

Obtención de una bebida integral de soja fortificada con calcio a partir de harina desgrasada

Andrés L. Márquez^{1,2}; Georgina N. Salvatore¹; Romina G. Otero¹;
Jorge R. Wagner^{1,2} y Gonzalo G. Palazolo^{1,2}

¹Departamento de Ciencia y Tecnología - Universidad Nacional de Quilmes. Bernal, Buenos Aires, Argentina.

²CONICET. Argentina

almarquez@conicet.gov.ar



Resumen

El objetivo del presente trabajo fue obtener una bebida integral de soja (BIS) fortificada con calcio, a partir de una harina desgrasada de soja (HDS) y aceite de girasol como fase lipídica dispersa. Para la fortificación se emplearon dos sales diferentes (cloruro o lactato) utilizando una estrategia diferente a las convencionales, dado que se pretendió favorecer y no minimizar la interacción del ion divalente con las proteínas y fibra de la soja. Se prepararon dispersiones de HSD en agua en ausencia (control) y presencia de Ca^{2+} (120 mg/100 g) con posterior cocción. Los agregados formados se homogeneizaron y micronizaron por tratamientos sucesivos a alta velocidad y de alta presión. Se formularon BIS sin y con adición de sacarosa (5 y 10% P/P), some-

tiéndolas luego a una pasteurización. Se analizó la distribución de tamaño de partícula (DTP) y el comportamiento de flujo, evaluando la estabilidad frente al almacenamiento refrigerado (1, 9 y 16 días). Las BIS exhibieron un comportamiento pseudoplástico y tixotrópico. Las DTP indicaron que la adición de Ca^{2+} produjo la insolubilización de proteínas favorecida por la presencia del catión, otorgando a las BIS una mayor viscosidad inicial por un incremento en la interacción entre partículas. La refrigeración no produjo cambios apreciables en la apariencia visual de ninguna muestra. Durante el tratamiento se produjeron leves cambios microestructurales que sugirieron agregación de proteína tanto insoluble como inicialmente soluble, observándose también aumentos moderados en la viscosidad aparente de los sistemas. Por su parte, la presencia de sacarosa desaceleró los fenómenos de agregación proteica. Los resultados muestran que el método empleado permite la obtención de una bebida de soja fortificada con calcio, con la fibra incorporada, y estable en condiciones de refrigeración.

Palabras clave: bebida integral de soja, calcio, estabilidad, homogeneización, refrigeración.

Introducción

El extracto acuoso que se obtiene por remojo del poroto de la soja, seguido por un proceso de molienda húmeda, filtrado y cocción, es la forma más simple de alimento derivado de la soja. Este alimento líquido es conocido en muchos países con el nombre de "leche de soja", pero en la Argentina dicha denominación no está permitida. Esta bebida contiene más proteína y menos calorías que la leche vacuna. Además, posee un buen balance de ácidos grasos esenciales, lecitina y está libre de colesterol y lactosa. La composición típica (P/P) de este alimento es la siguiente: agua, 90,8%; proteínas, 3,6%; lípidos, 2,0%; carbohidratos, 2,9%; y cenizas, 0,5% (Chen, 2006).

La preparación tradicional de la bebida de soja requiere un mínimo de cinco etapas básicas (Chen,

2006): limpieza de la soja, remojo, molienda, filtrado del residuo de soja (okara) y cocimiento del extracto líquido. El okara que comúnmente se elimina en dicho proceso, según estudios previos, contiene 55% (en base seca) de fibra dietaria (Redondo-Cuenca *et al.*, 2008) y 27% (en base seca) de proteínas de alta calidad nutritiva (Ma *et al.*, 1997). Por lo tanto, la obtención de una bebida integral de soja (BIS), conteniendo una alta fracción de los componentes del okara, permitiría el aprovechamiento de fibra y nutrientes usualmente eliminados. Para tal fin, el presente trabajo propone el empleo de una harina desgrasada de soja (HDS), cuya dispersión en agua y posterior homogeneización y micronización (con aceite de girasol adicionado) puede permitir la obtención de una BIS con alto contenido de fibra.

