

Hidrólisis enzimática de la sangre de bovino para la obtención de hierro hemínico

Andrea Bacca Llain y Jerly Yorleth Herreño Galván

Trabajo de grado para optar el título de Ingeniera Química

Modalidad investigación

Directora

Viviana Sánchez Torres

Ph.D. en Ingeniería Química

Codirectora

María Angélica Angarita Rangel

Magíster en Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2024

Dedicatoria

Para mi madre, por ser mi motor y mi razón de crecer cada día, que siempre me apoya y estuvo presente en todo momento, que cuando la necesitaba, siempre me daba palabras de aliento.

A mi padre, por su apoyo y esfuerzo incondicional, por estar presente durante mi formación académica y apoyarme en cada momento de mi camino, por ser mi mayor motivación para lograr este título.

A mi hermana Juliana, por ser mi compañera de vida incondicional, por ayudarme a no desfallecer en mis momentos de estudio e impulsarme a continuar sin importar las dificultades en mi camino.

A mis hermanos Edwin y Diego por ser mi ejemplo a seguir, por motivarme a mejorar, apoyarme en todo el proceso, y que sin su acompañamiento hubiera sido más difícil este proceso.

A mi compañera Jerly, por compartir cada momento en el laboratorio, por su entrega y su disposición para finalizar esta etapa.

A mi amiga Valentina, por siempre demostrarme su apoyo incondicional desde el primer día de Universidad y acompañarme durante todo este tiempo.

A mi compañero Anderson, por tener siempre las palabras de aliento y apoyo en estos últimos momentos de mi proceso, por brindarme su compañía y su ayuda en todo momento.

Andrea Bacca Llain

Para mi madre y mi tía, por ser mi motor y mi razón de crecer cada día, que siempre me apoyaron y estuvieron presentes en todo momento, que cuando las necesitaba, siempre me daban palabras de aliento.

A mi hermano Danny, por ser mi ejemplo a seguir, por motivarme a mejorar, apoyarme en todo el proceso, y que sin su acompañamiento hubiera sido un poco difícil culminar esta etapa.

A mi padre, por su apoyo y por estar presente durante mi formación académica.

A mi compañera Andrea, por compartir cada momento en el laboratorio, por su entrega y su disposición para finalizar esta etapa.

A mis amigas, por siempre demostrarme su apoyo incondicional, por estar en todo momento.

A mis tíos y prima, por acogerme y hospedarme en su casa cuando debía asistir al Laboratorio en el Parque Tecnológico de Guatiguará.

Jerly Yorleth Herreño Galván

Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander por ser nuestra segunda casa y formarnos en el camino.

Al Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos CICTA, por permitirnos el uso de sus materiales, equipos y prestarnos su servicio.

A la Escuela de Ingeniería Química por la formación, el conocimiento y las experiencias.

A Minciencias por la oportunidad de participar en investigación y financiar el proyecto del cual hace parte este trabajo de grado.

A Colbeef S.A por permitirnos visitar sus instalaciones y recolectar el subproducto necesario para la realización de este trabajo.

A la Doctora Viviana Sánchez Torres, por la oportunidad de ser parte de este trabajo de grado.

A la Magister María Angélica Angarita Rangel por el acompañamiento durante todo el desarrollo del trabajo de grado.

Tabla de contenido

Introducción	11
1.Objetivos	14
1.1.Objetivo general.....	14
1.2.Objetivos específicos	14
2.Marco conceptual.....	15
2.1 Sangre bovina:	15
2.1.1. Hierro	15
2.1.2 Hierro hemínico	15
2.1.3 Grupo hemo	15
2.1.4 Hierro no hemo	16
2.1.5 Cuantificación de hierro hemínico.....	16
2.2 Proteasas	16
3.Estado del arte.....	17
4.Metodología.....	20
4.1.Fase I: Establecimiento de protocolo de recolección de sangre inocua.....	20
4.1.1.Revisión bibliográfica.....	20
4.1.2.Creación del protocolo de recolección inocua:	22
4.2.Fase II: Proceso de hidrólisis enzimática en sangre de bovino.....	22

4.2.2. Establecimiento del protocolo de cuantificación de hierro hemínico	24
4.3. Fase III: Cuantificación y comparación del hierro hemínico en las muestras obtenidas en cada una de las etapas de evaporación de película descendente en vacío y secado por aspersión.	25
4.3.1. Análisis del hierro hemínico	25
5. Resultados	27
5.1. Elaboración del protocolo de recolección inocua de sangre bovina	27
5.1.1. Caracterización de la sangre de bovino	28
5.2. Hidrólisis enzimática	29
5.2.1. Grado de hidrólisis	29
5.3. Curva de calibración para la medición de hierro hemínico	31
5.3.1. Determinación de hierro hemínico	32
5.4. Cuantificación del hierro hemínico en las muestras obtenidas en el procesamiento de los hidrolizados por filtración, evaporación de película descendente en vacío y secado por aspersión	34
6. Conclusiones	37
7. Recomendaciones	38
Referencias bibliográficas	39

Lista de Tablas

Tabla 1 Resultados de análisis bromatológico realizado a una muestra de sangre bovina.....	28
Tabla 2 Lecturas de absorbancia de patrones de hierro hemínico	31
Tabla 3 Resultados de la medición de concentración de hierro hemínico en cada una de las etapas de evaporación de película descendente de vacío y secado por aspersión	35
Tabla 4 Comparación entre la concentración de hierro hemínico cuantificada con enzimas Alcalasa (0.76 % p/p) y Gelzyme L-500 (0.7 % p/p)	37

Lista de figuras

Figura 1 Hemoglobina y estructura del grupo hemo	16
Figura 2 Fases metodológicas del proyecto	20
Figura 3 Montaje del reactor utilizado.....	23
Figura 4 Etapas del proceso de evaporación de película descendente en vacío y secado por aspersión	26
Figura 5 Diagrama de flujo del protocolo de recolección inocua de sangre bovina.....	28
Figura 6 Resultados del grado de hidrólisis en función de tiempo de reacción utilizando tres concentraciones de enzima GELZYME L-500 (1.0% p/p; 0.7% p/p y 0.3% p/p) en 500 mL de sangre bovina a 60 °C y pH 9.5.....	30
Figura 7 Curva de calibración de hierro hemínico.....	32
Figura 8 Concentración de hierro hemínico en un tiempo de hidrólisis de 3 horas.....	34
Figura 9 Relación de las muestras cuantificadas de hierro hemínico con cada una de las etapas de evaporación de película descendente de vacío y secado por aspersión	36

Lista de Apéndices

Apéndice A Ficha técnica Gelzyme L-500.....	43
Apéndice B Determinación de la longitud de onda nominal	44
Apéndice C Protocolo de cuantificación de hierro hemínico	45
Apéndice D Protocolo de recolección inocuo de sangre bovina.....	49
Apéndice E Ficha técnica cuchillo vampiro	51
Apéndice F Resultados de la medición de absorbancia y concentración de hierro hemínico para cada una de las muestras hidrolizadas a concentración de 1.0, 0.7 y 0.3% p/p.	52

Resumen

Título: Hidrólisis enzimática de la sangre de bovino para la obtención de hierro hemínico.*

Autores: Andrea Bacca Llain, Jerly Yorleth Herreño Galván.**

Palabras clave: Sangre bovina, hierro hemínico, hidrólisis enzimática, cuantificación de hierro hemínico

Descripción: La fortificación de alimentos es una alternativa para la mitigación de las deficiencias nutricionales presentadas por falta de hierro, que es más común en niños y mujeres en embarazo. Un recurso aprovechable para la obtención de hierro hemínico mediante hidrólisis enzimática es la sangre de bovino, el cual es un subproducto de la industria cárnica. Con el fin de valorizar este residuo, se evaluó la hidrólisis enzimática de sangre de bovino para la obtención de hierro hemínico. En el presente trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica en el repositorio institucional de la Universidad Industrial de Santander, utilizando como criterio de selección, título, resumen y contenido, buscando establecer un protocolo de recolección inocua de sangre de bovino. Se realizó una hidrólisis enzimática empleando sangre de bovino como materia prima en un volumen de reacción de 500 mL, empleando la enzima Gelzyme L-500 y teniendo como variable de entrada las concentraciones de enzima correspondientes a 0.3, 0.7 y 1.0% %p/p en un tiempo de reacción de 3 h. Se realizó una cuantificación de hierro hemínico a los hidrolizados obtenidos mediante una extracción con metil isobutil cetona, por último, se aplicó el mismo procedimiento de cuantificación a hidrolizados de sangre de bovino procesados mediante filtración, evaporación de película descendente y secado por aspersión. Se estableció un protocolo de recolección de sangre de bovino inocua para la aplicación en plantas de beneficio animal de tipo nacional. Como resultado se obtuvo 28.48% como mayor grado de hidrólisis a 1.0% de concentración de enzima. Se realizó la cuantificación de hierro hemínico evidenciando una mayor concentración en los hidrolizados obtenidos con 1.0 %p/p de enzima. Por último, la concentración de hierro hemínico presentó valores variados a lo largo del procedimiento y se evidenció una disminución de la concentración de hierro en la etapa final, siendo la concentración de 370.52 mg/L en el hidrolizado y 35.50 mg/L en los pulverizados gruesos.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: Viviana Sánchez Torres, Ph. D en Ingeniería Química. Codirectora: María Angélica Angarita Rangel, Magíster en Ingeniería Química

Abstract

Title: Enzymatic hydrolysis of bovine blood to obtain heme iron.*

Authors: Andrea Bacca Llaine, Jerly Yorleth Herreño Galván.**

Key Words: Bovine blood, heme iron, enzymatic hydrolysis, heme iron quantification

Description: Food fortification is an alternative to mitigate nutritional deficiencies due to iron deficiency, which is more common in children and pregnant women. A usable resource to obtain heme iron by enzymatic hydrolysis is bovine blood, a by-product of the meat industry. To valorize this waste, the enzymatic hydrolysis of bovine blood was evaluated to obtain haem iron. In the present work, a bibliographic search was carried out in the institutional repository of the Universidad Industrial de Santander, using as selection criteria, title, abstract and content, seeking to establish a protocol for the safe collection of bovine blood. An enzymatic hydrolysis was performed using bovine blood as raw material in a reaction volume of 500 mL, using Gelzyme L-500 enzyme and having as input variable the enzyme concentrations corresponding to 0.3, 0.7 and 1.0% % w/w in a reaction time of 3 h. A quantification of heme iron was carried out on the hydrolysates obtained by extraction with methyl isobutyl ketone. Finally, the same quantification procedure was applied to bovine blood hydrolysates processed by filtration, falling film evaporation and spray drying. A protocol for collecting safe bovine blood was developed for application in slaughterhouses. As a result, 28.48% was obtained as the highest degree of hydrolysis at 1.0% enzyme concentration. The quantification of heme iron was performed, showing a higher concentration of heme iron in the hydrolysates obtained with 1.0% w/w enzyme. Finally, the concentration of heme iron presented varied values throughout the procedure and a decrease in the iron concentration was evident in the final stage, with a concentration of 35.50 mg/L in the coarse pulverized products and 370.52 mg/L in the hydrolyzate.

