GH más alto (9,86%); sin embargo, la hidrólisis con Alcalasa 2,4L, en una relación enzima/sustrato de 1,75% durante 120 minutos, fue la condición más efectiva para maximizar el contenido de hierro hemo. El análisis mediante SDS-PAGE confirmó que el tratamiento enzimático permitió una fragmentación exitosa de las proteínas hacia péptidos de bajo peso molecular (entre 16 y 105 kDa). Finalmente, el hidrolizado obtenido con Alcalasa en una relación E/S de 1,75% fue sometida a estudios de estabilidad en el tiempo, determinándose que la congelación a  $-18^{\circ}$  C es el método de almacenamiento óptimo para preservar la integridad del grupo hemo y prevenir su degradación.

---

\*Trabajo de Grado

\*\*Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: Viviana Sánchez Torres, Ingeniera Química, PhD. Codirectora: María Angelica Angarita, Ingeniera Química, Mg.

### Abstract

**Title:** Study of the enzymatic hydrolysis of bovine blood and the stability of the heme iron obtained\*

**Author:** Adriana Marcela Gutiérrez Sarabia, Yamile Ardila Larrahondo\*\*

**Key Words:** Enzymatic hydrolysis, heme iron, SDS-PAGE, degree of hydrolysis, bovine blood.

**Description:** Meat production in Colombia generates large volumes of bovine blood, which represent a significant environmental risk due to their high organic load; however, this by-product has high nutritional value, as it contains approximately 15–18% protein. The present study evaluated enzymatic hydrolysis as a technology to transform this residue into a source of heme iron, which exhibits higher bioavailability (15–35%) compared to inorganic iron. Initially, the effect of the enzymes Gelzyme L-500, Alcalase 2.4L, and Flavourzyme on the degree of hydrolysis (DH) was compared. Subsequently, the enzymes that showed the highest DH values were evaluated at different enzyme-to-substrate ratios to determine their effect on heme iron content. The results indicated that Gelzyme L-500 achieved the highest DH (9.86%); however, hydrolysis with Alcalase 2.4L at an enzyme-to-substrate ratio of 1.75% for 120 minutes was the most effective condition for maximizing heme iron content. SDS-PAGE analysis confirmed that enzymatic treatment enabled successful protein fragmentation into low molecular weight peptides (between 16 and 105 kDa). Finally, the hydrolysate obtained with Alcalase at an E/S ratio of 1.75% was subjected to stability studies over time, determining that freezing at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  is the optimal storage method to preserve the integrity of the heme group and prevent its degradation.

---

\*Bachelor Thesis

\*\*Physicochemical Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Director: Viviana Sánchez Torres, Chemical Engineer, PhD. Co-director: María Angelica Angarita, Chemical Engineer, MSc.

## Introducción

En los últimos años, la necesidad de aprovechar mejor los recursos y reducir la contaminación ha llevado a buscar soluciones que permitan dar valor a los residuos generados por la industria alimentaria. En Colombia, la producción cárnica genera grandes cantidades de subproductos, entre ellos la sangre bovina, que suele ser desechada y representa un riesgo ambiental por su alta carga orgánica y contenido de nitrógeno, capaz de contaminar fuentes hídricas (Nazifa et al., 2021). Durante el tercer trimestre de 2025, el sacrificio de ganado vacuno en Colombia alcanzó 880.183 cabezas, un crecimiento de 6,8 % frente al mismo trimestre de 2024 al sacrificar 56.195 cabezas más (DANE, 2025). Este incremento implica mayor generación de sangre en plantas de beneficio, un subproducto con potencial alto de valorización, pero también con riesgo ambiental si se descarga sin tratamiento.

Entre estos problemas, la deficiencia de hierro destaca como la carencia micronutricional más común a nivel mundial y nacional, asociada a anemia y deterioro de la salud pública. En Colombia, afecta a más del 20 % de la población infantil y a un porcentaje significativo de mujeres en edad fértil (INS, 2019). Desde la perspectiva nutricional, la sangre bovina presenta una composición proteica elevada aproximadamente un 17–20 % y una fracción celular rica en hemoglobina, que puede representar el 90 % de las proteínas de los eritrocitos (Abou-Diab et al., 2021). Este perfil convierte a la sangre en una materia prima atractiva para la obtención de péptidos bioactivos y complejos péptido-hierro, aprovechando el carácter hemo del hierro asociado a la hemoglobina, con mejores tasas de absorción que las sales inorgánicas tradicionales (Banjari & Hjartaker, 2018; Abou-Diab et al., 2021).

El hierro en forma hemo exhibe una absorción superior del 15–35 % frente a compuestos inorgánicos 2–20 % (Banjari et al., 2018). Sin embargo, la hemoglobina entera no es la mejor

alternativa por problemas de solubilidad y sabor; aquí surge la hidrólisis enzimática como tecnología clave para liberar péptidos hemo con alta estabilidad digestiva (Zhu et al., 2024). La hidrólisis enzimática requiere del control de condiciones fisicoquímicas como el pH y la temperatura según el tipo de enzima que se emplea, influyendo en el grado de hidrólisis y el tamaño de los fragmentos de proteínas obtenidos (Bah et al, 2016).

Este trabajo de investigación busca determinar cómo el tipo de enzima, la relación enzima/sustrato y el tiempo de reacción influyen en el grado de hidrólisis, el contenido de hierro hemo, la estabilidad del hierro hemo y la distribución de tamaños proteicos en hidrolizados de sangre bovina. Con ello se pretende identificar las condiciones que favorecen la liberación de péptidos hemo y preservan el hierro en formas más estables.

## **1. Objetivos**

### **1.1 Objetivo general**

Evaluar las condiciones de hidrólisis enzimática de sangre bovina que favorezcan la estabilidad del contenido de hierro hemo en los hidrolizados.

### **1.2 Objetivos específicos**

Determinar el efecto del tipo de enzima sobre el grado de hidrólisis.

Analizar el efecto de la relación enzima/sustrato y tiempo de hidrólisis durante la reacción de hidrólisis sobre la estabilidad del hierro hemo en los hidrolizados, contenido de hierro hemo y la distribución de tamaño.

## 2. Marco conceptual

### 2.1 Sangre bovina

La sangre bovina es un fluido biológico de naturaleza compleja que circula a través del sistema vascular del ganado bovino y cumple funciones esenciales para el transporte de oxígeno y nutrientes, así como la eliminación de los compuestos residuales del metabolismo. Se compone de 80 a 85% de agua, 15 a 18% de proteínas, 2% de carbohidratos y bajas concentraciones lípidos y minerales. Sus características fisicoquímicas pueden variar en función de las condiciones fisiológicas y productivas del animal (Barragán & Sánchez, 2013), manteniendo un pH ligeramente alcalino (7,2 – 7,5) a temperatura ambiente (Barut et al., 2020; Dafferner et al., 2017).

Estructuralmente, la sangre bovina está constituida por una fracción líquida denominada plasma que representa la mayor proporción del volumen total y por una fracción celular (Barragán & Sánchez, 2013). El plasma actúa como medio de suspensión y transporte de los componentes celulares, caracterizándose por un elevado contenido de agua y una proporción significativa de sólidos disueltos entre los cuales destacan proteínas de alto valor como la albúmina, las globulinas y el fibrinógeno. Asimismo, contiene electrolitos, compuestos nitrogenados, hormonas y vitaminas que interviene en múltiples funciones fisiológicas y regula el equilibrio osmótico y ácido-base del organismo (Del Hoyo Gonzáles, 2012).

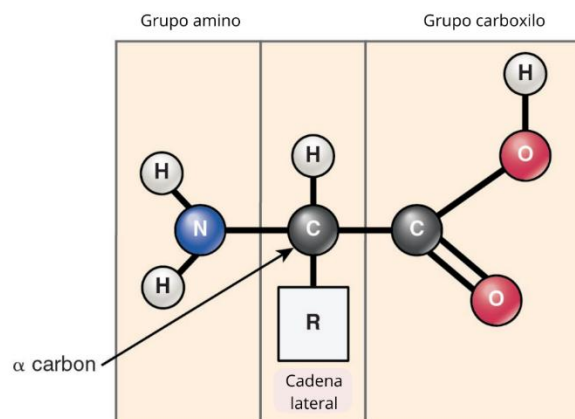
La fracción celular es el conjunto de eritrocitos, leucocitos y plaquetas presentes en la sangre. Está compuesta aproximadamente entre 25 a 29 % de proteínas, de las cuales la hemoglobina, localizada en los eritrocitos representa el 85,5%. Esta fracción concentra alrededor del 60% del contenido proteico total sanguíneo (Rocha Sanchez, 2006).

## 2.2 Proteínas

Son macromoléculas biológicas constituidas principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, pudiendo incorporar otros elementos como azufre, fósforo y otros metales dependiendo de su naturaleza específica. Se estructuran por la unión secuencial de aminoácidos mediante enlaces peptídicos, donde cada aminoácido presenta un grupo amino, un grupo carboxilo y un radical lateral enlazados a un carbono central (Luque Guillén, 2009). La estructura de la proteína se ilustra en la Figura 1.

### Figura 1

*Representación esquemática de la estructura general de una proteína*



*Nota.* Adaptado de *Estructura de Aminoácidos* [JPEG], por OpenStax College – Anatomía y Fisiología, 2013, sitio Web Connexions (<http://cnx.org/content/col11496/1.6/>). CC BY 3.0

Donde, A representa la estructura cuaternaria de la molécula de hemoglobina y B la estructura química del grupo hemo.

### 2.2.1 Enzima

Son biomoléculas de naturaleza proteica que actúan como catalizadores biológicos en las reacciones químicas que ocurren en los sistemas celular sin ser consumidas en el proceso. Su eficiencia catalítica y su alto grado de especificidad les permiten la transformación de sustratos

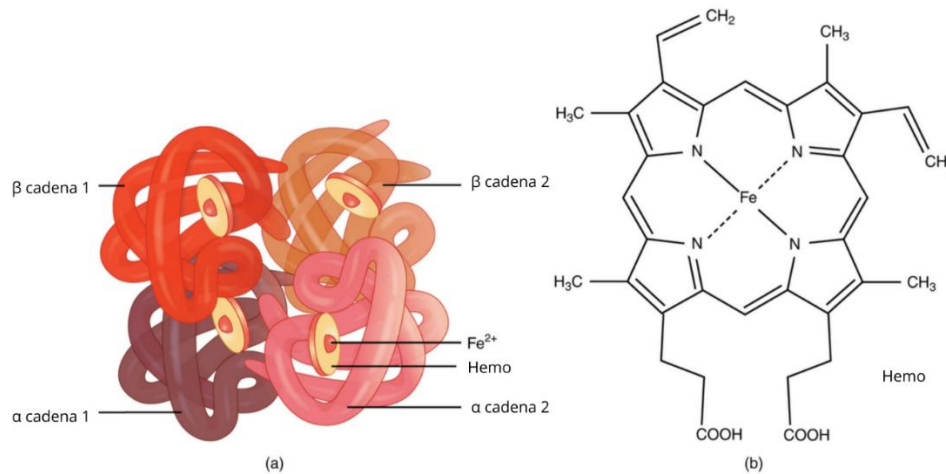
particulares incluso en presencia de otras sustancias (Del Moral et al., n.d.). Además, pueden modificar las características fisicoquímicas de los alimentos, como textura, apariencia, valor nutricional y propiedades sensoriales (Nelson & Cox, 2009; Obregón, 2008) lo que ha fortalecido su papel en aplicaciones biotecnológicas donde la acción catalítica de las enzimas posibilita procesos de hidrólisis más selectivos y eficientes (Robinson, 2015).

En este contexto, la hidrólisis enzimática es un proceso de conversión bioquímica mediante el cual las proteínas son divididas de forma controlado en péptidos y aminoácidos libres a través de la acción específica de enzimas proteolíticas endógenas o exógenas. La ruptura de los enlaces peptídicos provoca una disminución del peso molecular y la alteración de la estructura terciaria de las proteínas modificando sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Este método se lleva mediante condiciones controladas de pH y temperatura lo que permite preservar la integridad funcional de los productos y reducir reacciones secundarias (Kalita et al., 2024).

El perfil final del hidrolizado está determinado por variable como el tipo de la enzima, la naturaleza del sustrato proteico, el grado de hidrólisis y las estrategias de separación y purificación aplicadas (Akbarian et al., 2022).

### **2.2.2 Hemoglobina**

Es una proteína de naturaleza globular presente en los eritrocitos, cuya función principal es el transporte reversible de oxígeno a través del sistema circulatorio. Su estructura se caracteriza por cuatro cadenas polipeptídicas organizadas en dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\beta$ , cada una asociada a un grupo hemo. Este grupo tiene una estructura conformada por un anillo de porfirina (C, H, N) unido a un átomo de hierro en estado ferroso y un átomo de oxígeno (Castellano Jerez, 2024). La organización estructural de la hemoglobina se esquematiza en la Figura 2.

