

Elaboración de Leche Saborizada Fortificada con Hierro Hémico Proveniente de Hidrolizados de Hemoglobina Bovina

Lorena Arias⁽¹⁾, Karen S. Ospino^{(2)*} y José E. Zapata⁽¹⁾

(1) Grupo de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Universidad de Antioquia, Colombia

(2) Grupo GEAB, Universidad Popular del Cesar, Colombia. (e-mail: ingenierakov@gmail.com)

Recibido Oct. 5, 2017; Aceptado Nov. 30, 2017; Versión final Ene. 31, 2018, Publicado Ago. 2018

Resumen

Se analizó el efecto del pH, la concentración inicial de sustrato (S_0) y la relación enzima/sustrato (E/S), sobre el grado de hidrólisis (GH) en la reacción de hidrólisis enzimática de hemoglobina bovina utilizando Alcalasa 2.4L. Precipitado enriquecido en hierro hémico proveniente del hidrolizado con máximo GH fue agregado a leche chocolatada para incrementar su contenido en hierro. Se determinaron las coordenadas de color para establecer los cambios ocurridos en la leche adicionada con hierro hémico con respecto a su control. Además, se realizó un test de escala hedónica para determinar la aceptación sensorial de la leche fortificada. Los resultados mostraron que el GH de la hemoglobina depende de las tres variables: pH, S_0 y E/S. La leche fortificada reportó 56,92 mg Fe/kg, en tanto que el análisis de color determinó que la diferencia de color está por encima de la tolerancia. Sin embargo, el análisis sensorial demostró aceptación satisfactoria de la leche.

Palabras clave: hidrólisis enzimática; péptido; hierro hémico; leche fortificada; hemoglobina bovina

Elaboration of Flavored Milk Fortified with Hemic Iron from of Bovine Hemoglobin Hydrolyzed

Abstract

The effect of pH, initial substrate concentration (S_0) and enzyme/substrate ratio (E/S) on hydrolysis degree (HD) in enzymatic hydrolysis reaction of bovine hemoglobin using Alcalase 2.4L was determined and analyzed. The precipitate rich in heme iron obtained from the hydrolyzed product with higher HD was added to flavored milk to increase its iron content. The color coordinates were determined to establish the changes occurred in the added milk with heme iron enriched peptides respect to control milk. Additionally, a test of hedonic scale was carried out to determine the acceptance level of fortified milk. The results showed that HD depends on the three variables: pH, S_0 and E/S. The fortified milk achieved 56,92 mg Fe/kg, while the color analysis determined a color difference above acceptable tolerance. However, the sensorial analysis showed satisfactory acceptance of the milk.

Keywords: enzymatic hydrolysis; peptides; heme iron; milk flavored; bovine hemoglobin

INTRODUCCIÓN

La carencia de hierro en la dieta es uno de los flagelos que impacta negativamente a millones de personas en el mundo (De-Regil et al., 2011; Haider et al., 2013). Los grupos de mayor riesgo corresponden a lactantes, niños, adolescentes, mujeres embarazadas y en edad reproductiva, con inadecuado consumo o asimilación de este nutriente (WHO, 2016). Las alternativas de solución y/o prevención de este problema nutricional con mejor relación costo/efectividad, han sido la fortificación de alimentos o la suplementación farmacológica (Burden et al., 2015). La ventaja fundamental que posee este procedimiento consiste en que la población que está afectada por la deficiencia de uno o varios micronutrientes en particular, incorporará una cantidad adicional de los mismo a través de la dieta habitual, sin que se modifiquen sus costumbres alimentarias (Das et al., 2013).

