

# LECHES FORTIFICADAS CON CALCIO: CAMBIOS EN LAS CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS QUE AFECTAN SU ESTABILIDAD

Acosta N.B. <sup>(1, 2)</sup>

(1) Facultad de Ingeniería Química – Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina  
(2) Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (UNL-CONICET), Santa Fe, Argentina

Directora: María Laura Olivares.  
Co-Director: Guillermo Adrián Sihufe  
Área: Ingeniería

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, la producción de alimentos suplementados con minerales es una estrategia importante para prevenir carencias de cationes. La leche y los productos a base de leche son buenos candidatos para el fortalecimiento mineral, no sólo debido a que es un alimento de consumo masivo sino también por su alto valor alimenticio, por su efecto protector de la digestión y de la absorción y por los efectos positivos sobre el crecimiento (Lombardi y col. 2016). En la leche, el calcio y las caseínas se encuentran en equilibrio entre la fase micelar (o coloidal), y la fase continua (o suero). En el suero, el calcio está principalmente en forma libre o asociado con citrato y, en menor medida, con fosfato inorgánico, cloruro y  $\alpha$ -lactoalbúmina. En la fase micelar, se presenta como fosfato de calcio coloidal unido a las micelas de caseína (MC). La mayoría del calcio (70%) se localiza en esta fase (Koutina y col. 2015). Este equilibrio depende de condiciones fisicoquímicas como temperatura, pH, presencia de diferentes minerales o agentes quelantes, entre otros (Udabage y col. 2000). A pesar de que la estructura interna de las MC es todavía un tema controversial, existe consenso en considerar que la mayoría de las  $\kappa$ -caseínas se encuentra presente sobre la superficie de las micelas y forman una capa o “cepillo” extendiendo su porción C-terminal hacia el suero. Esta organización genera la conocida estabilización estérica (Dalgleish y Corredig, 2012). El incremento de calcio en productos lácteos produce alteración del balance mineral natural de la leche, la modificación de su estructura micelar y la pérdida de estabilidad. Esto podría causar inconvenientes en las distintas etapas del procesamiento de la leche y podría estar asociado al problema de producción de sedimentos, de gelificación en las leches evaporadas o al aumento de viscosidad (conocido como “*age-thickening*”) que suele ocurrir durante el almacenamiento (Bienvenue y col., 2003).

## OBJETIVO

Se propone estudiar el efecto de la fortificación de leches con sales de cloruro, lactato y citrato de calcio, sobre las características fisicoquímicas que afectan su estabilidad.

## MATERIALES Y METODOS

### Preparación de las muestras

Para la preparación de las leches se usó leche en polvo descremada (SanCor Cooperativas Unidas Ltda., Sunchales, Argentina). Se prepararon por duplicado 500 g de dispersiones de leche en polvo descremada con una concentración de 10 % (p/p) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se agregó azida sódica en una concentración final de 0,02 % (p/p) para prevenir la degradación microbiana. Las dispersiones así formuladas se mantuvieron a 25°C durante toda la noche. Luego, se fraccionaron en alícuotas de 100 g y se adicionó la cantidad necesaria de cloruro, lactato o citrato de calcio para alcanzar concentraciones de 0, 5, 30, 50 y 100 mmol/kg de leche fluida, agitando en cada caso durante 10 minutos. Finalizado este procedimiento las muestras se mantuvieron a 25°C durante toda la noche para garantizar que se alcance el equilibrio iónico. Al siguiente día se centrifugaron alícuotas de las leches a 50.000 x g durante dos horas a 25°C para obtener en el sobrenadante el suero libre de MC.

Título del proyecto: “Reología de sistemas modelos lácteos”.

Instrumento: CAI+D Código PI - 50120110100088.

Año convocatoria: 2011

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Director/a: Dra. María Laura Olivares

## Método de análisis

La concentración proteica en leche y en suero se determinó por el método de Bradford, el cual se basa en la medición a 595 nm de la cantidad de colorante Coomassie Blue G-250, en su forma aniónica (azúl), unido a las proteínas (Kruger, 2002).

