

Optimización de Hidrólisis Enzimática de la Fracción Globular de Sangre Bovina por Metodología de Superficie Respuesta y Evaluación de sus Propiedades Antioxidantes

Jesús A. Morales^{(1)*}, Omar A. Figueroa⁽²⁾ y José E. Zapata⁽³⁾

(1) Universidad Popular del Cesar, Facultad de Ingenierías y Tecnologías. Grupo GEAB. Balneario Hurtado Vía a Patillal- oficina 205; Valledupar, Cesar – Colombia.

(e-mail: jesusmoralesg@unicesar.edu.co)

(2) Universidad de la Guajira, Programa de Ingeniería Industrial. Kilómetro 5 vía Maicao, Riohacha – Colombia. (e-mail: ofigueroam@uniguajira.edu.co)

(3) Universidad de Antioquia, Grupo de Nutrición y tecnología de Alimentos. Calle 67 No. 53-108, Medellín – Colombia. (e-mail: edgar.zapata@udea.edu.co)

Recibido Jul. 6, 2016; Aceptado Sep. 9, 2016; Versión final Nov. 3, 2016, Publicado Abr. 2017

Resumen

En este trabajo se optimizó la reacción de hidrólisis enzimática de proteínas de la fracción globular de sangre bovina usando la metodología de superficie de respuesta. Se evaluó el efecto de la concentración de sustrato (S_0 : 8-12 %), la relación enzima/sustrato (E_0/S_0 : 4-12 g/100 g proteína) y el pH (8-10), sobre el grado de hidrólisis (GH), en un reactor Batch (temperatura de 55° C, por 2 h). La optimización del modelo estadístico obtenido entregó un máximo GH de 38,08 % para pH: 8,16; S_0 : 6,6 y E_0/S_0 : 14,7, el cual fue corroborado experimentalmente dando un GH de 36,25 ± 0,3 con sesgo negativo de 5 %. A estas condiciones se tomaron muestras a tres tiempos de hidrólisis para evaluar la capacidad antioxidante, con los métodos químicos conocidos como ORAC, ABTS y FRAP. Se alcanzó mayor capacidad antioxidante a mayor tiempo de hidrólisis. Después de una digestión *in vitro* se corroboró que la capacidad antioxidante del hidrolizado se conserva.

Palabras clave: péptidos bioactivos; hidrólisis enzimática; actividad antioxidante; sangre bovina; proteína

Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Bovine Blood Cell Fraction by Response Surface Methodology (RSM) and Evaluation of its Antioxidant Properties

Abstract

In this paper the reaction of enzymatic hydrolysis of the erythrocyte fraction of bovine blood was optimized through the response surface methodology. The effects of substrate concentration (S_0 : 8-12 %), enzyme/substrate ratio (E_0/S_0 : 4-12 g/100 g protein) and pH (8-10), on degree of hydrolysis (DH) working to constant temperature of 55° C in a batch reactor, by 2 h were determined. The optimization of the statistical model obtained gave a maximum DH of 38.08 %, with pH 8.16; S_0 : 6.6 and E_0/S_0 : 14.7, which was experimentally proved giving a DH of 36.25 ± 0.3 with negative bias of 5 %. At the optimal conditions samples were taken at three hydrolysis times to evaluate the antioxidant capacity, which was analyzed with ORAC, ABTS and FRAP methods. Greater antioxidant capacity was obtained at long hydrolysis time. After *in vitro* digestion it was confirmed that the antioxidant capacity of hydrolyzate remained.

Keywords: bioactive peptides; enzymatic hydrolysis; antioxidant activity; bovine blood; protein

INTRODUCCIÓN

Desde el momento que se empieza la acumulación de materia prima de origen biológico para el acondicionamiento y la transformación en productos de consumo por parte de la agroindustria, hasta las últimas etapas de los diferentes procesos, se generan diversos subproductos que al no ser aprovechados se convierten en un problema para las empresas procesadoras (Laca *et al.*, 2004). En el caso de la industria cárnica se generan subproductos como sangre, tendones, astillas de huesos y diferentes recortes, que realmente no tienen una demanda clara en el mercado. La sangre proveniente de sacrificio animal representa una parte significativa de estos subproductos, alrededor de 4 % de peso vivo del animal (Laca *et al.*, 2004; Bah *et al.*, 2013).

La sangre es una fuente rica en proteínas de alta calidad, pero muy poco valorada en el mercado, 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 (Bah *et al.*, 2013). En la última década se ha establecido que algunos péptidos obtenidos por hidrólisis de proteínas alimentarias, son capaces de ejercer efectos biológicos específicos, tales como: antimicrobiano, antiviral, anticancerígeno, opioide, antioxidante, antihipertensivo y antitrombótico (Gomes *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Möller *et al.*, 2008), mientras que en el caso de la sangre se ha podido evaluar principalmente su capacidad antioxidante y antihipertensiva (Bah *et al.*, 2013). Estas actividades dependen principalmente de factores como el tipo de proteasa utilizada, las condiciones de la hidrólisis, la composición en amino-ácidos, la secuencia y configuración de los péptidos (Tavano, 2013). Obtener hidrolizados con altos grados de hidrólisis (GH), es de interés cuando de buscar péptidos bioactivos se trata, debido a la relación entre la actividad biológica de los péptidos y su peso molecular (Saidi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Gómez *et al.*, 2013), siendo las fracciones con pesos moleculares entre 1 - 4kDa los más interesantes para usos nutricionales y/o farmacéuticos (Saidi *et al.*, 2014; de Castro y Sato, 2015; Opheim *et al.*, 2015).