En la literatura se reportan diferentes compuestos de hierro usados en la fortificación de alimentos o productos lácteos, entre ellos están las sales de hierro y el hierro elemental. Santillán et al. (2017) y Gutiérrez et al. (2016) fortificaron yogurt, el primero con óxido de hierro y el segundo con hierro encapsulado. Gupta et al. (2015) evaluó el efecto de la biodisponibilidad *in vitro* de hierro en la fortificación de leche con sales de hierro y microcápsulas de hierro. Las primeras tienen la desventaja de interactuar libremente con los elementos constitutivos del alimento y pueden alterar sus propiedades sensoriales, mientras las segundas son compuestos poco solubles o insolubles en agua y químicamente inertes, lo que dificulta su homogenización (Gilliard, 2015). Esto ha llevado a la utilización de compuestos de hierro protegido, los cuales pueden suplir las necesidades de hierro y poseen alta biodisponibilidad, son solubles en agua y que además tienen baja reactividad con la matriz alimentaria. Esto los hace tecnológicamente aptos para ser utilizados en los procesos industriales de fortificación de alimentos (Schönfeldt y Hall, 2011). El hierro hémico es un compuesto naturalmente protegido, posee una elevada biodisponibilidad aún en presencia de sus inhibidores de absorción presentes en la dieta (Schönfeldt y Hall 2011; Toldrà et al., 2011). Este puede ser obtenido a partir de sangre de bovino y/o porcino (Toldrà et al., 2011; Hurrell y Egli 2010) la cual es un subproducto del faenado de estos animales con alto valor nutricional, y que en muchos casos es descartada sin aprovechar y cuyo inadecuado vertimiento genera graves problemas de contaminación ambiental (Bah et al., 2013). El hierro hémico proveniente de la sangre de animales de abasto, ha sido utilizado en la fortificación de pan crujiente (Hoppe et al., 2013), galletas (González-Rosendo et al., 2010), así como en la producción de cápsulas de polipéptidos (Seligman et al., 2000). Sin embargo la fortificación de alimentos con hierro hémico ha encontrado algunas limitaciones por ser un compuesto intensamente coloreado y por los sabores metálicos que puede generar (Toldrà et al., 2011).

Por otro lado los productos lácteos son ampliamente consumidos, proporcionan proteínas de alta calidad, vitaminas y calcio, pero sus niveles de hierro usualmente son muy bajos (Abbasi y Azari, 2011). Apoyados en estudios recientes que descartan el efecto inhibitorio del calcio sobre la absorción de hierro (Herrera et al., 2015) o sobre su biodisponibilidad (Ríos-Castillo et al., 2014). El principal objetivo de la presente investigación es el desarrollo de una leche chocolatada fortificada con hierro hémico proveniente de hidrolizados de hemoglobina bovina, que supla el requerimiento diario de este mineral (11mg/día) en niños de 1-3 años que consumen diariamente 250 g de leche, conservando la aceptación sensorial por parte de los consumidores.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el trabajo se empleó un método experimental, que incluye el desarrollo de técnicas analíticas *in vitro*, seleccionando reactivos de grado analítico. La selección de los materiales y la selección de los métodos estadísticos de análisis se hicieron con especial cuidado, teniendo en cuenta la normatividad vigente.

Sustrato hidrolizado

El sustrato utilizado fue hemoglobina obtenida de sangre bovina higienizada suministrada por un proveedor comercial de la ciudad de Medellín-Colombia, la cual se recolectó y transporto en refrigeración. Posteriormente la sangre se centrifugo en dos ocasiones por 10 min/8500 rpm, a 4°C, usando una centrifuga modelo U-320R (Boeco, Alemania), con el objetivo de separar el plasma de la fracción celular (glóbulos rojos) que contiene principalmente hemoglobina bovina, La fracción globular obtenida fue almacenada a -20 °C hasta el momento de la hidrólisis enzimática.

Elaboración de Leche saborizada

Para elaborar la leche saborizada fortificada con hierro hémico, se empleó leche comercial pasteurizada adicionada con vitaminas y se utilizó leche chocolatada comercial como producto control para analizar y comparar los cambios en los diferentes parámetros fisicoquímicos, ambas leches fueron adquiridas en un supermercado de la ciudad de Medellín- Colombia.

Enzima comercial

En la hidrólisis de proteínas de la hemoglobina se usó Alcalase® 2,4 L (2,4 AU-A/g) grado alimenticio (Novozymes, Dinamarca), una enzima proteolítica producida por fermentación sumergida de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis*, con temperaturas de trabajo entre 55°C y 70°C y pH entre 6,5 y 8,5, dependiendo del tipo de sustrato (Márquez y Vázquez, 1999).

