

## CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y REOLÓGICAS DE LECHE FORTIFICADAS CON SALES DE CALCIO

*Acosta, N.B.<sup>2</sup>; Sihufe, G.A.<sup>1</sup>; Meza, B.E.<sup>1</sup>; Marino, F.<sup>1</sup>; Costabel, L.M.<sup>2</sup>;  
Zorrilla, S.E.<sup>1</sup>; Olivares, M.L.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> INTEC – CONICET - UNL.

<sup>2</sup> IDICAL (INTA- CONICET).

*olivares@santafe-conicet.gov.ar*

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar los cambios en las características fisicoquímicas y reológicas de leches fortificadas con diferentes sales de calcio. Se formularon muestras de leche utilizando leche en polvo descremada con diferentes concentraciones de cloruro y lactato de calcio (0,5 y 30 mmol kg<sup>-1</sup>). Se utilizaron diferentes técnicas fisicoquímicas y reométricas para analizar el efecto de la fortificación con calcio sobre la leche. Los resultados obtenidos indican que, para ambas sales de calcio, parte del calcio añadido migra al interior de la micela de caseína formando fosfato de calcio coloidal y que el calcio añadido como lactato de calcio ingresa en mayor proporción. Una fracción de proteínas del suero también se integraría a la estructura micelar. En tal sentido, sería factible una adición de 5 mmol kg<sup>-1</sup> de cloruro o lactato de calcio como modificación tecnológica, debido a que el equilibrio mineral y la estabilidad térmica no se ven afectados significativamente a dicha concentración. Se concluyó que los resultados obtenidos a partir de las técnicas fisicoquímicas comúnmente utilizadas en la literatura, están en concordancia con los obtenidos por reometría, demostrando que esta técnica sencilla y rápida permite inferir sobre cambios en el equilibrio mineral y los efectos sobre la estabilidad térmica cuando se utilizan diferentes sales en la fortificación de leches.

**Palabras clave:** leche, fortificación con calcio, reología, cambios fisicoquímicos, estabilidad térmica.

### 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la producción de alimentos suplementados con minerales es una estrategia importante para prevenir carencias de los mismos. 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, su efecto protector sobre la digestión y la absorción y los efectos positivos sobre el crecimiento (Lombardi *et al.*, 2016).

La fortificación de leche con sales de calcio es una práctica a la que normalmente se recurre para mejorar sus propiedades nutricionales. Existe una gran variedad de sales de calcio que pueden utilizarse para tal fin, tales como cloruro, carbonato, citrato, lactato, gluconato, entre otras (Deeth & Lewis, 2014; Ramasubramanian, D'Arcy & Deeth, 2012; Singh *et al.*, 2007). La adición de calcio puede generar cambios en las propiedades fisicoquímicas de la leche y causar su coagulación durante el tratamiento térmico industrial desarrollando inacceptabilidad sensorial (Ramasubramanian *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2007). Por lo tanto, la selección de la sal apropiada o una combinación de ellas se basa generalmente en evitar efectos indeseables y en mejorar la biodisponibilidad de dicho mineral.

Se han realizado numerosos estudios para analizar los cambios en las características fisicoquímicas y la distribución de iones entre las diferentes fases presentes en la leche (Bijl *et al.*, 2007; Omoarukhe *et al.*, 2010; Philippe *et al.*, 2003; Gaucheron *et al.*, 2003). En este alimento, el calcio está en equilibrio entre las fases micelar (o coloidal) y el suero. En el suero, está presente principalmente en forma libre o asociada con citrato y, en menor medida, con fosfato inorgánico, cloruro y  $\alpha$ -lactoalbúmina (Gaucheron, 2005; Ramasubramanian *et al.*, 2013). En la fase coloidal, el calcio está presente como fosfato de calcio coloidal (CCP) unido a las micelas de caseína (MC). La mayor parte del calcio (70%) se encuentra en esta fase (Bijl *et al.*, 2013; Koutina, Knudsen & Skibsted, 2015a; Omoarukhe *et al.*, 2010). El CCP está en equilibrio dinámico con el fosfato de calcio presente en el suero. Este equilibrio depende de condiciones fisicoquímicas como la temperatura, el pH, la presencia de diferentes minerales y la fuerza iónica (de la Fuente, 1998; Nogueira Silva *et al.*, 2015).

El enriquecimiento de la leche con sales de calcio influye en el nivel de CCP, la proporción de caseínas en las fases coloidal y sérica, la actividad del  $\text{Ca}^{2+}$  y la fuerza iónica de la leche. También produce una disminución en la hidratación de las MC y el potencial zeta (Famelart, Le Graet, & Raulot, 1999; Koutina *et al.*, 2015a; Philippe, Le Graët, & Gaucheron, 2005). En la superficie de las MC se neutralizan los residuos cargados negativamente haciéndolos más susceptibles a la agregación. En consecuencia, las propiedades estabilizadoras de la capa de  $\kappa$ -caseína que rodea a las MC se ven afectadas por la concentración de calcio (Ye & Harte, 2013). Además, la estabilidad de la leche durante el proceso térmico puede verse afectada por la adición de calcio (Koutina *et al.*, 2015b). Existe una amplia variedad de técnicas para evaluar el efecto de la adición de calcio en la estabilidad de la leche, siendo los estudios reológicos métodos relativamente fáciles que pueden proporcionar información complementaria y útil (Meza, Zorrilla & Olivares, 2019).