Buscando comprender el proceso de hidrólisis enzimática de proteínas se han planteado diferentes modelos para representar la cinética enzimática de proteínas de fuentes alimentarias, como caseínas, lactoalbumina, hemoglobina bovina y sustratos de origen vegetal, generando información básica para la optimización de procesos (Figuroa *et al.*, 2012). Además se han estudiado los modelos y mecanismos enzimáticos considerando la inhibición de enzimas y relacionándolo con las constantes cinéticas, obteniendo buenos ajustes para las curvas de cinéticas (Márquez-Moreno y Fernández-Cuadrado, 1993; Qi y He, 2006; Valencia *et al.*, 2014; Valencia *et al.*, 2015). Mientras que otros estudios han demostrado que el pH y la concentración de sustratos son claves en análisis de la hidrólisis enzimática de proteínas de sangre porcina y bovina (Chang, Wu, *et al.* 2007; Figuroa, O *et al.* 2016).

Los péptidos bioactivos de diferentes fuentes, han encontrado aplicación en la industria nutracéutica y farmacéutica, principalmente para la elaboración de alimentos funcionales. En esta investigación se buscó la optimización del proceso de hidrólisis de la fracción globular de la sangre bovina (FG) con respecto al grado de hidrólisis GH, analizando la cinética enzimática con relación a las variables más importantes del proceso (pH, S_0 y E_0/S_0). Los hidrolizados resultantes de la optimización fueron evaluados en sus propiedades antioxidantes con métodos *in vitro*, luego se sometieron a un proceso de digestión *in vitro* y se analizó su efecto sobre la capacidad antioxidante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se detalla la preparación de las muestras, los materiales y métodos usados, además del diseño de experimentos utilizado.

Preparación de hidrolizados enzimáticos

Se emplearon reactores de vidrio de 500 mL conectados a un regulador termostático. El control de pH se hizo empleando un titulador automático Titrand 842 (Metrohm, Suiza), operado por ordenador (software Tiamo 1.2.1). El medio de reacción fue constantemente agitado utilizando agitadores magnéticos (200 rpm). La sangre fue suministrada por Altecsan, una empresa dedicada a la comercialización de sangre higienizada, ubicada en la ciudad de Medellín-Colombia. Al momento de recepción del sustrato se realizaron controles microbiológicos de mohos y levaduras, coliformes totales y mesófilos. Las muestras de sangre bovina se centrifugaron a 4° C en una centrifuga Boeco (Ref. 1406-12) a 8500 rpm durante 10 min para separar la fracción globular (FG) del plasma, se realizó doble centrifugación para obtener la mayor recuperación de FG. Posteriormente la FG fue almacenada a -20 °C hasta el momento de la hidrólisis. El análisis del contenido proteico se llevó a cabo por el método de determinación del nitrógeno total Kjeldahl. La enzima usada fue Alcalase® 2,4 L grado alimenticio (Novozymes, Dinamarca), cuyo componente principal es Subtilisina A (Subtilisina Carlsberg). La concentración de enzima y el pH en cada ensayo se fijaron para cumplir con las relaciones enzima/sustrato (E_0/S_0) que se definieron en el diseño experimental, de igual forma que el pH, el cual se ajustó adicionando NaOH 1N (preparado con NaOH 97% pureza Merck®). Mientras que la temperatura y el tiempo de hidrólisis se fijaron en 55° C y 2 h respectivamente.

La reacción fue monitoreada para la determinación del grado de hidrólisis (GH), expresado como la relación entre el número de enlaces peptídicos cortados en la hidrólisis (h) y el número de enlaces peptídicos totales en la proteína nativa por unidad de peso (h_i). Para éste caso, se empleó un h_i de 8,3 Eqv/Kg (Márquez y Vázquez, 1999). El método empleado para la determinación del grado de hidrólisis es el de valoración del protón o método del pH-estático Ecuaciones (1-3) (Adler-Nissen, 1986).

$$GH = \frac{BN_B}{M_p} \frac{1}{\alpha} \frac{1}{h_i} 10 \quad (1)$$

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

$$pk = 7,8 + \frac{298 - T}{298 \times T} 2400 \quad (3)$$

Donde B es el Volumen consumido de base en litros, N_B = Normalidad de la base (Eqv/L), M_p es Masa de la proteína en Kg y α es el grado 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 (Valencia *et al.*, 2014).

Ajuste experimental de datos

Los valores del GH en el tiempo de reacción, obtenidos en cada corrida experimental se ajustaron al modelo exponencial propuesto por Márquez-Moreno y Fernández-Cuadrado (Márquez-Moreno y Fernández-Cuadrado, 1993; Qi y He, 2006) que permite analizar el comportamiento del GH en el tiempo con dos constantes cinéticas "a" y "b", como se indica en la Ecuación (4). Las constantes cinéticas se calcularon con los resultados de GH y tiempo, medidos cada cinco minutos hasta 2 horas, por el método de mínimos cuadrados utilizando la función "lsqcurvefit" del "toolbox" de Matlab 2014 R2014a. La bondad de ajuste del modelo se evaluó utilizando el coeficiente de determinación.

$$GH = \frac{1}{b} \ln(abt + 1) \quad (4)$$

Determinación de la capacidad antioxidante

Para la medición de la capacidad antioxidante se emplearon los métodos de determinación directa ABTS e indirecta ORAC y FRAP. Para el ajuste de las técnicas se usó un espectrofotómetro marca Thermo Scientific Genesis 10 S UV-vis. Para los tres métodos se establecieron curvas de calibración con diferentes concentraciones del antioxidante estándar Trolox (análogo hidrofílico del alfa tocoferol, Lote STBB72184, ALDRICH®). Los resultados se expresan como micromoles de equivalentes Trolox por gramo de proteína ($\mu\text{molET/g}$ proteína). Todos los reactivos usados para la medición de capacidades antioxidantes fueron de grado analítico.