Paralelamente, existe el objetivo de fortificar la BIS con calcio al nivel de la leche vacuna (120 mg Ca^{2+} /100 mL), ya que el contenido del ion divalente en estas bebidas es mucho menor (20-30 mg Ca^{2+} /100 mL) (Chaiwanon *et al.*, 2000). Dado que tal fortificación está limitada por la interacción del calcio con proteínas, fosfolípidos y fibra de la soja, desestabilizando al sistema (Appu Rao y Narasinga Rao, 1975; Whittinghill *et al.*, 2000; Pathomrungsyounggul *et al.*, 2007), se han desarrollado métodos que en general apuntan a minimizar este fenómeno, por ejemplo mediante el uso de agentes quelantes del catión (Yazici *et al.*, 1997; Pathomrungsyounggul *et al.*, 2010).

El presente trabajo propone una estrategia diferente, favoreciendo y no minimizando la interacción del calcio con los componentes de la soja, para luego homogeneizar y micronizar el sistema desestabilizado a fin de lograr la redispersión de los agregados formados. De esta manera, se pretende obtener una BIS fortificada con calcio, para luego estudiar su estabilidad durante el almacenamiento refrigerado.

Materiales y métodos

Materiales

Pellet desgrasado de soja en forma de escamas, desolventizado sin inactivación de factores antitripticos (provisito por Bunge Argentina S.A.; Puerto San Martín, Argentina); agua destilada; aceite de girasol refinado (Molino Cañuelas SACIFIA; Cañuelas, Argentina); cloruro de calcio anhidro (Anedra; San Fernando, Argentina); y lactato de calcio (Parafarm, Buenos Aires, Argentina). La HSD fue obtenida a partir del pellet desgrasado por molienda (Molino Chincan modelo FW100; China), aplicándose dos tamizados posteriores: primero utilizando un tamiz con tamaño de poro de 500 μm y luego empleando otro con tamaño de poro de 125 μm ; la cantidad de HSD obtenida fue de 92% P/P respecto de la masa inicial del pellet. La composición de la HSD (g/100 g) fue la siguiente: proteínas (Micro-Kjeldahl con colorimetría final; $\text{N} \times 6,25$), $43,6 \pm 0,9$; humedad (seca-



Gral. Fructoso Rivera 2964 - CABA (1437) Buenos Aires - Argentina
Tel./Fax: 4918-9055 - admvtas@fjusto.com.ar - www.fabricajusto.com.ar

FABRICA JUSTO
colorante caramelo

MAS DE 60 AÑOS
DE EXPERIENCIA

Elaboración de Colorante Caramelo Natural
Un moderno laboratorio
con alto nivel de equipamiento
Asesoramiento Técnico Especializado
Un producto para cada necesidad específica
Certificaciones BMP.HACCP y FSSC 22000



do en estufa a presión normal y $103 \pm 2^\circ\text{C}$, hasta peso constante), $8,36 \pm 0,08$; cenizas (calcificación a $550 \pm 5^\circ\text{C}$), $6,45 \pm 0,03$; lípidos totales (según lo declarado por el proveedor), $0,75$; y carbohidratos totales, incluyendo fibra dietaria (determinado por diferencia respecto a los demás componentes), $40,84$.

Preparación de bebida integral de soja (BIS)