En el presente trabajo se analizaron los cambios en las características fisicoquímicas de leches fortificadas con cloruro y lactato de calcio. Además, se exploró la eficiencia de la reometría como técnica para analizar el efecto de la fortificación de la leche con sales de calcio.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Preparación de las muestras de leche

Se utilizó leche en polvo descremada de bajo tratamiento térmico (4% m/m de humedad, 1,5% m/m de grasa, 35% m/m de proteína, 8,5% m/m de ceniza, WPNI (whey protein nitrogen index) =7 mg de nitrógeno de proteína de suero sin desnaturalizar por gramo de leche en polvo, SanCor Cooperativas Unidas Limitada, Sunchales, Argentina). Las muestras de leche se reconstituyeron al 10% m/m dispersando la cantidad necesaria de polvo en agua ultra pura bajo agitación constante (1200 rpm) a 25 °C. Las muestras se sellaron y agitaron durante 4 h a 25 °C. Para prevenir el crecimiento microbiano, se añadió azida sódica (0,02% m/v) a las muestras de leche reconstituida antes de almacenarlas durante toda la noche a 25 °C para asegurar la completa hidratación de las MC y el equilibrio del contenido mineral. Al siguiente día, diferentes cantidades de cloruro o lactato de calcio se agregaron a las muestras para alcanzar las concentraciones de 0, 5 y 30 mmol  $\text{kg}^{-1}$  bajo agitación constante durante 5 min a 25 °C. Nuevamente, las muestras fueron almacenadas toda la noche a 25 °C para asegurar el equilibrio del contenido mineral, y posteriormente se les determinó el pH con un pHmetro (Oakton Instruments, Vernon Hills, IL, EE. UU.). Cada tratamiento se preparó por duplicado.

### 2.2. Ultra-centrifugación de la leche

El sobrenadante libre de MC de las muestras de leche se obtuvo mediante ultra-centrifugación (centrífuga Biofuge 28RS, Heraeus Sepatech, Osterode, Alemania) a 50.000 g por 2 h a 25 °C (Koutina *et al.*, 2015a).

### 2.3. Determinación de proteínas

El contenido de proteínas totales en leche y en suero se determinó por el método de Bradford (Kruger, 2002). Se analizó la naturaleza proteica del suero (caseínas,  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina) mediante la técnica PAGE-SDS discontinuo, donde se utilizaron dos geles de poliacrilamida de resolución (12% m/v de acrilamida, pH 8,8) y apilamiento (8% m/v de acrilamida, pH 6,8). Se aplicó una corriente constante de 70 mA. Al finalizar la corrida, los geles fueron teñidos utilizando Coomassie Brilliant Blue R250 al 0,125 % m/v en una mezcla 1:1 de etanol al 95% m/v y ácido acético al 10% m/v y finalmente fueron decolorados utilizando una mezcla 2:3 de etanol al 95% m/v y ácido acético al 5% m/v.

### 2.4. Determinación de minerales

El contenido de calcio total y en suero se determinó mediante absorción atómica (USEPA, 1991). La concentración de calcio micelar se determinó por diferencia entre las concentraciones de calcio en leche y en suero.

El contenido de fósforo total y en suero se determinó mediante técnica estándar colorimétrica (ISO 9874 | IDF 42:2006). La digestión húmeda de las muestras se realizó con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno; se adicionó una solución de molibdato/ácido ascórbico, que forma el compuesto azul de molibdeno en presencia de fosfatos con una absorbancia máxima a 820 nm.

### 2.5. Osmolalidad

La osmolalidad de las leches se midió usando un osmómetro de presión de vapor Wescor VAPRO® modelo-5520 (Wescor Inc, Puteaux, Francia). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se depositaron 10  $\mu$ L de la muestra sobre un disco de papel libre de soluto en el portamuestras, luego se introdujo el portamuestras en el instrumento y se cerró la cámara de muestra para realizar una medición automática. Previo a la medición de las muestras, el osmómetro fue calibrado con estándares de NaCl de 100, 290 y 1000 mmol kg<sup>-1</sup>.

### 2.6. Reometría

Las leches descremadas adicionadas con diferentes cantidades de cloruro y lactato de calcio se evaluaron en un reómetro de velocidad controlada Brookfield DV3TLVCP (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, MA, EE.UU.) con una geometría de cono-plato CPA-40Z (0,8° de ángulo y 48 mm de diámetro). Se colocaron 0,5 mL de leche en la celda reométrica y se midió la viscosidad en función de la temperatura en el rango de 25-80 °C a una velocidad de corte constante de 100 s<sup>-1</sup>. La temperatura de la celda se incrementó a una velocidad de 2,4 °C min<sup>-1</sup>. En dichas condiciones, la viscosidad de la leche disminuye a medida que aumenta la temperatura hasta alcanzar una temperatura crítica ( $T_c$ ) a la cual diverge (Meza, Zorrilla & Olivares, 2019). Para determinar las temperaturas críticas representativas de cada formulación, se analizaron los datos experimentales de viscosidad en función de la temperatura siguiendo el procedimiento reportado por Meza *et al.* (2019). Se obtuvo una regresión lineal de cada segmento lineal (antes y después del inicio del proceso de agregación). Luego, se determinó la intersección entre los dos segmentos lineales para determinar  $T_c$ , la cual se puede considerar como una estimación de la temperatura crítica de agregación.

### 2.7. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico con los parámetros obtenidos, tomando como factores principales el tipo y la concentración de sal adicionada a la leche, evaluando la interacción entre ambos factores. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) a los parámetros utilizando el programa

Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, USA). Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$ ), se realizó una comparación múltiple de medias, mediante la prueba de diferencias mínimas significativas (LSD).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. pH

En la Tabla 1, se presentan los valores de pH promedio de las muestras analizadas. Los valores de pH de las muestras sin adición de sal de calcio coincidieron con los reportados para este tipo de alimento (Anema, 2009; Gaucheron, 2005; On-Nom, Grandison & Lewis, 2012; Philippe *et al.*, 2003; Walstra, Wouters & Geurts, 2006; Williams, D'Ath & Augustin, 2005). El agregado de sales de calcio disminuyó el pH de la leche.

A través del análisis estadístico se detectó una interacción significativa ( $P < 0,05$ ) para los valores de pH entre el tipo de sal y la concentración de calcio adicionado a las leches. Esto se debe a que el comportamiento del pH es diferente, dependiendo del tipo y la concentración de sal utilizada. Los valores de pH de las muestras sin adición de sal y aquellas con  $5 \text{ mmol kg}^{-1}$  de sal agregada no mostraron diferencias significativas debido al tipo de sal utilizada, mientras que para la concentración de  $30 \text{ mmol kg}^{-1}$ , los valores de pH de las muestras con agregado de lactato de calcio fueron significativamente mayores que los de las muestras con agregado de cloruro de calcio.

La disminución del pH de la leche debido al agregado de sales de calcio ha sido reportada previamente (Gaucheron, 2005; Lewis, 2010; Philippe *et al.*, 2003; Ramasubramanian *et al.*, 2013).