* Degree Work

** Physical-Chemical Engineering Faculty. School of Chemical Engineering. Director: Viviana Sanchez Torres Ph. D in Chemical Engineering. Co-director: María Angélica Angarita Rangel, Master in Chemical Engineering

Introducción

La desnutrición y problemas de salud asociados a la deficiencia de hierro en la población mundial afectan principalmente a la primera infancia, poblaciones económicamente vulnerables y mujeres en edad fértil y gestantes según lo reporta la Organización Mundial de la Salud (OMS). La anemia, que se presenta en la mayoría de los países de la región latinoamericana por falta de calidad y cantidad de hierro en la dieta, es la deficiencia nutricional más común y afecta al 34% de la población mundial, de la cual el 80% vive en países en desarrollo. Los grupos con mayor probabilidad de sufrir deficiencia de hierro corresponden a las poblaciones que experimentan una ingesta y/o absorción inadecuada de hierro de los alimentos, esto está asociado a que gran cantidad de los alimentos ingeridos con aporte de hierro contienen formas poco solubles del metal y baja biodisponibilidad (Boccio et al., 2004). La fortificación de alimentos con hierro hemínico se emplea como una estrategia eficaz para abordar esta problemática, ya que ofrece una fuente de hierro altamente biodisponible.

La biodisponibilidad del hierro se refiere a la proporción de hierro de los alimentos que el cuerpo absorbe y utiliza. El principal factor que afecta la biodisponibilidad de este mineral es su forma química. El hierro se produce naturalmente como hierro hemínico y hierro no hemo. El hierro hemínico sólo se encuentra en alimentos de origen animal, ya sea como hemoglobina y/o mioglobina (González Urrutia, 2005)

La sangre de bovino es un recurso aprovechable para la obtención de hierro hemínico mediante hidrólisis enzimática, esto a su vez permite la fortificación de alimentos. El Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) reveló que durante todo el 2022 se sacrificaron 3.107.462 ejemplares de ganado bovino. La sangre de bovino es un subproducto de la industria cárnica que representa hasta el 4% del peso del animal vivo, destacándose como un

componente de uso no alimentario (Montanero Zambrano et al., 2022). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) la cantidad media de sangre por bovino es de 10 a 12 litros, por lo cual, este subproducto como residuo es un contaminante orgánico que requiere diferentes procesos de tratamiento (Monroy Rodríguez, 2013). Sin embargo, la sangre bovina es una fuente rica de proteínas y puede ser utilizada para la elaboración de alimentos y como abono para sistemas agrícolas.

La hidrólisis enzimática tiene como fin la obtención de cadenas peptídicas, mediante el rompimiento de proteínas empleando enzimas (Monroy Rodríguez, 2013). Este proceso favorece la solubilización de las proteínas sanguíneas, liberando péptidos hemo que mejoran la asimilación de hierro hemínico. Además, la biodisponibilidad de los péptidos hemo depende del tamaño y la composición de cadena de los aminoácidos unidos al anillo de hierro hemínico (Berraquero-García et al., 2022). El grado de hidrólisis es una propiedad fundamental del hidrolizado y determina en gran medida las características del hidrolizado restante y sus posibles usos. Se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en comparación con la proteína nativa. El grado final de hidrólisis está determinado por las condiciones utilizadas, a saber, la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de hidrólisis y las condiciones fisicoquímicas como el pH y la temperatura.

Este trabajo de grado hace parte del proyecto financiado por 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 hemínico en la dieta de las familias con niños menores de 5 años del departamento de Boyacá”, el cual está siendo llevado a cabo por el grupo CICTA. El presente trabajo de grado está relacionado con el Objetivo específico 3 del proyecto global, el cual busca evaluar las condiciones de hidrólisis enzimática

para la obtención de hierro hemínico que será añadido a la harina vegetal. En este trabajo se evaluó la influencia de la concentración de enzima en el grado de hidrólisis y por consiguiente en la concentración de hierro hemínico obtenido en el hidrolizado, así como la concentración de hierro hemínico en muestras de hidrolizados de sangre de bovino procesadas con filtración, evaporación y secado.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Evaluar la hidrólisis enzimática de la sangre de bovino para la obtención de hierro hemínico.

1.2. Objetivos específicos

- Establecer un protocolo de recolección inocuo de sangre de bovino, para su posterior uso en la formulación de alimentos para consumo humano enriquecidos con hierro hemínico.
- Analizar el efecto del tiempo de hidrólisis y concentración de enzima en el grado de hidrólisis y obtención de hierro hemínico.
- Determinar la concentración de hierro hemínico en hidrolizados de sangre de bovino procesados mediante filtración, evaporación de película descendente y secado por aspersión.

2. Marco conceptual

2.1 Sangre: La sangre puede ser separada en dos fases, la fase sólida donde se encuentran los glóbulos blancos, rojos y plaquetas, y la fase líquida que es el plasma el cual está compuesto por 90% agua, 7.9% de proteínas (4.2% inmunoglobulinas, 3.3% albúminas y 0.4% fibrinógeno) y por 2.1% de lípidos, glucosa, vitaminas, entre otras (Acosta Camacho & Rios Morales, 2013).

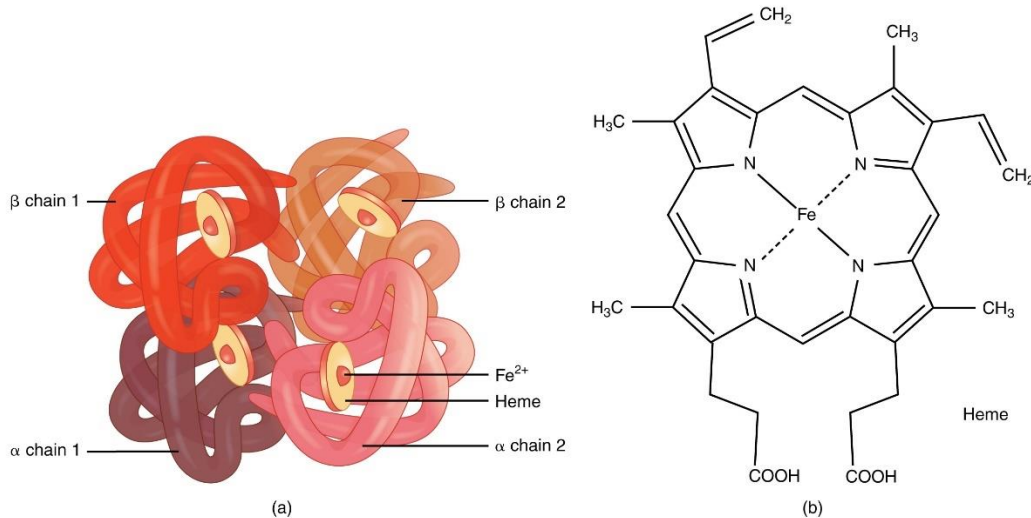
2.1.1. Hierro: El hierro es un elemento esencial en sistemas biológicos que desempeña un papel fundamental en una variedad de procesos biológicos clave. En sistemas biológicos, el hierro se encuentra en forma de iones ferrosos (Fe^{2+}) o férricos (Fe^{3+}) y se utiliza en numerosas funciones vitales, como el transporte de oxígeno, la producción de energía celular y la síntesis de ADN. El hierro también es un componente esencial de muchas proteínas y enzimas, como la hemoglobina y el citocromo oxidasa, que son cruciales para el transporte de oxígeno y la respiración celular (Instituto Linus Pauling, 2023).

2.1.2 Hierro hemínico: Forma parte de proteínas como la hemoglobina, mioglobina, entre otras hemoproteínas que se encuentran solamente en alimentos de origen animal. El hierro en forma divalente se encuentra quelado con un anillo de porfirina estableciendo un complejo denominado grupo hemo (Armando et al., 2009)

2.1.3 Grupo hemo: Estructuralmente el grupo hemo está compuesto por un átomo de hierro y un anillo orgánico heterocíclico de gran tamaño denominado porfirina, es decir, un tetrapirrol cíclico en el que los 4 anillos de pirrol están unidos por enlaces metileno ($=\text{CH}-$) y en el centro de este anillo se encuentra el átomo de hierro (Figura. 1b) (Gordon Betts et al., 2013). Aunque presenta cargas negativas que le confieren un extremo polar, el grupo hemo tiene propiedades apolares y es por tanto insoluble en agua por lo que se sitúa en una cavidad hidrofóbica dentro de las proteínas (Villavicencio Queijeiro, 2012).

Figura 1

Hemoglobina y estructura del grupo hemo



Nota: Hemoglobina (a) y estructura del grupo hemo (b). Tomado de OpenStax

2.1.4 Hierro no hemínico: Corresponde a aquel hierro que no se encuentra unido al grupo hemo; básicamente está formado por sales inorgánicas de este metal y el mismo se encuentra principalmente en los alimentos de origen vegetal, como así también en la mayoría de los preparados farmacéuticos utilizados en la terapia contra la deficiencia de este mineral (Arango Ruiz et al., 2012).

2.1.5 Cuantificación de hierro hemínico: Como se describió anteriormente, el hierro hemínico se refiere al hierro que forma un complejo con el anillo de porfirina. Este complejo absorbe radiación electromagnética en la región visible y, por tanto, es cuantificable mediante espectrofotometría (Ardila Quintero, 2009).