Métodos analíticos

Los análisis fisicoquímicos se basaron en los métodos oficiales de análisis, la humedad se determinó en estufa a vacío modelo VD 53 (BINDER, Alemania), a 70°C y 70 mmHg, durante cuatro horas (AOAC 7.003). Para la evaluación del contenido de cenizas, se calcino la muestra a 550°C en una mufla modelo D8 (Terrígeno, Colombia) por un periodo de 5 horas (AOAC 14.006). El contenido proteico se llevó a cabo por el método de determinación del nitrógeno total microkjendahl (AOAC 991.20) en un equipo DK 6 (Heating Digester, USA). La valoración de grasa se hizo por el método de Gerber (AOAC 2000.18). El hierro se analizó en un equipo de Absorción Atómica, AtómicainCE 3000 (Termo Scientific®, USA), siguiendo el método propuesto por Jorhem (2000) y el color se analizó con un espectro colorímetro portátil de esfera SP-60 (X-Rite, USA); Obteniendo las coordenadas de color L^* a^* b^* , donde L^* indica la luminosidad, a^* indica la cromaticidad en el eje verde (-) a rojo (+) y b^* indica cromaticidad azul (-) a amarillo (+). Con estas coordenadas se calculó la diferencia de color (ΔE), el croma (C^*) y el tono (h^0_{ab}) utilizando las siguientes ecuaciones 1 a la 3. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

$$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad (2)$$

$$h^0_{ab} = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (3)$$

Reacción de hidrólisis enzimática

La hidrólisis se llevó a cabo por 2h, en reactores de vidrio de 500 mL, a 55°C, con agitación constante (200 rpm), conectados a un regulador termostático. El control de pH se realizó adicionando NaOH 2N, por medio de un titulador automático Titrand 842 (Metrohm, Suiza), operado por ordenador (software Tiamo 1.2.1). La reacción fue monitoreada para la determinación del grado de hidrólisis (GH) (ecuación 4), 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_t). Para éste caso, se tomó un h_t 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 4-6) (Gómez et al., 2013). El cual consiste en mantener constante el pH del medio de reacción con adición de una solución básica (hidróxido de sodio 2.0 N), pues a medida que la hidrólisis avanza en medio alcalino, el grupo carboxilo terminal se disocia por completo y los protones formados se reparten de acuerdo con el equilibrio de protonación de los grupos α -amino liberados. La base agregada para mantener constante el pH neutraliza los protones liberados en la ruptura del enlace peptídico (Gómez et al., 2013).

$$GH = \frac{BN_B}{M_P} \frac{1}{\alpha} \frac{1}{h_t} * 100 \quad (4)$$

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}} \quad (5)$$

$$\text{pk} = 7,8 + \frac{298-T}{298 * T} 2400 \quad (6)$$

Donde B es el Volumen consumido de base en L, 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 y a su vez está asociado a la temperatura.

Recuperación de los péptidos enriquecidos en hierro hémico

Al finalizar la hidrólisis, el hidrolizado obtenido se sometió a calentamiento a 95°C por 5 minutos para inactivar la enzima. Posteriormente se ajustó el pH entre 3,0 – 5,0 para precipitar los péptidos enriquecidos en hierro (In et al., 2003). Por último se separó el hierro hémico por centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos obteniendo un fondo de centrifugación concentrado en hierro. Dichos péptidos fueron obtenidos de la homogenización de las tres replicas experimentales de hidrólisis enzimáticas desarrolladas a partir de los valores óptimos de los factores.

Diseño de Experimentos

Se desarrollaron 19 corridas experimentales de acuerdo con un diseño factorial central compuesto rotatable que se muestra en la tabla 1, para evaluar el efecto de los factores pH, S₀ (g/L) y relación E/S (%) sobre el GH. Lo cuales se ajustaron a un polinomio de la forma de la ecuación 7, cuyos coeficientes se establecieron a través del análisis de varianza (ANOVA), utilizando el software Statgraphics Centurion XVI. El ajuste del modelo se verificó por medio del R² y el R² Ajustado. La significancia de los coeficientes estimados en el modelo 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 la hidrólisis.

Tabla 1: Variables independientes del modelo estadístico

Factores	Símbolo		Niveles Codificados				
	Codificado	Sin Codificar	-1,68	-1	0	1	1,68
pH	X1	x1	7,3	8	9	10	10,7
S ₀ (g/L)	X2	x2	6,6	8	10	12	13,4
E/S (%)	X3	x3	1,3	4	8	12	14,7

$$Y_j = \alpha_0 \sum_{i=1}^3 \alpha_i X_i + \sum_{i=1}^3 \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j}^{j=3} \alpha_{ij} X_{ij} \quad (7)$$

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; α₀, α_i, α_{ii}, α_{ij}, son los términos independientes, lineales, cuadráticos y de interacción del polinomio.