#### 3.2. Análisis de proteína en leche y suero

La concentración de proteína total en leche obtenida fue de  $32,9 \text{ g L}^{-1}$ . Este valor coincide con los valores reportados previamente para este tipo de alimentos (Bijl *et al.*, 2013; Koutina *et al.*, 2015a; Walstra *et al.*, 2006).

En el Cuadro 1, pueden observarse los valores promedios de concentración de proteína obtenidos para los sueros de las muestras de leche. La concentración de proteína de suero de las muestras de leche sin adición de sal es inferior al valor reportado para el suero de leche fresca, esto podría deberse al tratamiento térmico sufrido durante la producción de la leche en polvo, lo que provoca la desnaturalización parcial de las proteínas del suero y su adherencia a la superficie de las MC (Dalgleish & Corredig, 2012; Koutina *et al.*, 2015a; Singh & Fox 1987).

**Cuadro 1:** Valores medios y desvíos estándar correspondientes a los parámetros fisicoquímicos de las muestras de suero y leche analizadas.

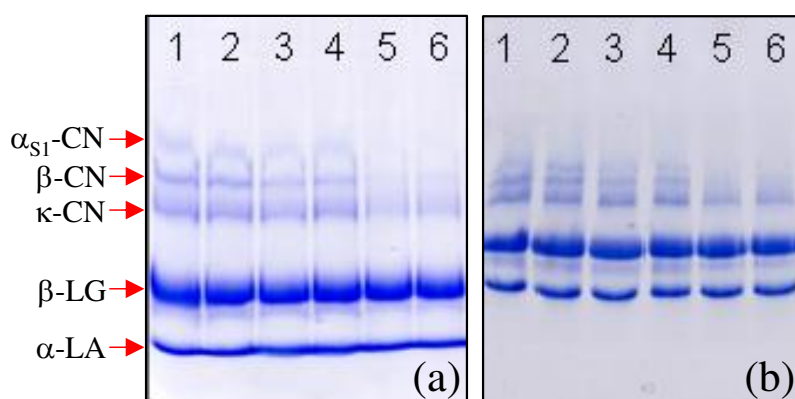
Sal	Concentración de sal (mmol kg <sup>-1</sup> )	pH	Calcio en leche (mg g <sup>-1</sup> )	Calcio en suero (mg g <sup>-1</sup> )	Calcio micelar (mg g <sup>-1</sup> )	Fósforo en suero (mmol kg <sup>-1</sup> )	Proteína en suero (g L <sup>-1</sup> )	Osmolalidad (mmol kg <sup>-1</sup> )
Lactato de calcio	0	6,65 ± 0,00	1,01 ± 0,02	0,31 ± 0,00	0,70 ± 0,02	12,51 ± 0,01	3,05 ± 0,11	285,2 ± 10,7
	5	6,54 ± 0,01	1,09 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,71 ± 0,02	11,90 ± 0,35	2,42 ± 0,13	300,5 ± 3,8
	30	6,18 ± 0,00	1,97 ± 0,07	0,94 ± 0,02	1,04 ± 0,05	10,04 ± 0,42	2,03 ± 0,07	349,3 ± 2,2
Cloruro de calcio	0	6,71 ± 0,07	1,01 ± 0,02	0,31 ± 0,00	0,70 ± 0,02	12,51 ± 0,01	3,05 ± 0,11	285,2 ± 10,7
	5	6,53 ± 0,01	1,17 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,75 ± 0,01	12,11 ± 0,02	2,75 ± 0,08	280,7 ± 3,0
	30	6,09 ± 0,01	1,94 ± 0,01	1,05 ± 0,04	0,89 ± 0,03	10,38 ± 0,06	2,07 ± 0,06	337,5 ± 5,2
<b>Sal</b>		NS	NS	*	NS	NS	*	*
<b>Concentración</b>		*	*	*	*	*	*	*
<b>Interacción</b>		*	NS	*	*	NS	*	*

NS: efecto no significativo (P>0,05); \*: efecto significativo (P<0,05).

Las concentraciones de proteína en suero de todas las muestras con agregado de calcio fueron significativamente menores que la concentración de proteína en suero de la muestra de leche sin fortificar. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores. Philippe *et al.* (2003) analizaron leches adicionadas con calcio y observaron que la concentración de caseínas en el suero disminuyó luego de la adición de sales de calcio y sugirieron que estas proteínas pasan desde el suero a formar parte de micelas pre-existentes o constituyen nuevas estructuras micelares. Asimismo, Williams *et al.* (2005) arribaron a la misma conclusión luego de trabajar con leches a las que se les agregó cloruro de calcio en combinación con ortofosfato tri-potásico. Más recientemente, Koutina *et al.* (2015a) realizaron estudios de caracterización de leche descremada fortificada con D-lactobionato de calcio donde observaron una disminución de fósforo y caseínas en el suero, y sugirieron que el calcio adicionado podría unirse al fósforo y a las caseínas del suero o permanecer como iones libres, que podrían ingresar a las micelas modificando su estructura.

Al realizar el análisis estadístico para este parámetro se detectó una interacción significativa ( $P < 0,05$ ) entre el tipo de sal y la concentración final de calcio (Cuadro 1). La concentración de proteína en suero de las muestras de leche con  $5 \text{ mmol kg}^{-1}$  de lactato de calcio fue significativamente menor que la concentración de proteínas de suero de leches con agregado de cloruro de calcio al mismo nivel de concentración de sal; esto permitiría suponer que la migración de proteínas del suero a la fase micelar es mayor cuando se utiliza lactato de calcio.

La caracterización proteica del suero fue también analizada mediante SDS-PAGE. En la Figura 1, se muestran las imágenes de los geles obtenidos. En ellos se puede observar que las bandas correspondientes a  $\alpha_{S1}$ -CN,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseínas y a la  $\beta$ -lactoglobulina disminuyen su intensidad a medida que aumenta la concentración de calcio total en leche para las dos sales utilizadas. Estos resultados se corresponden con los obtenidos en la cuantificación del contenido proteico de los sueros mediante el método de Bradford. En el caso de la  $\beta$ -lactoglobulina, la disminución de la intensidad de banda fue menos notoria.