Para preparar las BIS, la HSD fue dispersada en agua destilada a una concentración de 7,5% P/P de sólidos totales utilizando un agitador magnético durante tres horas. Tres dispersiones diferentes fueron preparadas: sin calcio añadido; con cloruro de calcio; y con lactato de calcio. En los últimos dos casos se adicionó la cantidad de sal necesaria para obtener una dispersión con 120 mg de $\text{Ca}^{2+}/100\text{ g}$ (sin contar la cantidad de calcio presente originalmente en la harina). La dispersión acuosa se trató térmicamente en baño en ebullición durante 40 minutos con el fin de inactivar los factores antinutricionales y la lipoxigenasa presentes en la harina. El calentamiento produjo la coagulación de las dispersiones, siendo este efecto más importante en presencia de calcio añadido por favorecer la agregación proteica. Posteriormente se agregó aceite de girasol de manera de obtener una BIS con 2,5% P/P de lípidos y se prehomogeneizó la mezcla con un dispositivo rotor-estator Ultraturax T-25 (IKA-Labortechnik; Staufen, Alemania) usando un rotor S25-20NK-18G (IKALabortechnik; Staufen, Alemania) a 24000 rpm durante un minuto. La emulsión obtenida fue pasada tres veces a través de un homogeneizador a válvula de alta presión (Panda 2K, GEA Niro Soavi; Parma, Italia) a 1200 bar. En cada BIS obtenida se agregó sacarosa al 5 y 10% P/P, quedando una tercera muestra sin azúcar añadida. Finalmente la BIS fue sometida a una pasteurización utilizando un baño en ebullición hasta llegar a los 75°C , manteniendo la muestra por sobre dicha temperatura durante un minuto y luego enfriando inmediatamente en agua con hielo. Las BIS obtenidas fueron almacenadas en heladera a 7°C durante 1, 9 y 16 días.

Distribución de tamaño de partícula

Para la obtención de las distribuciones de tamaño de partícula (DTP) se utilizó un analizador de tamaño de partículas Malvern Mastersizer 2000E (Malvern Instrument; Worcestershire, Reino Unido) por el principio de dispersión estática de luz. Las muestras fueron levemente agitadas para su homogeneización antes de la medición y diluidas en agua en la unidad de dispersión húmeda (Hydro 2000 MU, Malvern Instruments Ltd.; Worcestershire, Reino Unido) a una velocidad de agitación de 2000 rpm. Los valores de diámetro de partícula promedio $D_{4,3}$ se obtuvieron a partir de las DTP expresadas como volumen (%).

Reología

El comportamiento de flujo de las BIS fue estudiado con un reómetro AR-G2 (TA Instruments; New Castle, EE.UU.) con una geometría cono-plato. La temperatura (21°C) se controló con un baño de agua (Julabo ACW100, Julabo Labortechnik; Seelbach, Alemania) asociado al reómetro. El comportamiento de flujo fue analizado aumentando linealmente la velocidad de corte de $0,1$ a 100s^{-1} durante 310 s, luego manteniéndola constante a 100s^{-1} durante 60 s, y finalmente disminuyéndola linealmente de 100 a $0,1\text{s}^{-1}$ durante 310 s. A partir de los datos obtenidos, se utilizó como valor comparativo de viscosidad aparente a la registrada luego de 310 s desde el inicio del experimento, es decir al finalizar la primera etapa a una velocidad de corte de 100s^{-1} .

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado por análisis de varianza y la prueba de mínima diferencia significativa ($p \leq 0,05$) utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphic Corporation, EE.UU.).