2.2 Proteasas: Se encuentran disponibles comercialmente muchas proteasas grado-alimenticio. Estas proteasas pueden ser clasificadas, por su origen (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción catalítica (endo- o exo-actividad) o con base en su sitio catalítico. Las

endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos dentro de la cadena de la proteína. Las exoproteasas, por el contrario, eliminan aminoácidos y otros ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima-sustrato.

3. Estado del arte

La sangre es una fuente rica en proteínas de alta calidad, pero debido a la falta de alternativas de uso como subproducto cárnico no se le da el valor adecuado, por tal razón, diferentes investigaciones han estudiado los hidrolizados de sangre de diferentes animales de consumo, con el fin de evaluar la capacidad biológica de los péptidos resultantes de sus fracciones (Morales et al., 2017). En España se llevó a cabo un estudio de valorización de la proteína sanguínea de harina de sangre, produciendo hidrolizados enzimáticos ricos en hierro hemínico y péptidos antioxidantes, en este procedimiento se emplearon seis proteasas comerciales de origen animal, vegetal y bacteriano, teniendo como resultado una recuperación del 70% del hierro hemínico con subtilisina y tripsina, así mismo, concluyeron que dicha valorización enzimática aumentaba la biodisponibilidad del hierro hemínico y producía péptidos antioxidantes (Berraquero-García et al., 2022). Las técnicas empleadas para la recolección de sangre inocua para su posterior implementación en consumo humano no han sido establecidas de manera oficial en Colombia, sin embargo, existen procedimientos y recomendaciones empleadas en otros países como la empresa SENASA de Perú (Pastor Miranda, 2018). La industria cárnica usa la mayor parte de las proteínas de la sangre como ingredientes en la industria alimenticia, principalmente como aglutinante, pero también como mejoradores naturales del color, emulsionantes, sustitutivos de grasas y agentes de curado de la carne (Chang Escalante & Panduro Reátegui, 2017).

En países como Nicaragua y Argentina, la sangre bovina es aprovechada por empresas que cuentan con experiencia en investigación y desarrollo de proteínas funcionales, PROTENA S.A y

YERUVA S.A., respectivamente. Proporcionando una solución ambiental al manejo de este subproducto orgánico de instalaciones de beneficio animal, transformándolos en proteínas de alto valor nutricional para la elaboración de alimentos y fertilizantes (*protena, s/f*), (*Yeruvá, s/f*).

En Colombia se reportan investigaciones previas relacionadas con el aprovechamiento de la sangre, por ejemplo, en la Universidad Industrial de Santander se realizó el estudio de una estrategia para la obtención de péptidos de alto valor nutricional que permiten la valorización del subproducto, empleando la hidrólisis enzimática y la clarificación por fraccionamiento de hidrolizados usando membranas cerámicas donde fueron establecidas etapas de valorización de la sangre, obteniendo como condiciones de operación 0.76 %p/p de concentración de enzima a 53°C y un pH de 8.34, para la enzima alcalasa 2.4L (Monroy Rodríguez, 2013), así mismo, se estudiaron las técnicas con membranas aplicadas a la sangre de bovino hidrolizada resultando un alto porcentaje de proteínas (68%) en los permeados de sangre (Acosta Camacho & Rios Morales, 2013). Además, recientemente fue llevado a cabo en el grupo de investigación CICTA, un proyecto de tratamiento y valorización de sangre de bovino, implementando las técnicas de evaporación de película descendente al vacío y secado por aspersion, con el fin de obtener pulverizados con alto contenido de hierro, logrando incrementar esta concentración hasta un 242% y recomendando el análisis de hierro hemínico en cada una de sus etapas de operación (Castillo Hernández & Ortiz Ardila, 2023).

Por otro lado, la Universidad de La Salle desarrolló una investigación relacionada con la elaboración de harina de sangre con destino al consumo animal y la elaboración de plasma sanguíneo líquido con destino al consumo humano (Beltrán Fernández & Perdomo Robayo, 2007).

En China, un estudio de Qingdao Agricultural University examinó la extracción enzimática de hierro hemínico proveniente de la sangre de ganso, una de las aves acuáticas más consumidas

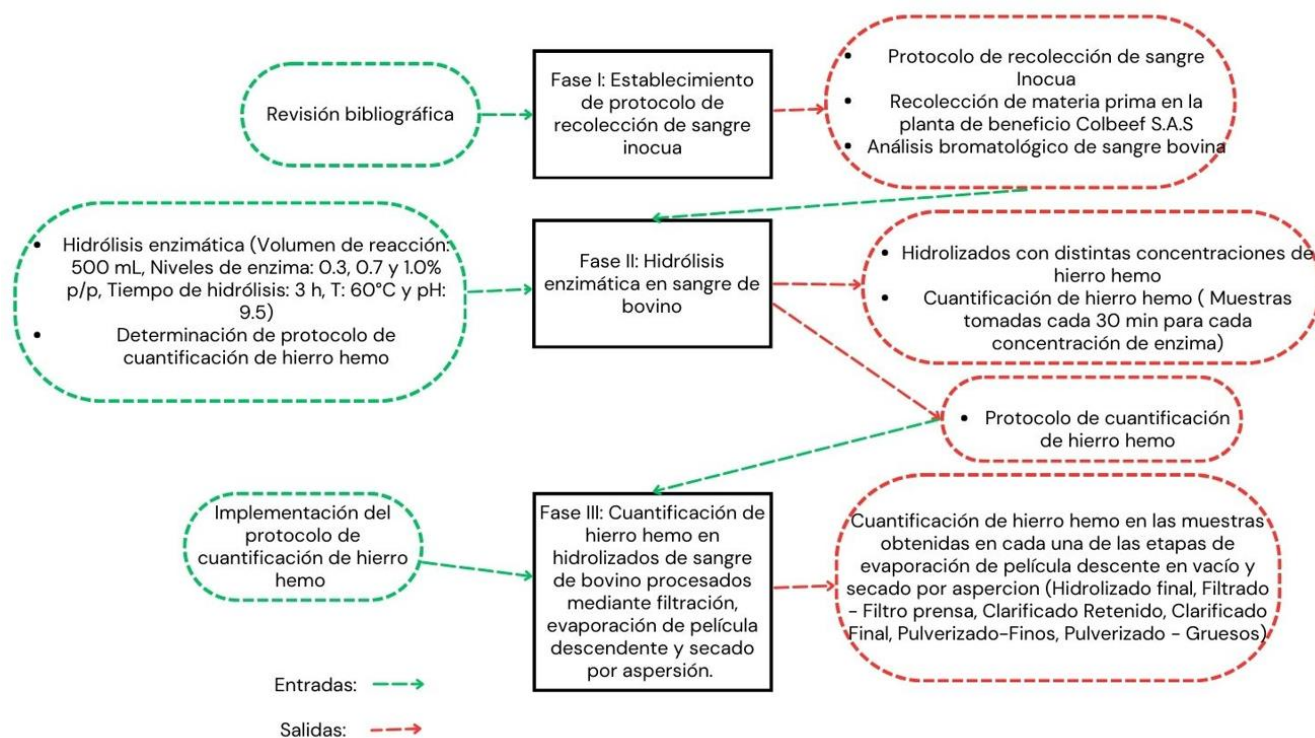
en el país. La extracción con acetona ácida fue el método utilizado para la recuperación de hierro hemínico a partir de la sangre de ganso, demostrando alta eficiencia (Wang et al., 2017). De igual manera, en Colombia, en la Universidad Industrial de Santander se realizó una validación interna de los métodos analíticos para la cuantificación de hierro hemínico, no hemo y hierro total en un producto de tipo alimenticio fortificado, logrando porcentajes de variación inferiores al 10% en las metodologías validadas logrando clasificar las técnicas como precisas (Ardila Quintero, 2009).

4. Metodología

La metodología aplicada fue dividida en 3 fases. La Figura 2 ilustra las fases y las actividades de la metodología.

Figura 2

Fases metodológicas del proyecto



4.1. Fase I: Establecimiento de protocolo de recolección de sangre inocua

4.1.1. Revisión bibliográfica

Se realizó una revisión bibliográfica en el repositorio institucional de la Universidad Industrial de Santander, utilizando palabras clave como “sangre bovina”, “inocuidad de sangre”, “recolección”, las ecuaciones de búsqueda se plantearon utilizando el operador booleano “y”. El periodo de tiempo comprendido en los documentos está entre 2000 a 2023. En la revisión de las

normas y leyes establecidas para la recolección de derivados en las plantas de beneficio animal de categoría nacional fue utilizado el sistema de información del Ministerio de Salud y Protección Social, el cual por medio de la resolución número 2905 de 2007 establece el reglamento técnico utilizado para los parámetros sanitarios y de inocuidad en productos comestibles cárnicos o destinados para el consumo humano y sus distintas disposiciones.

En el proceso de revisión de los distintos documentos encontrados se realizaron los siguientes filtros para obtener los documentos con criterios de interés para la elaboración del protocolo:

- **Título:** Se tuvo en cuenta que se relacionara la obtención de la sangre bovina como materia prima para distintos procesos de valorización o fortificación de alimentos.
- **Resumen:** En el resumen de los documentos se buscó que se expresara como se realiza la obtención de la materia prima y cuáles son los procedimientos adecuados para que sea inocua.
- **Contenido:** Para este último proceso de revisión se analizó y depuró la información, escogiendo los documentos que tuvieran relación directa con el proceso de recolección de sangre inocua en plantas de beneficio de tipo nacional.

Se indagó en distintos sitios de información de plantas de tratamiento y temas de interés como CarneTec, un blog en línea de la revista CarneTec, sus ediciones contienen artículos especializados sobre el procesamiento y la ciencia de la carne. De igual manera, se estableció una organización de los documentos seleccionados en el gestor bibliográfico Mendeley, donde fueron cargados los documentos de interés, de esta manera, se obtuvo información de los autores, año de publicación y resumen. Además de la investigación bibliográfica, con el apoyo de la empresa Colbeef S.A se realizó una visita previa para conocer de cerca cómo era el proceso de beneficio

en sus instalaciones, debido a esto se pudo identificar el mejor momento para realizar la recolección de la sangre y las consideraciones que se debían tomar antes, durante y después de la recolección.