**Figura 1.** SDS – PAGE de sueros. (a) Muestras con cloruro de calcio, (b) Muestras con lactato de calcio. Concentración de sal:  $0 \text{ mmol kg}^{-1}$  (carriles 1 y 2),  $5 \text{ mmol kg}^{-1}$  (carriles 3 y 4),  $30 \text{ mmol kg}^{-1}$  (carriles 5 y 6).

### 3.3. Composición mineral de las muestras de la fase sérica y leche

#### 3.3.1. Contenido de calcio

En el Cuadro 1, se muestran los valores promedios del contenido de calcio en leche y en suero. El contenido de calcio en las muestras de leche sin adición de sal coincide con el reportado para este tipo de alimento (Walstra *et al.*, 2006). Además, el contenido de calcio total en leches aumentó de forma proporcional a la cantidad de sal agregada. A  $30 \text{ mmol kg}^{-1}$ , la concentración de calcio total en leche ( $1,95 \text{ mg g}^{-1}$ ) fue significativamente mayor que a  $5 \text{ mmol kg}^{-1}$  ( $1,13 \text{ mg g}^{-1}$ ), independientemente del tipo de sal utilizada.

También puede apreciarse que el contenido de calcio total en suero aumenta a medida que aumenta la concentración de calcio agregado para ambas sales estudiadas (Cuadro 1). A través del análisis estadístico se observó una interacción significativa ( $P < 0,05$ ) para este parámetro entre el tipo de sal y la concentración total de calcio agregada. A  $5 \text{ mmol kg}^{-1}$  de sal añadida, no se observaron diferencias significativas en la concentración de calcio total en suero independientemente del tipo de sal utilizada. Sin embargo, a  $30 \text{ mmol kg}^{-1}$  de sal agregada, las muestras adicionadas con cloruro de calcio mostraron valores de calcio en suero más altos que los de las muestras a las que se les agregó lactato de calcio. Estos resultados concuerdan con los reportados por Williams *et al.* (2005) y Zuraw *et al.* (1986). Además, Koutina *et al.* (2015a) obtuvieron resultados similares al estudiar la fortificación de la leche con D-lactobionato de calcio en un rango de concentración de 0 a 50 mM.

En este trabajo, al igual que en experiencias anteriores, se podría inferir que parte del calcio agregado se incorpora a la estructura micelar (Philippe *et al.*, 2003; Sievanen, Huppertz, Kelly, & Fox, 2008; Williams *et al.*, 2005; Zuraw *et al.*, 1986). Asimismo, a partir de estos resultados se podría suponer que el calcio aportado por el lactato de calcio es incorporado en mayor medida que el calcio aportado por el cloruro de calcio a la estructura micelar, lo cual está de acuerdo con estudios realizados por Singh *et al.*, (2007). Este comportamiento se condice con el observado en la determinación de pH, a  $30 \text{ mmol kg}^{-1}$  las muestras con agregado de lactato de calcio mostraron valores de pH más altos que los de las muestras con agregado de cloruro de calcio, probablemente debido a una menor cantidad de calcio fuera de las MC disponible para afectar el equilibrio de especies iónicas en la leche, particularmente iones  $\text{H}^+$ .

### 3.3.2. Contenido de fósforo

El valor del contenido de fósforo total en leche fue de  $31,65 \pm 0,54 \text{ mmol kg}^{-1}$ , este valor coincide con el reportado por Koutina *et al.* (2015a) para la leche.

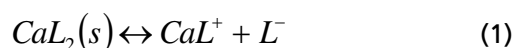
El contenido de fósforo en suero de todas las muestras puede observarse en el Cuadro 1. El análisis estadístico indicó que solo la concentración de sal agregada tuvo un efecto significativo sobre el contenido de fósforo en el suero. El contenido de fósforo en suero disminuyó con el incremento de la concentración de sales de calcio en la leche. A  $30 \text{ mmol kg}^{-1}$ , la concentración de fósforo ( $10,21 \text{ mmol kg}^{-1}$ ) fue significativamente menor que a  $5 \text{ mmol kg}^{-1}$  ( $12,00 \text{ mmol kg}^{-1}$ ) independientemente del tipo de sal utilizada para la fortificación mineral. Además, estos resultados presentan una tendencia similar a la reportada previamente por otros autores (Gaucheron, 2005; Koutina *et al.*, 2015a; Philippe *et al.* 2003; Udabage, McKinnon, & Augustin, 2000).

### 3.4. Osmolalidad

La osmolalidad se define como la concentración, expresada en base molar, de las partículas osmóticamente activas en una solución verdadera. Las sustancias disueltas en la leche dan como resultado una presión osmótica de aproximadamente 700 kPa (7 bar) y una disminución del punto de congelación cercano a 0,53 K (Walstra *et al.*, 2006). Utilizando la ecuación de van't Hoff para soluciones diluidas, que relaciona la presión osmótica con la concentración del soluto, este valor de presión osmótica se corresponde con un valor teórico de solutos disueltos en la leche de  $282 \text{ mmol kg}^{-1}$ . La osmolalidad de la leche solo depende de la concentración de cada soluto presente en la fase acuosa. Las partículas de grasa en suspensión y las MC no contribuyen a esta propiedad coligativa (Bachmann *et al.*, 2012); Novo, Reija, & Al-Soufi, 2007). Por lo tanto, mediante medidas de osmolalidad, es posible analizar la variación de la concentración de especies osmóticamente activas disueltas en el suero.