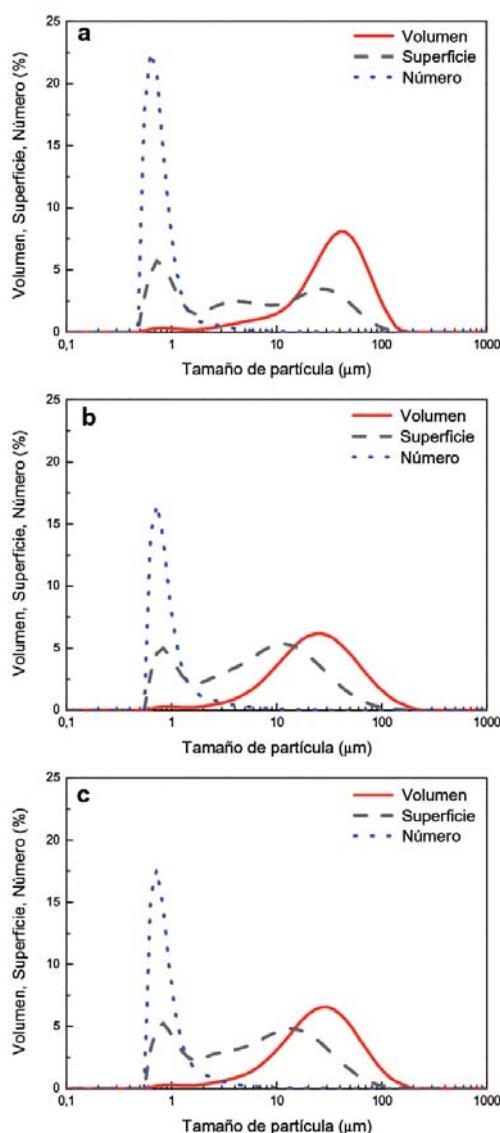
Resultados y discusión

En la figura 1 se observan las DTP de las BIS iniciales sin adición de sacarosa, con y sin sales de calcio agregadas, expresadas en volumen (%), superficie (%) y número (%). En estas muestras las partículas capaces de dispersar la luz son una conjunción de gotas de aceite, fibra y proteína insolubles. En todos los casos, las DTP en número fueron monomodales y asimétricas, exhibiendo partículas en el rango de $0,6$ y 10 Tm , y una moda cercana a $0,8\text{ Tm}$; la población mayoritaria observada en esta distribución correspondería a gotas de aceite y agregados proteicos submicrónicos.

Por su parte, en las BIS sin calcio añadido, las DTP en volumen y superficie fueron multimodales, exhibiendo tres poblaciones en un amplio rango de tamaños (Figura 1a). En este caso, la población más importante y de mayor tamaño de partícula observada en la DTP en volumen tuvo una moda aproximada de 40 mm , que correspondería principalmente a fibra insoluble, dado que por su rigidez el homogeneizador a válvula no es capaz de micronizarla de la misma manera que a las gotas de aceite y partículas proteicas. La población de tamaños de partícula intermedios, más claramente observada en la DTP en superficie, estaría vinculada principalmente a la presencia de agregados proteicos de mayor tamaño y flóculos de gotas de aceite.

En relación al efecto del agregado de sales de calcio sobre las DTP en superficie, se observó que la distribución multimodal de la BIS sin el catión añadido (Figura 1a) paso a ser bimodal en las muestras con cloruro y lactato de calcio (Figura 1b-c). En estas DTP la adición de calcio produjo una moda de valor intermedio ($10\text{-}20\text{ mm}$) entre las modas de las dos poblaciones de mayor tamaño de partí-

Figura 1 - Distribuciones de tamaño de partícula expresadas en volumen, superficie y número de las BIS sin adición de sacarosa, inmediatamente luego de su preparación: a) sin calcio añadido; b) con cloruro de calcio; c) con lactato de calcio



cula observadas en la emulsión sin agregado de la sal (4 y 30 mm). De esta manera, la modalidad de las DTP cambió al observarse una única moda donde antes había dos, y manteniéndose a la vez la correspondiente a la población de menor tamaño de partícula. El Ca^{2+} libre, al unirse a las proteínas de soja, favorece la formación de agregados proteicos insolubles por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Appu Rao y Narasinga Rao, 1975; Molina y Wagner, 1999; Pathomrungsinyounggul *et al.*, 2010). De esta manera, se produce precipitación de proteína soluble, dando lugar a nuevas partículas capaces de dispersar luz que serían más pequeñas que las partículas de fibra insoluble. Los menores valores de $D_{4,3}$ iniciales en presencia de sales de calcio (Tabla 1) confirmarían este resultado.

Por otro lado, para las tres BIS estudiadas se observó que la adición de sacarosa a dos niveles diferentes (5 y 10% P/P) no influyó significativamente sobre el tamaño promedio de partículas, observándose valores similares de $D_{4,3}$ iniciales (datos no mostrados).