La concentración de calcio en leche y en suero se determinó mediante absorción atómica por llama de oxi-acetileno (USEPA, 1991). La concentración de calcio micelar se determinó por diferencia entre las concentraciones de calcio en leche y en suero.

Se analizó la naturaleza proteica del suero mediante la técnica PAGE-SDS discontinuo, donde se utilizaron dos geles de poliacrilamida de resolución y apilamiento con diferentes concentraciones de acrilamida, composición y pH. El gel de apilamiento (8 % (p/v) de acrilamida, pH 6,8) se localizó en la parte superior del sistema formando los pocillos donde se depositaron las muestras. El gel de resolución (12 % (p/v) de acrilamida, pH 8,8), constituyó el gel por donde migraron y se separaron las proteínas generando un perfil de banda electroforético. Dicho perfil varía de acuerdo al peso molecular (PM) de cada una de las proteínas (Walker, 2002). Antes de ser utilizados en la corrida, los permeados de suero se calentaron a 100°C durante 3 minutos en buffer de muestra con dodecil sulfato de sodio (SDS), β-mercaptoetanol y azul de bromofenol. El β-mercaptoetanol reduce los puentes disulfuro que confieren la estructura terciaria a las proteínas, mientras que el SDS es un detergente aniónico que se une a las proteínas confiriéndoles carga neta constante negativa. De esta manera, la separación proteica se realizó por diferencia de PM.

## Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico del efecto del agregado de las distintas sales de calcio sobre los parámetros analizados mediante análisis de varianza utilizando el programa Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, USA). Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, se realizó una comparación múltiple de medias. El método utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD).

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

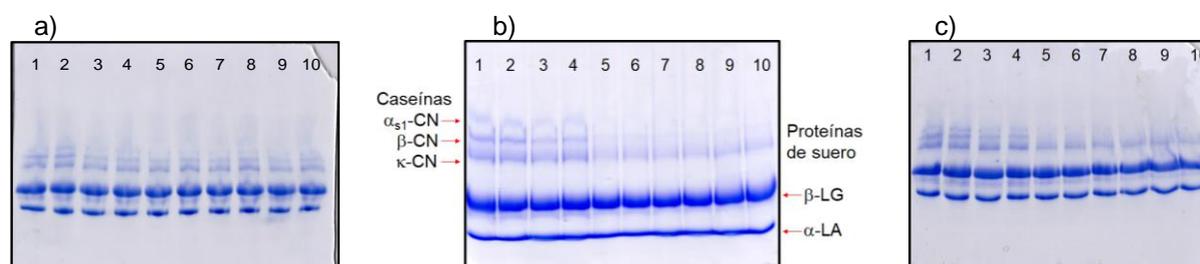
La concentración de proteína en leche fue de 32,9 g/l. Este resultado coincide con los reportados por el fabricante en el rótulo del envase y es similar al valor reportado por otros autores (Koutina y col., 2015; Walstra, 2006). La cantidad de proteína en suero de leche cruda es de aproximadamente 6,3 g/kg de leche (Walstra, 2006), un 20% de la concentración total de proteínas (Williams y col., 2005). El valor de la concentración de proteínas en suero (Tabla 1) de las leches sin agregado de sales de calcio resultaron inferiores a los esperados. Esto puede deberse al tratamiento térmico sufrido durante la producción de la leche en polvo, que provoca una desnaturalización parcial de las proteínas del suero generándose adherencia a la superficie de las MC (Koutina y col., 2015).

**Tabla 1.** Valores promedios de concentración de proteína en suero de leche sin y con agregado de sales de calcio.

Concentración final de la sal agregada (mmol/kg)	Proteína en suero (g/L)		
	Cloruro de Calcio	Lactato de Calcio	Citrato de Calcio
0	3,05 <sup>h</sup>	3,05 <sup>h</sup>	3,05 <sup>h</sup>
5	2,75 <sup>g</sup>	2,42 <sup>f</sup>	1,97 <sup>b,c,d</sup>
30	2,07 <sup>d,e</sup>	2,03 <sup>c,d,e</sup>	1,95 <sup>b,c</sup>
50	1,98 <sup>b,c,d</sup>	2,09 <sup>e</sup>	1,89 <sup>b</sup>
100	2,11 <sup>e</sup>	2,11 <sup>e</sup>	1,74 <sup>a</sup>