**Figura 2***Organización estructural de la hemoglobina*

*Nota.* Adaptado de *Hemoglobina* [JPEG], por OpenStax College – Anatomía y Fisiología, 2013, sitio Web Connexions (<http://cnx.org/content/col11496/1.6/>). CC BY 3.0

Donde, A representa la estructura cuaternaria de la molécula de hemoglobina y B es la estructura química del grupo hemo.

**2.3 Hierro**

Es un elemento metálico ampliamente distribuido en la naturaleza (Unigarro, 2011). Es esencial para las múltiples funciones biológicas (transporte y metabolismo del oxígeno, la respiración celular, la síntesis de ácidos nucleicos, entre otros) (Condezo & Izaguirre Orihuela, 2018).

En el organismo cerca del 70% del hierro total se encuentra asociado a la hemoglobina, cerca de un 25% se almacena en forma de ferritina y hemosiderina, alrededor del 4% forma parte de la mioglobina y el 1% restante se distribuye entre la transferrina y demás enzimas (Saavedra Díaz, 2010).

### **2.3.1 Hierro hemo**

Es la forma del hierro presente exclusivamente en alimentos de origen animal, donde se encuentra integrado en estructuras como la hemoglobina y mioglobina. En los alimentos presenta una alta biodisponibilidad con una absorción entre el 20 y 30% (Suárez, 2021).

### **2.3.2 Hierro no hemo**

Es la forma del hierro presente en alimentos de origen vegetal, aunque también puede encontrarse en algunos productos de origen animal (yema de huevo y las vísceras). Su absorción es baja, entre el 3 y 8%, y depende de diversos factores dietarios que favorecen o inhiben su solubilidad aprovechamiento (Gonzalez Carrión & Hernández Valdivia, 2012).

## **2.4 Análisis del tamaño de proteínas mediante SDS-PAGE**

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) es una técnica analítica ampliamente utilizada para la separación, visualización y caracterización de proteínas en función de su peso molecular permitiendo evaluar la degradación proteica (Akbarian et al., 2022).

La técnica se basa en la desnaturalización previa de las proteínas mediante SDS, un detergente aniónico que se une a las cadenas polipeptídicas en una proporción prácticamente constante, confiriéndoles una carga negativa uniforme y eliminando la influencia de la conformación tridimensional y de la carga intrínseca.

El sistema de separación emplea un gel de poliacrilamida compuesto por dos capas: un gel concentrador, de baja concentración de acrilamida, y un gel separador, de mayor concentración. El gel concentrador permite agrupar las proteínas en bandas finas antes de su ingreso al gel separador, donde la porosidad del gel actúa como un tamiz molecular que posibilita la separación

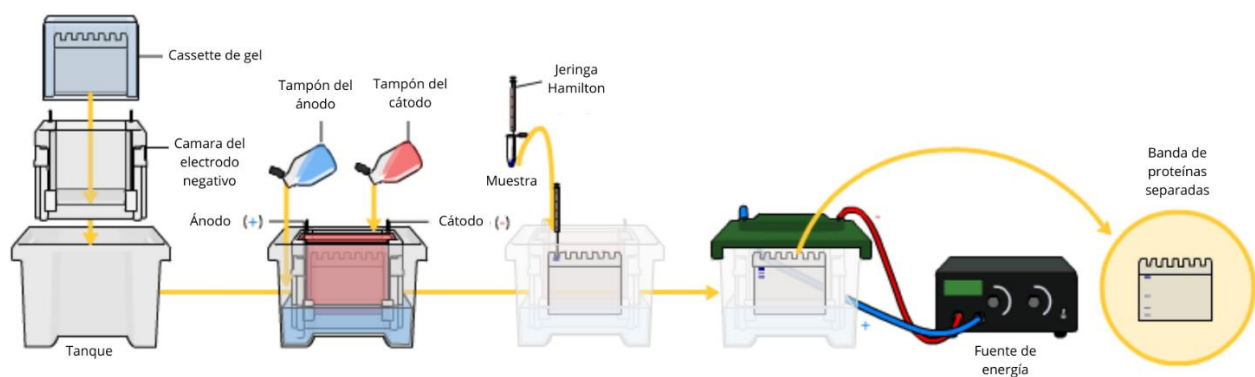
de las proteínas en función de su tamaño, siendo las de menor peso molecular las que migran más rápidamente (Roy & Kumar, 2014).

Previo a la electroforesis, las muestras proteicas se mezclan con un tampón de carga que contiene SDS, el agente reductor, glicerol para aumentar la densidad de la muestra y un colorante trazador. Posteriormente, las mezclas se someten a calentamiento para garantizar la desnaturalización completa de las proteínas. Las muestras preparadas se cargan en los pocillos del gel junto con un marcador de peso molecular, el cual permite estimar el tamaño de las proteínas separadas (Roy & Kumar, 2014).

Durante la electroforesis, el gel se coloca en una cámara con tampón de corrida y se aplica un campo eléctrico, provocando la migración de las proteínas desnaturalizadas hacia el ánodo debido a su carga negativa inducida por el SDS. Como resultado, la separación se produce exclusivamente en función del peso molecular (Costa, 2024).

### Figura 3

*Esquema de la carga de muestras, aplicación del campo eléctrico y separación de proteínas por SDS-PAGE en función del peso molecular*



*Nota.* Adaptado de *Electróforesis de SDS-PAGE*, por Bensaccount, Wikimedia Commons, 2009,

([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SDS-PAGE\\_Electrophoresis.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SDS-PAGE_Electrophoresis.png)). CC BY 3.0

### 3. Estado del arte

Actualmente, las industrias agroalimentarias tienen la gran necesidad de encontrar diversas soluciones para reducir los problemas medioambientales generados por subproductos no valorizados (Van Der Goot et al., 2016). De manera que, se han llevado a cabo diversos estudios y avances científicos enfocados en la valorización de la sangre bovina como un recurso valioso para la fortificación de alimentos, utilizando la hidrólisis enzimática como su principal método (Burdock et al., 2006). M. J. In et al. emplearon un método efectivo para la separación de péptidos enriquecidos en hierro hemo a partir de hemoglobina bovina mediante hidrólisis enzimática. Se llevó a cabo la hidrólisis con las enzimas Esperase y Flavourzyme 7,5 pH, 50 °C con una relación enzima/proteína de 1,0% p/p. Se observó que los grados de hidrólisis después de 480 minutos alcanzaron el 12,8% para Flavourzyme y el 14,2% para Esperase. La relación hemo/péptido fue mayor con un 11,4% para Esperase y 4,56% para Flavourzyme, en comparación con el 3,8% de la hemoglobina intacta (Cian et al., 2010).

En el contexto nacional, se evidenció un estudio donde se empleó la hidrólisis enzimática de hemoglobina bovina utilizando Alcalasa 2,4L para la obtención de hierro hémico con el fin de elaborar leche saborizada fortificada. En esta investigación, se logró evaluar el efecto del pH, la concentración inicial de sustrato y la relación enzima/sustrato sobre el grado de hidrólisis. La hidrólisis se llevó a cabo en un tiempo de 2 horas a 55°C de temperatura y en un rango de pH de 7,3 a 10,7. Finalmente, los resultados indicaron que las condiciones óptimas para obtener el mayor grado de hidrólisis (36,25%) fueron: 8,1 pH, S0 de 6,6 % (p/v), y E/S de 14,7% (p/p), destacando que la relación enzima/sustrato es el factor con mayor significancia sobre el grado de hidrólisis (Arias et al., 2018).

En el grupo de investigación CICTA de la Universidad Industrial de Santander, se han llevado a cabo diversos trabajos de investigación empleando el uso de la sangre de bovino. En un estudio, se planteó una estrategia para la obtención de péptidos de alto valor nutricional que permita la valorización de la sangre bovina mediante hidrólisis enzimática con Alcalasa 2,4L y la clarificación de los hidrolizados mediante fraccionamiento con membranas cerámicas, como resultado se estableció que las mejores condiciones de hidrólisis con la enzima Alcalasa 2,4L fueron temperatura de 53 °C, pH de 8,3 y concentración de enzima de 0,76% p/p (Monroy Rodríguez, 2013).

En otro estudio, se evaluaron las técnicas con membranas aplicadas a la sangre de bovino cruda e hidrolizada, este estudio demostró que se presentó un alto porcentaje de proteínas con un 68% para el permeado de sangre hidrolizada lo que permite considerar la valorización de la sangre bovina como un aditivo potencial para la industria alimentaria (Acosta Camacho & Ríos Morales, 2013). Actualmente, el grupo de investigación CICTA está ejecutando el proyecto 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”. En el marco de este proyecto se realizó un trabajo de grado cuyo objetivo fue valorizar la sangre de bovino mediante la hidrólisis enzimática para la obtención de hierro hemínico empleando la enzima Gelzyme L-500, obtuvieron como resultado un grado de hidrólisis de 10,03% a 55 °C con pH 10, siendo estas las condiciones óptimas encontradas y concluyeron que la mayor concentración de hierro hemo fue de 5191,8 mg/L con una relación enzima/sustrato al 1,25 %p/p (Parra Jaimes & Prada Morales, 2024).

La estabilidad del hierro hemo ha sido un tema poco estudiado, sin embargo, estudios previos indican que se presenta inestabilidad del grupo hemo frente a cambios de temperatura o tiempo de almacenamiento, evidenciado en la disminución del contenido de hierro hemo entre: carne de cordero cruda, asada o cocida (Pourkhalili et al., 2013), entre diferentes lotes de sangre de atún (Tansukkasem et al., 2023), después de cinco ciclos de congelación y descongelación de pescado (Turhan et al., 2006) y luego de 8 meses de almacenamiento de alimentos fortificados (Martínez Graciá et al., 2000).

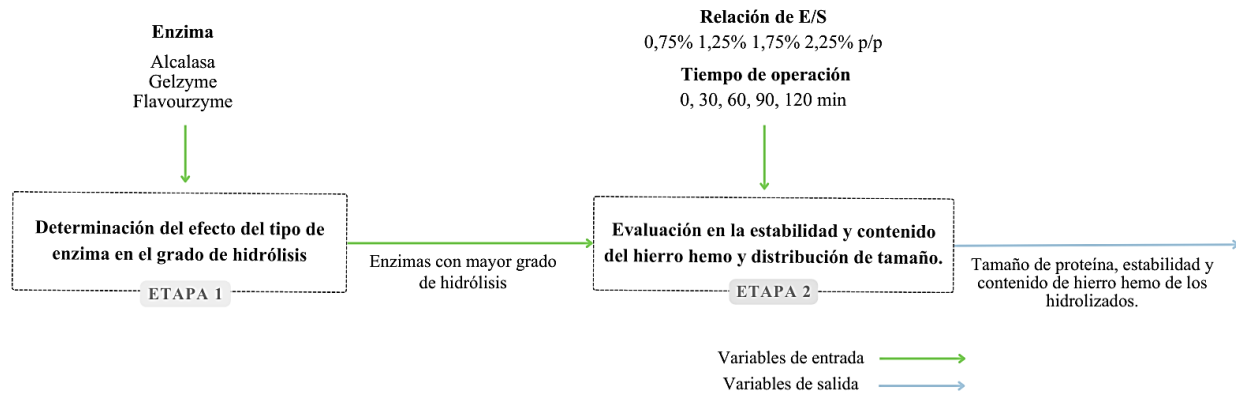
En el contexto de la valorización de la sangre bovina, este trabajo de investigación busca aportar conocimiento sobre la obtención de hierro hemo a partir de este subproducto. Este trabajo de grado se enfocará en la utilización de diferentes condiciones de operación como: distintas enzimas, control de pH durante la reacción, temperaturas y tiempo de almacenamiento, con el fin de observar cuál de dichas combinaciones proporciona una mayor estabilidad de contenido de hierro hemo.

## 4. Metodología

El procedimiento realizado para el desarrollo de esta investigación tuvo dos etapas secuenciales. La Figura 4 ilustra el diagrama de flujo de la metodología empleada.

