

LECHES ENRIQUECIDAS CON CALCIO: CAMBIOS EN LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS QUE AFECTAN SU ESTABILIDAD

Acosta Nadia Belén

*Tesinista en el Grupo de Ingeniería en Alimentos y Biotecnología del INTEC-UNL-CONICET
Estudiante de Licenciatura en Ciencias y Tecnologías de los Alimentos – FIQ- UNL*

Área: Ingeniería
Sub-Área: Alimentos
Grupo: X

Palabras clave: leches enriquecidas, calcio, estabilidad.

INTRODUCCIÓN

La leche y sus derivados suelen ser buenos vehículos para el fortalecimiento mineral, no sólo debido a que son alimentos de consumo masivo y con elevado valor nutricional, sino también por su efecto protector de la digestión y de la absorción de nutrientes y por los efectos positivos sobre el crecimiento (Lombardi et al., 2016). El organismo mantiene normales los niveles extracelulares de calcio mediante la movilización del mismo desde el hueso, a costa de deteriorar la cantidad, la estructura y la calidad de éste. Es por ello que el calcio es un componente clave en cualquier régimen preventivo o terapéutico de la osteoporosis (Quesada Gómez y Sosa Henríquez, 2011).

Desde el punto de vista fisicoquímico, la leche es un sistema en el cual se pueden diferenciar tres tipos de partículas de tamaño coloidal: los glóbulos de grasa compuestos principalmente por triacilglicérols ($\approx 1 \mu\text{m}$; 4% p/v); las micelas de caseína (MC) ($\approx 0,1 \mu\text{m}$; 2,8 % p/v); y las proteínas del suero ($\approx 0,01 \mu\text{m}$; 1% p/v). El resto de los componentes de tamaño más pequeño (más de 100.000 especies en la leche) pueden ser considerados como parte de la fase continua (Horne, 2003). Una micela bovina típica contiene cuatro tipos diferentes de caseínas: α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -caseína agregadas con fosfato de calcio y pequeñas cantidades de citrato (Horne, 2003). A pesar de que la estructura interna de las MC es todavía un tema controversial, existe consenso en considerar que la mayoría de las κ -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 (Dalglish y Corredig, 2012).

En la leche, el calcio se encuentra en equilibrio entre la fase micelar (o coloidal), y la fase continua (o suero). En el suero, está principalmente en forma libre o asociado con citrato y, en menor medida, con fosfato inorgánico, cloruro y α -lactoalbúmina. En la fase micelar, el calcio se presenta como fosfato de calcio coloidal unido a las MC. La mayoría del calcio (70%) se localiza en esta fase (Koutina et al., 2015). Este equilibrio depende de las condiciones fisicoquímicas como temperatura, pH, presencia de diferentes minerales, etc.

El incremento de calcio en productos lácteos se puede realizar mediante el agregado de sales. Esta modificación tecnológica produce alteración del balance mineral natural de la leche, la modificación de su estructura coloidal y a la pérdida de estabilidad. Esto podría causar inconvenientes en las distintas etapas del procesamiento de la leche y podría estar asociado al problema 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

Estudiar los cambios en las características fisicoquímicas que afectan la estabilidad de leches enriquecidas con cloruro de calcio.

METODOLOGÍA

Para la preparación de las dispersiones se usó leche en polvo descremada (SanCor Cooperativas Unidas Ltda., Sunchales, Argentina). Se prepararon por duplicado 500g de dispersiones de leche en polvo descremada con una concentración de 10% p/p siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para esto se pesó la cantidad necesaria de agua ultrapura y la masa correspondiente de leche en polvo descremada se dispersó bajo agitación constante a 25°C. Una vez finalizada la dispersión, ésta se mantuvo a 25°C bajo agitación durante cuatro horas. Unos minutos antes de finalizar el tiempo establecido, 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, las dispersiones se fraccionaron en alícuotas de 100 g y se adicionó la cantidad necesaria de cloruro de calcio para alcanzar concentraciones de 0, 5, 30, 50 y 100 mmol/kg, 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 g durante dos horas para obtener en el sobrenadante el suero libre de MC. 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 (azul), unido a las proteínas (Manzo, 2013).

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 que presentan diferentes concentraciones de acrilamida, composición y pH. El gel de apilamiento (8% p/v de acrilamida, pH 6,8) se localiza en la parte superior del sistema formando los pocillos donde se depositarán las muestras. El gel de resolución (12% p/v de acrilamida, pH 8,8), forma el cuerpo del gel por donde migrarán y se separarán 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. El SDS es un detergente aniónico que se une a las proteínas confiriéndoles carga neta constante negativa. De esta manera, la separación proteica se realiza por diferencia de PM. Se realizó un análisis estadístico del efecto del agregado de cloruro de calcio sobre los parámetros analizados (concentración de proteína y concentración de calcio) mediante análisis de varianza utilizando el programa Minitab (Minitab Inc., State College, PA, USA). Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$), se realizó una comparación múltiple de medias mediante el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher.

