



La composición de las sales en la leche:

efecto del procesamiento e implicaciones de la fortificación en productos lácteos

Mariana Aguilar-Morales* y María Teresa Jiménez-Munguía

*Programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos

Correos electrónicos: mariana.aguilarms@udlap.mx • mariat.jimenez@udlap.mx

Aguilar Morales, M. y Jiménez Munguía, M. T. (2024). La composición de las sales en la leche: efecto del procesamiento e implicaciones de la fortificación en productos lácteos. *TSIA*, 18.

RESUMEN

Las sales en la leche representan del 6 al 7 % (p/p) de los sólidos totales. A pesar de ser una fracción relativamente pequeña, juegan un rol crítico en la determinación de la estabilidad del sistema, principalmente por su influencia en la estructura y funcionalidad de las proteínas lácteas. El presente documento tiene como objetivo recopilar los avances recientes en el estudio de la partición de sales en las fases de la leche. Además, describe la influencia que las operaciones unitarias de concentración, fraccionamiento y tratamiento térmico tienen en el equilibrio salino del sistema lácteo. Finalmente, se plantean algunas consideraciones para la fortificación de derivados lácteos. Conocer los factores que afectan el equilibrio dinámico de las sales en la leche es fundamental en la definición de las propiedades fisicoquímicas y nutrimentales de productos lácteos fortificados, especialmente en aquellos sujetos a múltiples etapas de procesamiento durante su manufactura, como es el caso de las fórmulas infantiles.

Palabras clave: sales, calcio, fosfato, caseínas, proteínas de suero.

ABSTRACT

Milk salts account for 6 to 7 % (w/w) of the total solids in milk. Although it is a relatively small fraction, it plays an essential role in the determination of the milk's system stability, driven mainly by its influence on the structure and functionality of milk proteins. The present paper compiles the advancement related to the study of salt partition in milk phases. Furthermore, it describes the influence of concentration, fractioning, and thermal treatment unit operations in the salt equilibria of the milk system. Finally, it presents some considerations to account for during the fortification of dairy products. Understanding the factors affecting the dynamic equilibrium of milk salts is critical to define the physicochemical and nutritional properties of dairy products, especially in those subject to multiple processing steps during its manufacture, such as the case of infant formulas.

Keywords: salts, calcium, phosphate, caseins, whey protein.

INTRODUCCIÓN

Los productos lácteos constituyen un vehículo importante para proveer la fortificación nutricional necesaria a diversos segmentos de la población. En algunos casos, dicha fortificación constituye un requisito obligatorio para la comercialización de ciertos derivados lácteos, como es el caso de las fórmulas infantiles (DOF, 2012). Sin embargo, los procesos involucrados en la manufactura de estos productos, aunado a la adición de sales con los fines antes descritos, representan factores importantes que podrían alterar la estabilidad final del producto, influir en el rendimiento y efectividad del procesamiento y afectar la biodisponibilidad del micronutriente en cuestión (Barone *et al.*, 2021).

De manera general, se estima que del 6 al 7 % (p/p) de los sólidos totales de leche bovina están compuestos por sales. Esta fracción está integrada por cationes (principalmente calcio, magnesio, sodio y potasio) y aniones (mayoritariamente fósforo inorgánico, citrato y cloro) (Bauland *et al.*, 2022). Además del análisis cuantitativo de las sales presentes en la leche, el estudio de la distribución de estos componentes, la forma química en la que se encuentran y las relaciones de asociación que presentan son de especial relevancia, debido a la marcada influencia que ejercen estos elementos en la conformación y estabilidad de las proteínas lácteas, en la actividad de algunas enzimas presentes de manera natural en la leche y, en menor medida, en la estabilidad lipídica del sistema lácteo (Gaucheron, 2011a; Fox *et al.*, 2015).

Dada la relevancia relacionada con el estudio de sales en la leche, se han publicado revisiones recientes que atienden algunos de estos puntos (Deeth y Lewis, 2015; Masotti *et al.*, 2020; Barone *et al.*, 2021; Barone *et al.*, 2022; Nieuwenhuijse y Huppertz, 2022b). La mayoría de estos trabajos se han enfocado en el estudio específico del calcio. Probablemente esto puede atribuirse a la proporción mayoritaria en la que se encuentra presente este mineral y al papel fundamental que juega en la estabilidad y funcionalidad de las proteínas lácteas, principalmente en las micelas de caseína. Sin embargo, no se han reportado revisiones que contemplen las consecuencias fisi-

coquímicas y de estabilidad resultantes de la modificación en el equilibrio salino global en la manufactura de productos lácteos.

El objeto de esta revisión es presentar el progreso en el estudio y análisis de la repartición de sales en las fases coloidales y solubles de la leche. También se discutirá la influencia que ejercen las operaciones unitarias del tratamiento térmico, la concentración y el fraccionamiento en el equilibrio dinámico salino del sistema lácteo, así como las consecuencias fisi-coquímicas que dicha distribución tiene en el sistema final. Finalmente, se revisarán de manera crítica algunas de las implicaciones de fortificar derivados lácteos con sales minerales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Composición y distribución de las sales en la leche

La leche contiene sales orgánicas e inorgánicas. Esto comprende la presencia de iones orgánicos de importancia en la leche, como es el caso del fosfato orgánico y del citrato. Al hablar de las sales en la leche, es importante señalar que los términos *minerales* o *cenizas* no son considerados como equivalentes. El término *minerales* generalmente está asociado de forma exclusiva a compuestos inorgánicos. Por su parte, la obtención de cenizas del sistema lácteo resulta en la pérdida de incineración de citrato y acetato, y podría evaporar iones cloro y azufre (Walstra *et al.*, 2005; Noeparvar, 2018; Nieuwenhuijse y Huppertz, 2022b).

Las sales en la leche se encuentran distribuidas de forma soluble en el suero de leche (fase soluble o sérica) o bien asociados a las caseínas (fase micelar o coloidal). Un tercio del calcio, la mitad del fosfato inorgánico, dos tercios del magnesio y más del 90 % del ion citrato y el sodio se encuentran en la fase soluble de la leche. En esta fase, los iones pueden estar asociados entre ellos para formar sales como citrato de calcio, fosfato de calcio y cloruro de sodio. También es posible que se encuentren en sus formas iónicas libres. En contraste, la presencia de cationes divalentes (principalmente Ca^{2+} y Mg^{2+} y, en menor medida, Zn^{2+} y Mn^{2+}) domina en la fase micelar. Estos pueden

estar unidos mediante enlaces iónicos a los residuos fosforilados de serinas o, en menor medida, a los grupos carboxílicos de los aminoácidos aspartato o glutamato. Adicionalmente, el calcio y el fósforo pueden estar asociados en la forma de fosfato de calcio micelar (MCP, por sus siglas en inglés) en estructuras dentro de la micela, conocidas como *nanoclusters* (Gaucheron, 2005; Bauland *et al.*, 2022; Nieuwenhuijse y Huppertz, 2022).

Estos aglomerados han sido sujetos de investigación exhaustiva debido al papel fundamental que juegan en la estabilización de la estructura cuaternaria de las micelas y, consecuentemente, en la estabilidad y funcionalidad de los productos lácteos (Dumpler, 2018). La tabla I resume la composición, distribución y forma de asociación de las sales e iones presentes de manera natural en la leche.

Tabla I. Composición y distribución de iones en las distintas fases de la leche (micelar y soluble)

Ion	Localización	%	Concentración total por fase (mmol L ⁻¹) ^d	Forma de asociación ^d	Concentración según forma química (mmol L ⁻¹)
Ca	Fase soluble ^a	34	9.0	[Ca ²⁺]	2.0
				[CaCit ⁻]	6.9
				[CaPO ₄ ⁻]	0.6
				α-lactalbúmina	0.5
	Fase micelar	66	21.0	Caseínas	19.4
Mg	Fase soluble ^a	67	3.5	[Mg ²⁺]	1.2
				[MgHPO ₄ ^d]	0.7
				[Mg ₃ Cit ₂]	1.8
				MgCl ₂	0.1
	Fase micelar	33	1.5	Caseínas	1.9
Na	Fase soluble ^a	98	21.5	[Na ⁺]	21.0
				[NaCl]	0.4
	Fase micelar	2	0.5	Caseínas	0.5
K	Fase soluble ^a	92	34.3	[K ⁺]	36.3
				[KH ₂ PO ₄]	0.1
				[K ₂ HPO ₄]	0.7
				[KCl]	0.6
	Fase micelar	8	0.7	*	
P (orgánico) ^b	Fase soluble	31	2.6	Esterificado a fosfolípidos	0.3
				Ésteres de azúcares	2.4
	Fase micelar	69	5.7	Caseínas	5.7
P (inorgánico) ^c	Fase soluble ^a	52	11.0	[H ₂ PO ₄ ⁻ / HPO ₄ ²⁻]	11.0
	Fase micelar	48	10	Coloidal (MCP ^{**})	10