### Figura 4

*Esquema general de la metodología desarrollada en el proyecto*

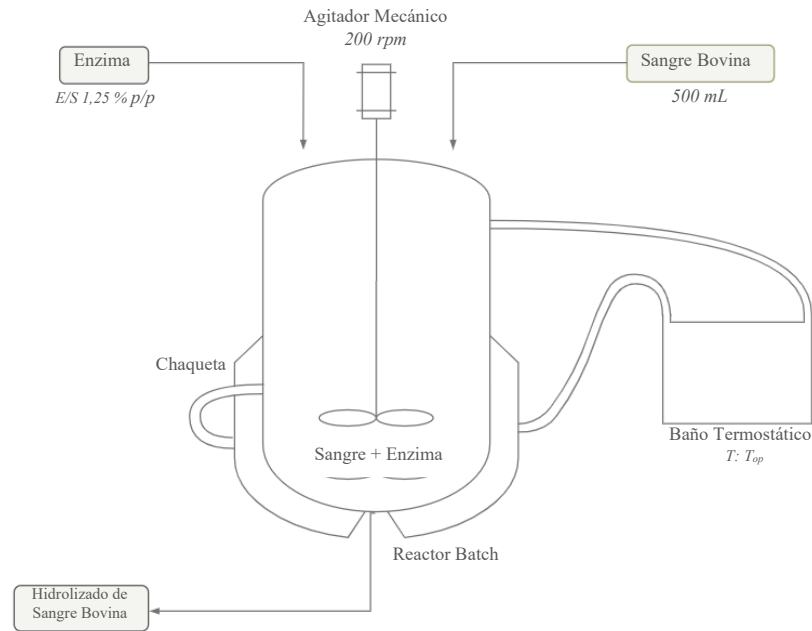


### 4.1 Etapa I. Determinación del efecto del tipo de enzima sobre el grado de hidrólisis

En cada ensayo por enzima se empleó un volumen de reacción de 500 mL de sangre bovina, suministrada por Colbeef S.A.S la cual se le adicionó citrato de sodio al 1,5% para evitar la coagulación. Cada muestra se sometió a hidrólisis enzimática en un reactor tipo batch, según el montaje mostrado en la Figura 5, utilizando condiciones reportadas en la literatura: Alcalasa 2,4L, pH 8,3 y 53 °C (Monroy Rodríguez, 2013); Gelzyme L-500, pH 10 y 55 °C (Parra Jaimes & Prada Morales, 2024); y Flavourzyme, pH 7 y 55 °C (Cian et al., 2010).

**Figura 5**

*Representación del montaje experimental para la hidrólisis de sangre bovina*



El pH de cada muestra se ajustó mediante una solución de NaOH 5N (Bacca Llain & Herreño Galván, 2024). El reactor se acondicionó a la temperatura de operación mediante un baño termostático con agitación mecánica a 200 rpm. Al mantener la temperatura requerida durante 10 minutos, se añadió la enzima correspondiente con una relación enzima/sustrato de 1,25 % p/p. El tiempo de reacción fue de 2 horas, registrando el pH cada 10 minutos (Parra Jaimes & Prada Morales, 2024).

Al finalizar la hidrólisis, se determinó el grado de hidrólisis (relación entre el número de enlaces peptídicos cortados en la hidrólisis y el número de enlaces peptídicos totales en la proteína nativa por unidad de peso  $h_t$ ), por el método del pH-estático mediante la titulación con una solución de NaOH 5N para llevar la muestra al pH inicial de cada condición de hidrólisis enzimática. Las ecuaciones empleadas para el cálculo se presentan a continuación, (Adler-Nissen, 1986):

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

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

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

En donde, B es el volumen de NaOH consumido [L], N<sub>B</sub> es la normalidad de la base,  $\alpha$  es el grado medio de disociación de los grupos  $\alpha - NH_2$ , que depende del pK y está asociado a la temperatura (Valencia et al., 2014) y Mp es la masa de proteína en kg. Con respecto al parámetro h<sub>t</sub>, se ha reportado un valor para proteínas de la sangre igual a 8,3 Eqv/kg (Márquez y Vázquez, 1999).

La masa total de proteína (Mp) presente en el sistema de reacción se estimó a partir de los valores de densidad de la sangre bovina ( $\rho_s = 1,0262 \text{ g/mL}$ ) reportados por Parra Jaime y Prada Morales (2024), y de la concentración proteica de la sangre ( $C_{p/s} = 0,1758 \text{ g proteína/g sangre}$ ), reportados en el estudio bromatológico efectuado por el laboratorio de servicios CICTA (Bacca Llain & Herreño Galván, 2024), ver Apéndice A, mediante la siguiente ecuación:

$$Mp = \rho_s \cdot V \cdot C_{p/s}$$

Determinando que un volumen de reacción de 500 mL de sangre bovina contiene 90,19 g de proteína.

Una vez calculado el grado de hidrólisis, la enzima fue desactivada en los hidrolizados mediante la adición de HCl 4N (Parra Jaimes & Prada Morales, 2024). Posteriormente, los hidrolizados se preservaron congelados a -18°C. Se evaluaron las dos enzimas que mostraron mayor efecto sobre el GH para continuar con la evaluación de la hidrólisis enzimática bajo la variación de la relación E/S y tiempo de reacción.

## **4.2 Etapa II. Evaluación del efecto de la relación enzima/sustrato y tiempo de hidrólisis sobre la estabilidad del hierro hemo en los hidrolizados, contenido de hierro hemo y la distribución de tamaño**

Se empleó el mismo montaje experimental de hidrólisis enzimática descrito en la Etapa 1. El estudio se realizó utilizando las dos enzimas previamente seleccionadas, evaluando el efecto de la relación enzima/sustrato y del tiempo de reacción sobre el proceso de hidrólisis, manteniendo constantes las condiciones operacionales establecidas en la etapa anterior.

Los niveles evaluados para la relación enzima/sustrato fueron 0,75, 1,25, 1,75 y 2,25% p/p, mientras que los tiempos de reacción considerados fueron 0, 30, 60, 90 y 120 minutos. En cada punto experimental se tomó una muestra de 5 mL de hidrolizado para los análisis posteriores.

### **4.2.1 Cuantificación de hierro hemo**

Las muestras de hidrolizado se diluyeron en relación 1:5 hidrolizado: agua destilada. Posteriormente, se tomaron 60  $\mu$ L de cada muestra, los cuales se hicieron reaccionar con 600  $\mu$ L metil-isobutil-cetona y 300  $\mu$ L HCl 4N. Las mezclas se sometieron a un baño ultrasónico durante 10 minutos; posteriormente, se adicionaron 300  $\mu$ L de agua destilada y se dejaron en reposo durante 20 minutos en oscuridad (Ardila Quintero, 2009).

Una vez finalizado el tiempo de reacción, se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos y se filtraron las muestras a través de un filtro PVDF 0,45  $\mu$ m para la determinación de la absorbancia a una longitud de onda de 640 nm, utilizando un espectrofómeto de microplacas (Multiskan fc, Thermo scientific) (Monroy Rodríguez, 2013). La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración construida a partir de soluciones patrón de hierro hemo (Hemin Chloride 3741-5GM, Sigma), con concentraciones entre 250 y 1750 mg/L, (Todaka et al., 2014)

#### 4.2.2 Análisis estadístico

Para el tratamiento de los datos se aplicó un diseño factorial completo 2 x 4 x 5 con réplica. Teniendo como variables de entrada el tipo de enzima, relación enzima/sustrato y el tiempo de hidrólisis. Los niveles de las variables evaluadas para los tratamientos con Gelzyme L-500 y Alcalasa 2,4L se presenta en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Diseño factorial de los tratamientos aplicados con Gelzyme L-500 y Alcalasa 2,4L en función de los niveles de relación enzima/sustrato y del tiempo de hidrólisis*

Tratamiento	Enzima	Relación E/S				Tiempo				
		0,75	1,25	1,75	2,25	0	30	60	90	120
1	Alcalasa	X				X				
2	Alcalasa	X					X			
3	Alcalasa	X						X		
4	Alcalasa	X							X	
5	Alcalasa	X								X
6	Alcalasa		X			X				
7	Alcalasa		X				X			
8	Alcalasa		X					X		
9	Alcalasa		X						X	
10	Alcalasa		X							X
11	Alcalasa			X		X				
12	Alcalasa			X			X			
13	Alcalasa			X				X		
14	Alcalasa			X					X	
15	Alcalasa			X						X
16	Alcalasa				X	X				
17	Alcalasa				X		X			
18	Alcalasa				X			X		
19	Alcalasa				X				X	
20	Alcalasa				X					X
21	Gelzyme	X				X				
22	Gelzyme	X					X			
23	Gelzyme	X						X		
24	Gelzyme	X							X	
25	Gelzyme	X								X
26	Gelzyme		X			X				

27	Gelzyme	X			X		
28	Gelzyme	X				X	
29	Gelzyme	X					X
30	Gelzyme	X					X
31	Gelzyme		X		X		
32	Gelzyme		X			X	
33	Gelzyme		X				X
34	Gelzyme		X				X
35	Gelzyme		X				X
36	Gelzyme			X	X		
37	Gelzyme			X		X	
38	Gelzyme			X			X
39	Gelzyme			X			X
40	Gelzyme			X			X

Estos resultados se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Este análisis permitió identificar los puntos experimentales con diferencias significativas y determinar la influencia de las variables estudiadas (Enzima, relación E/S y tiempo de reacción) sobre el sistema. A partir de estos resultados, se seleccionaron las mejores condiciones para el posterior estudio de estabilidad.

#### 4.2.3 Estabilidad del hierro hemo

Para la evaluación de la estabilidad del hierro hemo, los hidrolizados obtenidos tras la hidrólisis enzimática realizada bajo las condiciones seleccionadas a partir del análisis estadístico se almacenaron bajo condiciones de refrigeración (4 °C) y congelación (-18 °C) durante un periodo de siete días, contados a partir de la finalización de la hidrólisis. Durante este periodo, en los días 1, 3, 5 y 7, se determinó nuevamente el contenido de hierro hemo, con el fin de evaluar el comportamiento de la concentración en función del tiempo de almacenamiento y de los posibles cambios fisicoquímicos asociados.

#### 4.2.4 *Distribución de tamaño*

En el análisis se evaluó la distribución del tamaño molecular de las enzimas empleadas, la sangre sin hidrolizar y los hidrolizados obtenidos a diferentes relaciones enzima/sustrato por enzima. De igual forma, se analizó el comportamiento del patrón de degradación proteica a lo largo del tiempo para la enzima que presentó el mayor grado de hidrólisis.

La distribución del tamaño molecular de los hidrolizados se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Previo al análisis, las muestras se mezclaron con un buffer de tratamiento reductor que contenía SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol, y se sometieron a calentamiento para asegurar la desnaturalización completa de las proteínas. Posteriormente, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida compuestos por un gel concentrador (5 %) y un gel separador (12 %), preparados a partir de una solución de acrilamida/bisacrilamida (Bio-Rad Laboratories, 2024).

La electroforesis se llevó a cabo en un sistema vertical a voltaje constante, utilizando buffer de corrido Tris–glicina–SDS, lo que permitió la separación de las proteínas en función de su peso molecular. Finalizando, los geles se tiñeron con azul de Coomassie G-250 y se sometieron a un proceso de desteñido hasta obtener un contraste adecuado de las bandas proteicas (Bio-Rad Laboratories, 2024).

Para determinar la movilidad relativa ( $R_f$ ) de las bandas proteicas se utilizó el software GelAnalyzer 23.1. A partir de los  $R_f$  del marcador de peso molecular, se construyó la curva de calibración Log (PM) vs  $R_f$ , para determinar el peso molecular de las proteínas presentes en las muestras y analizar el patrón completo de migración (distribución del tamaño proteico). La curva de electroforesis se presenta en el Apéndice E.

## 5. Resultados

### 5.1 Hidrólisis enzimática

#### 5.1.1 Grado de hidrólisis

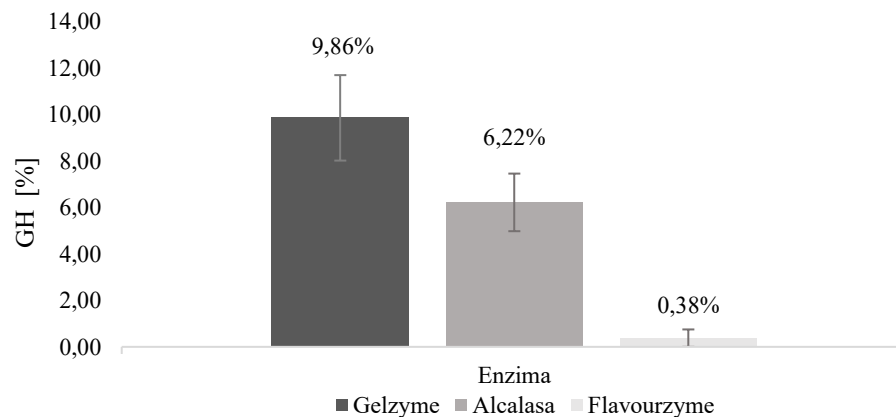
El grado de hidrólisis para cada tratamiento se calculó a partir de la masa total de proteína (Mp), determinada mediante la Ecuación 4 y posteriormente la Ecuación 1.