Optimización por metodología de superficie de respuesta MSR

Esta es una de las herramienta empleada para establecer condiciones óptimas de diferentes tipos de procesos, se basa en el método de la máxima pendiente en ascenso, que consiste en recorrer la trayectoria de los factores que entreguen la máxima pendiente de la respuesta en un sentido deseado (Douglas, 2009). La región de exploración son los niveles de los factores evaluados. Se empleó el software Statgraphics Centurion ®. Para corroborar los resultados de la rutina de optimización, lo valores óptimos de los factores codificados (T, pH y E/S), se emplearon en la ejecución de tres replicas experimentales, cuyos resultados se compararon con los predichos por el modelo polinomial ajustado.

Elaboración de leche fortificada con hierro hémico

La leche saborizada fortificada con hierro hémico se elaboró con leche líquida entera, leche en polvo entera, azúcar, cocoa y estabilizante según la NTC 1419 (2004). Inicialmente se realizó la estandarización de los sólidos grasos y los sólidos no grasos lácteos por medio de balances de masa. Seguido de la mezcla de todos los ingredientes incluyendo los péptidos enriquecidos, continuando con una adecuada homogenización, pasteurización, enfriamiento, envasado y finalizando con el almacenamiento en refrigeración a 4°C por dos días. Al día siguiente de la elaboración se llevó a cabo el análisis sensorial y al segundo día se desarrollaron los análisis fisicoquímicos.

Análisis sensorial

Se llevó a cabo una prueba sensorial de aceptación al consumidor en la que la muestra fortificada con hierro hémico se presentó a 31 jueces no entrenados, estudiante de la Universidad de Antioquia - Colombia entre 20 y 30 años de edad. La evaluación sensorial se realizó en diferentes espacios del campus universitario y la leche se ofreció en recipientes de plástico 1 oz y a una temperatura de 4°C. A las personas se les pidió que probaran y evaluaran la muestra frente al grado de aprobación en una escala hedónica de 7 puntos en cuanto al color, olor, sabor y aceptación en general.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos para la variable respuesta, en cada una de las corridas experimentales ejecutadas en forma aleatoria. 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 la E/S_0 es el factor con mayor significancia sobre el GH de la reacción, considerando que los términos lineales y cuadráticos muestran un efecto significativamente elevado con valores $p \leq 0,01$ y $p \leq 0,05$ respectivamente. El aumento de E/S_0 eleva la velocidad de hidrólisis como es común que ocurra cuando las concentraciones de enzimas son relativamente bajas en relación con las concentraciones críticas que inducen saturación en sistemas de reacción de hidrólisis enzimática (Morales et al., 2017).

Tabla 2: Matriz de datos del diseño experimental factorial central compuesto de la hidrólisis enzimática de hemoglobina bovina con Alcalasa 2.4L

Corrida No.	pH	S_0 Valores codificados	E/S_0	GH	R^2
1	-1	1	1	27,075	0,957
2	0	0	0	30,576	0,968
3	0	-1,68	0	29,057	0,953
4	0	-1	-1	23,194	0,918
5	1	-1	-1	19,169	0,993
6	1	1	-1	27,850	0,955
7	-1	-1	1	31,724	0,958
9	0	1,68	0	31,064	0,936
9	1	1	1	26,018	0,968
10	1,68	0	0	22,555	0,955
11	0	0	0	31,296	0,964
12	0	0	1,68	34,296	0,955
13	-1,68	0	0	22,757	0,971
14	0	0	0	31,048	0,984
15	0	0	0	30,341	0,987
16	1	-1	1	25,366	0,959
17	0	0	-1,68	21,595	0,999
18	-1	1	-1	22,695	0,998
19	0	0	0	28,123	0,992

Tabla 3: Análisis de varianza para el diseño experimental factorial central compuesto de la hidrólisis enzimática de hemoglobina bovina con Alcalasa 2.4L

Fuente	Coficiente	Valor-P
Lineal		
pH	-0,301	0,462
S_0	0,741	0,102
E/S_0	3,016	0,001
Cuadrático		
pH^2	-2,974	0,001
E/S_0^2	-1,106	0,031
Interacciones		
pH* S_0	1,496	0,042
pH* E/S_0	-1,382	0,053
S_0^* E/S_0	-1,842	0,017
Falta de ajuste		0,294
Total (corr.)		18

En la región de exploración los efectos lineales de S_0 y pH no resultan significativos, sin embargo las interacciones lineales de estos factores si lo son ($p \leq 0,05$) y teniendo en cuenta la dimensión de los coeficiente

en el modelo, estas dos variables son determinantes en la eficiencia predictiva del GH. El pH por su parte tiene un efecto cuadrático elevado ($p \leq 0,01$), lo que indica un doble efecto sobre la respuesta en la región de exploración, esto sugiere que aunque la enzima utilizada es de amplio rango de trabajo a pH alcalinos, cuando hidroliza hemoglobina bovina, se recomienda operar a valores de pH cercano a 9,0. 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 de la enzima, propiciando mayor afinidad por el sustrato (Shi et al., 2005).