Método FRAP (Ferric reducing/antioxidant power)

Mide el efecto que tienen los compuestos antioxidantes para reducir en un medio ácido el hierro férrico (Fe^{+3}) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}). Se siguió la metodología ajustada de Pulido *et al.*, en la que 900 μL del reactivo FRAP (con TPTZ, FeCl_3 y buffer de acetato de sodio 3 M, S7899 SIGMA®) recién preparado y calentado a 37° C, se mezclan con 90 μL de agua destilada y 30 μL de la muestra o estándar Trolox y se incuban a 37° C por 30 min; la absorbancia se lee a 595 nm (Pulido *et al.*, 2000).

Método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS

Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS⁺ (ácido 2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico) provocado por la interacción con moléculas donantes de electrones. Se basó en la metodología descrita por Re *et al.*, en el cual 100 μL de la muestra o estándar Trolox, son mezclados con 1 mL de la solución ABTS⁺ e incubados a 30° C por 30 min. Después de esto se toman las medidas de absorbancia a 730 nm (Re *et al.*, 1999).

Método ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

Mide el efecto estabilizador de los radicales libres que tienen los compuestos antioxidantes mediante un mecanismo de donación de un átomo de hidrógeno. La capacidad antioxidante del método Orac se determinó por la metodología descrita por Ou *et al.*, en la mezcla de 150 μL de fluorescina 1 μM (sustrato fluorescente) y 25 μL de muestra (diluidos en buffer fosfato 10 μM a pH 7,4 hasta una concentración de proteínas de 0,2 mg/mL), fueron preincubada por 30 min a 37° C. Luego 25 μL de una solución de 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) 250 mM fue adicionada. La intensidad de la fluorescencia fue medida con longitudes de onda de excitación y emisiones fijadas en 485 y 520 nm, respectivamente (Ou *et al.*, 2001).

Digestión *in vitro*

Tanto a la FG entera como a la hidrolizada se les realizó un ensayo de digestión *in vitro*, siguiendo la descripción de Gómez *et al.*, 2013, que fue ajustada de la metodología de Yagoub *et al.*, 2004, en la cual la muestra de interés fue incubada con 10 μg de pepsina/mg proteína (E.C. 3.4.23.1; $\geq 250 \text{ U mg}^{-1}$ sólido; Sigma, Louis, USA), a un pH de 2 ajustado con HCl, durante 3 h a 37° C, se ajustó el pH de la mezcla entre 7,5 a 8,0 con adición de NaOH (0,2 N), luego la adición del buffer fosfato (pH 7.4) con 1 mM de CaCl₂, 0,01 % de NaN₃ y 13 μg de pancreatina/mg de proteína (Sigma, No. P1750). Finalmente la mezcla se incubó a 37° C durante 24 horas (Gomez *et al.*, 2013; Yagoub *et al.*, 2004). Los hidrolizados se inactivaron y almacenaron a -20° C para la determinación de la capacidad antioxidante.

Diseño experimental

Se analizó la influencia de los factores pH, concentración inicial de sustrato (S_0 m/v) y relación enzima/sustrato (E_0/S_0 m/m), sobre las variables respuesta, las cuales fueron el GH y las constantes cinéticas a y b de la Ecuación (4). Para ello se ejecutó un diseño de experimentos Central Compuesto Rotable, con los niveles de los factores que se indican en la Tabla 1. El análisis de varianza (ANOVA) y el ajuste de los modelos (Ecuación 5), se hicieron utilizando el software *Statgraphics Centurion XVI*. La calidad de los ajuste se verificó por medio del R^2 y el R^2 Ajustado. La significancia de los coeficientes estimados en los modelos se probó con el estadístico F a un nivel de confianza de 95 % (valor $p < 0,05$). Una vez obtenido el modelo, se empleó la metodología de superficie de respuesta MSR para establecer las condiciones óptimas de trabajo recomendadas para maximizar el rendimiento de la hidrólisis (maximizar el GH).

Tabla1: Variables independientes y sus niveles codificados y reales utilizados en el diseño MSR

Variable	Niveles codificados				
	-1,68	-1	0	+1	1,68
pH	7,32	8	9	10	10,68
S_0 (% m/v)	6,63	8	10	12	13,36
E_0/S_0 (% m/m)	1,27	4	8	12	14,73

$$Y_j = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (5)$$

Donde Y_j es la respuesta predicha (GH), X_i y X_j desde $i, j=1$ hasta 3 son las variables independientes o factores; β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} , son los términos independientes, lineales, cuadráticos y de interacción del polinomio.

En el caso de los resultados de análisis de capacidad antioxidante por los métodos FRAP, ABTS y ORAC se hicieron por triplicado y se realizó un análisis de diferencias significativas entre medias con el test de rangos múltiples de Duncan. La significancia de las comparaciones entre medias de la capacidad antioxidantes se probó con el estadístico F y un nivel de confianza del 95 % ($P < 0,05$).