Gelzyme L-500 presentó el mayor grado de hidrólisis, con un valor promedio de 9,86%, lo que indica una mayor ruptura de los enlaces peptídicos de la matriz proteica. El tratamiento con Alcalasa 2,4L mostró un grado intermedio con un valor de 6,22%. Flavourzyme presentó el menor grado de hidrólisis con 0,38%, lo que sugiere una baja actividad hidrolítica sobre la sangre bovina. Aunque el grado de hidrólisis es reducido en comparación con las otras enzimas, corresponde a un valor medible y no a una ausencia de hidrólisis.

La Figura 5 expone el efecto del tipo de enzima sobre el grado de hidrólisis tratada con Gelzyme L-500, Alcalasa 2,4L y Flavourzyme, a un tiempo de reacción de 120 minutos.

#### Figura 5

*Resultados del grado de hidrólisis utilizando las enzimas; Gelzyme L-500, Alcalasa 2,4L y Flavourzyme a una concentración de 1,25% p/p en función de temperatura (55, 53 y 50 °C) y pH (10, 8,3 y 10) en 500 mL de sangre bovina*



El bajo grado de hidrólisis observado para Flavourzyme podría estar asociado a una disminución de su actividad enzimática, posiblemente relacionada con su almacenamiento prolongado previo al uso, lo que puede conducir a la pérdida parcial o total de su actividad catalítica. Las enzimas, debido a la complejidad de su estructura tridimensional, son susceptibles a procesos de desnaturalización durante el almacenamiento, proceso que implica el desdoblamiento de la estructura terciaria hacia una conformación polipeptídica desordenada, en la cual los residuos catalíticos clave dejan de encontrarse adecuadamente alineados para participar en interacciones funcionales y estabilizadoras (Iyer & Ananthanarayan, 2008).

## **5.2 Efecto de la relación enzima/sustrato y del tiempo de hidrólisis**

Con base en los resultados obtenidos en la Etapa I, se seleccionaron Gelzyme L-500 y Alcalasa para analizar el efecto de la relación enzima/sustrato y del tiempo sobre el contenido de hierro hemo, la distribución de tamaño de los hidrolizados y estabilidad del hierro hemo.

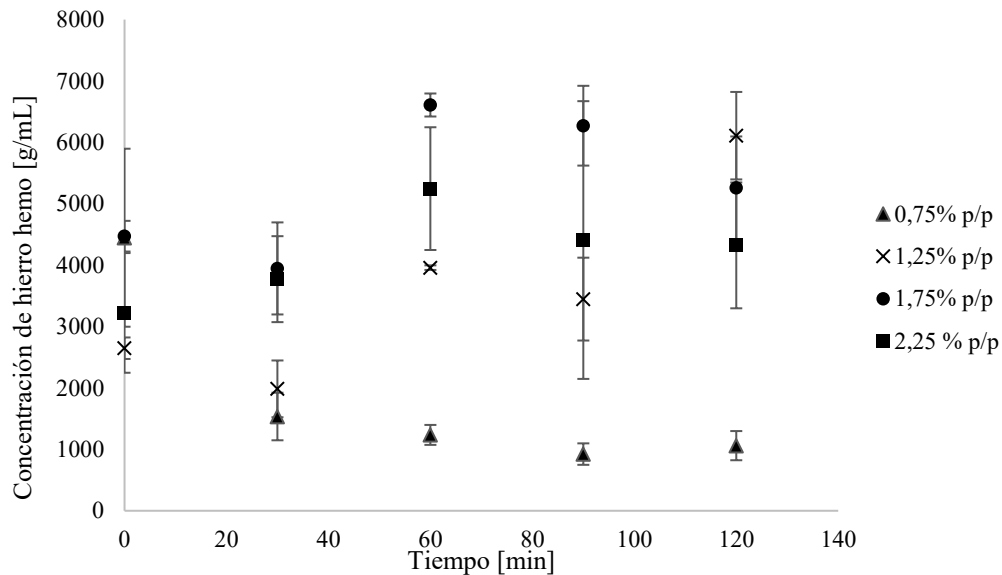
### **5.2.1 Cuantificación de hierro hemo**

La Figura 7 muestra la variación del contenido de hierro hemo durante la hidrólisis enzimática con Gelzyme L-500 en función del tiempo y de la relación enzima/sustrato. Para 0,75% p/p, el contenido de hierro hemo disminuyó de 4446,99 g/mL en el tiempo inicial (sin enzima) a 1060,58 g/mL (120 min). En la relación 2,25 % p/p, se observó un incremento respecto al tiempo inicial de 3222,39 g/mL a 4322,04 g/mL para el tiempo final, aunque este valor fue inferior a los registrados en tiempos intermedios.

Las relaciones 1,25 % p/p y 1,75 % p/p presentaron los mayores contenidos de hierro hemo. Para 1,25 % p/p, la concentración aumentó de 2647,57 g/mL (0 min) a 6108,97 g/mL (120 min). En el caso de 1,75 % p/p, se alcanzó un máximo de 6608,81 g/mL a los 60 min, seguido de una disminución hasta 5259,24 g/mL a los 120 min.

**Figura 6**

Variación de la concentración de hierro hemo en función de la relación enzima/sustrato (0,75, 1,25, 1,75 y 2,25% p/p) y del tiempo de hidrólisis (0, 30, 60, 90 y 120 min) con Gelzyme L-500



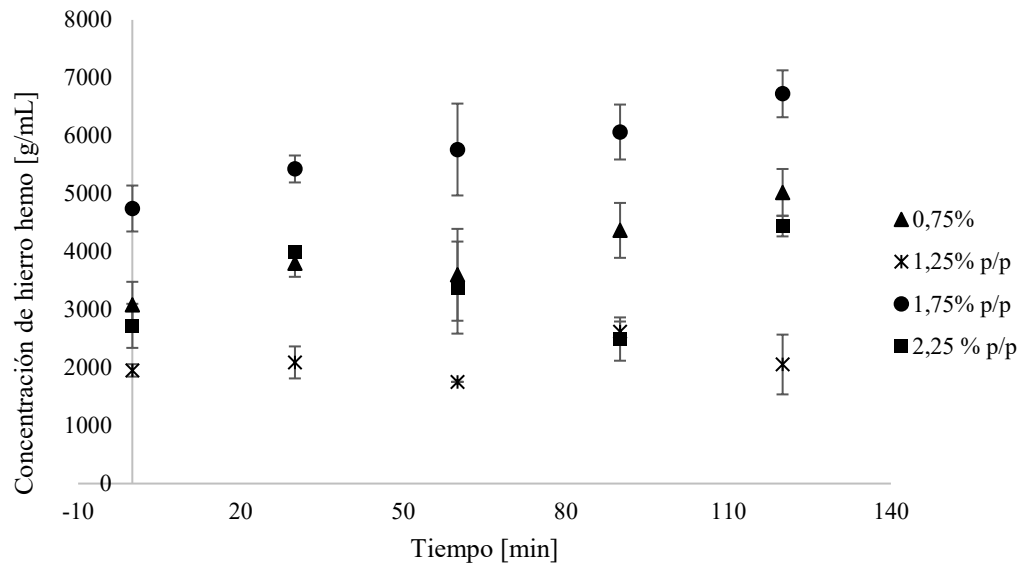
Tiempos prolongados (120 min) favorecieron la retención de hierro hemo únicamente en relaciones intermedias (La relación 1,25 % p/p a 120 minutos la más favorable), mientras que para 0,75 y 2,25% p/p no se observó un incremento sostenido.

La Figura 8 presenta la variación del contenido de hierro hemo empleando Alcalasa 2,4L en función del tiempo y la relación enzima/sustrato. Para 0,75% p/p la concentración aumentó progresivamente de 3085,06 g/mL (0 min) hasta 5023,32 g/mL (120 min). En la condición de 1,25% p/p se presentó fluctuaciones sin una tendencia notoria de incremento.

Por su parte, la relación 1,75% p/p presentó las mayores concentraciones durante toda la reacción pasando de 4745,95 g/mL (0 min) a 6725,60 g/mL a los 120 minutos. La relación 2,25% p/p demostró una disminución marcada a los 90 minutos, sin embargo, se evidenció el incremento respecto al tiempo 0 pasando de 2721,55 g/mL a 4443,96 g/mL a los 120 minutos.

**Figura 7**

Variación de la concentración de hierro hemo en función de la relación enzima/sustrato (0,75, 1,25, 1,75 y 2,25% p/p) y del tiempo de hidrólisis (0, 30, 60, 90 y 120 min) con Alcalasa 2,4L



El contenido de hierro hemo en la sangre bovina se ve favorecido cuando se emplea la enzima Alcalasa 2,4L, por lo que presenta concentraciones superiores y una tendencia de incremento proporcional con el tiempo, lo que sugiere una mayor liberación del hierro hemo.

**5.2.2 Análisis estadístico ANOVA**

El presente análisis fue realizado utilizando el software estadístico Statistica, disponible en el laboratorio de servicios del grupo CICTA.

En cuanto a la interpretación del valor p, cuando este es inferior a un nivel de significancia previamente establecido como 0,05 sugiere que existe evidencia para afirmar que al menos uno de los grupos presenta una diferencia significativa en relación con la variable analizada. Si el valor p supera el nivel de significancia, implica que no se pueden confirmar diferencias significativas entre los grupos evaluados.

En la Tabla 2, se determinó que el análisis de varianza ( $p < 0,05$ ) indica que el factor como el tipo de enzima, la interacción entre la Relación E/S\*Tiempo y Enzima\*Tiempo no son variables significativas que influyen en la concentración de hierro hemo. Por lo contrario, la relación E/S, el tiempo, la interacción Enzima\*Relación E/S y la interacción triple Enzima\*Relación E/S\*Tiempo presentan un efecto estadísticamente significativo sobre el contenido de hierro hemo. Asimismo, la no significancia del factor réplica confirma la consistencia y reproducibilidad de las mediciones.

**Tabla 2**

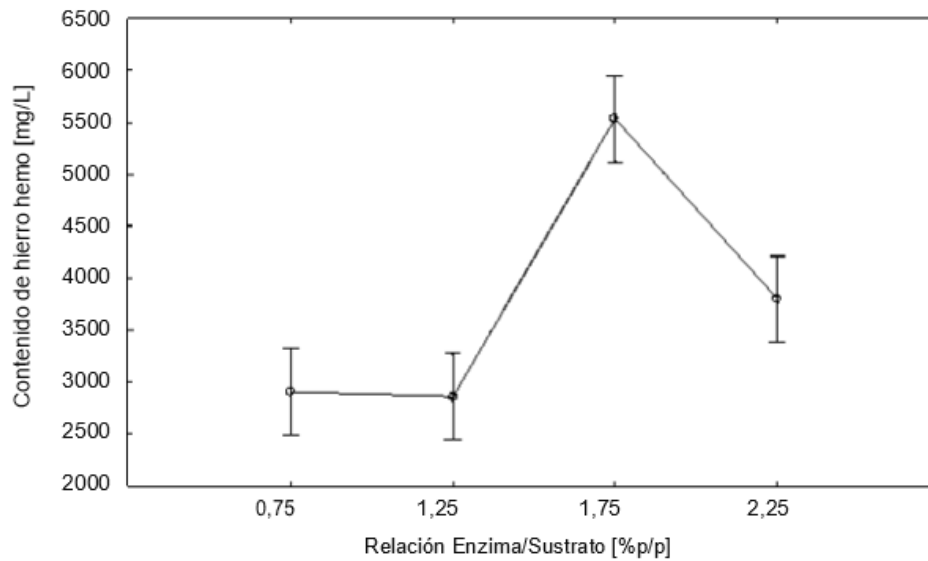
*Análisis de varianza ( $p < 0,05$ ) para la interacción entre la relación enzima/sustrato y tiempo*

Fuente	Pruebas Univariadas de Significancia para el contenido de hierro hemo Parametrización restringida por Sigma Descomposición efectiva de la hipótesis					
	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Valor F	p	
<b>Intercepto</b>	1,139876E+09	1	1,139876E+09	1378,997	0,000000	<b>Significativo</b>
<b>Enzima</b>	7,497846E+04	1	7,497846E+04	0,091	0,764880	No significativo
<b>Relación E/S</b>	9,323641E+07	3	3,107880E+07	37,598	0,000000	<b>Significativo</b>
<b>Tiempo</b>	1,169934E+07	4	2,924835E+06	3,538	0,014782	<b>Significativo</b>
<b>Enzima*Relación E/S</b>	3,857387E+07	3	1,285796E+07	15,555	0,000001	<b>Significativo</b>
<b>Enzima*Tiempo</b>	7,608090E+06	4	1,902023E+06	2,301	0,075835	No significativo
<b>Relación E/S*Tiempo</b>	1,893765E+07	12	1,578138E+06	1,909	0,063697	No significativo
<b>Enzima*Relación E/S*Tiempo</b>	2,902197E+07	12	2,418497E+06	2,926	0,005548	<b>Significativo</b>
<b>Réplica</b>	1,811160E+06	1	1,811160E+06	2,181	0,146844	No significativo
<b>Error</b>	3,223731E+07	39	8,265978E+05			

La Figura 8 muestra que la relación enzima/sustrato influye en el contenido de hierro hemo, observándose que la relación E/S a 1,75% p/p favorece la concentración del hierro hemo en la hidrólisis de sangre bovina.