En la ecuación 8, se presenta el ajuste del modelo polinomial de segundo orden, cuyos coeficientes fueron calculados por regresión múltiple. El modelo es resultado de la exclusión de términos no significativos ($p > 0,05$), conservando la jerarquía del modelo. El análisis de varianza, demuestra que el modelo representa adecuadamente los datos experimentales, teniendo un R^2 de 0,926 y un R^2 ajustado de 87%, lo que indica que los factores estudiados, junto con sus interacciones explican en un porcentaje satisfactorio el GH, por tanto el modelo propuesto es una buena descripción matemática del fenómeno de hidrólisis enzimática de este sustrato con Alcalasa 2,4L.

La optimización de este modelo muestra que los valores óptimos de los factores evaluados y el GH predicho son: pH= 8,1, S_0 = 6,6 % (m/v), E/S_0 = 14,7 % (m/m), GH= 38,08%. Mientras que el valor promedio del GH, obtenido con tres corridas experimentales bajo las condiciones óptimas establecidas, fue de $36,25 \pm 0,31$. Este resultado presenta un error del 5,03% con respecto al GH predicho. 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. La maximización del GH permite obtener fracciones con mayor concentración de hierro puesto que se pueden separar en más alto grado las cadenas peptídicas de la hemoglobina del grupo hemo.

$$\begin{aligned} \text{GH} = & 29,9453 - 0,301 \cdot \text{pH} + 0,741 \cdot \text{So} + 3,016 \cdot \text{Eo} - 2,974 \cdot \text{pH}^2 + 1,496 \cdot \text{pH} \cdot \text{So} - 1,382 \cdot \text{pH} \cdot \text{Eo} \\ & - 1,842 \cdot \text{So} \cdot \text{Eo} - 1,106 \cdot \text{Eo}^2 \end{aligned} \quad (8)$$

Análisis de color en la leche

En la tabla 4 y 5 se presentan los resultados de los parámetros de color tanto para la leche adicionada con hierro, como para la leche control, y la comparación de medias para el croma y el tono. En ellas se observa que no existen diferencias entre el croma (C) de la leche control y la leche evaluada, mientras que existen diferencias entre el tono (hab^*) de la leche fortificada y la leche control.

Tabla 4: Valores obtenidos de coordenadas de color

Parámetro					
ΔE^*	15,93				
	L	a*	b*	C*	hab*
<i>hab* leche control</i>	36,13	5,78	8,34	10,15	55,29
<i>hab* leche fortificada con Hierro</i>	20,24	4,55	8,28	9,45	61,19

Tabla 5: Medias para el croma y el tono con el método de diferencia mínima significativa (LSD). *Los grupos con X en la misma columna no presentan diferencias estadísticamente significativas

Parámetro	Media	Grupos Homogéneos
<i>C* leche fortificada con Hierro</i>	9,45	X
<i>C* leche control</i>	10,15	X
<i>hab* leche fortificada con Hierro</i>	61,19	X
<i>hab* leche control</i>	55,29	X

La estimación de la diferencia de color (ΔE^*) en la leche saborizada fortificada con hierro hémico en relación a la muestra control está por encima de la tolerancia ($\Delta E^* > 5$) (Gonnet, 2001), dado que el hierro proporciona un color oscuro. El valor de luminosidad disminuye drásticamente, mientras que los valores obtenidos de croma (C^*) no tienen diferencia estadísticamente significativa (Valor-P $> 0,05$) con un nivel de confianza del 95%, este resultado indica que el índice de saturación de color permanece constante en la muestra con

adición de hierro (Salinas Moreno et al., 2013). Por su parte los valores de tono de ambas muestras tienen diferencias estadísticamente significativas (tabla 5), la muestra fortificada tiene un valor más alto y según los datos obtenidos de los parámetros L^* , a^* y b^* de ambas leches saborizadas, el color se ubica en el cuadrante que va del color rojo (+ a^*) al amarillo (+ b^*). Indicando que la leche con adición de hierro tiende a un color más naranja amarillo en comparación con la muestra control.