Optimización por MSR

Una de las herramientas generalmente empleadas para establecer condiciones óptimas de operación es la metodología de superficie de respuesta, la cual se basa en el método de la máxima pendiente en ascenso, que consiste en recorrer la trayectoria de máxima pendiente, que conduce a la dirección del máximo cambio en la respuesta (Montgomery, 2013). La región de exploración son los niveles codificados de los factores evaluados. En este estudio se empleó el software *Statgraphics Centurion*®, para corroborar los resultados de la rutina de optimización. Los valores óptimos de los factores (pH, S_0 y E_0/S_0), se emplearon en la ejecución de tres replicas experimentales, cuyos resultados se compararon con los predichos por el modelo polinomial ajustado. En estos ensayos se tomaron muestras a diferentes tiempos de hidrólisis para someterlas al proceso de digestión *in vitro* y posteriormente determinarles las capacidades antioxidantes (FRAP y ABTS) antes y después de la digestión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se describen los resultados en subsecciones para una mejor organización de los resultados presentados con su discusión.

Determinación de las constantes de la Ecuación de Hidrólisis enzimática de la FG de sangre bovina

Los valores del GH para la hidrólisis enzimática de la FG y las constantes “a” y “b” estimadas por regresión no lineal de la Ecuación (4), así como los coeficientes de determinación (R^2), se muestran en la Tabla 2. En la cual se evidenció la relación entre las variables independientes codificadas y el rendimiento de la reacción (GH) para las 19 corridas definidas por el diseño experimental.

Tabla 2: Diseño central compuesto para la hidrólisis enzimática de la fracción globular de sangre bovina. Valores de GH, a y b, obtenidos de la curva de hidrólisis a 2 horas de reacción.

N° corrida	pH	S ₀	E ₀ /S ₀	GH	a	B	R ²
	Variables codificadas						
1	-1	1	1	27,0752	6,7784	0,1718	0,957
2	0	0	0	30,5763	14,8029	0,1835	0,9682
3	0	-1,68	0	29,0578	15,1328	0,1897	0,9533
4	0	-1	-1	23,1937	2,3383	0,1546	0,9178
5	1	-1	-1	19,1689	4,6055	0,2494	0,9926
6	1	1	-1	27,8498	1,7835	0,1104	0,9555
7	-1	-1	1	31,7236	9,0767	0,1528	0,9579
8	0	1,68	0	31,0637	5,5459	0,1376	0,9358
9	1	1	1	26,0182	5,0398	0,1736	0,9678
10	1,68	0	0	22,5548	32,7888	0,2942	0,9547
11	0	0	0	31,2958	8,2872	0,1531	0,9636
12	0	0	1,68	34,2958	17,8838	0,1572	0,9555
13	-1,68	0	0	22,7574	2,0376	0,1496	0,9708
14	0	0	0	31,0476	11,4581	0,1698	0,9836
15	0	0	0	30,3410	8,1447	0,1605	0,9866
16	1	-1	1	25,3664	43,4013	0,2667	0,9587
17	0	0	-1,68	21,5955	1,433	0,1492	0,9991
18	-1	1	-1	22,6949	3,1362	0,1841	0,9979
19	0	0	0	28,1226	7,0187	0,1714	0,9925

Se obtuvo un buen ajuste de las constantes cinéticas “a” y “b” para la mayoría de las reacciones de hidrólisis experimentales del diseño ($R^2 > 0,95$). Esta calidad del ajuste de la Ecuación (4) ha sido reportada por diferentes autores para otros sustratos (Valencia *et al.*, 2014; Valencia *et al.*, 2015; Apar y Özbek, 2008; Ruan *et al.*, 2010; Demirhan *et al.*, 2011).

Efectos de los factores sobre las respuestas

En la Tabla 3 se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la prueba de significancia de los coeficientes del modelo. El análisis indica que E₀/S₀ es el factor más significativo sobre el GH, puesto que los términos lineales y cuadráticos muestran un efecto muy significativo elevado con valores $p \leq 0,01$ y $p \leq 0,05$ respectivamente.

En la región de exploración los efectos lineales de S₀ y el pH no resultan significativos, sin embargo las interacciones de estos factores si lo son ($p \leq 0,05$) y a juzgar por el considerable valor del coeficiente en el modelo, estas dos variables juegan un papel importante en la predicción del GH. Teniendo en cuenta que el pH tiene un efecto cuadrático elevado con $p \leq 0,01$, es concluyente que este factor presenta un efecto dual sobre la respuesta (GH) en la región de exploración, indicando que aunque la enzima utilizada es de amplio rango de trabajo a pH alcalino con este sustrato (hemoglobina bovina), lo más recomendable es operar a valores de pH cercanos a 8,0. La actividad de la enzima se ve fuertemente afectada por el pH, debido a que el estado activo de la enzima se presenta en alguna forma ionizada de la misma, lo cual está influenciado por

los cambios de pH y la disociación de los grupos activos, propiciando mayor afinidad por el sustrato (Shi *et al.*, 2005). Este fenómeno explica entre otras cosas la significancia estadística de la interacción $pH \cdot S_0$ del análisis mostrado (Tabla 3). Los resultados muestran además que la disminución del rendimiento de la reacción a valores de pH elevados, puede deberse a fenómenos de desnaturalización de la enzima a esos valores de pH.

Tabla 3: Significancia para los coeficientes de regresión del modelo ajustado.