4.1.2. Creación del protocolo de recolección inocua:

Se estableció el protocolo de recolección de sangre bovina en planta de beneficio de tipo nacional teniendo en cuenta las recomendaciones y operaciones establecidas en los distintos documentos encontrados en la primera actividad, entre ellos: Decreto número 1500 de 2007, Decreto número 2270 de 2012, la Resolución número 2905 de 2007, los principios generales de higiene en comida CAC/RCP 1-1969, Rev. (2020) y la norma técnica NTP 901 de 2011. Para la redacción del protocolo se siguió el formato establecido en el semillero de investigación CICTA de la Universidad Industrial de Santander.

4.2. Fase II: Proceso de hidrólisis enzimática en sangre de bovino

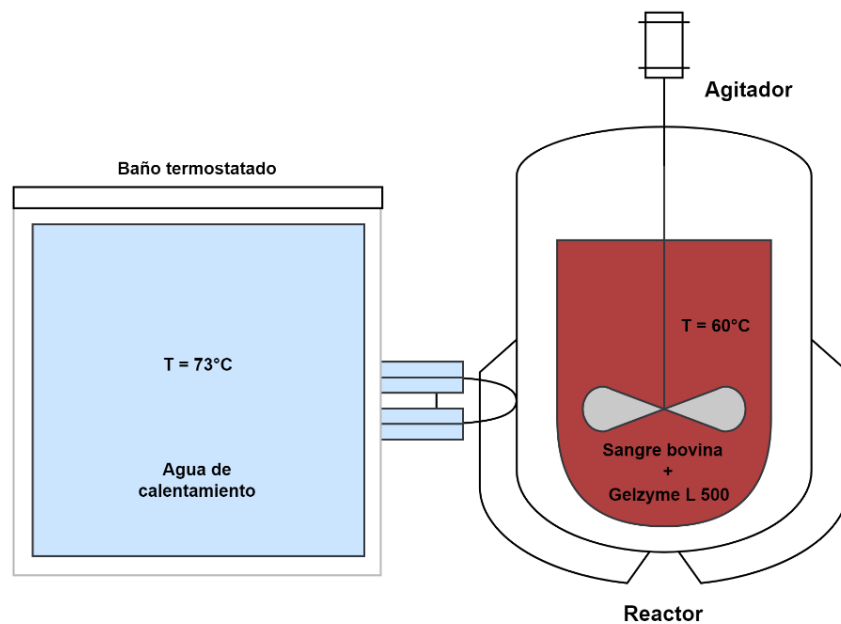
4.2.1. Hidrólisis enzimática

Se estableció un proceso de hidrólisis buscando evaluar el efecto del tiempo y la concentración de enzima en el grado de hidrólisis. Se emplearon 500 mL de sangre de bovino obtenida de la planta de beneficio Colbeef S.A.S, (Girón, Santander) adicionándole citrato de sodio al 3.2% p/v como anticoagulante (Laboratorio Clínico ASTECLAB, 2012). Para el proceso de hidrólisis enzimática se realizó un montaje experimental el cual consistió en la implementación de un reactor tipo batch hermético de 5 L, el cual consta de una chaqueta de calentamiento, por el cual fluía agua caliente a través de un baño termostatado como se muestra en la Figura 3. Dentro del reactor se incorporó un recipiente para la disposición de la muestra que sería hidrolizada. En el montaje era requerido también un agitador mecánico. La enzima empleada en este

procedimiento fue GELZYME L-500 (Proenzimas S.A.). Se estableció como variable de entrada la concentración de enzima. Los niveles evaluados con respecto a la concentración de enzima fueron de 0.3, 0.7 y 1.0 %p/p, durante un tiempo de reacción de 3 h a una temperatura de 60 °C y pH 9.5. Estas condiciones de reacción fueron establecidas teniendo en cuenta la ficha técnica de la enzima empleada (Apéndice A).

Figura 3

Montaje del reactor utilizado



Se aclimataron las muestras a temperatura ambiente y posteriormente se ajustó el pH a 9.5 utilizando NaOH al 5 N. La reacción inició agregando la enzima y seguido a esto, se realizó un control de las condiciones establecidas cada 3 minutos. El pH se midió con un medidor portátil de pH y la temperatura con un termómetro de mercurio. Durante el tiempo de reacción se agregaron cantidades de NaOH al 5 N con el fin de mantener constante el valor de pH del volumen de

reacción. La reacción se detuvo a las 3 h, llevando la muestra a una temperatura de 20 °C y disminuyendo el pH hasta 7.0 con HCl al 5 N (Monroy Rodríguez, 2013).

Para la determinación del grado de hidrólisis se empleó el método pH stat con las siguientes ecuaciones:

$$\%GH = B \times NB * \frac{1}{\alpha} * \frac{1}{MP} * \frac{1}{ht} \times 100\% \quad (\text{Ec. 1})$$

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

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

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, MP (kg) es la cantidad de proteína en la mezcla de reacción, y 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).

4.2.2. Establecimiento del protocolo de cuantificación de hierro hemínico

Se estableció un procedimiento de cuantificación de hierro hemínico basándose en los métodos aplicados por (Berraquero-García et al., 2022) y (Ardila Quintero, 2009). Se realizó una extracción mediante metil isobutil cetona. Los grupos hemo son extraídos y posteriormente son cuantificados mediante absorbancia a una longitud de onda nominal del grupo hemo (378 nm) en un espectrofotómetro Genesys 20 (Thermo Scientific, USA), dicha longitud de onda fue hallada en este trabajo y se puede evidenciar en el Apéndice B. Se preparó una curva de calibración de

hierro hemínico de 0-20 mg/L en NaOH al 1 N, en el cual se empleó el patrón Hemin Chloride 3741 (Merck Millipore Corp). Los patrones y las muestras fueron tratados de la siguiente manera:

Se dispuso 1 mL de la muestra en tubos Eppendorf forrados con papel aluminio. La reacción se inició agregando 4 μ L de agua, 1 μ L de HCl y 45 μ L de metil isobutil cetona, posteriormente la muestra se agitó manualmente durante 30 s y se llevó a un baño ultrasónico EASY 30 H (Elmasonic, Alemania) durante 10 min, una vez terminado este tiempo la muestra se dejó en oscuridad durante 1 hora. Se centrifugó en una microcentrífuga Prism a 2260 g durante 10 min y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de PVDF de 0.45 μ m. Por último, se midió la absorbancia del filtrado utilizando como blanco NaOH al 1 N a una longitud de onda nominal de 378 nm. El protocolo establecido se encuentra en el Apéndice C.

De igual manera, se realizó el proceso de cuantificación a las muestras tomadas cada 30 minutos hasta terminar la reacción de hidrólisis de 3 h a concentraciones de enzima de 0.3, 0.7 y 1.0 %p/p, dichas muestras fueron diluidas 50 veces en agua. La absorbancia se interpoló en la curva de calibración de hierro hemínico.

4.3. Fase III: Cuantificación y comparación del hierro hemínico en las muestras obtenidas en cada una de las etapas de evaporación de película descendente en vacío y secado por aspersion.

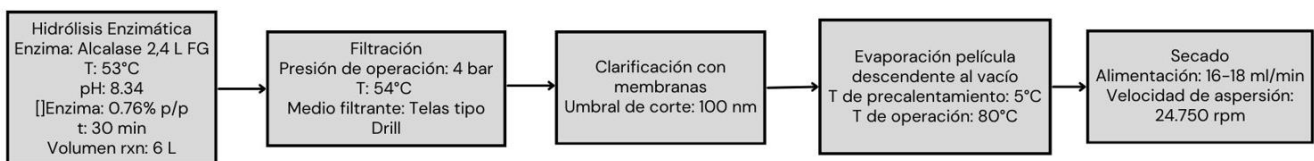
4.3.1. Análisis del hierro hemínico

Como parte del proyecto global se realizó el trabajo de grado en ingeniería química: “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” (Castillo Hernández & Ortiz Ardila, 2023). En este trabajo de grado se realizó una

hidrólisis enzimática de sangre de bovino con la enzima Alcalase 2.4L FG, a una temperatura de 53 °C, pH aproximado de 8.34 y una concentración de enzima de 0.76% p/p durante 30 min en un volumen de reacción de aproximadamente 6 L. Posteriormente se realizó una filtración con filtro prensa con el fin de retirar los sólidos de mayor tamaño, la presión de operación fue de 4 bar, temperatura de 54 °C y 3 telas tipo Drill como medio filtrante. Se realizó una clarificación con membranas con umbral de corte de 100 nm, estos clarificados se concentraron mediante un evaporador de película descendente al vacío con temperatura de precalentamiento y operación de 45 y 80 °C respectivamente. El hidrolizado concentrado obtenido de la evaporación se alimentó a un secador a razón entre 16-18 ml/min y el motor a una velocidad de aspersión de 24.750 rpm (Figura 4). Durante el procedimiento se tomaron muestras antes y después de cada operación unitaria. Dichas muestras fueron sometidas en el presente trabajo al proceso de cuantificación de hierro hemínico para hacer seguimiento durante el procesamiento.

Figura 4

Etapas del proceso de evaporación de película descendente en vacío y secado por aspersión



Se realizó una comparación de la cantidad de hierro hemínico encontrado en las muestras recolectadas en las hidrólisis enzimáticas desarrolladas con la enzima GELZYME L-500 y la enzima Alcalase 2.4L FG.