Contenido de hierro y atributos sensoriales

Los contenidos de hierro de las fracciones precipitadas (péptidos ricos en hierro hémico), la leche fortificada con hierro y la leche control son: 427,92, 56,92 y >0,005 (mg Fe/Kg) respectivamente. El contenido del hierro en la leche saborizada fortificada con hierro hémico en el presente estudio posee un valor elevado en comparación con los resultados de estudios anteriores, como el de Gupta et al. (2015) los cuales obtuvieron concentraciones finales de 25 ppm de hierro en una mezcla de leche de vaca y de búfalo en una proporción 1:1 a partir de la fortificación con microcápsulas preparadas con sales de hierro. Por su parte Alemán et al. (2016) fortificaron con hierro hémico crema de chocolate, utilizada como relleno para galletas tipo sándwich, la cual aportó 4,63 mg de hierro/ por porción (2 galletas). Xia y Xu. (2005), elaboraron leche líquida con 15mg/L de hierro a partir de 10ml de liposomas de sulfato ferroso. Adicionalmente se debe considerar que con hierro mineral el porcentaje de absorción es menor y puede presentar diferentes efectos adversos (Cabrera et al., 2014).

Estos resultados muestran un método de fortificación de leche saborizada que posibilita el uso tecnológico del hierro hémico como extensor del nutriente en la fabricación de productos lácteos, dado que suplente el requerimiento diario de dicho mineral en los niños (11 mg de hierro/día) si se consumen 250g de leche al día (Resolución 003803, 2016). Los resultados del análisis fisicoquímico de la leche saborizada fortificada con hierro hémico son los siguientes: Humedad (81,6%), Cenizas (1,35%), Grasa (3,5%), proteína (7,4%) y carbohidratos (6,2%). El contenido de hierro en el producto registró un valor de 57 (mg Fe/kg). Estos valores se encuentran dentro de los parámetros estipulados por la NTC 1419 (2004), como aceptados para el consumo humano.

Tabla 6: Número de personas por atributo en el análisis sensorial de leche fortificada con hierro proveniente de hidrólisis enzimática de hemoglobina

Escala de análisis	Color	Olor	Sabor	Aceptación general
Me disgusta mucho		3,22		
Me disgusta moderadamente				
Me disgusta levemente				6,45
No me gusta ni me disgusta	19,35	3,22		
Me gusta levemente	32,26	6,45	16,13	16,13
Me gusta moderadamente	38,71	41,93	25,81	41,93
Me gusta mucho	9,68	45,16	58,06	35,48

Según los resultados del análisis sensorial para los diferentes atributos según el nivel de agrado, que se muestran en la tabla 6, se puede decir que el nivel de la escala "me gusta moderadamente" fue la preferida por la mayoría de los consumidores (43%), con excepción del atributo sabor, donde la escala más reportada (60%) fue "me gusta mucho", indicando que en términos generales el hierro hémico no confiere sabor desagradable al producto final y en los demás atributos no se detecta un efecto negativo marcado.

CONCLUSIONES

La hidrólisis de la hemoglobina bovina se ve afectada de manera significativa por la relación enzima/sustrato (E/S0) y en menor medida por el pH y la concentración de sustrato (S0). Se puede obtener un grado de hidrólisis (GH) máximo de $36,25 \pm 0,31\%$, trabajando a $\text{pH} = 8,1$; $S_0 = 6,6 \%$ (m/v); $E/S_0 = 14,7 \%$ (m/m). La adición de péptidos enriquecidos en hierro hémico a leche con sabor a chocolate, modifica algunas de las características de color del producto pero mantiene la aceptación sensorial del mismo, mientras que incrementa su contenido en hierro y proteínas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Popular del Cesar, por su apoyo a través del financiamiento parcial en la convocatoria interna de proyectos de investigación 2016 y a la estrategia de sostenibilidad 2016-2017 del Comité para el Desarrollo de la Investigación en la Universidad de Antioquia (CODI) por el apoyo financiero entregado.