### Figura 8

*Representación gráfica ANOVA para el efecto del factor enzima/sustrato en el contenido de hierro hemo*



*Nota:* Relación E/S; Media LS

Efecto actual:  $F(3,39) = 37,598$ ,  $p = 0,000000$

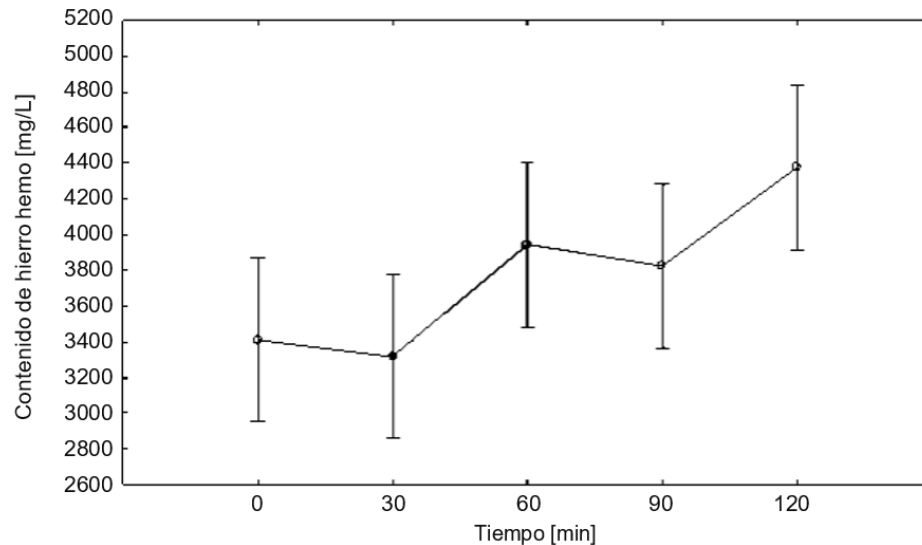
Descomposición de hipótesis efectiva

Las barras verticales denotan intervalos de confianza del 0,95

La Figura 10 expone la variación del contenido de hierro hemo en función del tiempo de hidrólisis en el que se evidencia un incremento progresivo de la concentración a mayores tiempos, con el valor más alto registrado a los 120 minutos.

**Figura 9**

Representación gráfica ANOVA para el efecto del factor tiempo en el contenido de hierro hemo



*Nota:* Tiempo; Media LS

Efecto actual:  $F(4,39) = 3,5384$   $p = 0,01478$

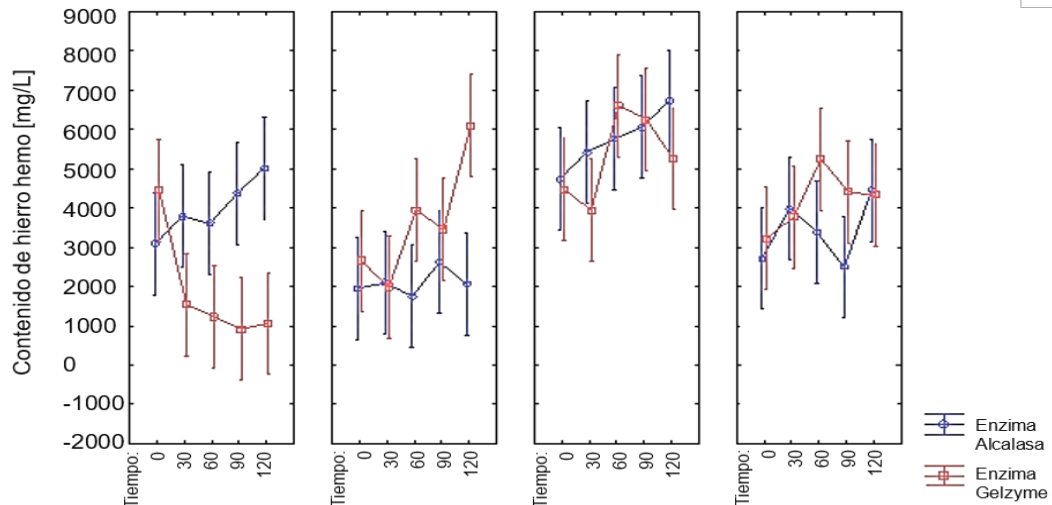
Descomposición de hipótesis efectiva

Las barras verticales denotan intervalos de confianza del 0,95

La Figura 10 presenta el comportamiento del contenido de hierro hemo en función del tiempo de hidrólisis para ambas enzimas, Alcalasa 2,4L y Gelzyme L-500, a diferentes relaciones enzima/sustrato. En comparación con el contenido de hierro hemo al tiempo 0, se observa en la mayoría de los casos un incremento de la concentración a lo largo del proceso de hidrólisis demostrando la efectividad del tratamiento en la liberación del hierro hemo; no obstante, esta tendencia no se presenta para Gelzyme L-500 a una relación E/S de 0,75% p/p.

**Figura 10**

Representación gráfica ANOVA del efecto entre la relación E/S, el tiempo y el tipo de enzima sobre el contenido de hierro hemo



Nota: Enzima\*Relación E/S\*Tiempo; Media LS

Efecto actual:  $F(12,39) = 2,9258$   $p = 0,00555$

Descomposición de hipótesis efectiva

Las barras verticales denotan intervalos de confianza del 0,95

**5.2.2.1 Método Tukey.** El método de Tukey se utiliza en ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores mientras controla la tasa de error por familia en un nivel especificado. Las pruebas post hoc, como la de Tukey, se utilizan solo cuando el ANOVA muestra una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) para determinar específicamente qué grupos difieren entre sí (Jarquín Matamoro, 2023).

En el Apéndice D, se presentan los resultados de la prueba de comparación múltiple de Tukey a la interacción Enzima\*Relación E/S\*Tiempo sobre el contenido de hierro hemo, con el fin de identificar la condición experimental que presentó la mayor diferencia significativa entre los tratamientos y permitió establecer la mejor condición para la evaluación de la estabilidad del hierro hemo.

Los tratamientos se agruparon en conjuntos homogéneos, las medias que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha = 0,05$ ). Se evidencia que las menores concentraciones de hierro hemo corresponden principalmente a los tratamientos con Gelzyme L-500 con relaciones E/S bajas y tiempos cortos mientras que las concentraciones más altas se obtuvieron de relaciones E/S intermedias a altas y con mayores tiempos de reacción. En particular, la interacción con Alcalasa 2,4L con una relación E/S 1,75% p/p a 120 minutos, es la condición más favorable y estadísticamente significativa para la evaluación de la estabilidad del hierro hemo.

### **5.3 Estabilidad de hierro hemo**

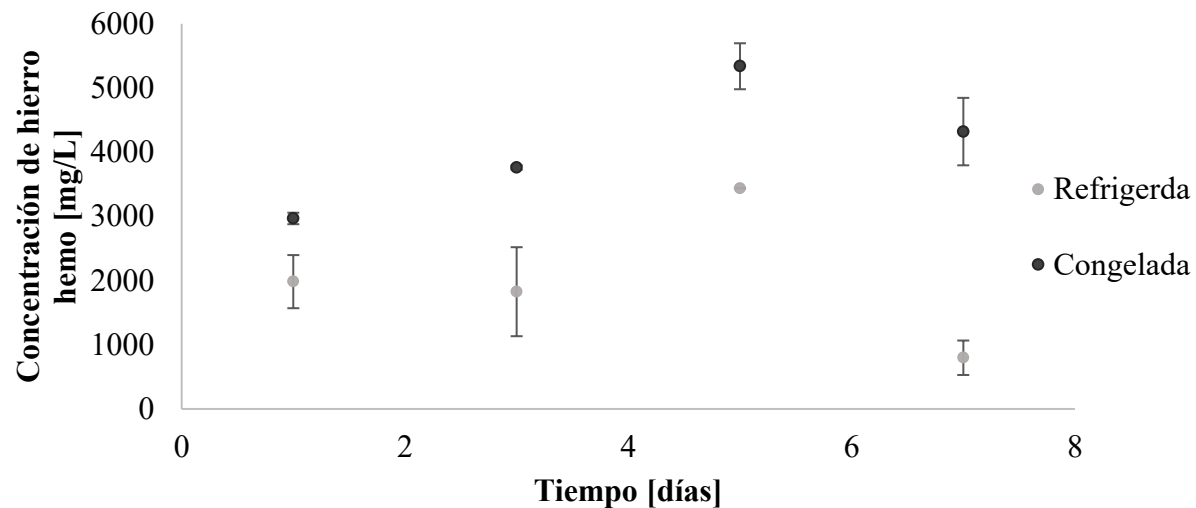
Durante el estudio de estabilidad del hierro hemo en el tiempo, los resultados obtenidos evidenciaron diferencias notables entre las dos condiciones de almacenamiento, mostrando una clara influencia de la temperatura sobre la estabilidad de este.

En la Figura 11, se puede observar que las muestras de los hidrolizados durante la refrigeración (4 °C) evidenciaron una disminución progresiva del contenido de hierro hemo, lo que indica que, a esta temperatura, continúan ocurriendo procesos de degradación del grupo hemo asociados a oxidación, ruptura del anillo de porfirina y posibles interacciones entre el hierro y compuestos generados durante el almacenamiento. En contraste, las muestras almacenadas en congelación (-18 °C) mostraron una mayor estabilidad, lo que evidencia una inhibición de las rutas de degradación enzimáticas; ya que los valores de las concentraciones del hierro hemo durante la congelación resultan más próximos a las concentraciones de hierro hemo cuantificadas en la fase previa de Alcalasa 2,4L a una relación E/S de 1,75% p/p. Por lo tanto, los resultados de la gráfica permiten observar que la congelación es la condición de almacenamiento más adecuada para garantizar la estabilidad del hierro hemo en hidrolizados obtenidos con Alcalasa 2,4L durante el

tiempo, mientras que la refrigeración genera una pérdida significativa del hierro hemo, evidenciando una menor estabilidad térmica y química de este.

### Figura 11

*Estabilidad del hierro hemo durante 7 días en refrigeración y congelación de los hidrolizados de la relación E/S 1,75% p/p de Alcalasa 2,4L*



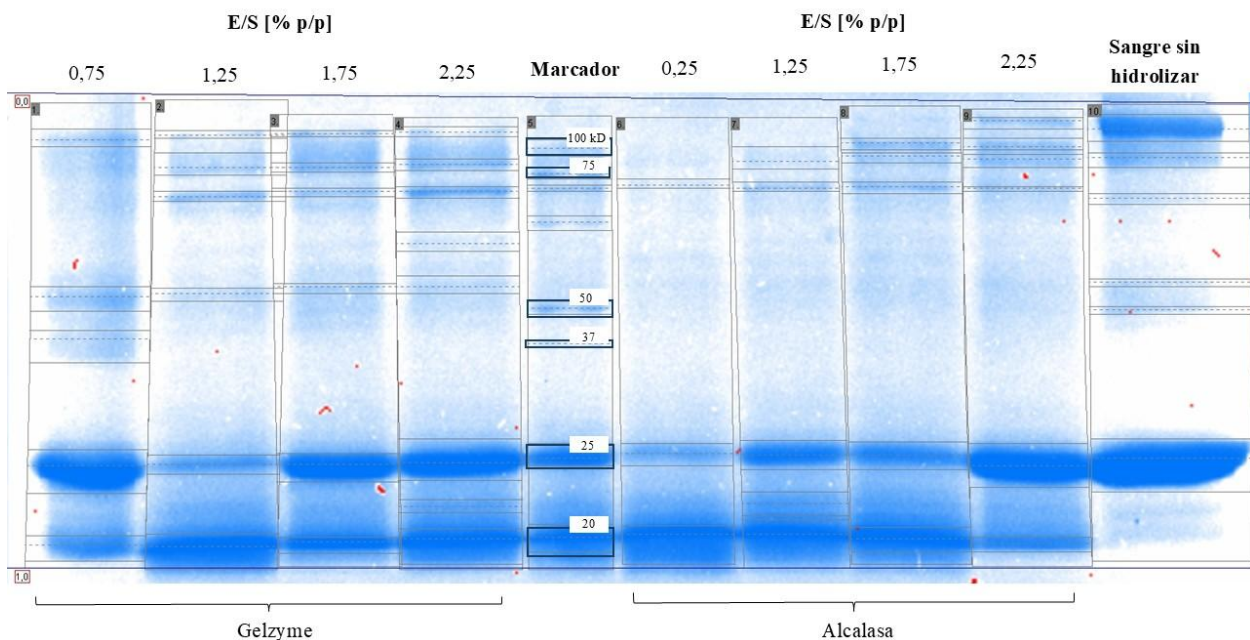
Los procesos de congelación y descongelación se asocian con pérdidas de hierro hemo debido a que la descongelación genera un goteo que arrastra fracciones solubles portadoras de hierro principalmente hemoglobina y mioglobina. Por otro lado, tenemos la degradación/oxidación del grupo hemo la cual es inducida por los cambios físico-químicos del proceso como la formación de hielo, tensiones osmóticas y ruptura de interacciones hemo-proteína (Turhan et al., 2006). Lo descrito en la literatura, explica el comportamiento observado en los hidrolizados obtenidos con Alcalasa (E/S 1,75 %) y fundamenta la recomendación de almacenarlos en congelación, evitando descongelaciones que aumenten la degradación del hierro hemo, ya que, en estado de congelamiento, la menor movilidad de las moléculas reduce las reacciones de oxidación y la actividad enzimática que desestabilizan el hierro hemo presente.