Tabla I. Composición y distribución de iones en las distintas fases de la leche (micelar y soluble) (continuación)

Ion	Localización	%	Concentración total por fase (mmol L ⁻¹) ^d	Forma de asociación ^d	Concentración según forma química (mmol L ⁻¹)
Citrato	Fase soluble ^a	90	8.1	Unido a Ca ²⁺ y Mg ²⁺	6.9
				Cit ³⁻	1.1
				HCit ³⁻	0.9
	Fase micelar	10	0.9	*	
Cloruro	Fase soluble ^a	100	30	[Cl ⁻]	27.8
				CaCl ₂	0.2
				MgCl ₂	0.1
				NaCl	0.3
				KCl	0.6
Hierro	Fase soluble	75	0.008	Membrana del glóbulo de grasa	0.001
				Asociado a proteínas séricas	0.004
				Asociado con componentes de bajo peso molecular	0.003
	Fase micelar	25	0.002	Caseínas	0.002

Fuente: elaboración propia con información de Wulansari Sugiarto (2004); Gaucheron (2005); Mekmene *et al.* (2009); Fox *et al.* (2015); Bauland *et al.* (2022); Lucey y Horne (2022); Nieuwenhuijse y Huppertz (2022a).

Notas:

^aLa composición de la fase soluble corresponde al permeado de la ultrafiltración de leche usando una membrana con un tamaño de poro de 10 kDa.

^b El fósforo orgánico comprende todo aquel que se encuentra ligado covalentemente a moléculas orgánicas (micelas de caseína, fosfolípidos, ADN, ARN, nucleótidos y azúcares fosfatadas) (Gaucheron, 2011b).

^c El fósforo inorgánico corresponde al ion fosfato, el cual puede adquirir diferentes formas químicas o estados de ionización (HPO₄²⁻ o H₂PO₄⁻), dependiendo del pH del medio (Gaucheron, 2011b).

^d Discrepancias entre las sumatorias totales de las columnas concentración total por fase (mmol L⁻¹) y forma de asociación pueden atribuirse al método analítico o modelo utilizado para estimar la concentración de la forma salina estudiada.

*Información no disponible.

**MCP: por sus siglas en inglés, fosfato de calcio micelar.

Por lo anterior, el estudio de la distribución y el equilibrio de sales en la leche está íntimamente ligado a la modelación de la estructura de las micelas de caseína y, en seguida, a la puesta a prueba de tales modelos a través de observaciones experimentales. Lo anterior supone un reto, pues las caseínas son foproteínas que no cristalizan, razón que explica el porqué del

desconocimiento de la estructura exacta de la micela y, consecuentemente, de los aglomerados de fosfato de calcio micelar dentro de ella (Lenton *et al.*, 2020; Enax *et al.*, 2022). Actualmente no existe un modelo de la estructura de la micela de caseína que la comunidad científica reconozca de manera unánime; no obstante, se reconoce el papel biológico de estas

proteínas como transportadoras de calcio y fosfato de la madre al neonato; ello explica cómo la concentración de estos minerales en la leche sobrepasa de manera sustancial la solubilidad en agua del fosfato cálcico (Bauland *et al.*, 2022).

La unión de calcio y otros iones polivalentes a las estructuras proteínicas resulta en la reducción de la carga neta negativa de las micelas de caseína, lo que facilita la interacción entre ellas y podría conducir a la agregación. Este fenómeno se observa en tres de las cuatro fracciones de caseínas presentes en la leche bovina ($\alpha_{s2} > \alpha_{s1} > \beta$), razón por la cual se clasifican como sensibles al calcio (Huppertz *et al.*, 2018). En esta línea, diversos trabajos se han propuesto explicar la partición de sales en leche bovina entre las fases micelar y soluble, fundamentando los modelos generados en el conocimiento estructural de las fracciones de caseína (Holt *et al.*, 1981; Lyster, 1981; Mekmene *et al.*, 2009). Bijl *et al.* (2019) explican que una de las dificultades de estos modelos tiene que ver con la disconformidad entre las fórmulas químicas del fosfato de calcio micelar, comparada con aquel presente en la fase soluble. Aunque dicha diferencia es necesaria para explicar algunas observaciones experimentales, rompe la suposición inicial del equilibrio termodinámico entre los iones en la fase continua y aquellos presentes en la micela de caseína. Por lo anterior, Bijl *et al.* (2019) propusieron un modelo cuantitativo para describir las interacciones de los iones divalentes considerando la contribución individual de cada fracción de las caseínas sensibles al calcio. Concluyen que el modelo les permitió predecir que un promedio de 67 ± 10 % de las fracciones de caseínas estudiadas (α_{s2} , α_{s1} y β) se encuentran unidas a un ion divalente, comparado con un 80-90 % de los modelos propuestos anteriormente. Finalmente, señalan la importancia de desarrollar métodos para el estudio de la estructura de las micelas en estado nativo.

Para complementar los trabajos anteriores, es indispensable reconocer que la distribución del sistema salino lácteo se encuentra en intercambio permanente entre los iones en sus distintas fases (Bauland *et al.*, 2022). El estudio de la movilidad de sales entre las fases séricas y coloidales contribuye al entendimiento de los factores que modulan dicho equilibrio y las con-

secuencias tecnológicas que tal equilibrio pudiera tener. Entre los trabajos pioneros en este ámbito destacan los de Pierre *et al.* (1983) y Zhang y Aoki (1996). Ambos grupos de trabajo estudiaron el comportamiento del calcio y del fósforo en las micelas de caseína a través de resonancia magnética nuclear usando fósforo ^{31}P y ^{45}Ca como los núcleos de interés. Pierre *et al.* (1983) distinguieron la presencia de tres tipos de calcio, de acuerdo con las cinéticas de intercambio que seguían: rápido de intercambiar (demoraba solo unos minutos), lento para intercambiar (tardaba algunas horas) y no intercambiable (más de 24 horas sin movilidad). Por su parte, Zhang y Aoki (1996) estimaron que entre el 30-40 % del fosfato cálcico micelar pertenece a la categoría no intercambiable con la fase soluble, hecho que atribuyeron al involucramiento de esta fracción con estructuras de unión más estables.

Estudios recientes han corroborado las observaciones antes señaladas. Hindmarsh y Watkinson (2017) identificaron estructuras rígidas de fósforo en las micelas de caseína de las que el calcio fue quelado con el uso de 20 mM de EDTA. Reconocieron que estas estructuras no coinciden con las planteadas en modelos de la micela de caseína (Holt *et al.*, 1989; Horne, 1998), los cuales plantean la presencia de enlaces interproteínicos por fosfoserinas con calcio y a través de estos hacia el fosfato de calcio micelar. Por el contrario, Hindmarsh y Watkinson (2017) postulan que probablemente se trate de puentes de calcio para la unión de dos residuos de fosfoserinas, ya sea intra o interproteína.

En comparación con los trabajos relacionados con el calcio y el fosfato, el estudio de la distribución, interacciones y equilibrio influenciado por otros iones de importancia en la leche es limitado. Philippe *et al.* (2005) estudiaron el efecto de la adición de diferentes cationes di y trivalentes en las características fisicoquímicas de las micelas de caseínas y en el balance de sales en el sistema lácteo estudiado. Reportaron el orden de asociación de los cationes a las micelas de caseínas como $\text{Fe}^{3+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$. Señalan que, para todos los casos, la asociación a las micelas no es directa, sino que se da a través de los aniones de citrato y fosfato inorgánico. Sobre los cambios

estructurales en la micela, observaron que la hidratación de estas disminuyó considerablemente en presencia de cualquiera de los cationes estudiados.

En cuanto a la distribución del magnesio en las distintas fases de la leche, Franzoi *et al.* (2018) monitorearon la distribución de sales en las fases sérica y micelar de leche bovina después de la coagulación mediante quimosina. Reportaron que el 48 % del magnesio presente en la leche se encontraba asociado a la fase coloidal, en contraste con 79 % del calcio que se encontraba en esta misma fase. Comparada con la del calcio, la proporción disminuida de magnesio en la fase micelar se atribuye a la baja afinidad que presenta este al fosfato inorgánico y al citrato. Además, se sabe que la repartición de este ion depende del pH y fuerza iónica del medio en donde, a menor pH, aumenta la concentración del ion magnesio (Mg^{2+}) en la fase sérica, lo cual pudiera tener un efecto desestabilizante en las proteínas lácteas (Philippe *et al.*, 2005; Huppertz, 2013; Begum, 2019).