Fuente	GH		"a"		"b"	
	Coefficiente	Valor-P	Coefficiente	Valor-P	Coefficiente	Valor-P
Lineal						
pH	-0,3011	0,4620	7,5400	0,0012	0,0296	0,0003
S_0	0,7409	0,1018	-3,2302	0,0205	-0,01644	0,0101
E_0/S_0	3,0164	0,0010	6,9410	0,0013	-	0,0019
Cuadrático						
pH^2	-2,9736	0,0009	-	0,0026	0,0211	
$(E_0/S_0)^2$	-1,1064	0,0312	-		-	
Interacciones						
$pH \cdot S_0$	1,4958	0,0425	-7,1623	0,0045	-0,0381	0,0005
$pH \cdot E_0/S_0$	-1,3822	0,0533	-	-	-	
$S_0 \cdot E_0/S_0$	-1,8422	0,0167	-6,6660	0,0043	-	
Falta de ajuste		0,2945		0,1289		0,2612
Total (corr.)		19				

El análisis de los efectos de las variables independientes sobre las constantes cinéticas "a" y "b" del sistema de reacción Alcalasa-FG de sangra bovina, se realizó siguiendo la metodología propuesta por Valencia P, *et al.*, la cual analiza las constantes cinéticas como función de las condiciones de operación de la reacción (Valencia *et al.*, 2015). Los parámetros cinéticos estimados por el ajuste de la Ecuación (4) empleando datos experimentales se muestran en la Tabla 3. Los resultados son coherentes con el argumento y la expresión de los mecanismos desarrollados expuesto por Qi *et al.*, 2006, quienes al deducir las posibles expresiones de los parámetros en la Ecuación (4) de acuerdo con el mecanismo cinético asumido, indican que a pesar de los posibles mecanismos expuestos, el parámetro "a" siempre depende de la concentración de enzima (E_0) y el parámetro "b" de la constante cinética (K_m) (Qi y He, 2006). Los resultados muestran que los valores de "a" efectivamente aumentan con la E_0/S_0 , cuando la temperatura y pH permanecen constantes, lo cual es consistente con los resultados de varios autores (Figueroa *et al.*, 2012; Valencia *et al.*, 2015; Camacho *et al.*, 1993).

Los valores de "b" decrecen cuando la hidrólisis ocurre en concentraciones de sustrato elevadas, lo cual se detecta por el coeficiente negativo para la concentración de sustrato en la Ecuación (8), con valor $p < 0,05$. Sin embargo no existe relación estadística significativa entre estos valores y el GH. En términos generales existe una fuerte tendencia a que los valores más bajos de "b" se registran cuando mayor es el GH, lo que sin duda indicaría mayor afinidad de la Alcalasa 2,4 L con la fracción globular de sangre bovina, independientemente del mecanismo cinético expuesto. Para soportar estadísticamente esta afirmación se sugiere disminuir el error en la determinación de los parámetros de ajuste, utilizando un mayor número de puntos en cada curva de hidrólisis. La constante "a" presenta relación estadística significativa con el pH y la E_0/S_0 , pues se reportan importantes incrementos de la velocidad inicial de hidrólisis en la medida en que estas variables aumentan. Valencia *et al.*, sugieren que las constantes cinéticas "a" y "b" se pueden utilizar para comparar y caracterizar la eficacia de la proteasa y la susceptibilidad a la hidrólisis por parte de los sustratos (Valencia *et al.*, 2015).

Los modelos estadísticos ajustados con sus coeficientes calculados por regresión múltiple, se muestran en las Ecuaciones (6-8). Estos modelos son resultado de la exclusión de términos no significativos ($p > 0,05$), conservando en cada caso la jerarquía de los mismos.

$$GH = 29,95 - 0,30pH + 0,74S_0 + 3,02E/S_0 - 2,97pH^2 + 1,5pH \cdot S_0 - 1,38pH \cdot E_0 - 1,84S_0 \cdot E/S_0 - 1,11E/S_0^2 \quad (6)$$

$$a = 9,79 + 7,53pH - 3,23S_0 + 6,94E/S_0 - 7,16pH \cdot S_0 - 6,67S_0 \cdot E/S_0 \quad (7)$$

$$b = 0,16 + 0,03pH - 0,02S_0 + 0,02pH^2 - 0,04pH \cdot S_0 \quad (8)$$

Maximización del GH para la hidrólisis enzimática del FG bovina

El modelo de la Ecuación (6) se sometió a un proceso de optimización, para maximizar el GH. En la Tabla 4, se muestran los resultados de la optimización empleando MSR, aquí se registran los valores óptimos de los factores evaluados (codificados y reales) y el GH (variable respuesta) predicho frente al valor experimental obtenido. La Figura 1, muestra el gráfico de superficie de respuesta del (GH) en función de los factores más significativos en el estudio (pH y E_0/S_0). En este caso la relación concentración de sustrato (S_0) se fijó en su máximo nivel codificado, mientras que el pH y E_0/S_0 se establecieron en los ejes X y Y de la gráfica. El GH corresponde a una superficie curva, debido a la importancia de los efectos de segundo grado. La optimización numérica de GH, por MSR entregó un valor de 38 %, para condiciones de pH= 8,14; $S_0= 6,64$ y $E_0/S_0= 14,73$.

Para confirmar la validez del modelo estadístico propuesto, se llevaron a cabo tres corridas experimentales bajo las condiciones óptimas establecidas, encontrando que el GH experimental fue de $36,25 \pm 0,31$ %, lo que representa un sesgo negativo del 5,03 % en relación con el GH esperado. La prueba de falta de ajuste con $p > 0,05$ y la buena precisión de los experimentos sugiere que efectivamente los valores encontrados de los niveles para cada factor evaluado, son condiciones óptimas de trabajo para este sistema de reacción.

Tabla 4: Condiciones óptimas de los factores experimentales en la hidrólisis enzimática de la FG bovina.