Las curvas de flujo de las BIS en condiciones iniciales, con y sin agregado de sacarosa y sales de calcio, se muestran en la Figura 2. En todos los casos se observó un comportamiento pseudoplástico, de acuerdo a la forma en que el esfuerzo de corte aumenta con la velocidad de corte en la primera etapa del experimento.

También se observó un comportamiento tixotrópico en todas las muestras, reflejado por la disminución del esfuerzo de corte en la etapa de velocidad de corte constante; y en la última etapa, donde se disminuyó la velocidad de corte, los valores de esfuerzo de corte fueron menores que los de la primera etapa. Estos resultados indican una disminución de la viscosidad aparente con el aumento de la velocidad de corte y cuando está es constante, que puede ser atribuida a la disrupción de estructuras y agregados dados por la interacción entre las partículas presentes en las BIS (proteínas, gotas de aceite, fibra) en las condiciones de flujo aplicadas.

La adición de las sales de calcio produjo sistemas con mayores valores de esfuerzo de corte, lo cual se manifestó en mayores valores de viscosidad aparente inicial (Tabla 2). Dado que, como se mencionó antes, la presencia del catión llevaría a la insolubilización de proteína por formación de agregados, las muestras con calcio añadido dispondrían de mayor cantidad de partículas que interac-

Tabla 1. Efecto de la sal de calcio añadida y del tiempo de almacenamiento refrigerado sobre el diámetros promedio de partícula $D_{4,3}$ (μm) de las BIS sin adición de sacarosa

| Sal añadida | Tiempo de almacenamiento | | | |
|-------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | Inicial | 1 día | 9 días | 16 días |
| Sin calcio | $37,66 \pm 0,30^{\text{bc}}$ | $48,21 \pm 1,10^{\text{a}}$ | $41,29 \pm 1,39^{\text{b}}$ | $47,56 \pm 0,42^{\text{a}}$ |
| Cloruro de calcio | $28,77 \pm 1,55^{\text{a}}$ | $27,27 \pm 0,30^{\text{ab}}$ | $25,30 \pm 0,68^{\text{bc}}$ | $24,25 \pm 0,50^{\text{c}}$ |
| Lactato de calcio | $30,00 \pm 0,33^{\text{a}}$ | $26,18 \pm 0,41^{\text{c}}$ | $28,20 \pm 0,34^{\text{b}}$ | $27,75 \pm 0,91^{\text{b}}$ |

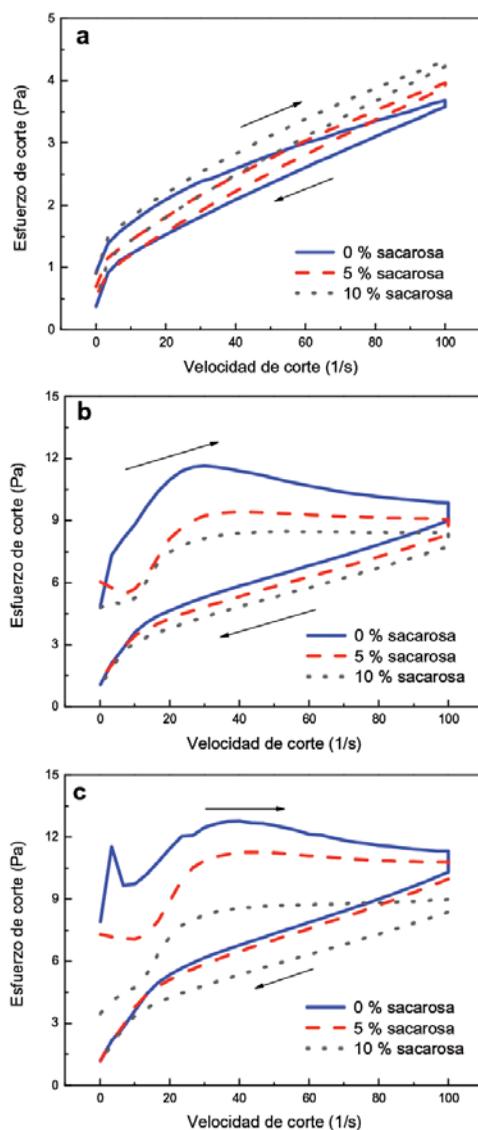
Los valores son medias de dos medidas \pm desviación estándar. Medias con símbolos diferentes indican que hay diferencias significativas entre muestras iniciales con diferente sal añadida ($p \leq 0,05$). Medias con letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre mismas muestras con diferente tiempo de almacenamiento ($p \leq 0,05$).