En el Cuadro 1, se presentan los valores medios de osmolalidad obtenidos para las leches fortificadas con las diferentes sales de calcio. Los valores obtenidos para la leche sin adición de sales coinciden con los reportados para este alimento (Novo *et al.*, 2007). Independientemente de la sal utilizada, la osmolalidad aumenta a medida que aumenta la concentración de calcio añadida. Existió una

interacción estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre el tipo de sal y la concentración final de calcio adicionada a las leches. Esto se debe a que a 5 y 30  $\text{mmol kg}^{-1}$  de sal agregada, los valores de osmolalidad de las muestras con agregado de lactato de calcio son mayores que los de las muestras con agregado de cloruro de calcio. Estos resultados parecerían contrarios a los obtenidos en el análisis del contenido de calcio en suero. Se podría suponer que si los iones de calcio ingresan a las MC en mayor proporción cuando se agrega lactato de calcio a las leches, la osmolalidad debería disminuir más en estas muestras que en las que tienen añadido cloruro de calcio. Pero debe considerarse que el lactato de calcio ( $\text{CaL}_2$ ) presenta un equilibrio de disolución que consta de dos pasos (Kubantseva & Hartel, 2002; Vavrusova, Munk, & Skibsted, 2013; Vavrusova, & Skibsted, 2014):

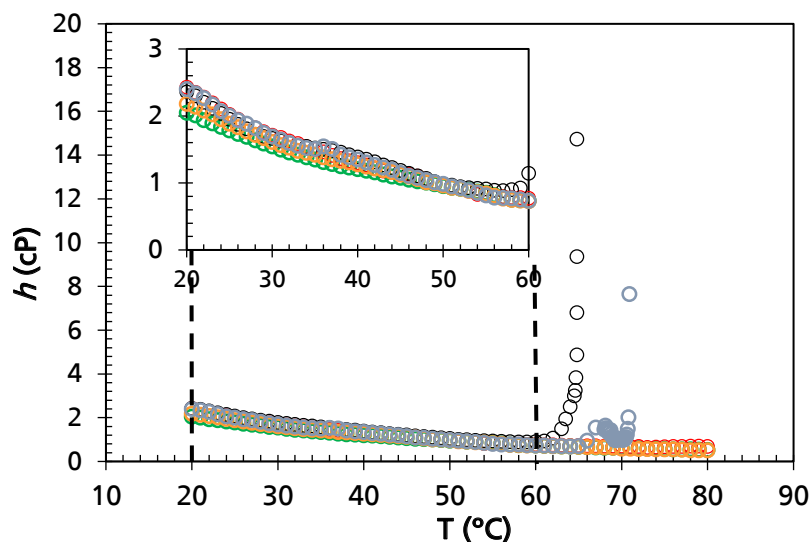


En solución, la segunda disociación no se encuentra desplazada completamente hacia los productos, se alcanza un equilibrio (Kubantseva, & Hartel, 2002) del cual pueden derivar reacciones secundarias del ion lactato como, por ejemplo, la formación de ácido láctico por asociación con iones de hidrógeno. La presencia de iones comunes y contra iones puede modificar el estado de equilibrio (2) y favorecer la formación de productos o reactivos. Además, debe tenerse en cuenta la distribución de aniones entre las fases micelar y continua que también afectan dicho equilibrio (2). Por lo tanto, es difícil estimar el número de especies osmóticamente activas en estas muestras.

### 3.5. Reometría

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos mediante barridos de temperatura para todas las muestras analizadas. En el rango de 20 a 60 °C, la viscosidad de las leches disminuye lentamente a medida que aumenta la temperatura. Varios cambios en los equilibrios de las especies presentes en la leche se modifican con la temperatura y podrían explicar los cambios de viscosidad en este rango. De 4 a 40 °C, la concentración de calcio en suero se reduce al aumentar la temperatura debido a la disminución de la solubilidad del fosfato de calcio (Koutina *et al.*, 2015b; Walstra *et al.*, 2006; Wang, & Ma, 2020). Si se compara la viscosidad de la leche sin agregados con la de las fortificadas con calcio a una misma temperatura puede observarse que el valor de viscosidad de éstas últimas aumenta a medida que aumenta la concentración de sales añadidas (Figura 2, inserto ampliado). Al parecer las muestras con 5  $\text{mmol kg}^{-1}$  de lactato de calcio agregado fueron las que menos vieron aumentada su viscosidad. Esta tendencia indicaría que la adición de calcio podría modificar la viscosidad de la estructura de la fase acuosa (suero) o la fase dispersa (MC), incluso a temperaturas relativamente bajas, generando cambios fisicoquímicos en las leches.





**Figura 2.** Barridos de temperatura de muestras de leches enriquecidas con diferentes sales de calcio. (○) Leche sin adición de sal. Leche con cloruro de calcio: (○) 5 mmol kg<sup>-1</sup>; (◐) 30 mmol kg<sup>-1</sup>. Leche con lactato de calcio: (◑) 5 mmol kg<sup>-1</sup>; (◒) 30 mmol kg<sup>-1</sup>.

Se podría utilizar una ecuación de tipo Arrhenius para representar la disminución de la viscosidad con la temperatura en el rango de 20 a 60 °C como sugieren Meza *et al.* (2019) (Ecuación 3),

$$\eta = A_0 \exp\left(\frac{E_A}{RT}\right). \quad (3)$$

donde  $A_0$  es el factor pre-exponencial,  $E_A$  la energía de activación,  $R$  la constante universal de gases y  $T$  la temperatura absoluta. El valor numérico de  $E_A$  es la barrera energética que debe superarse para que el proceso de flujo elemental pueda ocurrir (o flujo viscoso). Los valores de  $E_A$  para las diferentes condiciones estudiadas pueden observarse en el Cuadro 2. Estos se encuentran en el mismo orden de magnitud que los obtenidos para la leche desnatada reconstituida en un estudio previo para el rango de 25 a 60 °C (Meza *et al.*, 2019). El test de ANOVA indicó que el factor concentración de la sal tuvo un efecto significativo en este parámetro. Como puede apreciarse el valor de la  $E_A$  aumentó con el incremento de concentración de sal pero no se detectaron diferencias significativas entre las muestras con 5 y 30 mmol kg<sup>-1</sup> de calcio agregado. En tal sentido, se podría inferir que la adición de calcio afecta el cambio de viscosidad de la leche durante el calentamiento.

**Cuadro 2.** Valores medios de energía de activación y temperatura crítica para todas las muestras de leche fortificadas con calcio.