Condiciones Optimas			GH (%)	
Variables	Valor Codificado con MSR	Valor sin Codificar con MSR	Predicho	Experimental
pH	-0,8643	8,1	38,08	36,25
S_0 (m/v)	-1,68	6,6		
E_0/S_0 (m/m)	1,68	14,7		

En lo que respecta al GH, el análisis de varianza (ANOVA) demuestra que el modelo representa adecuadamente los datos experimentales, teniendo en cuenta que el R^2 es de 0,9264. Lo que indica que éste describe la influencia de las variables estudiadas sobre el GH de las proteínas de la fracción globular de sangre bovina en un porcentaje satisfactorio de 93% aproximadamente. El estadístico R^2 ajustado es de 87 %, lo cual nos dice que efectivamente los factores estudiados, junto con sus interacciones explican en un porcentaje satisfactorio la variabilidad observada en el GH, por tanto, el modelo propuesto es una buena descripción del fenómeno de hidrólisis enzimática de este sustrato con Alcalasa 2,4 L.

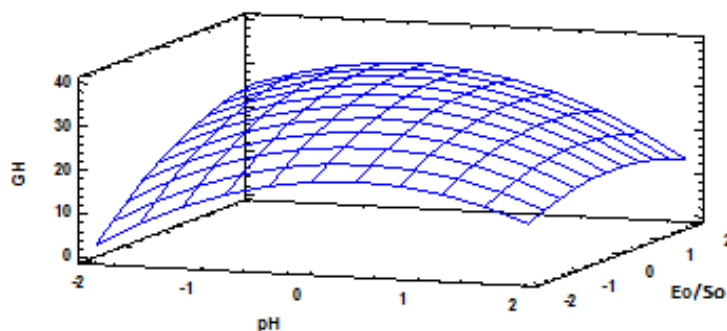


Fig. 1: Superficie de respuesta para GH con S_0 constante 10 % (m/V).

Estos resultados muestran, que es importante analizar el efecto del pH y la concentración de sustrato sobre el comportamiento cinético en reacciones de hidrólisis de proteínas, pues estas condiciones ofrecen información de gran valor en el análisis del rendimiento de estas reacciones, lo cual permite avanzar en criterios de identificación de condiciones de trabajo ideales para la identificación de fracciones peptídicas de interés bioactivo.

Capacidad antioxidante

Se determinaron las capacidades antioxidantes de la FG y sus hidrolizados en las condiciones óptimas del diseño a diferentes tiempos de hidrólisis, además se simuló la digestión *in vitro* para ver el efecto que tiene sobre la capacidad antioxidante. Los resultados con sus respectivas desviaciones se muestran en la Tabla 5, los valores están dados en $\mu\text{mol ET/g}$ proteína. Las medias (3 réplicas) de la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 5: Capacidades antioxidantes con los métodos ORAC, FRAP y ABTS de la FG de sangre bovina, sus hidrolizados antes y después de digestión *in vitro* a diferentes tiempos de hidrólisis.

Tipo Muestra	ORAC	FRAP	ABTS
FGSH	-	45,2 ± 2,5 ^a	608,9 ± 4,1 ^a
FGPD	-	45,7 ± 1,8 ^a	1038,22 ± 9,5 ^c
FG30SD	461,2 ± 37,7 ^a	54,8 ± 2,2 ^b	747,5 ± 68,5 ^b
FG30PD	-	81,8 ± 5,1 ^d	1417,75 ± 4,1 ^e
FG60SD	464,2 ± 14,0 ^a	57,4 ± 1,8 ^b	725,6 ± 56,0 ^b
FG60PD	-	70,4 ± 2,1 ^c	1396 ± 6,3 ^e
FG120SD	513,7 ± 8,2 ^b	65,3 ± 5,8 ^c	748,3 ± 71,3 ^b
FG120PD	-	64,8 ± 2,4 ^c	1245,6 ± 7,2 ^d

En las actividades antioxidantes por lo métodos ORAC y FRAP existieron diferencias significativas entre los hidrolizados sin digestión a diferentes tiempos ($p < 0,05$). Mientras en el análisis de ABTS los hidrolizados sin digestión no difieren entre ellos ($p < 0,05$). Esto quiere decir que para obtener la mayor capacidad de reducción de radicales libres de Oxígeno y Fe se debe efectuar a un tiempo de hidrólisis de 2 horas bajo las condiciones óptimas, mientras que para obtener la máxima capacidad de los agentes antioxidantes de los hidrolizados de FG de sangre bovina para atacar el catión radical ABTS⁺ basta con ejecutar la hidrólisis enzimática a 30 min, o cualquier otro tiempo estudiado.

Es claro que no es posible hacer comparaciones ni equivalencias entre los distintos métodos que analizan la actividad antioxidante, debido a los diversos mecanismos de acción de los antioxidantes de origen biológico que involucran procesos químicos variados (Prior, 2015). De igual manera, existen diferentes metodologías y/o diferentes unidades de expresión de capacidad antioxidante, lo que dificulta las comparaciones entre diferentes reportes de literatura (Samaranayaka y Li-Chan, 2011). Se ha evidenciado que la capacidad antioxidante de alimentos provenientes de fuentes proteicas independientemente de la metodología, son menos propensos a la capacidad de reducción del ion Fe⁺³, que a la capacidad de captación de radicales ABTS y peroxilo (Gomez *et al.*, 2013), como efectivamente se comprobó en este estudio, puesto que a pH ácido (3,6), los registros de actividad antioxidante empleando el método FRAP son sustancialmente bajos. Aquí se debe tener en cuenta que el ensayo FRAP es diferente de los ensayos ORAC y ABTS porque no hay radicales libres u oxidantes implicados (Cao y Prior, 1998).