Tabla 2. Efecto de la sal de calcio añadida y del tiempo de almacenamiento refrigerado sobre la viscosidad aparente ($\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot 10^2$) de las BIS sin adición de sacarosa

| Sal añadida | Tiempo de almacenamiento | | | |
|-------------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Inicial | 1 día | 9 días | 16 días |
| Sin calcio | $3,68 \pm 0,00^{\blacksquare c}$ | $4,22 \pm 0,23^b$ | $4,80 \pm 0,10^a$ | $4,76 \pm 0,12^a$ |
| Cloruro de calcio | $9,60 \pm 0,36^{\bullet b}$ | $10,12 \pm 0,01^b$ | $11,81 \pm 0,18^a$ | $11,43 \pm 0,11^a$ |
| Lactato de calcio | $11,54 \pm 0,32^{\blacktriangle a}$ | $12,63 \pm 0,88^a$ | $11,80 \pm 0,83^a$ | $12,45 \pm 0,14^a$ |

Los valores son medias de dos medidas \pm desviación estándar. Medias con símbolos diferentes indican que hay diferencias significativas entre muestras iniciales con diferente sal añadida ($p \leq 0,05$). Medias con letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre mismas muestras con diferente tiempo de almacenamiento ($p \leq 0,05$).

Figura 2 - Comportamiento de flujo de las BIS, inmediatamente luego de su preparación: a) sin calcio añadido; b) con cloruro de calcio; c) con lactato de calcio



cionan entre sí, repercutiendo en el comportamiento de flujo del sistema (Pathomrunsiyounggul *et al.*, 2010). La formación de flóculos de gotas de aceite inducida por la presencia de calcio también podría ser responsable del aumento de viscosidad. La viscosidad aparente de las BIS en presencia de lactato de calcio fue levemente superior que con cloruro de calcio (Tabla 2); dado que la cantidad de Ca^{2+} agregada fue la misma, este resultado podría atribuirse a la mayor masa de soluto aportada por la sal orgánica, de mayor peso molecular.

Con respecto al efecto del almacenamiento refrigerado, todas las BIS mantuvieron la misma apariencia visual que la observada en condiciones iniciales, lo cual refleja una buena estabilidad física durante el período de tiempo estudiado, no observándose separación de fases o una apariencia heterogénea en ningún caso. Sin embargo, se detectaron cambios significativos, aunque moderados, en los valores de D_{4,3} de todas las muestras (Tabla 1).

En las BIS sin calcio añadido, se observó un aumento en el D_{4,3} luego de un día, lo cual podría ser atribuido principalmente a la agregación proteica por efecto del almacenamiento a baja temperatura. No obstante, tras nueve días de refrigeración, el D_{4,3} de estas muestras disminuyó con respecto a la etapa anterior. Este resultado estaría indicando la insolubilización de proteína que también tiene lugar debido al frío, dando origen a nuevas partículas que serían de menor tamaño que la fibra insoluble, y por tal motivo disminuirían los valores de los diámetros promedio. Luego de 16 días el D_{4,3} volvió a aumentar, indicando que en la última etapa predominó la agregación de proteína ya insolubilizada.

En las BIS con calcio añadido, a diferencia de lo observado sin adición del catión, durante el almacenamiento refrigerado habría un predominio importante de la insolubilización de proteína previamente soluble por sobre la agregación de proteína ya insolubilizada. Esto se vio reflejado en la disminución de los D_{4,3}, que fueron menores a los valores iniciales durante todo el período de almacenamiento (Tabla 1). Este resultado puede ser explicado por la interacción de Ca^{2+} libre con las proteínas, induciendo su precipitación durante el almacenamiento refrigerado.