RESULTADOS

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 (Walstra, 2006; Koutina et al., 2015). En la **Tabla 1** se presentan los valores de concentración de proteína en suero. Estos valores resultaron inferiores a los esperados debido al tratamiento térmico durante la producción de la leche en polvo, que provoca desnaturalización parcial de las proteínas del suero y adherencia a la superficie de las MC. No obstante, los valores obtenidos coinciden con los reportados por Koutina et al., (2015). Las muestras con 30, 50 y 100 mmol/kg de cloruro de calcio agregado presentaron concentraciones de proteína en suero significativamente menores a las de 0 y 5 mmol/kg. Asimismo, la muestra con 5 mmol/kg de cloruro de calcio agregado presentó menor concentración de proteína en suero que la muestra sin agregado de calcio. Estos resultados coinciden con los de PAGE-SDS como se muestra en la **Figura 1**. Se observó que a medida que aumenta la concentración de calcio agregado disminuye la intensidad de las bandas correspondientes a la α_{s1} -, β - y κ -caseínas, siendo escasamente detectadas en las muestras con 30, 50 y 100 mmol/kg. Estos resultados sugieren que, al adicionar calcio, las caseínas presentes en el suero se incorporan a MC pre-existentes o constituyen nuevas estructuras micelares a los efectos de secuestrar el calcio adicionado (Philippe et al., 2003). Asimismo, en forma cualitativa se observa una disminución de la intensidad de la banda correspondiente a la β -lactoglobulina a medida que aumenta la concentración de cloruro de calcio agregado (**Figura 1**). No obstante, se espera profundizar este análisis con nuevas experiencias y con la cuantificación de cada una de las fracciones proteicas observadas en los geles. Estos resultados acuerdan con lo reportado por Koutina et al. (2015) quienes sugieren que cuando se adiciona calcio las β -lactoglobulinas forman complejos con las κ -caseínas en la fase micelar.

Tabla 1. Contenido proteico en suero de leche y concentración de calcio en leche, suero y micelar de leches enriquecidas con cloruro de calcio.

CaCl ₂ adicionado (mmol/kg)	Proteína en suero (g/l)	Calcio total (mg/g)	Calcio en suero (mg/g)	Calcio micelar (mg/g)
0	3,05 ^c	1,75 ^a	0,67 ^a	1,08
5	2,75 ^b	2,26 ^a	0,86 ^a	1,40
30	2,07 ^a	3,80 ^b	1,87 ^b	1,93
50	1,98 ^a	5,08 ^c	3,14 ^c	1,94
100	2,11 ^a	10,46 ^d	7,73 ^d	2,73

a-c: los promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En la **Tabla 1** también se presentan los valores obtenidos de concentración de calcio en leche, suero y micelar. El único parámetro que no presentó diferencias significativas debido al agregado de cloruro de calcio fue el calcio micelar. Se obtuvo un valor de concentración de calcio en leche sin agregado de calcio similar a lo reportado para este alimento (Walstra, 2006). Con respecto a la concentración de calcio en suero, no se observaron diferencias significativas entre las muestras con 0 y 5 mmol/kg de cloruro de calcio agregado, mientras que el resto de las muestras presentaron valores significativamente mayores. Se podría inferir que parte del calcio adicionado logra incorporarse a la estructura micelar.

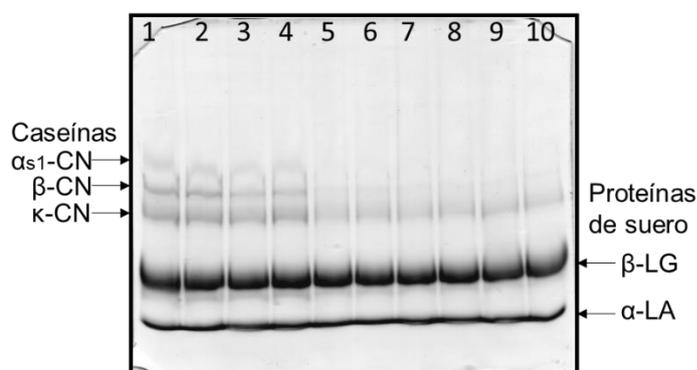


Figura 1. Electroforetograma correspondiente a permeados de leche: Carriles 1 y 2 sin agregado de cloruro de calcio, 3 y 4 con agregado de 5 mmol/kg, 5 y 6 con agregado de 30 mmol/kg, 7 y 8 con agregado de 50 mmol/kg, 9 y 10 con agregado de 100 mmol/kg.

CONCLUSIONES

Se concluye que el enriquecimiento con cloruro de calcio altera el equilibrio iónico natural de la leche y su estructura proteica afectando la estabilidad de este complejo sistema coloidal. No obstante, una adición de hasta 5 mmol/kg de cloruro de calcio sería factible como modificación tecnológica de la leche, 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. Rev. Food Sci. Technol.*, 3, 449-467.
- Horne, D.S.** (2003). *Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 213, 255-263.
- 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 Technology, 95, 63-74.
- Manzo, R. M.** (2013). *Preparación y caracterización de derivados insolubilizados de la enzima L-Arabinosa isomerasa para su empleo en la bioconversión de D-Galactosa en D-Tagatosa*. (Tesis de Doctorado). Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.
- 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.
- 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.
- Philippe, M., Le Graët, Y., Gaucheron, F.** (2005). *The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles*. Food Chemistry, 90: 673-683.
- Quesada Gómez, J.M., Sosa Henríquez, M.** (2011). *Nutrición y osteoporosis. Calcio y vitamina D*. Rev Osteoporos Metab Miner, 3-4, 165-182.
- 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.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M., y Geurts T.J.** (2006). *Dairy science and technology, 2nd edn.*, Boca Raton: CRC Press.