Por su parte, los cationes monovalentes presentes en la leche (sodio y potasio) se encuentran principalmente distribuidos como iones libres en la fase soluble (Gaucheron, 2005). La asociación de iones monovalentes con los residuos negativamente cargados de las caseínas puede ocurrir; sin embargo, se trata de una unión más débil en comparación con la de los iones divalentes. Por lo anterior, la asociación de cationes potasio o sodio con dichos residuos aminoácidos es relevante solo en aquellos casos en los que la concentración de Na^+ o K^+ excede la de los iones divalentes (Nieuwenhuijse y Huppertz, 2022a). Huppertz y Fox (2006) estudiaron diferentes concentraciones de NaCl añadidas (75-850 mmol L^{-1}) en las propiedades fisicoquímicas de leche concentrada. Reportaron que no encontraron cambios en el tamaño de las micelas de caseína, pero sí reducciones en las cargas netas negativas de las mismas y en el pH de la leche. Los autores atribuyen dichas observaciones al aumento de la fuerza iónica en el sistema. La disminución de pH puede explicarse por la disociación incremental de los pares iónicos, efecto directamente proporcional a la fuerza iónica. En contraste, incrementar la fuerza iónica conlleva la disminución del coeficiente de actividad iónico del fosfato cálcico micelar y, por ende, al incremento concomitante de la solubilidad de dicha sal. Este fenómeno resulta en la migración de parte del

calcio micelar a la fase soluble. El incremento del contenido de calcio en la fase soluble conduce a la reducción de la carga negativa total de las micelas de caseína (Dagleish, 1984). Finalmente, respecto al efecto negligible en el tamaño de las micelas de caseína con la adición de NaCl, Huppertz y Fox (2006) señalan que podría atribuirse a la concentración relativamente baja de calcio micelar solubilizado ($< 2 mmol L^{-1}$), lo que permite mantener la integridad de la micela mediante repulsión electrostática y estérica.

En el caso de las proteínas del suero de leche, también se ha reportado el efecto de la interacción de iones monovalentes con estas. Se han identificado dos tipos de interacciones: 1) los cationes monovalentes reducen las fuerzas de repulsión electrostáticas entre las moléculas de proteínas cargadas negativamente, lo que incrementa la proximidad entre los grupos reactivos y 2) reducen la formación de puentes de cationes divalentes entre las moléculas (Havea *et al.*, 2002).

Por último, cabe destacar que los análisis *in silico* pueden representar una herramienta de gran apoyo en el estudio de la distribución mineral y su interacción con las proteínas lácteas. Rodzik *et al.* (2023) determinaron la unión preferencial del zinc a ciertos residuos aminoácidos de las caseínas (histidina, cisteína, glutamato y aspartato) mediante el uso de *software* de modelación y acoplamiento molecular.

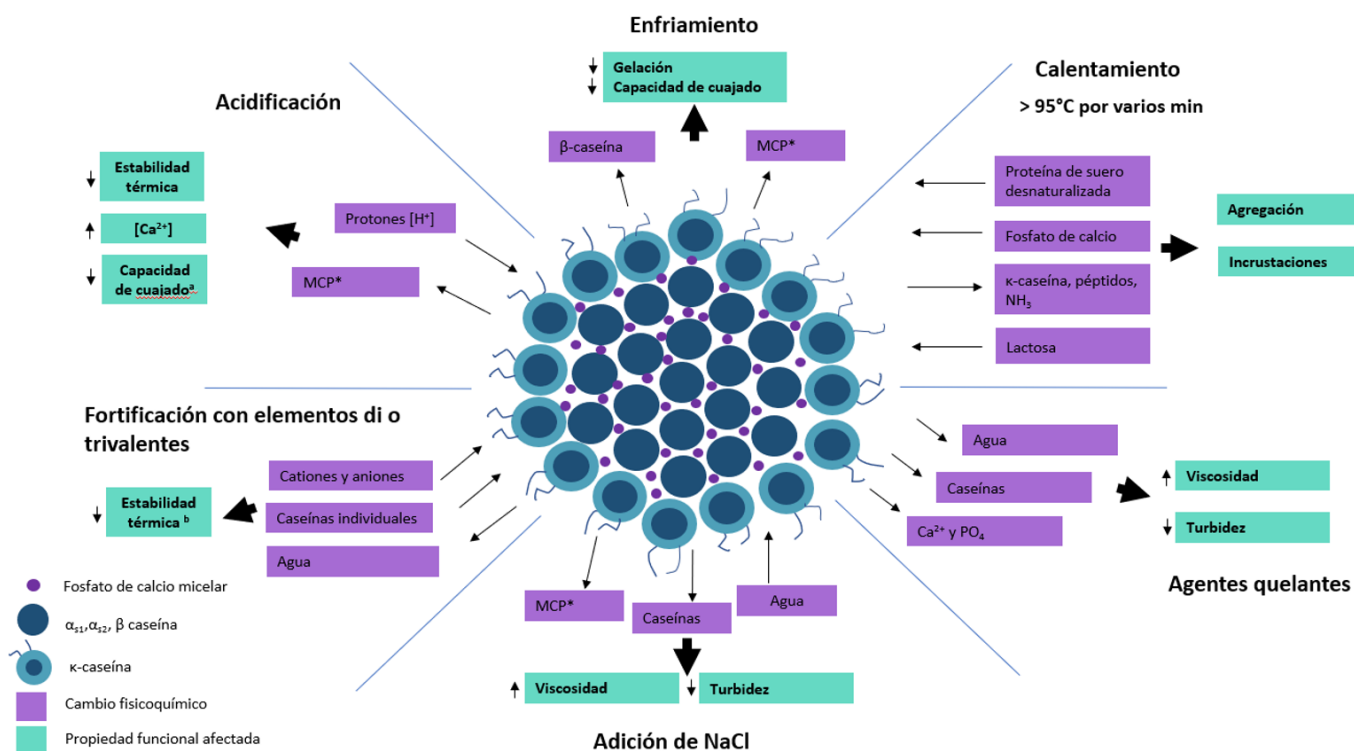
2. Cambios inducidos por el procesamiento de leche en el sistema de sales

Los cambios fisicoquímicos a los que está sujeta la leche a través de las diferentes operaciones unitarias involucradas en su procesamiento pueden alterar el balance en las sales distribuidas entre la fase coloidal y la fase soluble (de la Fuente, 1998).

Como se ha expuesto hasta ahora, el calcio juega un papel fundamental en el establecimiento de este equilibrio dinámico. La distribución de las diferentes formas de calcio en la leche está dada por la siguiente ecuación:



Ecuación 1.

**Figura 1.**

Modificaciones en el equilibrio salino en la leche, de acuerdo con diferentes condiciones fisicoquímicas.

De acuerdo con esta descripción, se observa que la concentración de calcio iónico ([Ca²⁺]) aumenta con la adición de iones hidronio (por ejemplo, durante un proceso de acidificación) o mediante la adición de sales de calcio solubles. La ecuación también permite explicar cómo, durante un proceso de calentamiento, al disminuir considerablemente la solubilidad de Ca₃(PO₄)₂, este precipita y se asocia con el fosfato cálcico micelar, lo que contribuye a la generación de H⁺ y a la disminución del pH de la leche durante el calentamiento (Lewis, 2011; Barone *et al.*, 2022; Lucey y Horne, 2022).

El presente apartado describe el efecto de las operaciones de concentración, fraccionamiento y tratamiento térmico en el balance mineral de las sales en la leche. La figura 1 ilustra algunos de los fenómenos involucrados en el procesamiento de productos lácteos y su influencia en el equilibrio de sales.

2.1. Efecto de la concentración y del fraccionamiento

En general, los procesos de concentración tienen un impacto en el equilibrio de sales. Esto se explica porque la solubilidad

de algunos productos puede verse superada, lo que provoca su precipitación y la disminución del pH del sistema (Walstra *et al.*, 1984; Fox *et al.*, 2015).

Markoska *et al.* (2019) utilizaron espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) para estudiar los cambios fisicoquímicos que experimenta la leche descremada durante la concentración por evaporación. Conforme aumentaba la cantidad de sólidos totales, observaron un incremento en el área bajo la curva de los picos 1,118, 1,075 y 1,041 cm⁻¹. Jaiswal *et al.* (2015) reportaron que el pico de 1,075 cm⁻¹ se ha relacionado con la presencia de grupos fosfato covalentemente unidos a las micelas de caseína; de este modo, en sistemas lácteos concentrados, un incremento en este pico puede asociarse con la asociación adicional de CaPO₄ a la micela.