Tipo de sal	Concentración de sal (mmol kg <sup>-1</sup> )	E <sub>A</sub> (kcal mol <sup>-1</sup> )	T <sub>c</sub> (°C)
Lactato de calcio	0	4,48 ± 0,44	-
	5	5,00 ± 0,19	-
	30	5,46 ± 0,23	71,20 ± 0,54
Cloruro de calcio	0	4,48 ± 0,44	-
	5	5,28 ± 0,36	-
	30	5,12 ± 0,36	64,60 ± 0,07
Tipo de sal		NS	*
Concentración		*	
Interacción		NS	

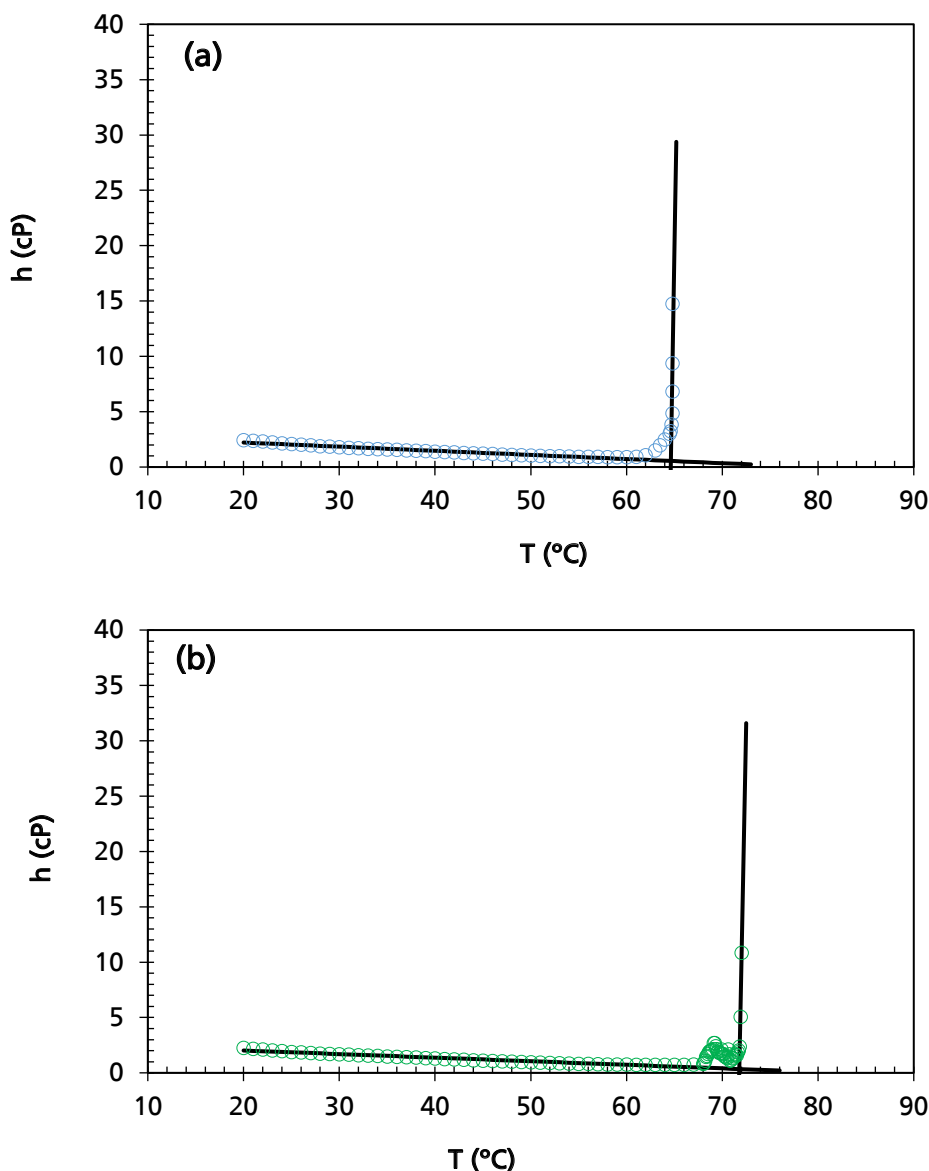
NS: efecto no significativo (P>0.05); \*: efecto significativo (P<0.05).

a-b: Valores medios en la misma columna con diferentes letras en el superíndice son significativamente diferentes (P<0,05).

Por encima de 60 °C, la viscosidad aumenta bruscamente en las muestras con 30 mmol kg<sup>-1</sup> de calcio agregado, pero a diferentes temperaturas dependiendo del tipo de sal utilizada (Figura 2). Las muestras con 5 mmol kg<sup>-1</sup> de calcio adicionado no mostraron divergencia de viscosidad en el rango de temperatura evaluado independientemente del tipo de sal utilizada.

En el caso de muestras con lactato de calcio, se puede observar una desestabilización en la viscosidad entre 65 y 70 °C hasta que finalmente se produce la divergencia. Esta característica se exhibió en todas las réplicas. Como se detalló anteriormente, el lactato de calcio en solución se somete a un proceso de equilibrio de dos pasos (Kubantseva, & Hartel, 2002; Vavrusova *et al.*, 2013). La presencia de otros iones en la leche y los cambios inducidos por la temperatura probablemente alteren ambos equilibrios, como sugieren Vavrusova *et al.*, (2013). A medida que aumenta la temperatura, las concentraciones de calcio en suero, fosfato inorgánico y citrato disminuyen, promoviendo la formación de estructuras de fosfato de calcio (Singh, 2004; Wang, & Ma, 2020). Estos cambios posiblemente afecten el equilibrio del lactato de calcio y su disociación durante el calentamiento de las leches, lo que provocaría esta inestabilidad en la viscosidad previa a la divergencia a 71,2 °C (Cuadro 2 y Figura 3).

La temperatura a la cual se observó la divergencia de la viscosidad en las muestras con 30 mmol kg<sup>-1</sup> de cloruro de calcio adicionado fue 64,6 °C (Cuadro 2 y Figura 3), este valor es significativamente menor que la temperatura de divergencia de las muestras con lactato de calcio a la misma concentración (Cuadro 2). Al calentar la leche por encima de 60 °C, pueden ocurrir otros cambios además de la alteración en el equilibrio mineral. La desnaturalización de las proteínas del suero tiene lugar a temperaturas por encima de 65 °C. Además, a pH 6,5, las proteínas desnaturalizadas del suero pueden formar agregados y adherirse a las MC a través de enlaces -S-S- (Koutina *et al.*, 2015b; Singh, 2004; Walstra *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Ejemplos del procedimiento utilizado para obtener la temperatura crítica  $T_c$  de muestras de leche con  $30 \text{ mmol kg}^{-1}$  de calcio agregado: (a) leche con cloruro de calcio, (b) leche con lactato de calcio.