5. Resultados

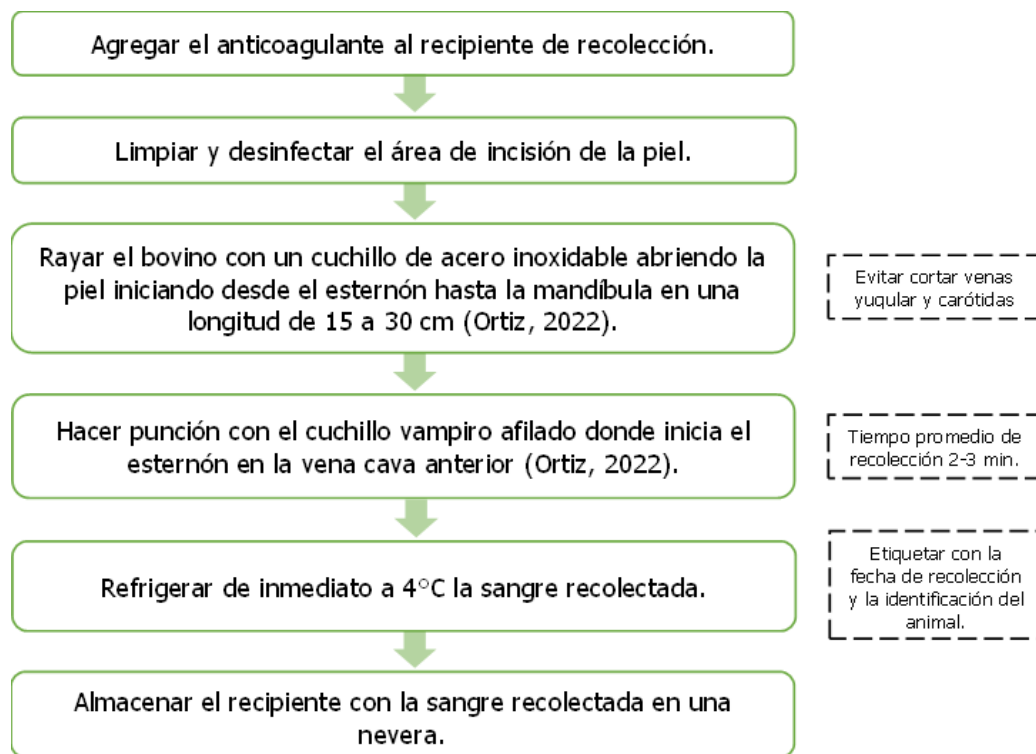
5.1. Elaboración del protocolo de recolección inocua de sangre bovina

El protocolo de recolección inocuo de sangre de bovino aquí establecido puede ser aplicado en la recolección de sangre bovina en plantas de beneficio animal de tipo nacional (Apéndice D).

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada se formuló el protocolo para evitar la contaminación cruzada al momento de la recolección de la sangre (Figura 5), por lo cual, fueron implementadas las siguientes consideraciones: los materiales deben ser exclusivos para esto y deben ser de acero inoxidable o de grado alimenticio, como el cuchillo vampiro fabricado en acero inoxidable AISI 304 (Apéndice E) que se utilizó para la recolección. Así mismo se realizó una conexión hermética entre el cuchillo vampiro, la manguera de transporte y el recipiente de recolección. Cabe aclarar que todos los materiales fueron previamente esterilizados. Por último, el personal encargado debe llevar indumentaria adecuada y limpia, tales como: calzado de seguridad (impermeable y antideslizante), guantes, gafas o pantallas de protección, casco de seguridad acompañado de cofia.

Figura 5

Diagrama de flujo del protocolo de recolección inocua de sangre bovina



5.1.1. Caracterización de la sangre de bovino

En la tabla 1 se presentan los resultados de los análisis bromatológicos realizados por el Laboratorio de Alimentos CICTA, para la muestra de sangre bovina.

Tabla 1

Resultados de análisis bromatológico realizado a una muestra de sangre bovina

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

En la tabla 1 se puede evidenciar que la sangre de bovino mostró características semejantes a las reportadas en investigaciones previas, Acosta (2013) reportó que la sangre de bovino contiene 78.33% de humedad y 18.6% de proteínas. Este último es muy cercano al valor reportado por la muestra de sangre analizada en este trabajo, siendo de 17.58%.

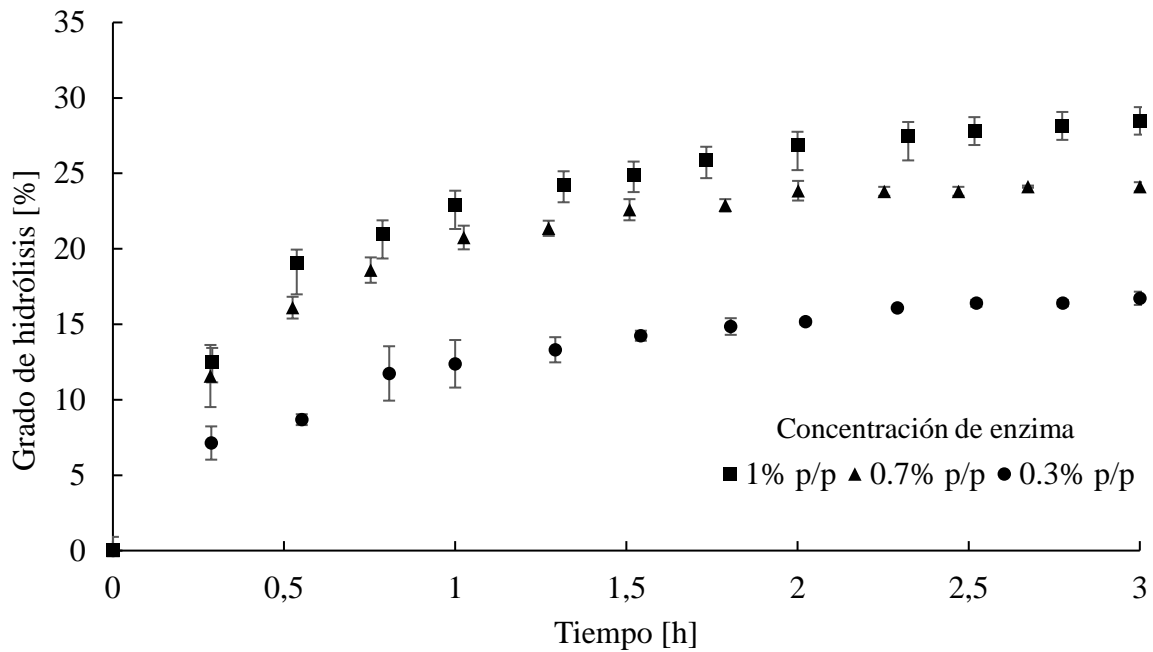
5.2. Hidrólisis enzimática

5.2.1. Grado de hidrólisis

En el proceso de hidrólisis enzimática se pudo evidenciar un aumento en el grado de hidrólisis a medida que aumenta el tiempo de reacción y la concentración de enzima. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6.

Figura 6

Resultados del grado de hidrólisis en función de tiempo de reacción utilizando tres concentraciones de enzima GELZYME L-500 (1.0%p/p; 0.7%p/p y 0.3%p/p) en 500 mL de sangre bovina a 60 °C y pH 9.5.



A su vez, se puede identificar que pasadas dos horas de reacción el grado de hidrólisis tiende a mantenerse constante, esto se puede justificar por una disminución en el número de enlaces peptídicos disponibles para el ataque enzimático.

Al reportarse un valor de proteínas (17.58%) para la sangre bovina empleada en la tabla 1, se logró calcular el grado de hidrólisis correspondiente a este subproducto. Los resultados de los grados de hidrólisis cuando se completó el tiempo de reacción a concentraciones de la enzima de 1% p/p, 0.7% p/p y 0.3% p/p fueron de 28.48%, 25.51% y 17.69%, respectivamente. (Lafarga & Hayes, 2017) mencionaron que la concentración de enzima es el parámetro con mayor influencia

en la hidrólisis enzimática, seguido de parámetros como la temperatura y el pH (Montanero Zambrano et al., 2022) como se evidencia en los resultados obtenidos en este trabajo.

5.3. Curva de calibración para la medición de hierro hemínico

Con los resultados de absorbancia de las muestras patrón reportados en la tabla 2 se construyó la curva de calibración para hierro hemínico que se observa en la figura 7.

Tabla 2

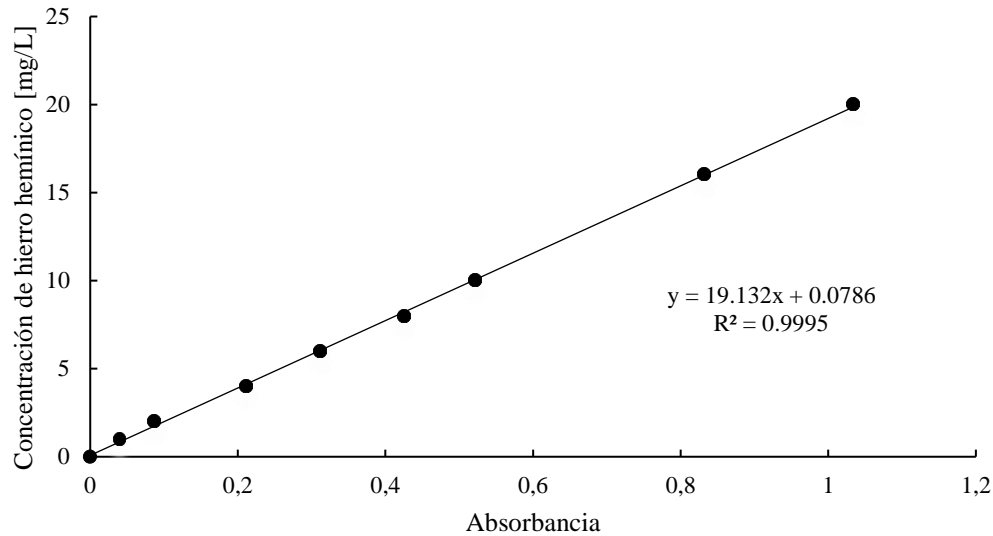
Lecturas de absorbancia de patrones de hierro hemínico

Concentración de hierro hemínico [mg/L]	Absorbancia
0	0
1	0.04
2	0.087
4	0.212
6	0.312
8	0.426
10	0.522
16	0.832
20	1.034

El valor obtenido en el coeficiente de correlación ($R = 0.9995$) evidenciado en la Figura 7, muestra que existe correlación lineal entre la absorbancia y la concentración de hierro hemínico.

Figura 7

Curva de calibración de hierro hemínico

**5.3.1. Determinación de hierro hemínico**

El hierro hemínico fue cuantificado de la forma descrita en la metodología en el numeral 4.2.2, esta cuantificación fue realizada a las muestras hidrolizadas teniendo en cuenta las diferentes concentraciones de enzima empleadas.