Aprovechando la diferencia en tamaño entre las micelas de caseína (200 nm de diámetro) y las proteínas de suero (3.6 nm), el uso de micro y ultrafiltración permite generar concentrados de proteínas lácteas con una proporción incremental de caseína

en comparación con la presente en la leche bovina (Bijl *et al.*, 2014; O'Mahony y Fox, 2014; Corredig *et al.*, 2019). Este tipo de productos presenta una solubilidad reducida, lo que constituye un factor limitante en su funcionalidad (Wu *et al.*, 2020). Dicho fenómeno se ha asociado principalmente con la interacción hidrofóbica entre micelas de caseínas y la interacción de las micelas con el calcio. Estos iones promueven la formación de entrecruzamiento entre las diferentes fracciones de caseína, lo que contribuye a la insolubilidad de los concentrados de proteína (Corredig *et al.*, 2019; Khalesi y FitzGerald, 2022). Kommneni *et al.* (2022) obtuvieron una reducción del 30 % del calcio micelar en concentrados de caseína micelar mediante la inyección de CO₂ durante el proceso de ultrafiltración. Reportaron que la disminución de este catión mejoró sustancialmente la solubilidad del polvo de caseína micelar. Señalaron también que la reducción de calcio resultó en la disminución del tamaño de las micelas de caseína, lo que se reflejó en valores de densidad aparente menores en los polvos estudiados en comparación con el control.

La reducción del calcio micelar en concentrados de proteína de leche, con el fin de mejorar la solubilidad, también puede lograrse mediante el uso de aditivos quelantes. García-Amezqueta *et al.* (2022) estudiaron el efecto de la adición de citrato de sodio y hexametáfosfato de sodio en soluciones de aislados de caseína micelar. En su artículo describen que, aunque ambos agentes quelantes afectan la organización de las micelas, el mecanismo de acción es diferente. En el caso del citrato de sodio, este agente forma complejos solubles de citrato de calcio y solubiliza el fosfato inorgánico; mientras que el hexametáfosfato parece actuar mediante reacciones de peptización, alterando la estructura de los aglomerados de fosfato cálcico micelar sin solubilizarlos.

Estudios recientes referentes a la concentración de proteínas de suero de leche y su relación con la fracción de sales presentes se han centrado principalmente en la evaluación de la composición de las incrustaciones formadas en los evaporadores y en la búsqueda de estrategias para utilizar el suero ácido. Tanguy *et al.* (2015) demostraron que el ácido utilizado para la separación del suero de la caseína tiene un efecto en la composición mineral de la corriente sérica y, consecuentemente, en la composición de las incrustaciones formadas durante la evapo-

ración. Señalaron que la presencia de citrato durante la concentración del suero favoreció la formación e insolubilización de citrato cálcico.

Por otro lado, el avance en el conocimiento y escalamiento de tecnologías asociadas al fraccionamiento de compuestos de interés ha propiciado el desarrollo de diversas fracciones especializadas de proteínas lácteas, potencialmente relevantes en productos nutricionales. Jiménez-Barrios *et al.* (2022) propusieron mejorar la estabilidad térmica de la lactoferrina separada mediante cromatografía de intercambio catiónico con el uso de fosfato de potasio, fosfato de sodio, citrato de potasio y citrato de sodio. Reportaron que la presencia de 2 mM/L de fosfato de potasio inhibió la agregación de la proteína parcialmente desdoblada. Esta observación coincide con lo reportado por Baer *et al.* (1979), quienes señalaron que el proceso de renaturalización de lactoferrina ocurre únicamente en la forma proteínica con menos del 5 % de saturación de hierro (apo). Sustentados en este reporte, Jiménez-Barrios *et al.* (2022) sugieren que la capacidad de re-naturación de la lactoferrina en presencia el fosfato de potasio podría estar ligada al efecto de esta sal en la capacidad de ligar hierro de la proteína.

Por otra parte, Barone *et al.* (2020) estudiaron diferentes técnicas de separación y concentración de la fracción de α -lactoalbúmina presente en el suero de leche. Demostraron que la concentración mediante filtración por membranas resultó en una concentración significativamente mayor de calcio iónico, comparada con las otras dos técnicas de fraccionamiento estudiadas. Esto es relevante, ya que concentraciones elevadas de calcio iónico durante el procesamiento de productos a base de suero de leche incrementan las interacciones proteína-proteína (agregación) y pueden provocar inestabilidad en el producto terminado (Bryant y McClements, 2000; G. Singh *et al.*, 2007).

En comparación con la lactoferrina y la α -lactoalbúmina, la separación y producción industrial de β -caseína aún no es económicamente viable. El interés de esta fracción —entre otras aplicaciones— radica en su potencial uso en la fortificación de fórmulas infantiles, dada la mayor proporción de esta proteína en la leche humana, comparada con la leche bovina (van der Schaaf *et al.*, 2022). McCarthy *et al.* (2013) purificaron β -caseína mediante coagulación con renina y solubilización en frío. Asimismo, promovieron la defosforilación de la fracción aislada

con el objetivo de aproximarse más al porcentaje de fosforilación presente en la fracción humana. Dicha desfosforilación redujo la sensibilidad de β -caseína a la precipitación por calcio, lo que resultó en emulsiones más estables a la floculación ante la adición de CaCl_2 .

2.2. Efecto del tratamiento térmico

El tratamiento térmico destaca como uno de los procesos más ampliamente utilizados en la industria láctea. Su principal objetivo es el de asegurar la calidad microbiológica de la leche mediante la destrucción de microorganismos patógenos y deteriorativos (Deeth y Smithers, 2018). También puede emplearse para inactivar enzimas nativas de la leche (Fox *et al.*, 2015), incrementar la fuerza del gel de yogur y mejorar la estabilidad térmica de leche concentrada (McCarthy *et al.*, 2022).

Al incrementar la temperatura de la leche, la constante de disociación del fosfato dihidrógeno aumenta. Esto resulta en la transformación parcial del H_2PO_4^- a HPO_4^{2-} , mismo que tiene una afinidad más alta hacia el ion calcio que H_2PO_4^- . Junto al calcio, HPO_4^{2-} forma HPO_4Ca ; sin embargo, dado que la fase soluble se encuentra sobresaturada, este precipita. Como consecuencia, y con el fin de restablecer el equilibrio en el sistema,

aumenta la cantidad de fosfato cálcico asociado a las micelas. Este fenómeno se intensifica con el incremento en la intensidad del tratamiento térmico. En la ausencia de micelas de caseína (por ejemplo, en el suero de leche o en el permeado ultrafiltrado de leche) es posible observar un precipitado arenoso en suspensión o en la superficie de los intercambiadores de calor. En consecuencia, los cambios en el equilibrio salino, junto con los productos de la reacción de Maillard generados durante el calentamiento, provocan una disminución del pH del sistema (Deeth y Lewis, 2017; Bauland *et al.*, 2022).

Bajo condiciones de tratamiento térmico más severas o en matrices específicas, algunos trabajos (J. Singh *et al.*, 2019; Loveday *et al.*, 2021) han reportado un incremento en la concentración de calcio iónico en la fase soluble. On-Nom *et al.* (2012) observaron que, en el estudio de fases solubles obtenidas mediante diálisis y tratadas a diferentes temperaturas, tanto el pH como el Ca^{2+} disminuyen conforme aumenta la temperatura. Esto contradice lo postulado por Rose (1962), quien sugería que la concentración de Ca^{2+} aumenta con la temperatura debido a la disminución del pH. La tabla II resume algunos tratamientos comúnmente aplicados a productos lácteos y su efecto en el pH y en la concentración de Ca^{2+} .

Tabla II. Efecto de algunos procesos en el pH y concentración de calcio iónico en la leche

Proceso	Cambio en el pH	Cambio en Ca^{2+}
HTST ^a	Mínimo	Disminuye
UHT ^b	Mínimo	Disminuye, pero se recupera durante el almacenamiento
Esterilización en contenedor	Disminuye	Puede aumentar o disminuir
Evaporación y ósmosis inversa	Disminuye	Incrementa moderadamente
Ultrafiltración	No cambia	Incrementa moderadamente
Congelación	No cambia	Disminuye
Reducción de pH y recuperación	No cambia	Incrementa
Altas presiones	Incrementa	No cambia

Fuente: elaboración propia con información de Deeth y Lewis (2017).

^a HTST: tratamiento a altas temperaturas, por corto tiempo (72-82 °C durante 15 o 30 segundos).

^b UHT: tratamiento a ultra alta temperatura (138-145 °C por 1-10 segundos).

Otros estudios sobre los cambios en el equilibrio salino durante el tratamiento térmico han buscado comprender la naturaleza del precipitado de fosfato de calcio formado a diferentes temperaturas. Wang y Ma (2020) investigaron el precipitado generado durante el calentamiento de leche descremada y soluciones de caseína micelar a 70, 80, 90 y 100 °C durante 15 minutos. A medida que aumentaba la temperatura de tratamiento, reportaron cambios significativos en los niveles de Ca y P en la fase sérica. Es relevante señalar que el precipitado de fosfato de calcio formado hasta 90 °C era de naturaleza ácida, similar al de los aglomerados de fosfato cálcico micelar nativo. En contraste, señalaron que los calentamientos a 100 °C resultaron en la formación de una sal alcalina, probablemente con estructura cristalina.