El pH de la leche disminuye durante el calentamiento, cuanto menor es el pH inicial, menor es la temperatura a la que se produce la coagulación de la misma (Walstra *et al.*, 2006). Bajar el pH debilita las repulsiones electrostáticas y estéricas de las MC. Asimismo, la adición de sales aumenta la fuerza iónica del medio, este efecto contribuye al debilitamiento de las interacciones. El exceso de iones de calcio aumenta la probabilidad de formar puentes  $-\text{Ca}-$  entre grupos cargados negativamente de las capas superficiales de dos micelas de caseína. Además, a altas temperaturas podrían formarse enlaces covalentes entre los residuos de aminoácidos, fortaleciendo la unión entre éstas (Considine, Flanagan, & Loveday, 2014; Walstra *et al.*, 2006).

Como se detalló anteriormente, la disminución en el pH fue más pronunciada para las muestras con cloruro de calcio agregado que en el caso de muestras con lactato de calcio agregado a concentraciones similares. Adicionalmente, los contenidos de calcio y fósforo revelaron que el calcio añadido en forma de lactato de calcio podría ingresar en las micelas en mayor proporción. En

consecuencia, la cantidad de iones de calcio y fosfato fuera de las MC sería mayor en las muestras a las que se le agregó esta última sal. El efecto combinado de la adición de calcio (que aumentaría la fuerza iónica del medio) y la reducción del pH afectan el proceso de coagulación y la temperatura a la que inicia. Es relevante señalar que este estudio muestra cómo un parámetro macroscópico que puede ser fácilmente determinado, como la viscosidad, permite detectar diferencias a nivel microestructural de leches fortificadas con diferentes sales, aportando información para el análisis de la estabilidad coloidal.

#### 4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se pudieron caracterizar desde el punto de vista fisicoquímico y reométrico leches fortificadas con cloruro y lactato de calcio. Los resultados obtenidos permitieron relacionar los cambios fisicoquímicos que modifican la estructura micelar y la estabilidad térmica de la leche. Las técnicas aplicadas indicarían que parte del calcio añadido migraría al interior de las MC formando CCP y que el calcio añadido como lactato de calcio ingresa en mayor proporción a las micelas que el añadido como cloruro de calcio. Una fracción de las proteínas del suero también podría integrarse a la estructura micelar.

De la información obtenida se concluye que sería factible la adición de hasta 5 mmol kg<sup>-1</sup> de cloruro y lactato de calcio, debido a que el balance mineral y la estabilidad térmica no se vieron afectados significativamente a este nivel de concentración. Sin embargo, el lactato de calcio sería el candidato más apropiado para utilizar en formulaciones con concentraciones de calcio más elevadas (por ejemplo, concentraciones intermedias en el rango de 5-30 mmol kg<sup>-1</sup>).

Finalmente, como los resultados obtenidos de las técnicas fisicoquímicas normalmente utilizadas coinciden con los obtenidos por reometría, se ha podido demostrar que esta técnica sencilla y rápida, permite inferir sobre los cambios en el equilibrio mineral y los efectos sobre la estabilidad térmica cuando se utilizan diferentes sales para la fortificación de la leche.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo financiero de la Universidad Nacional del Litoral.

(proyecto CAI + D: 504 201501 00051 LI) (Santa Fe, Argentina), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (proyecto CONICET: 11220150100606) (Argentina), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (proyecto ANPCyT PICT 2016-249) (Argentina) e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (proyecto 2019-PD-E7-I152-001).

**NOTA:** Este trabajo fue previamente publicado: Acosta, N.B.; Sihufe, G.A.; Marino, F.; Costabel, L.M.; Zorrilla, S.E.; Olivares, M.L. (2020). Milk fortified with calcium: Changes in the physicochemical and rheological characteristics that affect the stability. *LWT-Food Science and Technology* 134, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110204>

#### 6. BIBLIOGRAFÍA

- ANEMA, S. G. 2009. Stability of milk-derived calcium phosphate suspensions. *Dairy Science & Technology*, 89, 269–282. <https://doi.org/10.1051/dst/2009005>
- BACHMANN, L., SCHMIDT, B., RAUWOLF, U., WENGE, J., & COENEN, M. 2012. Change of plasma volume, osmolality, and acid–base status in healthy calves after feeding of milk and water- and milk-based oral rehydration solution. *Journal of Dairy Science*, 95, 6006–6014. <https://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5562>
- BIJL, E., VAN VALENBERG, H. J. F., HUPPERTZ, T., & VAN HOOIJDONK, A. C. M. 2013. Protein, casein, and micellar salts in milk: Current content and historical perspectives. *Journal of Dairy Science*, 96, 5455–5464. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6497>