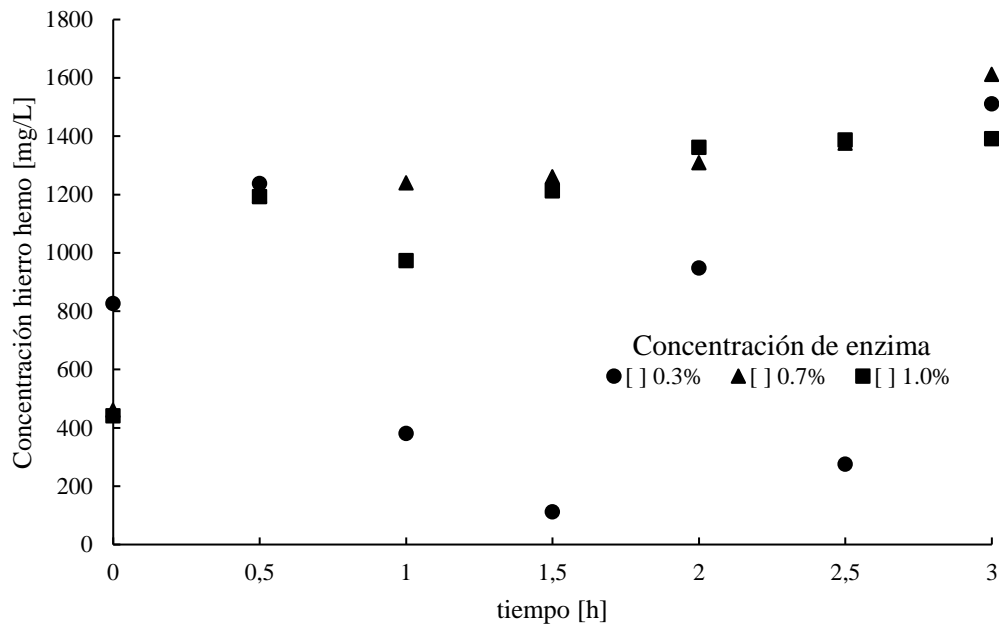
En la figura 7 se evidencia una mejor respuesta en la concentración de hierro hemínico en toda la reacción a una concentración de enzima de 1.0% p/p, con respecto a las otras dos concentraciones (0.7 y 0.3 %p/p), esto puede ser justificado debido a que a una mayor concentración de enzima se aumenta la probabilidad de encuentros con el sustrato y posteriormente el rompimiento de enlaces peptídicos, facilitando el proceso de cuantificación de hierro hemínico.

Se pudo evidenciar que el grado de hidrólisis tiene influencia sobre la cantidad de hierro hemínico en cada uno de los hidrolizados, al ser mayor este valor, aumenta la cantidad de hierro hemínico cuantificado en la muestra, como fue el caso de la muestra hidrolizada con concentración

de enzima de 1.0% en la cual se obtuvo un grado de hidrólisis de 28.48% y una concentración de hierro hemínico en la muestra final de 1391 mg/L. También, se refleja que después de las dos horas de reacción la concentración de hierro tiende a permanecer constante para las dos concentraciones más altas (0.7 y 1.0% p/p), estos resultados pueden ser relacionados con el grado de hidrólisis, que tiende a ser constante después de dos horas de reacción. Sin embargo, para una concentración menor de enzima (0.3% p/p) los valores de concentración de hierro presentaron variaciones, siendo mayor el valor en el tiempo inicial de 826.61 mg/L y disminuyendo pasadas una hora y media de reacción, obteniendo un valor de concentración de 112.03 mg/L, sin embargo, la muestra final para dicha concentración de enzima aumentó a 1510.58 mg/L. La variación de concentración de hierro en las muestras para la concentración de enzima de 0.3% p/p se debe a que el comportamiento de las muestras no fue el esperado, con esto se pudo evidenciar que a menor concentración de enzima se pueden presentar mayores dificultades en el proceso de cuantificación de hierro hemínico.

Figura 8

Concentración de hierro hemínico en un tiempo de hidrólisis de 3 horas



5.4. Cuantificación del hierro hemínico en las muestras obtenidas en el procesamiento de los hidrolizados por filtración, evaporación de película descendente en vacío y secado por aspersión.

La cuantificación de hierro hemínico se realizó a las muestras obtenidas al final de la hidrólisis enzimática, el filtrado del filtro prensa, los retenidos en el proceso de clarificado y los finales del clarificado, el hidrolizado concentrado final y por último los polvos finos y gruesos obtenidos en el proceso de secado.

Tabla 3

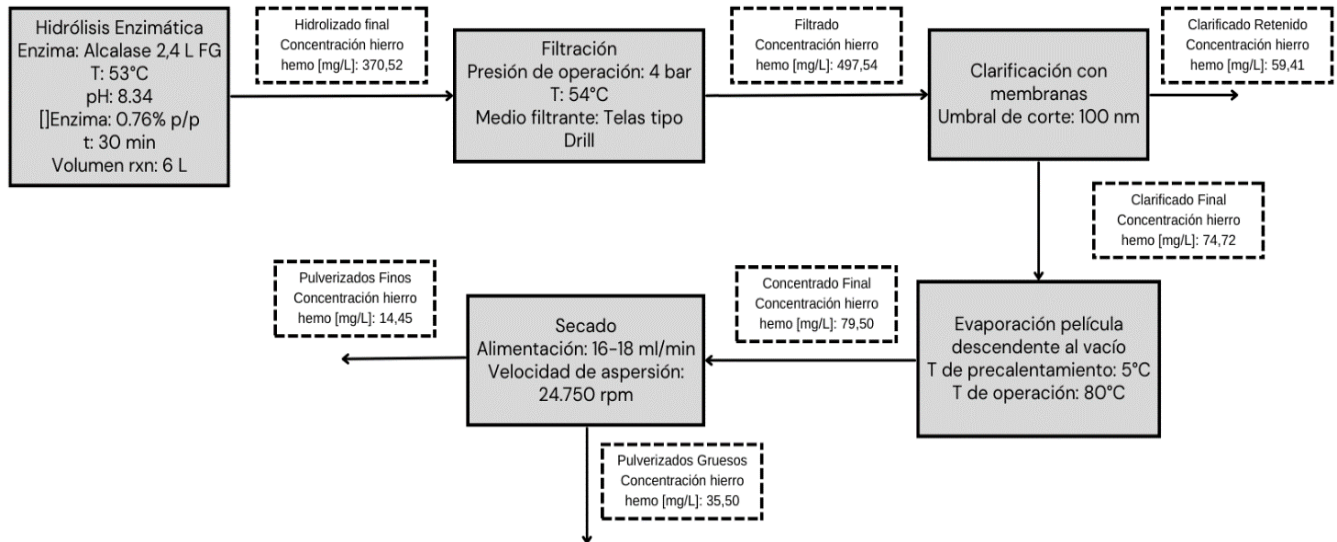
Resultados de la medición de concentración de hierro hemínico en cada una de las etapas de evaporación de película descendente de vacío y secado por aspersión

Muestra	Concentración [mg/L]
Hidrolizado Final	370.52
Filtrado – Filtro prensa	497.54
Clarificado Retenido	59.41
Clarificado Final	74.72
Concentrado Final	79.50
Pulverizado – Finos	14.45
Pulverizado – Gruesos	35.50

Se evidenció un aumento de concentración de hierro hemínico en el proceso de filtrado con respecto al hidrolizado obtenido siendo estos de 497.54 y 370.52 mg/L respectivamente, pero una disminución de este en las demás etapas, evidenciando una menor concentración en el resultado de pulverizado siendo de 14.45 mg/L (Figura 8), esto puede estar relacionado a la pérdida de agua que se evidencia en el proceso de secado, lo que puede influir en la concentración aparente de hierro hemínico. La disminución de la concentración de hierro hemínico en el proceso de clarificado puede ser asociado a la retención de hemoglobina en las membranas, debido a que la hemoglobina representa un alto peso molecular (64 KDa).

Figura 9 Relación de las muestras cuantificadas de hierro hemínico con cada una de las etapas de evaporación de película descendente de vacío y secado por aspersión

Relación de las muestras cuantificadas de hierro hemínico con cada una de las etapas de evaporación de película descendente de vacío y secado por aspersión.



En la tabla 4 se compara la concentración de hierro cuantificada de los hidrolizados de las muestras realizadas con la enzima Gelzyme L-500 a una concentración de 0.7 % y con la enzima Alcalasa a una concentración de 0.76%. Se debe tener en cuenta que el grado de hidrólisis con la Alcalasa fue de 11% (Castillo Hernández & Ortiz Ardila, 2023) y con la Gelzyme L-500 fue de 16.1% a los 30 minutos de hidrólisis. Se logra evidenciar una relación entre el grado de hidrólisis y la concentración de hierro hemínico al comparar las enzimas, evidenciando que a mayor grado de hidrólisis se presente una mayor cantidad de hierro hemínico. La enzima Gelzyme L-500 obtuvo un mayor valor de grado de hidrólisis, y, por ende, mayor concentración de hierro hemínico. Además, según la ficha técnica la enzima Gelzyme L-500 es útil sobre proteínas como la hemoglobina, caseína, albúmina, proteínas de pescado, entre otras.

Tabla 4

Comparación entre la concentración de hierro hemínico cuantificada con enzimas Alcalasa (0.76 % p/p) y Gelzyme L-500 (0.7 % p/p)

Enzima	Concentración enzima [% p/p]	Concentración hierro hemínico [mg/L]	Tiempo [min]
Gelzyme L-500	0.7	1195.85	30
Alcalasa	0.76	370.31	

6. Conclusiones

Este trabajo permitió el establecimiento e implementación del protocolo de recolección inocuo de sangre de bovina, evitando la contaminación cruzada al seguir las consideraciones mencionadas en el protocolo y por el cual se concluye que es necesario adquirir e implementar el cuchillo vampiro al momento de la recolección, debido a que este permite una conexión directa con la manguera y el recipiente de recolección, lo que asegura que la sangre no se exponga al ambiente, asimismo, que el cuchillo se debe afilar cada vez que se utilice y así asegurar la recolección.