a-h: los promedios con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

No obstante, los valores obtenidos son similares a los reportados por Koutina y col. (2015) para este tipo de producto. Además, en la Tabla 1, puede observarse que la concentración proteica en el suero disminuye a medida que aumenta la concentración de calcio agregado para todas las muestras. Esta disminución, al parecer, tendría un efecto más marcado para todas concentraciones de las muestras con agregado de citrato de calcio. Y se correspondería con lo observado en los electroforetogramas de la Figura 1 a, b y c en los cuales las fracciones electroforéticas correspondientes a las  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseínas y la  $\beta$ -lactoglobulina parecen disminuir su intensidad de banda a medida que aumenta la concentración de calcio para las tres sales utilizadas. En contraposición, se observó que, mientras la  $\alpha$ -lactalbúmina aumenta con la concentración de cloruro y lactato de calcio agregado, en las muestras con agregado de citrato de calcio esta proteína disminuyó. De este análisis se podría inferir que el mecanismo de interacción del calcio con las proteínas de la leche sería diferente dependiendo el tipo de sal adicionada. No obstante, debido al carácter semi-cuantitativa de la técnica de PAGE-SDS, estas observaciones deberían ser analizadas con mayor precisión mediante técnicas cuantitativas más confiables.



**Figura 1.** Electroforetogramas de sueros de leche con agregado de: a) citrato de calcio, b) cloruro de calcio y c) lactato de calcio. En los tres geles presentados los carriles 1 y 2: 0 mmol/kg, 3 y 4: 5 mmol/kg, 5 y 6: 30 mmol/kg, 7 y 8: 50 mmol/kg, 9 y 10: 100 mmol/kg de la correspondiente sal de calcio.

**Tabla 2.** Valores promedios de concentración de calcio en leche, suero y micelar para leches sin y con agregado de la correspondiente sal de calcio.

Concentración final de la sal agregada (mmol/kg)	Calcio (mg/g)		
	Leche	Suero	MC
<b>Cloruro de calcio</b>			
0	1,01 <sup>a</sup>	0,31 <sup>a</sup>	0,70 <sup>a</sup>
5	1,17 <sup>a</sup>	0,42 <sup>ab</sup>	0,75 <sup>a</sup>
30	1,94 <sup>c</sup>	1,05 <sup>c</sup>	0,89 <sup>c</sup>
50	2,61 <sup>d</sup>	1,59 <sup>d</sup>	1,02 <sup>d</sup>
100	4,12 <sup>e</sup>	3,22 <sup>e</sup>	0,90 <sup>e</sup>
<b>Lactato de calcio</b>			
0	1,01 <sup>a</sup>	0,31 <sup>a</sup>	0,70 <sup>a</sup>
5	1,08 <sup>a</sup>	0,38 <sup>ab</sup>	0,70 <sup>a</sup>
30	1,97 <sup>c</sup>	0,94 <sup>c</sup>	1,03 <sup>c</sup>
50	2,48 <sup>d</sup>	1,47 <sup>d</sup>	1,01 <sup>d</sup>
100	4,13 <sup>e</sup>	3,13 <sup>e</sup>	1,00 <sup>e</sup>
<b>Citrato de calcio</b>			
0	1,01 <sup>a</sup>	0,31 <sup>a</sup>	0,70 <sup>a</sup>
5	1,44 <sup>b</sup>	0,58 <sup>b</sup>	0,86 <sup>b</sup>
30	4,88 <sup>f</sup>	0,58 <sup>b</sup>	4,30 <sup>f</sup>
50	6,81 <sup>g</sup>	0,61 <sup>b</sup>	6,20 <sup>g</sup>
100	12,92 <sup>h</sup>	0,62 <sup>b</sup>	12,30 <sup>h</sup>