#### 5.4 Distribución del tamaño

La Figura 12 presenta el efecto de la relación enzima/sustrato sobre la distribución del tamaño de las proteínas para los hidrolizados de sangre bovina para 120 minutos en comparación con la muestra de sangre sin hidrolizar.

#### Figura 12

*Efecto de la relación enzima/sustrato sobre la distribución del peso molecular de proteínas en hidrolizados de sangre bovina a 120 min, con referencia a la muestra sin hidrolizar*



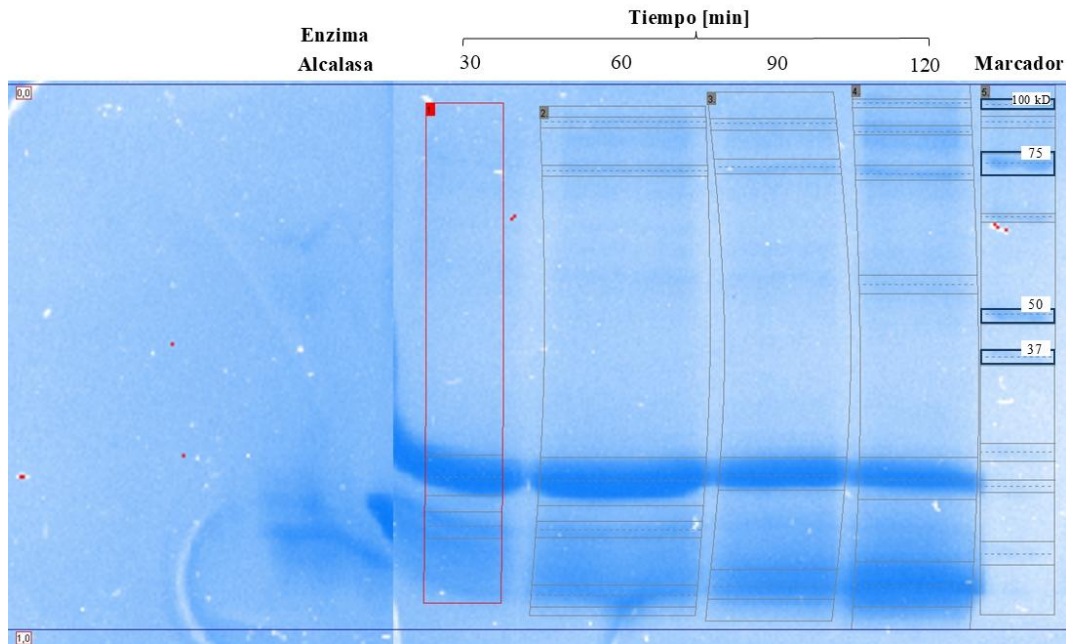
Para las diferentes relaciones enzima/sustrato evaluadas se observaron distribuciones de peso molecular similares dentro de un mismo rango para cada enzima. Empleando Gelzyme L-500, los pesos moleculares de las proteínas se distribuyeron aproximadamente entre 18 y 98 kDa para todas las relaciones E/S, mientras que para Alcalasa 2,4L los valores se ubicaron en un rango entre 18 y 105 kDa.

Si bien los rangos de peso molecular observados fueron comparables entre las distintas relaciones enzima/sustrato, se evidencian cambios en la intensidad relativa de las bandas proteicas, asociados al grado de fragmentación. En general, se observa una disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a proteínas de mayor peso molecular y un aumento en la intensidad de las bandas de menor tamaño, lo que indica una degradación de las proteínas. Este comportamiento es particularmente evidente para Gelzyme L-500, donde a una relación E/S de 1,25% p/p se intensifican las bandas ubicadas por debajo de 20 kDa. En contraste, la sangre sin hidrolizar presenta bandas intensas y definidas de alto peso molecular ( $\approx 100$  kDa). Tras la hidrólisis, la disminución de la intensidad de las bandas superiores y el aumento de la intensidad de las bandas inferiores de la sangre evidencian que la acción enzimática interviene en la fragmentación de proteínas de mayor tamaño en péptidos más pequeños (Segura-Campos et al., 2010).

En la Figura 13 se evaluó el efecto del tiempo de hidrólisis sobre el perfil proteico de los hidrolizados de sangre bovina obtenidos con la enzima Alcalasa 2,4L, empleando una relación E/S de 2,25% p/p, condición con mayor grado de hidrólisis, Apéndice E. La muestra pura sin tratar de la enzima Alcalasa 2,4L (10  $\mu$ L) y el hidrolizado para el tiempo inicial no fueron evaluadas ya que la migración en el gel no permitió una definición de las bandas (efecto smiling).

**Figura 13**

*Perfil proteico de los hidrolizados de sangre bovina obtenidos con Alcalasa 2,4L (E/S 2,25% p/p) con respecto al tiempo*



Los pesos moleculares de las proteínas se distribuyeron dentro de un rango similar para los distintos tiempos de hidrólisis evaluados, aproximadamente entre 16 y 100 kDa. No obstante, el efecto del tiempo de hidrólisis se evidencia principalmente a través de cambios en la intensidad de las bandas proteicas. A medida que aumenta el tiempo, se observa una atenuación progresiva de las bandas de mayor peso molecular y un incremento en la intensidad de las bandas de bajo peso molecular, lo que indica un aumento de la fragmentación proteica. Los valores estimados y las curvas de electroforesis se presentan en el Apéndice E.

## 6. Conclusiones

El tipo de enzima ejerció un efecto significativo sobre el grado de hidrólisis de la sangre bovina. Bajo las condiciones evaluadas, Gelzyme L-500 presentó la mayor eficiencia hidrolítica, alcanzando un grado de hidrólisis de 9,86% a los 120 minutos de reacción, pH 10 y 55 °C, seguida por Alcalasa 2,4L con un valor intermedio de 6,22%. En contraste, Flavourzyme presentó una actividad hidrolítica limitada bajo condiciones experimentales similares.

La relación enzima/sustrato y el tiempo de hidrólisis influyeron significativamente en la estabilidad del hierro hemo y en la distribución de tamaño de los hidrolizados de sangre bovina. En particular, la interacción Alcalasa 2,4L con una relación E/S 1,75% p/p a 120 minutos se identificó como la condición más favorable y estadísticamente significativa para maximizar el contenido de hierro hemo y evaluar su estabilidad. En la evaluación de la estabilidad del hierro hemo la congelación (-18 °C) mantuvo estable el hierro hemo, mientras que la refrigeración (4 °C) causó su disminución; por ello, es preferible conservar los hidrolizados congelados para evitar su degradación. Asimismo, el incremento del tiempo y de la relación E/S promovió una mayor degradación proteica, evidenciada por el desplazamiento de la intensidad hacia bandas de menor peso molecular sin modificar el rango de pesos moleculares, lo que confirma que la acción enzimática controla la degradación proteica.

### Referencias bibliográficas

- Abou-Diab, M., Thibodeau, J., Fliss, I., Dhulster, P., Nedjar, N., & Bazinet, L. (2021). Impact of conductivity on the performances of electro-acidification and enzymatic hydrolysis phases of bovine hemoglobin by electrodialysis with bipolar membranes for the production of bioactive peptides. *Separation and Purification Technology*, 269, 118650. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118650>
- Acosta Camacho, J. S., & Ríos Morales, 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]. <https://noesis.uis.edu.co/handle/20.500.14071/28938>
- Acuña Flores, D. E. (2024). *Biopéptidos provenientes de proteínas alimentarias y efectos benéficos de la salud* [Universidad Nacional Autónoma de México]. <https://ru.dgb.unam.mx/server/api/core/bitstreams/41df47aa-e44c-46ff-a2ae-2ad4061b284e/content>
- Adler-Nissen, J. (1986). A review of food hydrolysis-specific areas. In *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. In *Food Chemistry* (Vol. 26, Issue 1).
- Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., & Uversky, V. N. (2022). Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031445>
- Ardila Quintero, J. A. (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].  
<https://noesis.uis.edu.co/handle/20.500.14071/23057>

Arias, L., Ospino, K. S., & Zapata, J. E. (2018). Elaboration of flavored milk fortified with hemic iron from of bovine hemoglobin hydrolyzed. *Informacion Tecnologica*, 29(4).  
<https://doi.org/10.4067/s0718-07642018000400065>

Bacca Llain, A., & Herreño Galván, J. Y. (2024). *Hidrólisis enzimática de la sangre de bovino para la obtención de hierro hemínico* [Universidad Industrial de Santander].  
<https://noesis.uis.edu.co/handle/20.500.14071/15944>

Bah, C. S. F., Bekhit, A. E. D. A., McConnell, M. A., & Carne, A. (2016). Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases. *Food Chemistry*, 213, 98–107. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.06.065>

Banjari, I. & Hj\_artaker, A. (2018). Dietary sources of iron and vitamin B12: Is this the missing link in colorectal carcinogenesis? *Medical Hypotheses*, 116, 105–110.

Barragán, P., & Sánchez, Ó. (2013). *Estudio del plasma sanguíneo bovino para fermentación sumergida y sistemas alimentarios*.

Barut, G. T., Lischer, H. E. L., Bruggmann, R., Summerfield, A., & Talker, S. C. (2020). Transcriptomic profiling of bovine blood dendritic cells and monocytes following TLR stimulation. *European Journal of Immunology*, 50(11), 1691–1711.  
<https://doi.org/10.1002/EJI.202048643;JOURNAL:JOURNAL:15214141>

Bio-Rad Laboratories. (2024). *Mini-PROTEAN™ Tetra Cell instruction manual*. <https://www.bio-rad.com/MiniPROTEAN>

- Burdock, G. A., Carabin, I. G., & Griffiths, J. C. (2006). The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries. *Toxicology*, 221(1). <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.01.012>
- Castellano Jerez, J. (2024). *Revisión bibliográfica: mecanismos moleculares de las hemoglobinopatías A review: molecular mechanisms of hemoglobinopathies Trabajo de Fin de Grado* [Universidad de La Laguna]. [https://docs.moodle.org/all/es/images\\_es/5/5b/Hemoglobina.pdf](https://docs.moodle.org/all/es/images_es/5/5b/Hemoglobina.pdf)
- Cian, R. E., Drago, S. R., De Greef, D. M., Torres, R. L., & González, R. J. (2010). Iron and zinc availability and some physical characteristics from extruded products with added concentrate and hydrolysates from bovine hemoglobin. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(6). <https://doi.org/10.3109/09637481003649075>
- Condezo, A. A., & Izaguirre Orihuela, B. (2018). *Niveles de hierro sérico y su relación con la hemoglobina y el hematocrito en una población de adultos mayores de Lima. Año 2017*. [Universidad Norbert Wiener]. <https://hdl.handle.net/20.500.13053/1895>
- Costa, A. (2024). *Studying the effects of stressful factors on the structure and function of human ALDH3A1*. <https://doi.org/10.26257/HEAL.DUTH.17508>
- Dafferner, A. J., Lushchekina, S., Masson, P., Xiao, G., Schopfer, L. M., & Lockridge, O. (2017). Characterization of butyrylcholinesterase in bovine serum. *Chemico-Biological Interactions*, 266, 17–27. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2017.02.004>
- DANE. (2025). *Boletín técnico encuesta de sacrificio de ganado (ESAG) tercer trimestre de 2025*.