Se logró analizar el efecto del tiempo y la concentración de enzima sobre el grado de hidrólisis, donde se pudo evidenciar que a mayor concentración de enzima se alcanza un mayor grado de hidrólisis en el mismo tiempo de reacción, el mayor grado de hidrólisis obtenido fue 28.48% para la concentración de enzima de 1.0% p/p.

Se realizó la cuantificación de hierro hemínico de los hidrolizados obtenidos, donde se logró evidenciar que los hidrolizados con mayor concentración de enzima presentan mayores valores de hierro hemínico en la muestra, por lo que, las mejores condiciones para la cuantificación de hierro hemínico se dieron al emplear una concentración de enzima de 0.7%p/p, obteniendo en la muestra final 1611.97 mg/L de hierro hemínico. Así mismo, después de pasadas dos horas de

reacción la concentración de hierro hemínico tiende a mantenerse constante en los hidrolizados de concentración de enzima de 0.7% y 1.0% p/p.

Se logró cuantificar la cantidad de hierro hemínico presente en cada una de las muestras tomadas al inicio y final de cada una de las operaciones unitarias del proceso de evaporación de película descendente en vacío y secado por aspersión, donde se presentó una disminución progresiva después de la segunda etapa del proceso (filtrado). Al principio del procedimiento (Hidrólisis enzimática) se obtuvo una concentración de 370.52 mg/L de hierro hemínico y al final (secado) de 35.50 mg/L para los polvos gruesos y 14.45 mg/L para los polvos finos.

7. Recomendaciones

Se recomienda realizar pruebas microbiológicas a las muestras de sangre recolectadas empleando el protocolo de recolección inocuo de sangre bovina establecido en este trabajo, importante para investigaciones relacionadas con la fortificación de alimentos.

Para la hidrólisis enzimática se recomienda emplear un tiempo menor a 2 horas de reacción para las concentraciones de enzima Gelzyme L-500 (0.7 y 1.0 % p/p), ya que pasadas estas 2 horas el grado de hidrólisis tiende a mantenerse constante.

Se recomienda realizar un estudio que analice la distribución de tamaños de proteína en el hidrolizado obtenido, con el fin de realizar una caracterización de los productos obtenidos.

Referencias bibliográficas

- Acosta Camacho, J. S., & Rios 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.
- Arango Ruiz, Á. de J., Vélez Argumedo, C. M., Jaramillo Garcés, Y., Valencia Rojas, M. A., & Hernández Sierra, Á. (2012). Cuantificación de hierro ferroso en espinaca y harina fortificada: una aplicación para la industria de panificación. *J. Eng. Technol*, 1.
- 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.
- Beltrán Fernández, C., & Perdomo Robayo, W. F. (2007). Aprovechamiento de la sangre de bovino para la obtención de harina de sangre y plasma sanguíneo en el Matadero Santa Cruz de Malambo Atlántico [Universidad de La Salle]. https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/107
- Berraquero-García, C., Almécija, M. C., Guadix, E. M., & Pérez-Gálvez, R. (2022). Valorisation of blood protein from livestock to produce haem iron-fortified hydrolysates with antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 57(4), 2479–2486. <https://doi.org/10.1111/IJFS.15616>
- Boccio, J., Concepción Páez, M., Zubillaga, M., Salgueiro, J., Goldman, C., Domingo, B., Martínez Sarrasague, M., & Weill, R. (2004). Causas y consecuencias de la deficiencia de hierro sobre la salud humana. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000200005&lng=es&tlng=es.

Castillo Hernández, L. A., & Ortiz Ardila, R. J. (2023). 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.

Chang Escalante, I. J., & Panduro Reátegui, X. Y. (2017). Sangre bovina en polvo para fortificación de galletas. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

Gómez, L. J., Figueroa, O. A., & Zapata, J. E. (2013). Actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de plasma bovino obtenidos por efecto de alcalasa® 2.4 L. *Informacion Tecnologica*, 24(1), 33–42. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000100005>

González Urrutia, R. (2005). Biodisponibilidad del hierro. *Revista Costarricense de Salud Pública*. from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292005000100003&lng=en&tlng=es.

Gordon Betts, J., Young, K. A., Wise, J. A., Johnson, E., Poe, B., Kruse, D. H., Korol, O., Johnson, J. E., Womble, M., & DeSaix, P. (2013). *Anatomy and Physiology*. OpenStax. <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/18-3-erythrocytes>

Instituto Linus Pauling. (2023). *Hierro*. <https://lpi.oregonstate.edu/es/mic/minerales/hierro#:~:text=El%20hierro%20del%20cu>

Laboratorio Clínico ASTECLAB. (2012). Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología . https://issuu.com/laboratorio_hu/docs/hematologia-manual-asteclab/46

- Lafarga, T., & Hayes, M. (2017). Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: Overcoming current challenges. En *Food Reviews International* (Vol. 33, Número 3, pp. 217–246). <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175013>
- Monroy Rodríguez, R. A. (2013). Valorización de residuos de sangre de bovino mediante hidrólisis enzimática integrando procesos con membranas. Universidad Industrial de Santander.
- 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. *Publicación Trimestral*, 7(1), 17–36.
- 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. *Informacion Tecnologica*, 28(2), 75–86. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000200009>
- Pastor Miranda, J. (2018). Procedimiento: recolección, transporte y conservación de sangre bovina obtenida de mataderos autorizados.
- protena*. (s/f). Recuperado el 9 de julio de 2022, de <https://protena.com.ni/>
- Villavicencio Queijeiro, A. (2012). La mitocondria como fábrica de cofactores: biosíntesis de grupo hemo, centros Fe-S y nucleótidos de flavina (FMN/FAD). En *D.R. © TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* (Vol. 116, Número 2).
- Wang, B., Cheng, F., Gao, S., Ge, W., & Zhang, M. (2017). Double enzymatic hydrolysis preparation of heme from goose blood and microencapsulation to promote its stability and absorption. *Food Chemistry*, 217, 699–704. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.007>

Yeruvá. (s/f). Recuperado el 9 de mayo de 2022, de <https://www.yeruva.com.ar/>

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.

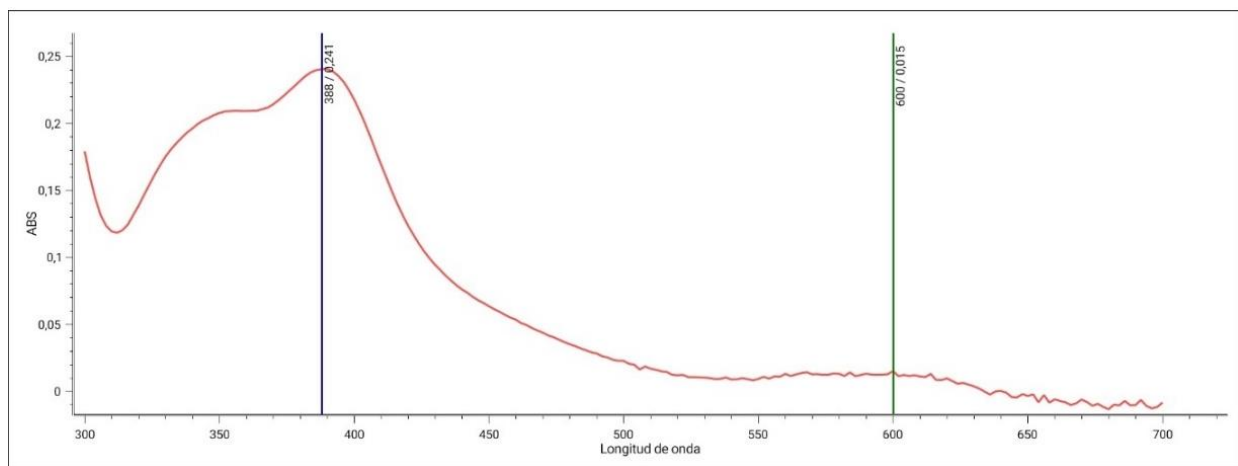
La información técnica y sugerencias para su uso, contenidas en el presente documento, se cree que son confiables, pero no pueden construirse como garantías. Las especificaciones están sujetas a cambios basados en variaciones de las materias primas. Proenzimas S.A. no se hace responsable de los resultados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

Apéndice B Determinación de la longitud de onda nominal


La figura 1 muestra el espectro de absorción de radiación visible del patrón de hierro hemínico de 8 mg/L, en el rango de 300 a 700 nm. Donde se observa que a 388 nm ocurre la mayor absorción de radiación para el hierro hemínico.

Figura 1

Espectro de absorción de hierro hemínico



Apéndice C Protocolo de cuantificación de hierro hemínico

	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	PROTOCOLO DE CUANTIFICACIÓN DE HIERRO HEMÍNICO	CODIGO
			Versión: 01
			Página 1 de 5

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

OBJETO	ALCANCE
Describir el procedimiento para la cuantificación de hierro hemínico en hidrolizados de sangre bovina utilizando método espectrofotométrico.	Aplica para la medición de hierro hemínico en hidrolizados de sangre bovina.
DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	
Hierro hemínico: Forma parte de proteínas como la hemoglobina, mioglobina y entre otras hemoproteínas, que están presentes únicamente en alimentos de origen animal.	

PROTOCOLO DE CUANTIFICACIÓN DE HIERRO HEMÍNICO


CONSIDERACIONES

Muestras, materiales y equipos:

- Forrar los tubos eppendorf de 1,5 mL con papel aluminio y cinta de papel para mejor ajuste, como se muestra a continuación:



- Cambiar el agua del baño ultrasónico cada vez que se utilice para evitar que se caliente el agua.
- Apagar la luz del lugar de trabajo para evitar el contacto directo de la luz con las muestras

	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	PROTOCOLO DE CUANTIFICACIÓN DE HIERRO HEMÍNICO	CODIGO
			Versión: 01
			Página 3 de 5

METODOLOGÍA

Acondicionamiento de la muestra de hidrolizado:

- Descongelar las muestras hasta temperatura ambiente y agitarlas.
- Diluir las muestras en agua 50 veces, preparando 1,5 mL.