- CONSIDINE, T., FLANAGAN, J., & LOVEDAY, S. M. 2014. Interactions between milk proteins and micronutrients. In: H. Singh, M. Boland & A. Thompson (Eds.), *Milk proteins from expression to food* (pp. 421–449), 2nd ed. New York: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405171-3.00014-3>
- DALGLEISH, D. G., & CORREDIG, M. 2012. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 449–467. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>
- DEETH, H. C., & LEWIS, M. J. 2014. Practical consequences of calcium addition to and removal from milk and milk products. *International Journal of Dairy Technology*, 67, 2–11. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12188>
- DE LA FUENTE, M. A. 1998. Changes in the mineral balance of milk submitted to technological treatments. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 281–288. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00052-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00052-1)
- FAMELART, M. H., LE GRAET, Y., & RAULOT, K. 1999. Casein micelle dispersions into water, NaCl and CaCl<sub>2</sub>: physicochemical characteristics of micelles and rennet coagulation. *International Dairy Journal*, 9, 293–297. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00077-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00077-1)
- GAUCHER, I., PIOT, M., BEAUCHER, E., & GAUCHERON, F. 2007. Physico-chemical characterization of phosphate-added skim milk. *International Dairy Journal*, 17, 1375–1383. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.05.002>
- GAUCHERON, F. 2005. The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, 45, 473–483. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005030>
- IDF. 2006. Milk. Determination of total phosphorus content. Method using molecular absorption spectrometry. IDF Standard 42, Brussels, Belgium.
- KOUTINA, G., KNUDSEN, J. C., & SKIBSTED, L. H. 2015a. 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 & Technology*, 95, 63–74. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0196-z>
- KOUTINA, G., CHRISTENSEN, M., BAKMAN, M., ANDERSEN, U., & SKIBSTED, L. H. 2015b. Calcium induced skim-milk gelation during heating as affected by pH. *Dairy Science & Technology*, 96, 79–93. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0240-7>
- KRUGER, N. J. 2002. The Bradford method for protein quantitation. In: J. M. Walker (Ed.), *The protein protocols handbook* (pp. 15–21), 2nd ed. New Jersey: Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:15>
- KUBANTSEVA, N., & HARTEL, R. W. 2002. Solubility of calcium lactate in aqueous solution. *Food Reviews International*, 18(2-3), 135–149. <https://doi.org/10.1081/FRI-120014355>
- LEWIS, M. J. 2010. The measurement and significance of ionic calcium in milk – A review. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00639.x>
- 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.052>
- MEZA, B. E., ZORRILLA, S. E., & OLIVARES, M. L. 2019. Rheological methods to analyse the thermal aggregation of calcium enriched milks. *International Dairy Journal*, 97, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.05.001>
- NOGUEIRA SILVA, N., BAHRI, A., GUYOMARC'H, F., BEAUCHER, E., & GAUCHERON, F. 2015. AFM study of casein micelles cross-linked by genipin: effects of acid pH and citrate. *Dairy Science & Technology*, 95, 75–86. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0199-9>
- NOVO, M., REIJA, B., & AL-SOUFI, W. 2007. Freezing point of milk: a natural way to understand colligative properties. *Journal of Chemical Education*, 84, 1673–1675. <https://doi.org/10.1021/ed084p1673>

- OMOARUKHE, E. D., ON-NOM, N., GRANDISON, A. S., & LEWIS, M. J. 2010. Effects of different calcium salts on properties of milk related to heat stability. *International Journal of Dairy Technology*, 63(4), 504–511. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00613.x>
- ON-NOM, N., GRANDISON, A. S., & LEWIS, M. J. 2012. Heat stability of milk supplemented with calcium chloride. *Journal of Dairy Science*, 95, 1623–1631. <https://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4697>
- PHILIPPE, M., GAUCHERON, F., LE GRAET, Y., MICHEL, F., & GAREM, A. 2003. Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. *Lait*, 83, 45–59. <http://doi.org/10.1051/lait:2002049>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.001>
- RAMASUBRAMANIAN, L., D'ARCY, B., & DEETH, H. C. 2012. Heat-induced coagulation of whole milk by high levels of calcium chloride. *International Journal of Dairy Technology*, 65, 183–190. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00823.x>
- RAMASUBRAMANIAN, L., WEBB, R., D'ARCY, B., & DEETH, H. C. 2013. Characteristics of a calcium–milk coagulum. *Journal of Food Engineering*, 114, 147–152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.015>
- SIEVANEN, K., HUPPERTZ, T., KELLY, A. L., & FOX, P. F. 2008. Influence of added calcium chloride on the heat stability of unconcentrated and concentrated bovine milk. *International Journal of Dairy Technology*, 61(2), 151–155. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2008.00391.x>
- SINGH, G., ARORA, S., SHARMA, G. S., SHINDHU, J. S., KANSAL, V. K., & SANGWAN, R. B. 2007. Heat stability and calcium bioavailability of calcium-fortified milk. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 625–631. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.03.009>
- SINGH, H. 2004. Heat stability of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 111–119. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00143.x>
- SINGH, H., & FOX, P. F. 1987. Heat stability of milk: role of  $\beta$ -lactoglobulin in the pH dependent dissociation of micellar  $\kappa$ -casein. *Journal of Dairy Research*, 54, 509–521. <https://doi.org/10.1017/S0022029900025711>
- UDABAGE, P., MCKINNON, I. R., & AUGUSTIN, M-A. 2000. Mineral and casein equilibria in milk: effects of added salts and calcium-chelating agents. *Journal of Dairy Research*, 67, 361-370. <https://doi.org/10.1017/S0022029900004271>
- 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.
- VAVRUSOVA, M., MUNK, M. B., & SKIBSTED, L. H. 2013. Aqueous solubility of calcium L-lactate, calcium D-gluconate, and calcium D-lactobionate: importance of complex formation for solubility increase by hydroxycarboxylate mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8207–8214. <http://doi.org/10.1021/jf402124n>
- VAVRUSOVA, M., & SKIBSTED, L. H. 2014. Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 1198-1204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.034>
- WALKER, J. M. 2002. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: J. M. Walker (Ed.), *The protein protocols handbook* (pp. 61-67), 2nd ed. New Jersey: Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:61>
- WALSTRA, P., WOUTERS, J. T. M., & GEURTS, T. J. 2006. *Dairy science and technology* (2nd ed.). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- WANG, Q., & MA, Y. 2020. Effect of temperature and pH on salts equilibria and calcium phosphate in bovine milk. *International Dairy Journal* 110, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104713>

- WILLIAMS, R. P. W., D'ATH, L., & AUGUSTIN, M. A. 2005. Production of calcium-fortified milk powders using soluble calcium salts. *Lait*, *85*, 369–381. <http://doi.org/10.1051/lait:2005011>
- YE, R., & HARTE, F. 2013. Casein maps: effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl<sub>2</sub> on the particle size of reconstituted casein micelles. *Journal of Dairy Science*, *96*, 799–805. <http://doi.org/10.3168/jds.2012-5838>
- ZURAW, J., SMIETANA, Z., SZPENDOWSKI, J., & CHOJNOWSKI, W. 1986. Influence de l'addition de sels de calcium et du chauffage sur les diverses formes de calcium dans le lait. *Le Lait*, *66*, 421–429. <https://doi.org/10.1051/lait:1986427>