La digestión *in vitro* tuvo un efecto significativo favorable para la captación de radicales ABTS por parte de los hidrolizados, mientras que no afectó la captación de los mismos radicales por parte de la FG sin hidrolizar. Así mismo, se favoreció la capacidad de reducción del ion Fe⁺³, tanto para la fracción globular sin hidrolizar como para sus hidrolizados a diferentes tiempos de hidrolisis, posiblemente porque durante el proceso de digestión *in vitro* se liberan péptidos con capacidad antioxidante (Zhu *et al.*, 2008; Borawska *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

(i) La hidrólisis enzimática (GH) de proteínas de la fracción celular de la sangre de bovino con la enzima Alcalasa 2,4 L se ve afectada por el pH, la concentración inicial de sustrato y la relación enzima sustrato, llegando al máximo GH cuando se trabaja pH: 8,16; S: 6,6 y E₀/S₀: 14,7. (ii) La actividad antioxidante de los hidrolizados de la fracción celular de la sangre depende del tiempo de hidrolisis, siendo el tiempo de 2 h el que mayores actividades antioxidantes genera. (iii) La digestión *in vitro* puede favorecer la actividad antioxidante de los hidrolizados de la fracción celular de sangre bovina.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Popular del Cesar, por la financiación del proyecto de investigación y a Colciencias por la financiación en conjunto con la misma Universidad de una beca-pasantía a través del programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores. Así mismo a la Universidad de Antioquia y a su programa de sostenibilidad.

NOTACIÓN

FG	Fracción globular
GH	Grado de hidrólisis
FGSH	Fracción globular bovina sin hidrolizar
FGPD	Fracción globular bovina con digestión
FG30SD	Hidrolizado de Fracción globular bovina 30 min sin digestión
FG30PD	Hidrolizado de Fracción globular bovina 30 min por digestión
FG60SD	Hidrolizado de Fracción globular bovina 60 min sin digestión
FG60PD	Hidrolizado de Fracción globular bovina 60 min por digestión
FG120SD	Hidrolizado de Fracción globular bovina 120 min sin digestión
FG120PD	Hidrolizado de Fracción globular bovina 120 min por digestión
MSR	Metodología superficie de respuesta

REFERENCIAS

- Adler-Nissen, J., *Enzymic hydrolysis of food proteins*, 116-124, Elsevier, Londres, Inglaterra (1986)
- Apak, R., M. Özyürek, K. Güçlü y E. Çapanoğlu, *Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays*, doi: 10.1021/acs.jafc.5b04739, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (en línea), 64 (5), 997-1027 (2016)
- Apar, D. y Özbek, B., *Corn gluten hydrolysis by Alcalase: effects of process parameters on hydrolysis, solubilization and enzyme inactivation*, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, ISSN: 0352-9568 (en línea), 22(2), 203–212, <http://silverstripe.fkit.hr/cabeq/assets/Uploads/Cabeq-2008-02-09.pdf> (2008)
- Bah, C., Bekhit, A., Carne, A. y McConnell, M., *Slaughterhouse blood: An emerging source of bioactive compounds*, doi: 10.1111/1541-4337.12013, *Comprehensive Review Food Science and Food Safety* (en línea), 12 (3), 314–331 (2013)
- Borawska, J., Darewicz, M., Pliszka, M. y Vegarud, G., *Antioxidant properties of salmon (*Salmo salar* L.) protein fraction hydrolysates revealed following their ex vivo digestion and in vitro hydrolysis*, doi: 10.1002/jsfa.7441, *Journal of the Science of Food and Agriculture* (en línea), 96(8), 2764–2772 (2016)
- Camacho, F., González, P., Páez, M., Márquez, M.C., Fernández, V., *Hidrólisis de caseína con alcalasa*, *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, ISSN: 1131-799X (en línea), 33(1), 59-70, <http://www.ugr.es/~fcamacho/Originales/Trabajos%20Publicados/RECTA1993.pdf> (1993)
- Cao, G. y Prior, R. *Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum.*, *Clinical Chemistry*, ISSSN: 1309–1315 (en línea), 44(6), 1309-1315, <http://clinchem.aaccjnl.org/content/clinchem/44/6/1309.full.pdf> (1998)
- Chang, Chi-Yue., Kuei-Ching, W. y Shu-Hua C., *Antioxidant Properties and Protein Compositions of Porcine Haemoglobin Hydrolysates*, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.12.019, *Food Chemistry* (en línea), 100(4), 1537–1543 (2007)
- De Castro, R. J. S. y Sato, H.H., *Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries*, doi:10.1016/j.foodres.2015.05.013, *Food Research International*, 74, 185-198 (2015)
- Demirhan, E., Apar, D. y Özbek, B., *Sesame cake protein hydrolysis by Alcalase: effect of process parameters on hydrolysis, solubilization and enzyme inactivation*, doi: 10.1007/s11814-010-0316-2, *Korean Journal of Chemical Engineering* (en línea), 28(1), 195–202 (2011)
- Figuroa, O., Zapata, J. y Gutierrez, G. *Modelamiento de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas del plasma bovino*, *Revista EIA*, ISSN: 1794-1237 (en línea), 9(17), 71 - 84, <http://revistabme.eia.edu.co/index.php/reveia/article/view/452/444> (2012)
- Figuroa, O., Zapata, J. y Sánchez, C., *Optimización de La Hidrólisis Enzimática de Proteínas de Plasma Bovino*, doi: 10.4067/S0718-07642016000200006, *Información Tecnológica* (en línea), 27(2), 39–52 (2016)
- Gomes, I., Dale, C., Casten, K., Geigner, M., Gozzo, F., Ferro, E., Heimann, A y Devi, L., *Hemoglobin-derived Peptides as Novel Type of Bioactive Signaling Molecules*, doi: 10.1208/s12248-010-9217-x, *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal* (en línea), 12(4), 658-669 (2010)
- Gomez, L., Figuroa, O. y Zapata, J., *Actividad Antioxidante de Hidrolizados Enzimáticos de Plasma Bovino Obtenidos por Efecto de Alcalasa® 2.4 L.*, doi: 10.4067/S0718-07642013000100005, *Información Tecnológica* (en línea), 24(1), 33-42 (2013)
- Laca, A., Diaz, M. y Rendueles, M., *Alternativas e implicaciones medioambientales de la gestión de residuos en la industria cárnica*, *Alimentación, Equipos y Tecnología*, ISSN: ISSN 0212-1689 (en línea), 23 (189), 92-99, <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=859857> (2004)
- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. y Xia, X., *Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis.*, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.05.013, *Food Chemistry* (en línea), 118(2), 403-410 (2010)