Mediante el uso de ^{31}P NMR y FTIR, Boiani *et al.* (2018) estudiaron en tiempo real los cambios en la estructura y distribución del fosfato cálcico formado durante el calentamiento de leche descremada y modificada con diferentes fuentes de caseína micelar. Además de cambios en la distribución mineral entre la fase coloidal y soluble, reportaron que, a temperaturas superiores a los 70 °C, se observa un cambio en la señal de fósforo inorgánico (Pi), interpretado como un aumento en su carga negativa del Pi. Por otra parte, explicaron que un decremento en la señal asociada a los *nanoclusters* de fosfato cálcico micelar se traduce como un incremento en la relación Pi:Ca, lo que afecta la estructura y composición de estos sistemas.

Aunque se sabe que la mayor parte del fosfato y del calcio en la fase soluble de la leche se insolubiliza durante el calentamiento entre 80-140 °C, aún no se comprende por completo el mecanismo que rige la distribución ni la composición de sales en función del tratamiento térmico aplicado o del sistema involucrado en el calentamiento. Este hecho puede atribuirse a la complejidad de monitorear la distribución de las sales lácteas a altas temperaturas y a la reversibilidad de algunas reacciones al enfriar la muestra de estudio (Yoo *et al.*, 2013; Nieuwenhuijse y Huppertz, 2022b).

3. Fortificación de productos lácteos con elementos inorgánicos

Similar a lo discutido hasta ahora, el estudio de la fortificación con sales de calcio ha recibido una especial atención, lo cual se atribuye, por una parte, a que la leche constituye una fuente rica y biodisponible de este mineral (Perego *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2020) y, por otro lado, a la influencia que la adición de estos materiales ejerce sobre la estabilidad térmica del producto fortificado (G. Singh *et al.*, 2007). Para su uso con fines de fortificación, las sales de calcio pueden dividirse en dos grandes grupos: insolubles y solubles. El primer grupo comprende sales de carbonato, fosfato y citrato. Como ventajas, las sales de este grupo no afectan la concentración de $[\text{Ca}_2^+]$ en la leche y no modifican el pH del sistema, por lo que, en general, no alteran la estabilidad térmica del mismo. Sin embargo, debido a su baja solubilidad, presentan la desventaja de generar sedimentos durante el procesamiento y la vida de anaquel de los productos fortificados (Crowley *et al.*, 2014; Barone *et al.*, 2022). En contraste, las sales solubles se componen de sales de cloruro, lactato y gluconato. Estas presentan una mejor biodisponibilidad en comparación con las anteriores (G. Singh *et al.*, 2007), aunque afectan considerablemente la estabilidad térmica del producto en cuestión (On-Nom *et al.*, 2012).

Entender el efecto de la fortificación en las propiedades finales del producto es especialmente relevante en la producción de fórmulas infantiles, ya que la fortificación con calcio y otros minerales es un requisito obligatorio en esta categoría de productos (DOF, 2012). Además, se trata de productos que pueden someterse hasta cinco ciclos de calentamiento diferentes, por lo que asegurar la estabilidad térmica es fundamental (Francisquini *et al.*, 2020).

Ante este reto, se han propuesto diversas estrategias. Barone *et al.* (2021) evaluaron distintas proporciones de sales solubles (cloruro de calcio) e insolubles (citrato de calcio) para alcanzar una fortificación de 1,500 mg de calcio L^{-1} en la fórmula infantil. Reportaron que, al utilizar proporciones con un valor

menor o igual al 50 % de CaCl_2 , se mantienen las propiedades fisicoquímicas estudiadas sin cambios aparentes. Por su parte, France *et al.* (2020) exploraron la reducción del tamaño de partícula en la fortificación de fórmulas infantiles con citrato de calcio y demostraron una mejora en la estabilidad coloidal de los sistemas fortificados con citrato de calcio micronizado, atribuida a una mayor afinidad de estas partículas con las micelas de caseína. Otras estrategias propuestas para la fortificación de productos lácteos con calcio incluyen la microencapsulación (Gomez-Betancur *et al.*, 2022), el uso de hidrocoloides para aumentar la viscosidad en la fase continua (Münchbach y Gerstner, 2010; Barone *et al.*, 2022), el uso de fosfato cálcico lácteo como ingrediente funcional (Anema, 2009; Wang y Ma, 2022) y la adición de sales diseñadas específicamente para el uso en fortificación de productos lácteos, como es el caso del citrato de calcio y potasio (Gadocal K®) (Ramasubramanian *et al.*, 2014).

La fortificación con magnesio ha sido estudiada por Abdulghani *et al.* (2015) y Begum (2019). En el primer estudio, usaron sulfato de magnesio para fortificar leche UHT con 320 mg L^{-1} de magnesio, con el objetivo de cubrir el 100 % de la ingesta diaria recomendada para adultos. Reportaron un incremento significativo en la viscosidad de las muestras fortificadas con magnesio, comparadas con el control sin fortificación; sin embargo, los valores reportados estaban por debajo de 10 mPa.s, considerando el umbral crítico para el inicio de la gelación en productos lácteos. Por su parte, Begum (2019) reportó que el enriquecimiento de magnesio en leche con 5 mmol L^{-1} de cloruro de magnesio resultó en un incremento en la concentración de magnesio iónico y magnesio total en la fase sérica.

Blinov *et al.* (2021) estudiaron el efecto de la adición de seis formas químicas diferentes de zinc en la estabilidad coloidal de la leche. Mediante espectroscopía electroacústica demostraron que, para la fortificación de la leche, es necesario usar compuestos que presenten constantes de inestabilidad bajas y que afecten en menor medida el radio hidrodinámico de las partículas en solución. Rana *et al.* (2018) utilizaron 22.5 ppm de acetato

de zinc para fortificar la leche y no observaron cambios en las propiedades fisicoquímicas estudiadas (pH, acidez, viscosidad, tiempo de coagulación y estabilidad ante el alcohol). Sin embargo, desde el punto de vista estructural, observaron mediante FTIR que el zinc se unió a sitios preferenciales de proteínas y grasas lácteas, en concordancia con lo reportado por Wulansari Sugianto (2004), quien identificó una concentración de >2.5 mM de zinc añadido como concentración crítica de este catión, a partir de lo cual observaron la formación de agregados y pérdida de solubilidad en las caseínas. Por su parte, la fortificación de leche con hierro es complicada porque se trata de un prooxidante potente (Deeth y Lewis, 2017). No obstante, al ser un micronutriente esencial, su incorporación en fórmulas infantiles es indispensable, especialmente para productos que vayan dirigidos a lactantes menores de seis meses (Domellöf *et al.*, 2014). Guzun-Cojocar *et al.* (2011) estudiaron la estabilidad oxidativa de emulsiones estabilizadas con β -Lactoglobulina (β -Lg) y caseinato de sodio, fortificadas con bisglicinato de hierro, sulfato de hierro y un complejo de hierro con etilendiaminotetracetato (EDTA). Reportaron que la afinidad de las proteínas por el hierro iónico desempeña un papel clave en la transferencia de este catión hacia la interfaz de la emulsión y, consecuentemente, en la estabilidad lipídica del sistema. Para los sistemas estudiados, reportaron una mejor estabilidad en el caso de las emulsiones estabilizadas con β -Lg y en presencia de bisglicinato de hierro. Entre otras estrategias para la fortificación de productos lácteos con hierro, destaca la propuesta por Raouche *et al.* (2009), quienes propusieron reemplazar parcialmente el calcio de las micelas de caseína por hierro. Observaron diferencias notables en el color: las muestras preparadas con cloruro ferroso fueron más oscuras que el control (muestra sin fortificación), mientras que aquellas con cloruro férrico presentaban tonos rojizos y amarillentos. Los autores destacan la importancia de estudiar la biodisponibilidad y mejorar la estabilidad térmica de estos sistemas para su posible aplicación en productos nutricionales.

Cabe señalar que, además del efecto de la adición de diversas sales en la estabilidad física del sistema de estudio, la distribución de las sales desempeña un papel significativo en la determinación de la funcionalidad del producto final. En este sentido, Huppertz y Timmer (2020) evaluaron el balance de sales en fórmulas infantiles comerciales y encontraron diferentes valores de mineralización de las caseínas, influido principalmente por el pH y por la forma química de las sales añadidas. Asimismo, se ha reportado que la coagulación inducida por pepsina durante la digestión *in vitro* de fórmulas infantiles fue severamente afectada por el porcentaje de mineralización de las caseínas (Huppertz y Lambers, 2020). Estos hallazgos sugieren que, especialmente en productos dirigidos a poblaciones vulnerables, como es el caso de las fórmulas infantiles, las consideraciones en la selección de las sales usadas para la fortificación deben contemplar de manera integral tanto la funcionalidad tecnológica como la digestiva del producto en cuestión.