Preparación del patrón para la curva de calibración:

Construir una curva de calibración a partir de una solución stock de 20 mg/L

- Preparar la solución stock de patrón de hierro hemo a 20 mg/L:


En un vaso precipitado forrado con papel aluminio se pesan 0,0004 g de Hemin Chloride, luego se le agregan 20 mL de NaOH al 1N y se agitan por 5 minutos para homogenizar la solución. Luego, se agrega la solución preparada en un tubo de centrífuga de 50 mL forrado con papel aluminio. A partir de la solución concentrada, realizar diluciones a concentraciones de 16, 10, 8, 6, 4, 2 y 1 mg/L, preparar 1,5 mL de cada dilución en tubos eppendorf forrados con papel aluminio.

- Seguir el procedimiento de medición de hierro hemo en los hidrolizados sin diluir 50 veces, usando NaOH como blanco.
- Construir la curva de calibración de Absorbancia Vs Concentración de hierro hemínico con los valores de absorbancia obtenidos.

Medición de hierro hemo en los hidrolizados:

1. En un tubo eppendorf forrado con papel aluminio agregar 1 mL de muestra diluida 50 veces, 45 μ L de metil isobutil cetona, 4 μ L de agua y 1 μ L de HCl concentrado.
2. Mezclar por 30 segundos.
3. Llevar a un baño ultrasónico durante 10 min.



	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	PROTOCOLO DE CUANTIFICACIÓN DE HIERRO HEMÍNICO	CODIGO
			Versión: 01
			Página 4 de 5



- Mantener las muestras en la oscuridad por 1 hora.
- Centrifugar a 2260 g por 10 minutos.





Microcentrífuga Prism

- Recolectar el sobrenadante con jeringa de 1 mL y filtrar a través de un filtro de PVDF 0,45 μm .
- Tomar 0,6 mL de la muestra filtrada y 2,4 mL de NaOH al 1N y depositarlos en una cubeta de cuarzo de 3 mL.
- Medir absorbancia de las muestras a la 378 nm de longitud de onda nominal.



Espectrofotómetro Genesys 20 Thermo Scientific


 	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	PROTOCOLO DE CUANTIFICACIÓN DE HIERRO HEMÍNICO	CODIGO
			Versión: 01
			Página 5 de 5

REFERENCIAS

Armando, J., Quintero, A., De, F., Escuela, C., & Química, D. E. (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.*

Berraquero-García, C., Almécija, M. C., Guadix, E. M., & Pérez-Gálvez, R. (2022). Valorisation of blood protein from livestock to produce haem iron-fortified hydrolysates with antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 57(4), 2479–2486. <https://doi.org/10.1111/IJFS.15616>

Apéndice D Protocolo de recolección inocuo de sangre bovina

 	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	PROTOCOLO DE RECOLECCIÓN INOCUO DE SANDRE BOVINA	CODIGO
			Versión: 01
			Página 1 de 2

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

OBJETO	ALCANCE
Describir el protocolo de recolección inocuo de sangre de bovino, para su posterior uso en la formulación de alimentos para consumo humano.	Aplica para la recolección de sangre inocua en plantas de beneficio animal de tipo nacional.
NORMATIVIDAD	
Decreto número 1500 de 2007, Decreto número 2270 de 2012, Resolución número 2905 de 2007, CAC/RCP 1-1969, Rev. (2020) y NTP 901 de 2011.	
DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	
<ul style="list-style-type: none"> - Cuchillo vampiro: cuchillo hueco fabricado en acero inoxidable AISI 304. - Contaminación cruzada: es el proceso mediante el cual la suciedad o los microorganismos se expanden de una superficie a otra. 	

PROTOCOLO DE RECOLECCIÓN INOCUO DE SANDRE BOVINA**CONSIDERACIONES**

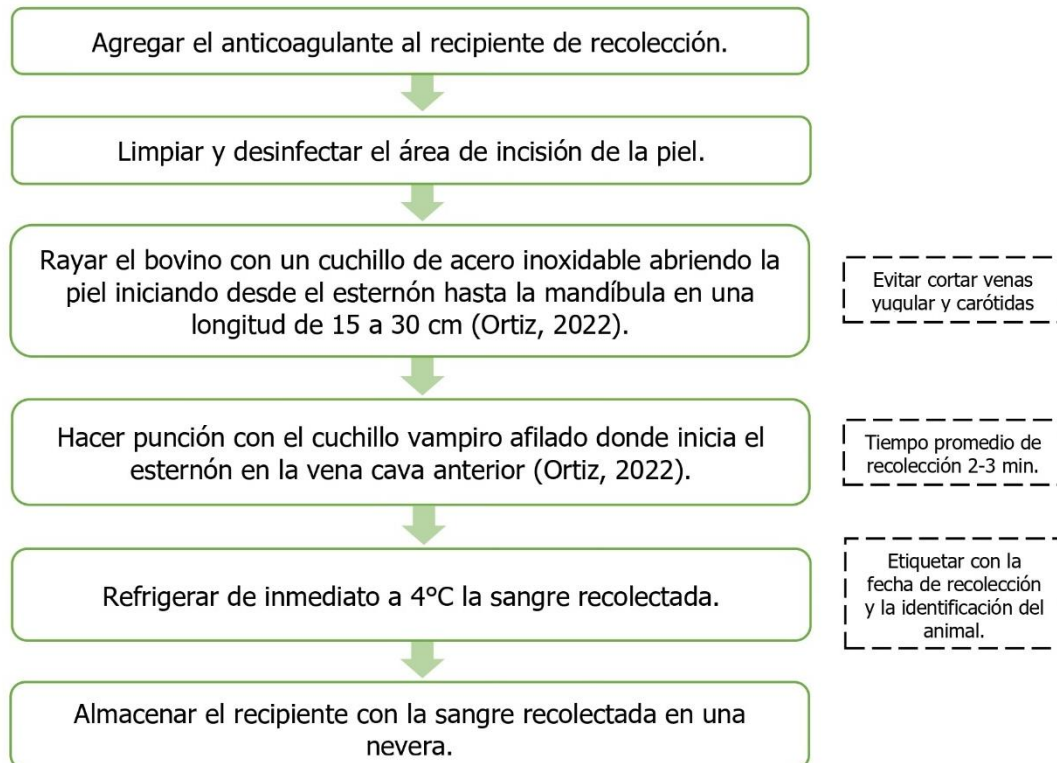
- El personal encargado de la recolección debe llevar la indumentaria adecuada y limpia. Se recomienda disponer de calzado de seguridad (impermeable y antideslizante), guantes (impermeables), gafas o pantallas de protección, casco de seguridad acompañado de cofia.
- Los materiales empleados deben ser exclusivos para la recolección de la sangre para evitar la contaminación cruzada.
- La recolección de sangre debe realizarse en un recipiente por cada animal, y a su vez, los materiales, equipos y utensilios que se usan en el proceso deben ser de acero inoxidable o de grado alimenticio que no sean absorbentes y que no emitan sustancias tóxicas.
- Se debe realizar una conexión hermética entre el cuchillo vampiro, la manguera de transporte y el recipiente de recolección evitando la contaminación cruzada.
- Se debe disponer de una zona de limpieza y recolección de desechos con el fin de evitar riesgos biológicos del personal involucrado en el procedimiento.
- Se debe preparar una solución de citrato de sodio al 3.2% (p/v) y se emplea a razón 1/9 (1 volumen de citrato para 9 volúmenes de sangre) (Laboratorio Clínico ASTECLAB, 2012)

 	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	PROTOCOLO DE RECOLECCIÓN INOCUO DE SANDRE BOVINA	CODIGO
			Versión: 01
			Página 2 de 2

Materiales, equipos y reactivos

- Cuchillo
- Cuchillo tipo vampiro (afilado)
- Manguera lisa flexible, sin porosidad ni pliegues
- Abrazadera para ajustar la manguera al cuchillo vampiro
- Anticoagulante (citrato de sodio)
- Recipiente de recolección de tipo alimenticio
- Conexiones herméticas

METODOLOGÍA



REFERENCIAS

- Laboratorio Clínico ASTECLAB. (2012). *Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología*. https://issuu.com/laboratorio_hu/docs/hematologia-manual-asteclab/46
- Ortiz, L. (2022, May). Aprovechamiento de la sangre de ganado bovino. *Entorno Ganadero*, 8–14.

Apéndice E Ficha técnica cuchillo vampiro

CUCHILLO TIPO VAMPIRO


ASERINOX
 Línea inoxidable ASERAGRO





Dimensiones en milímetros

ESPECIFICACIONES TECNICAS			
Referencia	Largo	Diámetro	Material
CU-VAM	585	63,5	Fabricada en acero inoxidable AISI 304


ASERAGRO[®]
 Asesorías y Representaciones Agroindustriales

Cra 73 No. 45F - 23 | PBX: (4) 444 21 84 | alberto.aguirre@aseragro.com | Medellín - Colombia

Apéndice F Resultados de la medición de absorbancia y concentración de hierro hemínico para cada una de las muestras hidrolizadas a concentración de 1.0, 0.7 y 0.3% p/p.

Tabla 1

Resultados de la medición de absorbancia y concentración de hierro hemínico para la concentración de enzima de 1.0% p/p

Tiempo [h]	Absorbancia	Concentración [mg/L]
0	0.457	441.10
0.5	1.243	1192.98
1	1.013	972.97
1.5	1.264	1213.07
2	1.419	1361.35
2.5	1.446	1387.17
3	1.45	1391.00

Tabla 2

Resultados de la medición de absorbancia y concentración de hierro hemínico para la concentración de enzima de 0.7 % p/p

Tiempo [h]	Absorbancia	Concentración [mg/L]
0	0.478	461.18
0.5	1.246	1195.85
1	1.292	1239.86
1.5	1.314	1260.90
2	1.364	1308.73
2.5	1.434	1375.69
3	1.681	1611.97

Tabla 3

Resultados de la medición de absorbancia y concentración de hierro hemínico para la concentración de enzima de 0.3 % p/p

Tiempo [h]	Absorbancia	Concentración [mg/L]
0	0.86	826.61
0.5	1.29	1237.94
1	0.394	380.83
1.5	0.113	112.03
2	0.987	948.09
2.5	0.284	275.60
3	1.575	1510.58