- Liu, Y., L. Xianghong y otros cuatro autores, Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products, doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.089, Food Chemistry (en línea), 151(15), 459-465 (2014)
- Márquez-Moreno, M. y Fernández-Cuadrado, V., Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics., doi: 10.1002/bit.260220804, Process Biochem (en línea), 28(7), 481-490 (1993)
- Márquez, M. y Vázquez, M., Modeling of enzymatic protein hydrolysis., doi: 10.1016/S0032-9592(99)00041-2, Process Biochemistry (en línea), 35 (1), 111-117 (1999)
- Möller, N., Scholz-Ahrens, K., Roos, N. y Schrezenmeir, J., Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects, doi: 10.1007/s00394-008-0710-2, European Journal of Nutrition (en línea), 47(4), 171-182 (2008)
- Montgomery, D., Design and Analysis of Experiments, 8th edition, 478-544, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA (2013)
- Opheim, M., R. Šližytė y otros cuatro autores, Hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo Salar*) rest raw materials-Effect of raw material and processing on composition, nutritional value, and potential bioactive peptides in the hydrolysates, doi:10.1016/j.procbio.2015.04.017, Process Biochemistry (en línea), 50(8), 1247-1257 (2015)
- Ou, B., Hampsche-Woodill, M. y Prior, R., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, doi: 10.1021/jf010586o, Journal of Agricultural and Food Chemistry (en línea), 49 (10), 4619-4626 (2001)
- Prior, R., Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits, doi: 10.1016/j.jff.2014.12.018, Journal of Functional Foods (en línea), 18(B), 797-810 (2015)
- Pulido, R., Bravo, L. y Saura-Calixto, F., Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay, doi: 10.1021/jf9913458, Journal of Agricultural and Food Chemistry (en línea), 48(8), 3396-3402 (2000)
- Qi, W. y He, Z., Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model, doi: 10.1007/s11458-006-0026-9, Frontiers of Chemistry in China (en línea), 1(3), 308-314 (2006)
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3, Free Radical Biology y Medicine (en línea), 26(9), 1231-1237 (1999)
- Ruan, C., Chi, Y. y Zhang, R., Kinetics of hydrolysis of egg white protein by pepsin, Czech Journal of Food Sciences, ISSN: 1805-9317, 28(5), 355-363 (2010)
- Saidi, S., Deratani, A., Ben Amar, R. y Belleville, M.P., Fractionation of a tuna dark muscle hydrolysate by a two-step membrane process, doi:10.1016/j.seppur.2013.01.048, Separation and Purification Technology (en línea), 108, 28-36 (2013)
- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M.P. y Amar, R.B., Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties, doi:10.1016/j.foodres.2014.04.026, Food Research International, 65(Part C), 453-461 (2014)
- Samaranayaka, A. y Li-Chan, E., Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications., doi: 10.1016/j.jff.2011.05.006, Journal of Functional Foods (en línea), 3(4), 229-254 (2011)
- Shi, D., He, Z. y Qi, W., Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin., doi: 10.1007/s11458-006-0026-9, Process Biochemistry (en línea), 40(5), 1943-1949 (2005)
- Tavano, O., Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology., doi: 10.1016/j.molcatb.2013.01.011, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (en línea), 90, 1-11 (2013)

Valencia, P., Espinoza, K., Ceballos, A., Pinto, M., Almonacid, S., Novel modeling methodology for the characterization of enzymatic hydrolysis of proteins, doi: 10.1016/j.procbio.2014.12.028, *Process Biochemistry* (en línea), 50(4), 589-597 (2015)

Valencia, P., Pinto, M. y Almonacid, S., Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase, doi: 10.1016/j.procbio.2013.11.012, *Process Biochemistry*, 49(2), 258-264 (2014)

Wang, B., Li, L., Chi, C.F., Ma, J.H., Luo, H.Y. y Xu, Y.F., Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate, doi:10.1016/j.foodchem.2012.12.002, *Food Chemistry* (en línea), 138(2-3), 1713-1719 (2013)

Yagoub, A., Mohamed, E., Ahmed, A. y El Tinay, A., Study on fururndu, a Traditional Sudanese fermented roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed: Effect on in vitro protein digestibility, chemical composition and functional properties of the total proteins, doi: 10.1021/jf0496548, *Journal Agricultural Food Chemistry* (en línea), 52, 6143-6150 (2004)

Zhu, L., Chen, J., Tang, X. y Xiong, Y., Reducing, Radical Scavenging, and Chelation Properties of in Vitro Digests of Alcalase-Treated Zein Hydrolysate, doi: 10.1021/jf703697e, *Journal Agricultural Food Chemistry* (en línea), 56(8), 2714–2721 (2008)