a-h: los promedios con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

El valor obtenido de concentración de calcio en leche (Tabla 2) sin agregados de sal coincide con lo reportado para este alimento (Walstra, 2006). En las muestras de leches fortificadas con las tres sales de calcio estudiadas, se observó que la concentración de calcio en leche aumentó acorde a la cantidad de sal agregada y coincidió con lo reportado por otros autores para concentraciones similares (Udabage y col., 2000). No se observaron diferencias significativas entre las muestras de suero de las leches con 0 y 5 mmol/kg de cloruro y lactato de calcio agregado, mientras que las muestras con 30, 50 y 100 mmol/kg de las mismas sales agregadas presentaron valores significativamente mayores. La concentración del calcio micelar se corresponde con los resultados obtenidos en la fase sérica coincidiendo a lo reportado por Williams y col., (2005). En consecuencia, para estas dos sales, se podría inferir que parte del calcio adicionado logra incorporarse a la estructura micelar validando lo propuesto por Philippe y col., (2003) quienes sugieren que las micelas poseen la habilidad de incorporar cationes. Cabe destacar además, que no se observaron diferencias significativas entre las muestras de suero de las leches con agregado de 5, 30, 50 y 100 mmol/kg de citrato de calcio. Sin embargo, se apreciaron diferencias significativas entre las muestras sin agregado de citrato de calcio y todas las muestras a las que se les adicionaron dicha sal. En tal sentido, se podría suponer que gran parte del citrato agregado migra desde la fase sérica a la fase micelar (Philippe y col., 2003).

### CONCLUSIONES

La fortificación con cloruro, lactato y citrato de calcio altera el equilibrio iónico natural de la leche de maneras diferentes dependiendo de la sal utilizada modificando la estructura proteica de la leche. Sin embargo, sería factible como modificación tecnológica una adición de hasta 5 mmol/kg de cloruro, lactato y citrato de calcio, debido a que no se afecta en forma significativa el balance mineral y, consecuentemente, la estabilidad coloidal.

### BIBLIOGRAFÍA

- Bienvenue, A., Jiménez-Flores, R., Singh, H.** (2003). Rheological properties of concentrated skim milk: importance of soluble minerals in the changes in viscosity during storage. *Journal of Dairy Science*, 86, 3813-3821.
- Dagleish, D.G., Corredig, M.** (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annu. Review Food Science Technolgie*, 3, 449-467.
- Koutina, G., Knudsen, J.C., Skibsted, L.H.** (2015). The effect of pH on calcium and phosphorus distribution between micellar and serum phase after enrichment of skim milk with calcium D-lactobionate. *Dairy Science and Technolgie*, 95, 63-74.
- Kruger, N.J.** (2002). The Bradford Method for Protein Quantitation. En: J.M. Walker (Ed), *The Protein Protocols Handbook*, 2da edn, Nueva Jersey: Humana Press. pp. 11-22.
- Lombardi, J., Spelzini, D., Folmer Corrêa, A.P., Brandelli, A., Risso, P., Boeris, V.** (2016). Milk protein suspensions enriched with three essential minerals: physicochemical characterization and aggregation induced by a novel enzymatic pool. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 140, 452-459.
- Philippe, M., Gaucheron, F., Le Graët, Y. Michel F., Garem A.** (2003). Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. *Lait* 83, 45-59.
- Udabage, P., McKinnon, I.R., Augustin M.** (2000). Mineral and casein equilibria in milk: effects of added salts and calcium-chelating agents. *Journal of Dairy Resarch* 67, 361-370.
- USEPA** 1991 – Method 200.3: Sample Preparation Procedure for Spectrochemical Determination of Total Recoverable Element in Biological Tissues. Environmental Protection Agency Revision 1.0 EPA – 600/4 – 91 – 010.
- Walker, J.M.** (2002). SDS Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: J.M. Walker (Ed), *The Protein Protocols Handbook*, 2nd edn, (pp. 69-72). Nueva Jersey: Humana Press.
- Williams R.P.W., D’Ath, L., Augustin, M.A.** (2005). Production of calcium-fortified milk powders using soluble calcium salts. *Le Lait*, 85, 369-381.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M., y Geurts T.J.** (2006). *Dairy Science and Technology*, 2nd edn, Boca Raton: CRC Press.