Del Hoyo Gonzáles, M. del P. (2012). *Valorización de sangre de mataderos mediante el desarrollo de nuevos materiales y productos.*

<https://aplicaciones.ciencia.gob.es/teseo/#/tesis/O322956/detalle>

Del Moral, S., Ramírez-Coutiño, L. P., De, M., & García-Gómez, J. (n.d.). *Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos.* Retrieved January 4, 2026, from [www.reibci.org](http://www.reibci.org)

Gonzalez Carrión, L. del S., & Hernández Valdivia, J. del L. (2012). *Determinación y comparación del contenido del hierro en algunas leguminosas antes y después de su tratamiento térmico usando la técnica de espectrofotometría de uv-visible previa complejación de hierro con o-fenantrolina* [Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua]. <http://hdl.handle.net/123456789/6157>

Instituto Nacional de Salud. (2019, julio 16). INS revela qué tan bien o mal nutridos están los colombianos: análisis de la ENSIN 2015.

Iyer, P. V., & Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 43(10), 1019–1032. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2008.06.004>

Jarquín Matamoro, R. F. (2023). Aplicación diseño experimental cuadrado latino al analizar variedades de semilla del cultivo de arroz (*Oryza Sativa*) en El Valle de Sébaco, Nicaragua. *Revista Científica de FAREM-Estelí*, 47. <https://doi.org/10.5377/farem.v12i47.16861>

Kalita, C., Mehta, U., Aayush, K., Sawant, P., Chavan, P., Rasane, P., Sharma, S., Singh, G. P., Nawghare, G. K., Dhruv, Singh, A. K., Maity, S., & Singh, S. (2024). Recent trends in antioxidative peptides derived from soybean and other soy-based products: A comprehensive

review. *Process Biochemistry*, 136, 311–323.  
<https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2023.11.027>

Luque Guillén, M. V. (2009). *Estructura y propiedades de las proteínas*.  
[https://www.uv.es/tunon/pdf\\_doc/proteinas\\_09.pdf](https://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf)

Márquez, M. C., & Vázquez, M. A. (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 35(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00041-2)

Martínez Graciá, C., Lopez 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). <https://doi.org/10.1021/jf991091q>

Monroy Rodríguez, 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/handle/20.500.14071/29624>

Nazifa, T.H., Cata Saady, N.M., Bazan, C., Zendejboudi, S., Aftab, A. & Albayati, T.M. (2021). Anaerobic digestion of blood from slaughtered livestock: A review. *Energies*, 14, 1–25. Available from: <https://doi.org/10.3390/en14185666>

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2009). Principios de Bioquímica. In *Lehninger - Principios de Bioquímica, 5ed.*

Obregón, W. D. (2008). *Hidrolasas de látex de especies del género Araujia. Purificación y caracterización de las enzimas proteolíticas*. [Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/2249>

- Parra Jaimes, C. J., & Prada Morales, H. J. (2024). *Evaluación de la hidrólisis de sangre bovina empleando Gelzyme L 500 para la obtención de hierro hemo*. Universidad Industrial de Santander. <https://noesis.uis.edu.co/handle/20.500.14071/43989>
- Pérez-Chabela, M. de L., Soriano-Santos, J., Ponce-Alquicira, E., & Díaz-Tenorio, L. M. (2015). Polyacrylamide gel electrophoresis-SDS as a tool to study myofibrillar proteins. A review. *Nacameh*, 15(2). <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/nacameh/2015v9n2/perez>
- Pourkhalili, A., Mirlohi, M., & Rahimi, E. (2013). Heme iron content in lamb meat is differentially altered upon boiling, grilling, or frying as assessed by four distinct analytical methods. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/374030>
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59. <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>
- Rocha Sanchez, B. (2006). *Alternativas de utilizacion del plasma y la globina de la sangre de bovino*. <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000611323>
- Roy, S., & Kumar, V. (2014). A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *International Journal of Science and Research*, 3(8).
- Saavedra Díaz, P. C. (2010). *Efecto del calcio sobre la absorción de hierro hemínico en humanos* [Universidad de Chile]. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/131372>
- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2010). Effect of digestion on bioavailability of peptides with biological activity. *Revista Chilena de Nutricion*, 37(3).

- Suárez, A. (2021). *Evaluación de los porcentajes de retención de hierro, cobre y zinc en carne vacuna según su modo de cocción y posibles modificaciones de hierro biodisponible (hierro hemo)* [Universidad de la República]. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/30035>
- Tansukkasem, S., Kaewpathomsri, P., Jonjaroen, V., Payongsri, P., Lertsiri, S., & Niamsiri, N. (2023). Production and Characterization of Heme Iron Polypeptide from the Blood of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Using Enzymatic Hydrolysis for Food Supplement Application. *Foods*, *12*(17). <https://doi.org/10.3390/foods12173249>
- Turhan, S., Sule Ustun, N., & Bank, I. (2006). Effect of freeze-thaw cycles on total and heme iron contents of bonito (*Sarda sarda*) and bluefish (*Pomatomus saltator*) fillets. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(4). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.10.005>
- Todaka, M., Oshima, T., & Baba, Y. (2014). Production and Characterization of Hydrophilic Heme Iron Preparation from Fish Blood. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, *47*(12), 893–899. <https://doi.org/10.1252/jcej.14we147>
- Unigarro, A. (2011). *Conocimientos, aptitudes y prácticas de las madres acerca de la anemia por deficiencia de hierro en niños de 5 a 12 años de edad que acuden al servicio de consulta externa del hospital básico San Gabriel de la ciudad de San Gabriel, Provincia del Carchi, período 2009-2010* [Universidad Técnica del Norte]. <https://doi.org/http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/709>
- Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, *49*(2). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.012>

Van Der Goot, A. J., Pelgrom, P. J. M., Berghout, J. A. M., Geerts, M. E. J., Jankowiak, L., Hardt, N. A., Keijer, J., Schutyser, M. A. I., Nikiforidis, C. V., & Boom, R. M. (2016). Concepts for further sustainable production of foods. In *Journal of Food Engineering* (Vol. 168). <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.010>

Zhu, C., Wen, Y., Xu, L., Zhang, Q., Wang, X., Zhao, G., & Han, G. (2024). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Bovine Hemoglobin Peptide and Study on Structure and Stability of Ferrous Chelate. *Science and Technology of Food Industry*, 45(8), 75-87. Scopus. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023040048>

## Apéndices

### Apéndice A 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	g/100 g muestra (%)	47,27	Espectroscopía de absorción atómica asistida por digestión por microondas

### Referencias

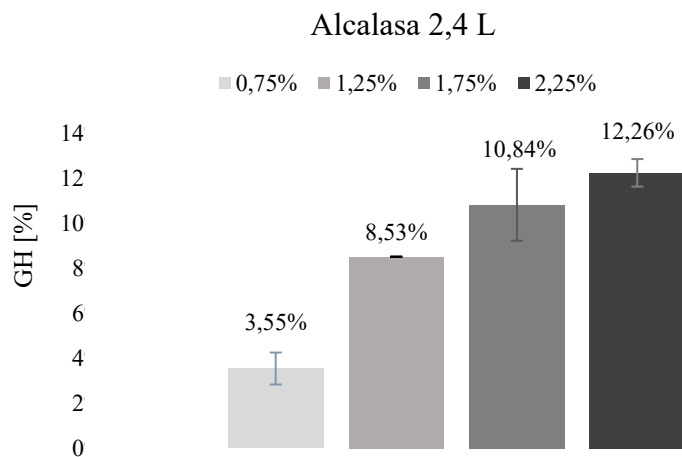
- J. Herreño y A. Bacca, «Hidrólisis enzimática de la sangre de bovino para la obtención de hierro hemínico», Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 2023

**Apéndice B** Resultados del grado de hidrólisis para diferentes relaciones enzima/sustrato

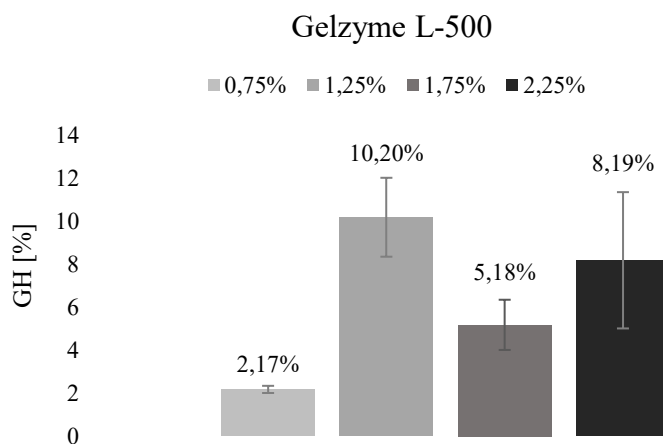
Con base en la hidrólisis enzimática realizada, se presentan los resultados del grado de hidrólisis obtenidos para las enzimas Alcalasa 2,4L y Gelzyme L-500 a diferentes relaciones enzima/sustrato (E/S) 0,75, 1,25, 1,75 y 2,25 % p/p

**Figura 1**

*Resultados del grado de hidrólisis para un tiempo de 120 minutos de hidrólisis enzimática con Alcalasa 2,4L a diferentes relaciones enzima/sustrato*

**Figura 2**

*Resultados del grado de hidrólisis para un tiempo de 120 minutos de hidrólisis enzimática con Gelzyme L-500 a diferentes relaciones enzima/sustrato*



**Apéndice C** Curva de calibración para la medición de hierro hemo

A partir de los valores de absorbancia obtenidos para las muestras patrón, registrados en las Tabla 1 y 2, se elaboraron las curvas de calibración correspondiente a la concentración de hierro hemo para cada tratamiento según la enzima empleada en la hidrólisis enzimática. Estas se presentan en la Figura 1 y 2.

**Tabla 1**

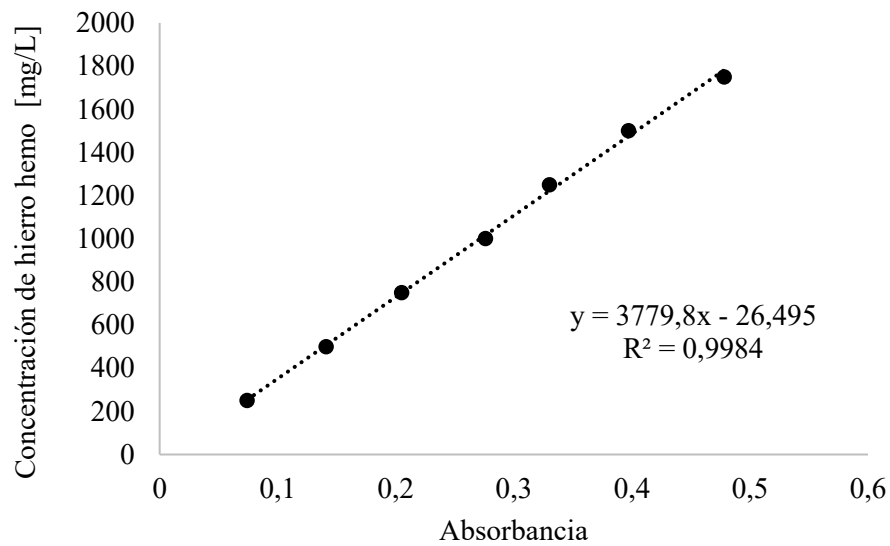
*Resultados de absorbancia de las soluciones patrón hierro hemo para la hidrólisis con Alcalasa 2,4L*

<b>Patrón Hemin Chloride</b>	
<b>Concentración de hierro hemo [mg/L]</b>	<b>Densidad Óptica</b>
1750	0,522
1500	0,441
1250	0,374
1000	0,32
750	0,249
500	0,185
250	0,118

El coeficiente de determinación obtenido ( $R^2 = 0,998$ ) en la figura indica una adecuada relación lineal entre la absorbancia y la concentración de hierro hemo.