4. Perspectivas futuras y necesidades de investigación en el estudio de la partición salina en lácteos

El uso generalizado de técnicas analíticas que permitan monitorear los cambios en el sistema salino lácteo de forma *in situ* permitirá consolidar el conocimiento en este campo y modular de manera más asertiva las condiciones de proceso utilizadas, así como las formas químicas adicionadas para la fortificación de productos lácteos. Algunos de estos trabajos, como el uso de NMR de ^{31}P y ^{45}Ca han sido expuestos en el presente documento. Entre otras técnicas prometedoras en esta área, destacan el uso de difracción de rayos X de ángulo pequeño (SAXS, por sus siglas en inglés) (Li *et al.*, 2022) y el desarrollo de sistemas que permiten monitorear el pH en tiempo real y en línea a temperaturas de hasta 140 °C (Aydogdu *et al.*, 2023).

Por otra parte, se ha descrito la forma en que la interacción de las sales, tanto con caseínas como con proteínas de suero de leche, determina en buena medida la estabilidad térmica y funcionalidad de la leche. Se expuso también que las propiedades funcionales de las proteínas están gobernadas por la estructura de las mismas (H. Singh y Li, 2022). Por lo anterior, estudios que

permitan evaluar el efecto de diversas condiciones de procesamiento en la estructura molecular de las proteínas prometen ser una estrategia para fortalecer el entendimiento en esta área de estudio. Entre estas estrategias, destacan los análisis *in silico* y técnicas de acoplamiento molecular. Delboni y Barroso da Silva (2016) demostraron la aplicación de técnicas de modelación para el estudio de la formación de complejos de α -Lactalbúmina, β -lactoglobulina y lactoferrina. Reportaron que, a 150 mM de solución salina, las fuerzas de repulsión disminuyen y las fuerzas de Van der Waals regulan la formación de complejos entre las proteínas mencionadas. En contraste, a concentraciones bajas de sales, los mecanismos de complejación están regulados por interacciones electroestáticas y cargas proteínicas. Es importante señalar que en este estudio la simulación no contempló el efecto particular de distintas sales, lo que plantea la pregunta: ¿son los efectos generalizados extrapolables a la contribución individual de cada sal presente en la leche? En cuanto a las caseínas, son destacables los trabajos de Du *et al.* (2023) y Farrell Jr. *et al.* (2002). Haciendo uso de simulaciones de dinámica molecular, Du *et al.* (2023) observaron que la presencia de calcio en las estructuras de caseína micelar resultaba en complejos extendidos y holgados, en comparación con las conformaciones más compactas observadas en los escenarios simulados de caseínas reducidas en calcio. Por su parte, Farrell Jr. *et al.* (2002) trabajaron con estrategias de minimización de energía para simular las interacciones sal-proteína entre iones divalentes y la fracción α_{s1} de caseína. Ambos grupos de trabajo concluyen que las simulaciones permiten dilucidar el papel del calcio en el bioensamblado de las micelas de caseína.

En esta línea, es interesante encontrar que ciertos autores comienzan a señalar la criticidad de descifrar el mecanismo de ensamble de las micelas de caseína y el papel que desempeñan diferentes iones en la formación de dichas estructuras. Esto se hace con el fin de habilitar el uso de proteínas recombinantes como sustitutos de proteínas lácteas. En el artículo de Hettinga y Bijl (2022) se describe con detenimiento el reto de fabricar *in vitro* los aglomerados de fosfato cálcico característicos de las micelas de caseína y las propiedades funcionales que estos

confieren a tales proteínas. Señalan que, aunque la capacidad de reensamblar fracciones de caseínas aisladas de leche de bovina ha sido demostrada, la habilidad de hacer micelas a partir de proteínas recombinantes queda por ser estudiada.

CONCLUSIONES

Como se ha expuesto hasta ahora, el estudio de la partición de sales en la leche no es precisamente nuevo. Sin embargo, se conoce relativamente poco a nivel fundamental y mecánico sobre los factores que rigen el equilibrio dinámico en los sistemas lácteos. Esto se ve exacerbado cuando se trabaja con matrices complejas, es decir, aquellas que han sido partícipes de múltiples operaciones unitarias durante su manufactura, que en su constitución se han alterado las proporciones de macro y micronutrientes de la leche nativa, o bien, que se consideran complejas por ambas causas. Este último caso representa a las fórmulas infantiles. Además de las consecuencias fisicoquímicas y de estabilidad térmica que la distribución de sales podría tener en el sistema, es indispensable considerar de manera exhaustiva el efecto que esta puede tener en la biodisponibilidad de nutrientes y, por ende, en la funcionalidad final planteada para el producto de estudio.

Por lo anterior, se ha señalado la relevancia de construir un entendimiento molecular y estructural como consecuencia de la distribución salina. Asimismo, se apunta a la oportunidad de investigar integralmente estos cambios en sistemas y procesos escalables, con el fin de poder traducir los hallazgos encontrados en productos comerciales.

AGRADECIMIENTOS

La autora Mariana Aguilar-Morales agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) —hoy Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)— y a la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP) por el apoyo financiero otorgado para sus estudios de doctorado.

REFERENCIAS

- Abdulghani, A. H., Prakash, S., Ali, M. Y. y Deeth, H. C. (2015). Sensory evaluation and storage stability of UHT milk fortified with iron, magnesium and zinc. *Dairy Science & Technology*, 95(1), 33-46. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0188-7>
- Anema, S. G. (2009). Stability of milk-derived calcium phosphate suspensions. *Dairy Science & Technology*, 89(3), 269-282. <https://doi.org/10.1051/dst/2009005>
- Aydogdu, T., O'Mahony, J. A., Huppertz, T., Magan, J. B. y McCarthy, N. A. (2023). Measuring pH of skim milk and milk permeate at ultra-high temperatures at laboratory and pilot scale. *International Dairy Journal*, 139, 105565. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105565>
- Baer, A., Oroz, M. y Blanc, B. (1979). Serological and fluorescence studies of the heat stability of bovine lactoferrin. *Journal of Dairy Research*, 46(1), 83-93. <https://doi.org/10.1017/S0022029900016885>
- Barone, G., Moloney, C., O'Regan, J., Kelly, A. L. y O'Mahony, J. A. (2020). Chemical composition, protein profile and physicochemical properties of whey protein concentrate ingredients enriched in α -lactalbumin. *Journal of Food Composition and Analysis*, 92, 103546. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103546>
- Barone, G., O'Regan, J., Kelly, A. L., y O'Mahony, J. A. (2021). Calcium fortification of a model infant milk formula system using soluble and insoluble calcium salts. *International Dairy Journal*, 117, 104951. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104951>
- Barone, G., O'Regan, J., Kelly, A. L., y O'Mahony, J. A. (2022). Interactions between whey proteins and calcium salts and implications for the formulation of dairy protein-based nutritional beverage products: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 1254-1274. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12884>
- Barone, G., Yazdi, S. R., Lillevang, S. K., y Ahrné, L. (2021). Calcium: A comprehensive review on quantification, interaction with milk proteins and implications for processing of dairy products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(6), 5616-5640. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12844>
- Bauland, J., Gaucheron, F., y Croguennec, T. (2022). Milk salt composition, distribution and analysis. En *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 941-953). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00262-2>
- Begum, N. (2019). *Magnesium enrichment of skim milk* [Master degree Thesis]. Massey University.
- Bijl, E., de Vries, R., van Valenberg, H., Huppertz, T. y van Hooijdonk, T. (2014). Factors influencing casein micelle size in milk of individual cows: genetic variants