Los fenómenos de agregación proteica fueron más atenuados en las BIS con adición de sacarosa (datos

no mostrados), probablemente debido a una mayor viscosidad de la fase acuosa continua en presencia del disacárido, lo cual disminuiría la movilidad de las proteínas y por ende su agregación.

En cuanto al efecto de la refrigeración sobre la reología de las BIS, en general la viscosidad aparente tuvo tendencia a crecer con el tiempo de almacenamiento (Tabla 2). Este aumento moderado de viscosidad sería resultado del aumento en la cantidad de partículas totales y su mayor interacción, oponiendo una mayor resistencia al flujo, producto de la agregación de proteína tanto insoluble como soluble previamente mencionada.

Conclusiones

Los resultados del presente trabajo muestran que es posible preparar una BIS incluyendo la fibra insoluble y fortificada con calcio al nivel de la leche vacuna, mediante procesos de homogeneización y micronización luego de favorecer la interacción del catión con los componentes de la soja. Se logró obtener sistemas fluidos y homogéneos, si bien en presencia de calcio añadido la viscosidad de los mismos fue mayor. Las BIS obtenidas presentaron buena estabilidad frente al almacenamiento refrigerado durante un tiempo convencional, detectándose leves cambios microestructurales y reológicos que no afectaron apreciablemente la apariencia visual de las bebidas.

Agradecimientos

Los autores agradecen el aporte financiero de la Universidad Nacional de Quilmes (Programa I+D PUNQ 53/1007) y CONICET.

Bibliografía

- Appu Rao, A. G. y Narasinga Rao, M. S. (1975). Binding of Ca (II) by the 11S fraction of soybean proteins. *Cereal Chemistry*, 52:21-33.
- Chaiwanon, P.; Puwastien, P.; Nitithamyong, A. y Sirichakwal, P. P. (2000). Calcium fortification in soybean milk and in vitro bioavailability. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13:319-327.
- Chen, S. (2006). Génesis sobre la preparación de la leche de soja. *Aceites y Grasas*, 16:238-251.
- Ma, C.-Y.; Liu, W.-S.; Kwok, K. C. y Kwok, F. (1997). Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). *Food Research International*, 29:799-805.
- Molina, M. I. y Wagner, J. R. (1999). The effects of divalent cations in the presence of phosphate, citrate and chloride on the aggregation of soy protein isolate. *Food Research International*, 32:135-143.
- Redondo-Cuenca, A.; Villanueva-Suarez, M. J. y Mateos-Aparicio, I. (2008). Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods. *Food Chemistry*, 108:1099-1105.
- Pathomrungsriyounggul, P.; Grandison, A. S. y Lewis, M. J. (2007). Effects of calcium chloride and sodium hexametaphosphate on certain chemical and physical properties of soymilk. *Journal of Food Science*, 72:428-434.
- Pathomrungsriyounggul, P.; Lewis, M. J. y Grandison, A. S. (2010). Effects of calcium-chelating agents and pasteurisation on certain properties of calcium-fortified soy milk. *Food Chemistry*, 118:808-814.
- Whittinghill, J. M.; Norton, J. y Proctor, A. (2000). Stability determination of soy lecithin-based emulsions by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77:37-42.
- Yazici, F.; Alvarez, V. B.; Mangino, M. E. y Hansen, P. M. T. (1997). Formulation and processing of a heat stable calcium-fortified soy milk. *Journal of Food Science*, 62:535- 538.

We measure it. **testo**



Termómetro Dual

Testo 104-IR: medición por inmersión con sonda plegable y medición sin contacto por infrarrojos

- Robusto y a prueba de agua (IP 65)
- Funciones Max / Min / Hold
- Compacto y seguro gracias a su sonda plegable

Av. Directorio 4901 (C1440ASB) - Buenos Aires
Tel.: (011) 4683-5050 - Fax: (011) 4683-2020
info@testo.com.ar - www.testo.com.ar