**Figura 1**

*Curva de calibración de concentración de hierro hemo para muestras de hidrolizados utilizando la enzima Alcalasa 2,4L*

**Tabla 1**

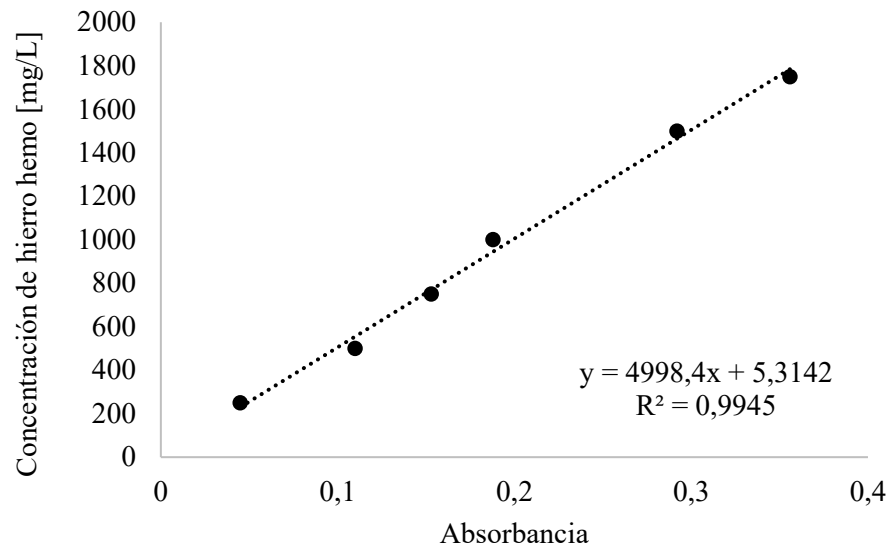
*Resultados de absorbancia de las soluciones patrón hierro hemo para la hidrólisis con Gelzyme L-500*

<b>Patrón Hemin Chloride</b>	
<b>Concentración de hierro hemo [mg/L]</b>	<b>Densidad Óptica</b>
1750	0,402
1500	0,338
1000	0,234
750	0,199
500	0,156
250	0,091

El coeficiente de determinación obtenido ( $R^2 = 0,994$ ) en la figura indica una adecuada relación lineal entre la absorbancia y la concentración de hierro hemo.

**Figura 2**

*Curva de calibración de concentración de hierro hemo para muestras de hidrolizados utilizando la enzima Gelzyme L-500*



**Apéndice D** Resultados del Test Tukey para los tratamientos evaluado**Tabla 1**

*Resultados de la prueba de comparación múltiple de Tukey para la interacción Enzima\*Relación E/S\*Tiempo en el contenido de hierro hemo*

Nº Tratamiento	Test HSD Tukey, Variable: Contenido de hierro hemo											
	Grupos Homogéneos, $\alpha = 0,05$											
	Error: Entre MS = 8266E2, df = 39,000											
	Enzima	Relación E/S	Tiempo	Contenido de hierro hemo Media	1	2	3	4	5	6	7	8
24	Gelzyme	0,75	90	923,125	h							
25	Gelzyme	0,75	120	1060,581	h	g						
23	Gelzyme	0,75	60	1235,525	h	g	f					
22	Gelzyme	0,75	30	1535,429	h	g	f	e				
8	Alcalasa	1,25	60	1755,334	h	g	f	e	d			
6	Alcalasa	1,25	0	1952,533	h	g	f	e	d	c		
27	Gelzyme	1,25	30	1985,285	h	g	f	e	d	c		
10	Alcalasa	1,25	120	2054,312	h	g	f	e	d	c		
7	Alcalasa	1,25	30	2090,397	h	g	f	e	d	c		
19	Alcalasa	2,25	90	2493,555	h	g	f	e	d	c	b	
9	Alcalasa	1,25	90	2616,931	h	g	f	e	d	c	b	
26	Gelzyme	1,25	0	2647,545	h	g	f	e	d	c	b	
16	Alcalasa	2,25	0	2721,545	h	g	f	e	d	c	b	
1	Alcalasa	0,75	0	3085,062	h	g	f	e	d	c	b	a
36	Gelzyme	2,25	0	3222,389	h	g	f	e	d	c	b	a
18	Alcalasa	2,25	60	3381,461	h	g	f	e	d	c	b	a
29	Gelzyme	1,25	90	3447,317	h	g	f	e	d	c	b	a
3	Alcalasa	0,75	60	3601,932	h	g	f	e	d	c	b	a
37	Gelzyme	2,25	30	3772,213	h	g	f	e	d	c	b	a
2	Alcalasa	0,75	30	3800,066	h	g	f	e	d	c	b	a
32	Gelzyme	1,75	30	3947,157	h	g	f	e	d	c	b	a
28	Gelzyme	1,25	60	3959,653	h	g	f	e	d	c	b	a
17	Alcalasa	2,25	30	3988,339	h	g	f	e	d	c	b	a
40	Gelzyme	2,25	120	4322,037	h	g	f	e	d	c	b	a
4	Alcalasa	0,75	90	4368,623	h	g	f	e	d	c	b	a



**Apéndice E** Curva de calibración para la cuantificación del peso molecular por SDS-PAGE

En la Tabla 1, se reportan los valores de movilidad relativa (Rf) correspondientes a las bandas del marcador de peso molecular. A partir de estos datos se construyó la curva de electroforesis mostrada en la Figura 1, obtenida al graficar el logaritmo del peso molecular del marcador en función del Rf.

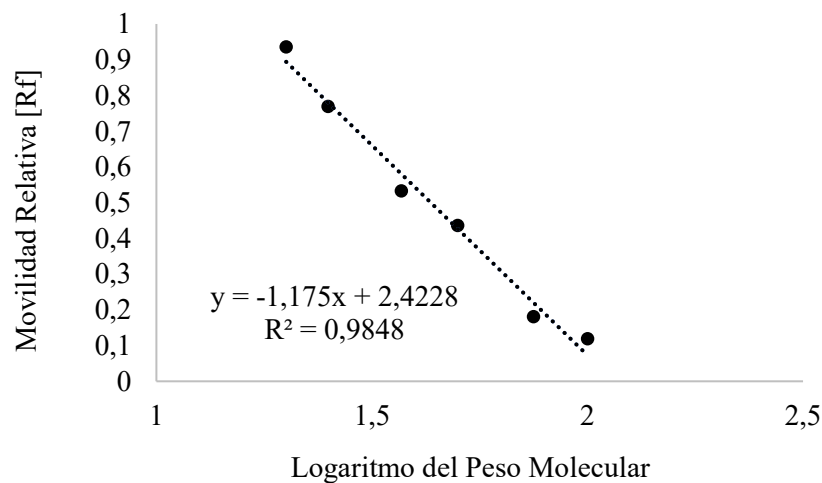
**Tabla 1**

*Valores de movilidad relativa (Rf) para los marcadores de peso molecular*

Bandas	PM [kDa]	Loragitmo PM	RF
1	100	2	0,119
2	75	1,875061263	0,181
3	50	1,698970004	0,436
4	37	1,568201724	0,533
5	25	1,397940009	0,769
6	20	1,301029996	0,936

**Figura 1**

*Curva de calibración de la electroforesis*



La curva de calibración presentó un coeficiente de correlación  $R = 0,985$ , lo que indica una adecuada correlación lineal entre la movilidad relativa y el logaritmo del peso molecular.

Con base en la ecuación obtenida a partir de la curva de electroforesis, se calcularon los pesos moleculares correspondientes a las bandas identificadas para cada relación enzima/sustrato de las enzimas evaluadas, así como para la muestra de sangre sin hidrolizar. Los valores estimados se presentan de manera detallada en la Tabla 3 y 4.

**Tabla 3**

*Valores de movilidad relativa (Rf) para los marcadores de peso molecular*

<b>Enzima</b>	<b>Relación E/S [% p/p]</b>	<b>Bandas</b>	<b>RF</b>	<b>PM [kDa]</b>	
<b>Gelzyme L-500</b>	0,75	1	0,099	95,0	
		2	0,429	49,8	
		3	0,518	41,8	
		4	0,786	24,7	
		5	0,953	17,8	
	1,25	1	0,087	97,3	
		2	0,156	85,0	
		3	0,218	75,2	
		4	0,422	50,4	
		5	0,783	24,9	
		6	0,956	17,7	
	1,75	1	0,083	98,0	
		2	0,158	84,6	
		3	0,211	76,3	
		4	0,411	51,5	
		5	0,783	24,9	
		6	0,946	18,1	
		2,25	1	0,082	98,2
			2	0,156	85,0
	3		0,218	75,2	
	4		0,325	61,0	
	5		0,415	51,1	
	6		0,779	25,1	
	7		0,871	20,9	
8	0,939		18,3		
<b>Alcalasa 2,4 L</b>	0,75	1	0,208	76,7	
		2	0,759	26,1	
		3	0,929	18,7	
	1,25	1	0,149	86,1	
		2	0,215	75,7	
		3	0,762	25,9	
	1,75	4	0,864	21,2	
		5	0,929	18,7	
		1	0,104	94,1	
	2,25	2	0,135	88,5	
		3	0,208	76,7	
		4	0,762	25,9	
	2,25	5	0,939	18,3	
		1	0,047	105,2	
			2	0,108	93,3

3	0,139	87,8
4	0,208	76,7
5	0,786	24,7
6	0,949	18,0

**Tabla 4**

*Estimación del peso molecular de las bandas proteicas para la sangre sin hidrolizar*

	<b>Bandas</b>	<b>RF</b>	<b>PM [kDa]</b>
<b>Sangre sin hidrolizar</b>	1	0,056	103,3
	2	0,115	92,1
	3	0,205	77,2
	4	0,386	54,1
	5	0,458	47,0
	6	0,783	24,9

Para el segundo análisis se siguió el mismo procedimiento anterior. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 5 y fueron empleados para construir la curva de electroforesis correspondiente, mostrada en la Gráfica 2, la cual presentó nuevamente un coeficiente de correlación cercano a  $R = 0,976$ , confirmando la adecuada relación entre las variables.

Con base en la ecuación obtenida de la Figura 2, se estimaron los pesos moleculares de las bandas observadas para los diferentes tiempos de hidrólisis de la enzima Alcalasa 2,4L. Asimismo, se determinaron los pesos moleculares de las bandas correspondientes a la enzima Gelzyme L-500 en estado puro, cuyos resultados se presentan en la última tabla.

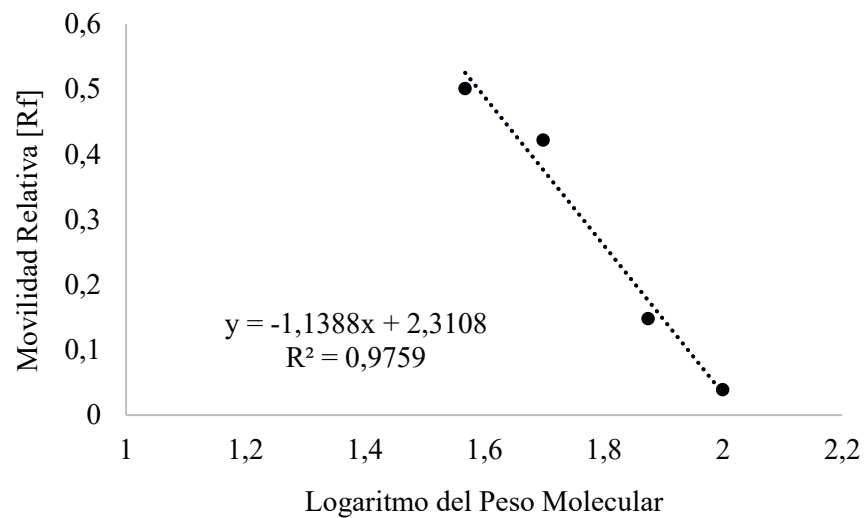
**Tabla 5**

*Valores de movilidad relativa (Rf) para los marcadores de peso molecular*

<b>Bandas</b>	<b>PM [kDa]</b>	<b>Loragitmo PM</b>	<b>RF</b>
<b>1</b>	100	2	0,039
<b>2</b>	75	1,875061263	0,148
<b>3</b>	50	1,698970004	0,422
<b>4</b>	37	1,568201724	0,501

**Figura 2**

*Curva de calibración de la electroforesis*

**Tabla 6**

*Pesos moleculares estimados de las bandas proteicas en función del tiempo de hidrólisis para hidrolizados tratados con la enzima Alcalasa 2,4L*

Tiempo	Bandas	RF	PM [kDa]
<b>30</b>	1	0,721	24,9
	2	0,811	20,7
<b>60</b>	1	0,07	92,8
	2	0,16	77,4
	3	0,728	24,5
<b>90</b>	4	0,818	20,5
	5	0,938	16,1
	1	0,073	92,3
	2	0,153	78,5
<b>120</b>	3	0,719	25,0
	4	0,923	16,5
	1	0,036	99,4
	2	0,07	92,8
	3	0,087	89,7
	4	0,165	76,6
	5	0,727	24,6
	6	0,923	16,5