REFERENCIAS

- Abbasi, S. y S. Azari, Efficiency of Novel Iron Microencapsulation Techniques, Fortification of Milk, doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02703.x, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 46(9), 1927–33 (2011)
- Alemán, M., R. Bou, A. Tres, J. Polo, R. Codon y F. Guardiola, Oxidative Stability of a Heme Iron-Fortified Bakery Product: Effectiveness of Ascorbyl Palmitate and Co-Spray-Drying of Heme Iron with Calcium Caseinate, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.031, *Food Chem.*, 196, 567–576 (2016)
- AOAC 7.003, 14.006, 991.20, 2000.18: Association of Analytical Communities (International). *Official Methods of Analysis* (2007)
- Bah, C.S., A. Bekhit, A. El Din, A. Carne y M.A. McConnell, Slaughter house Blood: An Emerging Source of Bioactive Compounds, doi: 10.1111/1541-4337.12013, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 12(3), 314–331 (2013)
- Burden, R.J., K. Morton, T. Richards, G.P. Whyte y C.R. Pedlar, Is Iron Treatment Beneficial in, Iron-Deficient But Non-Anaemic (IDNA) Endurance Athletes? A Systematic Review and Meta-Analysis, doi: 10.1136/bjsports-2014-093624, *Br J. Sports Med*, 49(21), 1389–97 (2015)
- Cabrera Cerero, J.R. y C. García-Cáceres, Aportes del Ferrical® a los Requerimientos Nutricionales Diarios de Minerales en la Población Cubana Sana, ISSN: 1561-2988, *Rev. Cubana de Farmacia* 48(4), 709–717 (2014)
- Das, J.K., R.A. Salam, R. Kumar y Z.A. Bhutta, Micronutrient Fortification of Food and its Impact on Woman and Child Health: a Systematic Review, doi: 10.1186/2046-4053-2-67, *Syst. Rev.*, 2(1), 67(2013)
- De-Regil, L.M., P.S. Suchdev, G.E. Vist, S. Walleser y J.P. Peña-Rosas, Home Fortification of Foods with Multiple Micronutrient Powders for Health and Nutrition in Children Under Two Years of Age (Review), doi: 10.1002/ebch.1895, *Evid. Based Child. Health*, 8(1), 112-201 (2013)
- D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, 7th Edition, 417-480, John Wiley & Sons, Inc Wiley, Nueva Jersey, Estados Unidos (2009)
- Gilliard Nkhata, S., Iron Fortification of Yogurt and Pasteurized Milk, doi: <http://dx.doi.org/10.15226/jnhfs.2015.00142>, *J. Nutr. Health Food Sci.*, 3(3), 1–12 (2015)
- Gómez, L.J., O.A. Figueroa y J.E. Zapata, Actividad Antioxidante de Hidrolizados Enzimáticos de Plasma Bovino Obtenidos por Efecto de Alcalasa® 2.4 L, doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642013000100005>, *Inf. Tecnol.*, 24(1), 33–42 (2013)
- Gonnet, J.F., Colour Effects of Co-Pigmentation of Anthocyanin Revisited-3. A Further Description Using Cielab Differences and Assessment of Matched Colours Using the Cmc Model, doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00221-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00221-7), *Food Chem.*, 75(4), 473–485 (2001)
- González-Rosendo, G., J. Polo, J.J. Rodríguez-Jerez, R. Puga-Díaz, E.G. Reyes-Navarrete y A.G. Quintero-Gutiérrez, Bioavailability of a Heme-Iron Concentrate Product Added to Chocolate Biscuit Filling in Adolescent Girls Living in a Rural Area of Mexico, doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01523.x, *J. Food Sci.*, 75(3), H73–8 (2010)
- Gupta, C., P. Chawla, S. Arora, S.K. Tomar y A.K. Singh, Iron Microencapsulation with Blend of Gum Arabic, Maltodextrin and Modified Starch Using Modified Solvent Evaporation Method – Milk Fortification, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.021>, *Food Hydrocoll.*, 43, 622–628 (2015)
- Gutiérrez, G., M. Matos, P. Barrero, D. Pando, O. Iglesias y C. Pazos, Iron-Entrapped Niosomes and their Potential Application for Yogurt Fortification, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.025>, *LWT-Food Sci Technol*, 74, 550-556 (2016)
- Haider, B.A., I. Olofin, M. Wang, D. Spiegelman, M. Ezzati y W.W. Fawzi, Anaemia, Prenatal Iron Use, and Risk of Adverse Pregnancy Outcomes: Systematic Review and Meta-Analysis, doi: 10.1136/bmj.f3443, *BMJ*, 21 346-f3443 (2013)
- Herrera J., B.E. Parra, A.V. Corrales, G.M. Olivares, A.F. Pizarro y C.D. Gaitán, Calcium as a Nutrient Involved in the Synthesis and Localization of Proteins that Facilitate Iron Uptake and Efflux in Enterocytes, doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182015000400011>, *Rev. Chil. Nutr.*, 42(4), 392–398 (2015)
- Hoppe, M., B. Brün, M.P. Larsson, L. Moraes y L. Hulthén, Heme Iron-Based Dietary Intervention for Improvement of Iron Status in Young Women, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2012.04.013>, *Nutrition*, 29(1), 89–95 (2013)
- Hurrell, R. e I. Egli, Iron Bioavailability and Dietary Reference Values, doi: <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674F>, *Am J. Clin. Nutr.*, 91(5), 1461S-1467S (2010)
- In, M.J., D.C. Kim, H.J. Chae y N.S. Oh, Effects of Degree of Hydrolysis and pH on the Solubility of Heme-Iron Enriched Peptide in Hemoglobin Hydrolysate, <https://doi.org/10.1271/bbb.67.365>, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67(2), 365–7 (2003)
- Jorhem, L., Determination of Metals in Foods by Atomic Absorption Spectrometry after Dry Ashing: NMKL Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, 83(5), 1204–1211 (2000)
- Márquez, M.C. y M.A. Vázquez, Modeling of Enzymatic Protein Hydrolysis, doi: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00041-2), *Process Biochem.*, 35(1), 111–117 (1999)
- Morales, J.A., O.A. Figueroa y J.E. Zapata, Optimización de Hidrólisis Enzimática de la Fracción Globular de Sangre Bovina por Metodología de Superficie Respuesta y Evaluación de sus Propiedades Antioxidantes, doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642017000200009>, *Inf. Tecnol.*, 28(2), 75–86 (2017)