- and glycosylation of κ -casein. *International Dairy Journal*, 34(1), 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.08.001>
- Bijl, E., Huppertz, T., van Valenberg, H. y Holt, C. (2019). A quantitative model of the bovine casein micelle: ion equilibria and calcium phosphate sequestration by individual caseins in bovine milk. *European Biophysics Journal*, 48(1), 45-59. <https://doi.org/10.1007/s00249-018-1330-2>
- Blinov, A. V., Siddiqui, S. A., Nagdalian, A. A., Blinova, A. A., Gvozdenko, A. A., Raffa, V. V., Oboturova, N. P., Golik, A. B., Maglakelidze, D. G. e Ibrahim, S. A. (2021). Investigation of the influence of Zinc-containing compounds on the components of the colloidal phase of milk. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(7), 103229. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103229>
- Boiani, M., Fenelon, M., FitzGerald, R. J. y Kelly, P. M. (2018). Use of ^{31}P NMR and FTIR to investigate key milk mineral equilibria and their interactions with micellar casein during heat treatment. *International Dairy Journal*, 81, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.01.011>
- Bryant, C. M. y McClements, D. J. (2000). Influence of NaCl and CaCl₂ on cold-set gelation of heat-denatured whey protein. *Journal of Food Science*, 65(5), 801-804. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb13590.x>
- Corredig, M., Nair, P. K., Li, Y., Eshpari, H. y Zhao, Z. (2019). Invited review: understanding the behavior of caseins in milk concentrates. *Journal of Dairy Science*, 102(6), 4772-4782. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15943>
- Crowley, S. V., Kelly, A. L. y O'Mahony, J. A. (2014). Fortification of reconstituted skim milk powder with different calcium salts: Impact of physicochemical changes on stability to processing. *International Journal of Dairy Technology*, 67(4), 474-482. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12150>
- Dalgleish, D. G. (1984). Measurement of electrophoretic mobilities and zeta-potentials of particles from milk using laser Doppler electrophoresis. *Journal of Dairy Research*, 51(3), 425-438. <https://doi.org/10.1017/S0022029900023724>
- de Kort, E., Minor, M., Snoeren, T., van Hooijdonk, T. y van der Linden, E. (2011). Effect of calcium chelators on physical changes in casein micelles in concentrated micellar casein solutions. *International Dairy Journal*, 21(12), 907-913. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.06.007>
- de la Fuente, M. A. (1998). Changes in the mineral balance of milk submitted to technological treatments. *Trends in Food Science & Technology*, 9(7), 281-288. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00052-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00052-1)
- Deeth, H. C. y Lewis, M. J. (2015). Practical consequences of calcium addition to and removal from milk and milk products. *International Journal of Dairy Technology*, 68(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12188>
- Deeth, H. C. y Lewis, M. J. (2017). *High Temperature Processing of Milk and Milk Products*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118460467>
- Deeth, H. C. y Smithers, G. (2018). *Heat treatment of milk- overview*. IDF Factsheet; 001/2018/002. <https://fil-idf.org/wp-content/uploads/2018/02/Factsheet-001-Heat-treatment-1-1.pdf>
- Delboni, L. A. y Barroso da Silva, F. L. (2016). On the complexation of whey proteins. *Food Hydrocolloids*, 55, 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.010>
- Domellöf, M., Braegger, C., Campoy, C., Colomb, V., Decsi, T., Fewtrell, M., Hojsak, I., Mihatsch, W., Molgaard, C., Shamir, R., Turck, D. y van Goudoever, J. (2014). Iron requirements of infants and toddlers. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 58(1), 119-129. <https://doi.org/10.1097/MPG.000000000000206>
- Du, Z., Xu, N., Yang, Y., Li, G., Tai, Z., Li, N. y Sun, Y. (2023). Study on internal structure of casein micelles in reconstituted skim milk powder. *International Journal of Biological Macromolecules*, 224, 437-452. <https://doi.org/10.1016/j.ijbio-mac.2022.10.135>
- Dumpler, J. (2018). *Heat stability of concentrated milk systems*. Springer Fachmedien. <https://doi.org/10.1007/978-3-658-19696-7>
- Enax, J., Meyer, F., Schulze zur Wiesche, E. y Eppe, M. (2022). On the Application of calcium phosphate micro- and nanoparticles as food additive. *Nanomaterials*, 12(22), 4075. <https://doi.org/10.3390/nano12224075>
- Farrell, Jr., H. M., Kumosinski, T. F., Malin, E. L. y Brown, E. M. (2002). The caseins of milk as calcium-binding proteins. En H. J. Vogel, *Calcium-Binding Protein Protocols* (Vol. 172, pp. 097-140). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-183-3.097>
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. y O'Mahony, J. A. (2015). *Dairy chemistry and biochemistry*. Springer.
- France, T. C., Barone, G., O'Regan, J., Kelly, A. L. y O'Mahony, J. A. (2020). Physical and colloidal stability of conventional and micronised calcium citrate ingredient powders in the formulation of infant nutritional products. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 194, 111125. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111125>
- Francisquini, J. d'Almeida, Nunes, L., Martins, E., Stephani, R., Perrone, Í. T. y Carvalho, A. F. de. (2020). How the heat treatment affects the constituents of infant formulas: a review. *Brazilian Journal of Food Technology*, 23, e2019272. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.27219>
- Franzoi, M., Niero, G., Penasa, M., Cassandro, M. y De Marchi, M. (2018). Technical note: development and validation of a new method for the quantification of soluble and micellar calcium, magnesium, and potassium in milk. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 1883-1888. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13419>
- García Amezcua, A., Alting, A. y Huppertz, T. (2022). Disruption of casein micelles by calcium sequestering salts: from observations to mechanistic insights. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4252540>

- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, 45(4), 473-483. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005030>
- Gaucheron, F. (2011a). MILK SALTS | Distribution and analysis. En *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 908-916). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.000355-1>
- Gaucheron, F. (2011b). Milk and dairy products: a unique micronutrient combination. *Journal of the American College of Nutrition*, 30(sup5), 400S-409S. <https://doi.org/10.1080/07315724.2011.10719983>
- Gomez-Betancur, A. M., Carmona-Tamayo, R., Martínez-Álvarez, O. L., Casanova-Yepes, H. y Torres-Oquendo, J. D. (2022). Effect of fat substitution using long-chain inulin and fortification with microencapsulated calcium in the rheological and sensory properties of yogurt mousse. *Journal of Food Process Engineering*, 45(7), e13433. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13433>
- Guzun-Cojocar, T., Koev, C., Yordanov, M., Karbowski, T., Cases, E. y Cayot, P. (2011). Oxidative stability of oil-in-water emulsions containing iron chelates: transfer of iron from chelates to milk proteins at interface. *Food Chemistry*, 125(2), 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.004>
- Havea, P., Singh, H. y Creamer, L. K. (2002). Heat-induced aggregation of whey proteins: comparison of cheese wpc with acid WPC and relevance of mineral composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4674-4681. <https://doi.org/10.1021/jf011583e>
- Hettinga, K. y Bijl, E. (2022). Can recombinant milk proteins replace those produced by animals? *Current Opinion in Biotechnology*, 75, 102690. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102690>
- Hindmarsh, J. P. y Watkinson, P. (2017). Experimental evidence for previously unclassified calcium phosphate structures in the casein micelle. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 6938-6948. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12623>
- Holt, C., Dalgleish, D. G. y Jenness, R. (1981). Calculation of the ion equilibria in milk diffusate and comparison with experiment. *Analytical Biochemistry*, 113(1), 154-163. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90059-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90059-2)
- Holt, C., van Kemenade, M. J. M., Nelson, L. S., Sawyer, L., Harries, J. E., Bailey, R. T. y Hukins, D. W. L. (1989). Composition and structure of micellar calcium phosphate. *Journal of Dairy Research*, 56(3), 411-416. <https://doi.org/10.1017/S0022029900028880>
- Horne, D. S. (1998). Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, 8(3), 171-177. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00040-5)
- Huppertz, T. (2013). Chemistry of the Caseins. En P. L. H. McSweeney y P. F. Fox (Eds.), *Advanced dairy chemistry: Basic aspects* (4ª ed., pp. 135-160). Springer.
- Huppertz, T. y Fox, P. F. (2006). Effect of NaCl on some physico-chemical properties of concentrated bovine milk. *International Dairy Journal*, 16(10), 1142-1148. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.011>
- Huppertz, T., Fox, P. F. y Kelly, A. L. (2018). 3-The caseins: structure, stability, and functionality. En R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in Food Processing (Second Edition)* (pp. 49-92). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00004-8>
- Huppertz, T. y Lambers, T. T. (2020). Influence of micellar calcium phosphate on in vitro gastric coagulation and digestion of milk proteins in infant formula model systems. *International Dairy Journal*, 107, 104717. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104717>
- Huppertz, T. y Timmer, C. (2020). Salt equilibria in nutritional formulae for infants and young children. *International Dairy Journal*, 110, 104805. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104805>
- Jaiswal, P., Jha, S. N., Borah, A., Gautam, A., Grewal, M. K. y Jindal, G. (2015). Detection and quantification of soymilk in cow-buffalo milk using Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR). *Food Chemistry*, 168, 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.010>
- Jiménez-Barrios, P., Jaén-Cano, C. M., Malumbres, R., Cilveti-Vidaurreta, F., Bellanco-Sevilla, A., Miralles, B., Recio, I. y Martínez-Sanz, M. (2022). Thermal stability of bovine lactoferrin prepared by cation exchange chromatography and its blends with authorized additives for infant formulas. *LWT*, 154, 112744. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112744>
- Khalesi, M. y FitzGerald, R. J. (2022). Insolubility in milk protein concentrates: Potential causes and strategies to minimize its occurrence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(25), 6973-6989. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1908955>
- Kommineni, A., Sunkesula, V., Marella, C. y Metzger, L. E. (2022). Calcium-reduced micellar casein concentrate-physicochemical properties of powders and functional properties of the dispersions. *Foods*, 11(10), 1377. <https://doi.org/10.3390/foods11101377>
- Lenton, S., Wang, Q., Nylander, T., Teixeira, S. y Holt, C. (2020). Structural biology of calcium phosphate nanoclusters sequestered by phosphoproteins. *Crystals*, 10(9), 755. <https://doi.org/10.3390/cryst10090755>
- Lewis, M. J. (2011). 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>
- Li, R., Christine Jæger, T., Rovers, T. A. M., Svensson, B., Ipsen, R., Kirkensgaard, J. K. y Byggrå Hougaard, A. (2022). In situ SAXS study of non-fat milk model systems during heat treatment and acidification. *Food Research International*, 157, 111292. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111292>
- Loveday, S. M., Weeks, M., Luo, D. y Cakebread, J. (2021). Type A and B bovine milks:

- Heat stability is driven by different physicochemical parameters. *Journal of Dairy Science*, 104(11), 11413-11421. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20201>
- Lucey, J. A. y Fox, P. F. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. *Journal of Dairy Science*, 76(6), 1714-1724. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77504-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77504-9)
- Lucey, J. A. y Horne, D. S. (2022). Milk salts: technological significance. En P. L. H. McSweeney, J. A. O'Mahony, & A. L. Kelly (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry* (pp. 297-338). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-92585-7_8
- Luo, M., Xiao, J., Sun, S., Cui, F., Liu, G., Li, W., Li, Y., y Cao, Y. (2020). Deciphering calcium-binding behaviors of casein phosphopeptides by experimental approaches and molecular simulation. *Food & Function*, 11(6), 5284-5292. <https://doi.org/10.1039/D0FO00844C>
- Lyster, R. L. J. (1981). Calculation by computer of individual concentrations in a simulated milk salt solution: II. An extension to the previous model. *Journal of Dairy Research*, 48(1), 85-89. <https://doi.org/10.1017/S002202990002149X>
- Markoska, T., Huppertz, T., Grewal, M. K. y Vasiljevic, T. (2019). FTIR analysis of physiochemical changes in raw skim milk upon concentration. *LWT*, 102, 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.011>
- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytė, M., Pica, V. y De Noni, I. (2020). Analytical advances in the determination of calcium in bovine milk, dairy products and milk-based infant formulas. *Trends in Food Science & Technology*, 103, 348-360. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.013>
- McCarthy, N. A., Kelly, A. L., O'Mahony, J. A. y Fenelon, M. A. (2013). The physical characteristics and emulsification properties of partially dephosphorylated bovine β -casein. *Food Chemistry*, 138(2), 1304-1311. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.080>
- McCarthy, N. A., Magan, J. B., Kelleher, C. M., Kelly, A. L., O'Mahony, J. A. y Murphy, E. G. (2022). Heat treatment of milk: effect on concentrate viscosity, powder manufacture and end-product functionality. *International Dairy Journal*, 128, 105289. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105289>
- Mekmene, O., Le Graët, Y. y Gaucheron, F. (2009). A model for predicting salt equilibria in milk and mineral-enriched milks. *Food Chemistry*, 116(1), 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.039>
- Münchbach, M. y Gerstner, G. (2010). Calcium fortification in dairy products. *Food Marketing and Technology*, 24, 4-8.
- Nieuwenhuijse, H. y Huppertz, T. (2022a). Milk salts: interaction with caseins. En *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 54-960. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00279-8>
- Nieuwenhuijse, H. y Huppertz, T. (2022b). Heat-induced changes in milk salts: a review. *International Dairy Journal*, 126, 105220. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105220>
- Noeparvar, P. (2018). *Development of a computational framework for the prediction of free-ion activities ionic equilibria and solubility in dairy liquids* [Ph. D. Thesis]. University of Canterbury.
- O'Mahony, J. A. y Fox, P. F. (2014). Milk: an overview. En *Milk Proteins*, 19-73. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405171-3.00002-7>
- On-Nom, N., Grandison, A. S. y Lewis, M. J. (2012). Heat stability of milk supplemented with calcium chloride. *Journal of Dairy Science*, 95(4), 1623-1631. <https://doi.org/10.3168/jds.2011.4697>
- Perego, S., Favero, E. D., Luca, P. D., Piaz, F. D., Fiorilli, A., Cantu', L. y Ferraretto, A. (2015). Calcium bioaccessibility and uptake by human intestinal like cells following in vitro digestion of casein phosphopeptide-calcium aggregates. *Food & Function*, 6(6), 1796-1807. <https://doi.org/10.1039/C4FO00672K>
- Philippe, M., Le Graët, Y. y Gaucheron, F. (2005). The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles. *Food Chemistry*, 90(4), 673-683. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.001>
- Pierre, A., Brule, G. y Fauquant, J. (1983). Etude de la mobilité du calcium dans le lait à l'aide du calcium 45. *Le Lait*, 63(633-634), 473-489. <https://doi.org/10.1051/lait:1983633-63430>
- Ramasubramanian, L., D'Arcy, B. R., Deeth, H. C. y Oh, H. E. (2014). The rheological properties of calcium-induced milk gels. *Journal of Food Engineering*, 130, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.01.020>
- Rana, B., Kaushik, R., Kaushal, K., Arora, S., Kaushal, A., Gupta, S., Upadhyay, N., Rani, P. y Kaushik, P. (2018). Physicochemical and electrochemical properties of zinc fortified milk. *Food Bioscience*, 21, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.12.008>
- Raouche, S., Dobenesque, M., Bot, A., Lagaude, A. y Marchesseau, S. (2009). Casein micelles as a vehicle for iron fortification of foods. *European Food Research and Technology*, 229(6), 929-935. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1130-0>
- Rodzic, A., Król-Górniak, A., Railean, V., Sugajski, M., Gołębiowski, A., Horne, D. S., Michalke, B., Sprynskyy, M., Pomastowski, P. y Buszewski, B. (2023). Study on zinc ions binding to the individual casein fractions: AS1-, β - and κ -casein. *Journal of Molecular Structure*, 1272, 134251. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134251>
- Rose, D. (1962). Factors affecting the heat stability of milk. *Journal of Dairy Science*, 45(11), 1305-1311. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(62\)89617-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(62)89617-9)
- Singh, G., Arora, S., Sharma, G. S., Sindhu, J. S., Kansal, V. K. y Sangwan, R. B. (2007). Heat stability and calcium bioavailability of calcium-fortified milk. *LWT* -

- Food Science and Technology*, 40(4), 625-631. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.03.009>
- Singh, H. y Li, S. (2022). Functional properties of caseins and whey proteins. En P. L. H. McSweeney y J. P. McNamara (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition)*, 579-585. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00250-6>
- Singh, J., Prakash, S., Bhandari, B. y Bansal, N. (2019). Comparison of ultra high temperature (UHT) stability of high protein milk dispersions prepared from milk protein concentrate (MPC) and conventional low heat skimmed milk powder (SMP). *Journal of Food Engineering*, 246, 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.11.003>
- Tanguy, G., Dolivet, A., Garnier-Lambrouin, F., Méjean, S., Coffey, D., Birks, T., Jeantet, R. y Schuck, P. (2015). Concentration of dairy products using a thin film spinning cone evaporator. *Journal of Food Engineering*, 166, 356-363. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.001>
- van der Schaaf, J. M., Crowley, S. V., Kelly, A. L. y O'Mahony, J. A. (2022). Fractionated casein ingredients - β -Casein. En *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 31-39. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00180-X>
- Walstra, P., Jenness, R. y Badings, H. T. (1984). *Dairy chemistry and physics*. Wiley.
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. M. y Geurts, T. J. (2005). *Dairy Science and Technology, Second Edition*. Taylor & Francis.
- Wang, Q. y Ma, Y. (2020). Effect of temperature and pH on salts equilibria and calcium phosphate in bovine milk. *International Dairy Journal*, 110, 104713. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104713>
- Wang, Q. y Ma, Y. (2022). Characterization of calcium phosphate nanoparticles sequestered by phosphopeptides in response to heat treatment. *LWT*, 167, 113816. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113816>
- Wu, S., Li, G., Xue, Y., Ashokkumar, M., Zhao, H., Liu, D., Zhou, P., Sun, Y. y Hemar, Y. (2020). Solubilisation of micellar casein powders by high-power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 67, 105131. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105131>
- Wulansari Sugianto, M. (2004). *Studies on the Binding of Iron and Zinc to Milk Protein Products* [PhD Thesis]. Massey University.
- Yoo, S.-H., Kang, S.-B., Park, J.-H., Lee, K.-S., Kim, J.-M. y Yoon, S.-S. (2013). Effect of heat-treat methods on the soluble calcium levels in the commercial milk products. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 33(3), 369-376. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2013.33.3.369>
- Zhang, Z. P. y Aoki, T. (1996). Behaviour of calcium and phosphate in bovine casein micelles. *International Dairy Journal*, 6(8), 769-780. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(96\)00006-4](https://doi.org/10.1016/0958-6946(96)00006-4)