- NTC 1419, Instituto Colombiano De Normas Técnicas ICONTEC, Productos Lacteos. Leche líquida Saborizada, 1-12, Bogotá, Colombia (2004)
- Resolución Número 003803, Ministerio de Salud y Protección Social, Bogotá, Colombia (2016)
- Ríos-Castillo, I., M. Olivares, A. Brito, D.L. de Romaña y F. Pizarro, One-Month of Calcium Supplementation does not Affect Iron Bioavailability, a Randomized Controlled Trial, doi: 10.1016/j.nut.2013.06.007, *Nutrition*, 30(1), 44–48 (2014)
- Salinas Moreno, Y., F. Aragón Cuevas y otros cuatro autores, Caracterización Física y Composición Química de Razas de Maíz de Grano Azul/Morado de las Regiones Tropicales y Subtropicales de Oaxaca, ISSN: 0187-7380, *Rev. Fitotec. Mex.*, 36(1), 23–31 (2013)
- Santillán-Urquiza, E., M.Á. Méndez-Rojas y J.F. Vélez-Ruiz, Fortification of Yogurt with Nano and Micro Sized Calcium, Iron and Zinc, Effect on the Physicochemical and Rheological Properties, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.025>, *LWT-Food Sci. Technol.*, 80, 462-469 (2017)
- Schönfeldt, H.C. y N.G. Hall, Determining Iron Bio-Availability with a Constant Heme Iron Value, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.002>, *J. Food Compos Anal*, 24(4–5), 738–740 (2011)
- Seligman, P.A., G.M. Moore y R.B. Schleicher, Clinical Studies of Hip: An Oral Heme-Iron Product, doi: [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00215-3](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00215-3), *Nutr. Res*, 20(9), 1279–86 (2000)
- Shi, D., Z. He y W. Qi, Lumping Kinetic Study on the Process of Tryptic Hydrolysis of Bovine Serum Albumin, doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.009>, *Process Biochem.*, 40(5), 1943–1949 (2005)
- Toldrà, M., D. Parés, E. Saguer y C. Carretero, Hemoglobin Hydrolysates From Porcine Blood Obtained Through Enzymatic Hydrolysis Assisted by High Hydrostatic Pressure Processing, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.05.002>, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 12(4), 435–42 (2011)
- WHO, Daily Iron Supplementation in Infants and Children (2016)
- Xia, S., y S. Xu, Ferrous Sulfate Liposomes: Preparation, Stability and Application in Fluid Milk, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.04.010>, *Food Res Int.*, 38(3), 289–296 (2005)

