

Estudio para la mejora de la elaboración y conservación de leche de almendra

B. Rodríguez ^{a,b}, I. Fernández-Pan ^b, T. Mizote ^a, J.I. Maté ^b

^a Food Technology Department, Universidad Pública de Navarra, Campus Arrosadía s/n, 31006 Pamplona, Spain.

^b Department of Human Nutrition, Yamaguchi Prefectural University, 〒753-0021 山口県山口市桜島3丁目2-1, Japan.

ARTICLE INFO

Keywords:

Almond milk
Dairy free
Freeze drying
Nutritional content
Emulsion's stability

Abreviaturas: L1: leche Universidad Prefectural de Yamaguchi; L2: leche Universidad Pública de Navarra; LL: leche liofilizada; LA: leche atomizada; LLRUT: leche liofilizada reconstituida por Ultra-Turrax; LLRUS: leche liofilizada reconstituida por ultrasonidos; LARUS: leche atomizada reconstituida por ultrasonidos; LC1: Leche comercial Mandorla; LC2: Leche comercial Almendrola; AH: almendra hidratada.

ABSTRACT

In the last years the consumption of dairy-free products has increased meaningfully. However, they still show some limitations in fully replacing dairy products due to a high glycemic index, low protein content or inappropriate sensory properties. The present study has established a new protocol for the elaboration of almond milk, free of artificial additives, with a high lipid, protein and fiber content, and maintaining its stability over five days. Almond milk was subjected to different conservation and reconstitution processes, studying its stability and physicochemical properties. It has been determined that the combination of freeze drying as a preservation method, plus a reconstitution process by ultrasounds, allows to obtain an almond milk physically stable over thirteen days, keeping its initial optical and nutritional properties.

1. Introducción

En los últimos años la creciente demanda por parte de los consumidores de productos saludables y el aumento de enfermedades relacionadas con el consumo de ciertos alimentos ha creado la necesidad de producir nuevos productos alimentarios (Swieca, Seczyk, Gawlik-Dziki, & Dziki, 2015). Del conjunto de enfermedades adversas vinculadas a los alimentos, son las relacionadas con la leche de vaca las que tienen una mayor prevalencia, alcanzando a una gran parte de la población mundial (Caffarelli et al., 2010).

El consumo de productos “dairy free” ha aumentado a nivel mundial en los últimos años, este incremento ha sido más importante en EEUU creciendo alrededor de un 20 % desde 1997 (Carmona, 2013; Adhikari, Dooley, Chambers, & Bhumiratana, 2010). Actualmente,

existen numerosas alternativas a la leche de vaca a partir de cereales, legumbres o frutos secos, sin embargo, existen limitaciones para su total remplazo debido a su alto índice glucémico (Mendoza, 2008) o a un bajo contenido en proteínas (Mäkinen, Uniacke-Lowe, O'Mahony, & Arendt, 2015). Del mismo modo, la mayoría de estos productos no son aceptados por los consumidores, que rechazan algunas de sus propiedades sensoriales como el color o el sabor muy alejadas del producto originario (Onning et al., 1999; Tarantola & Wujastyk, 2009). Así pues, es necesario buscar nuevas alternativas a los productos sustitutivos existentes, que no causen efectos adversos en la población y que posean un mejor contenido nutricional y unas características tecnológicas y sensoriales apropiadas.

Aunque la leche de soja es la más popular entre las leches vegetales debido a su alto contenido en proteína, el 60 % de las personas que son susceptibles a la leche de vaca también lo son a la de soja (Zeiger et al., 1999). La leche de almendra supone una alternativa potencial debido a su alto contenido en proteínas y grasas (Jenkins et al., 2002), de las cuales un 90 % están constituidas por ácidos grasos insaturados (ácido oleico y linoleico) (Maguire, O'Sullivan, Galvin, O'Connor, & O'Brien, 2004). Además, contiene fibra, vitamina E y minerales (fósforo y potasio) (Luengo, 2009), posee demostrados beneficios para la salud (Chen, Lapsley, & Blumberg, 2006) y presenta unos índices de alergia e intolerancia reducidos (Sampson 2004).

La leche de almendra es una dispersión coloidal obtenida de la trituración de almendras en agua, cuya fase dispersa está compuesta principalmente por lípidos, proteínas y fibra. La complejidad de esta dispersión dificulta la obtención de un producto estable durante su almacenamiento, incluso para un periodo corto de tiempo. Es necesario incluir una etapa de homogenización durante el proceso de elaboración que asegure su estabilidad y aumente su vida útil. (Toro, Bosch, Veciana, & Vidal, 2014). Generalmente, esta problemática es solventada adicionando emulsificantes y otros aditivos; sin embargo, recientes estudios han demostrado que las proteínas vegetales pueden actuar como emulsificantes en los tratamientos de homogeneización por ultrasonidos, aumentando la estabilidad de las emulsiones (O'Sullivan, Murray, Flynn, & Norton, 2015).

Tradicionalmente, la leche de almendra se ha comercializado en estado líquido sometida a tratamientos de esterilización UHT, los cuales modifican las características nutricionales y sensoriales del producto (Toro et al., 2014). Como alternativa a este proceso, se plantea la conservación de la leche mediante dos procesos de deshidratación distintos: liofilización y atomización. El tratamiento de liofilización emplea mecanismos de sublimación del hielo a baja presión, mientras que la atomización elimina el contenido en agua a través de una rápida vaporización gota a gota a altas temperaturas (Karel & Lund, 2003). Asimismo, la liofilización impide la supervivencia de levaduras

y bacterias y conserva el sabor y la apariencia inicial al reintroducir el agua en los alimentos (Verma & Vir, 2013), mientras que la atomización es un proceso con un coste mucho más reducido y en menor tiempo (Tamime, 2009). Además, la elaboración de este tipo de alimentos, permite una reducción de costes de transporte y almacenamiento, no requiriendo refrigeración para su conservación.

El objetivo de este Proyecto Fin de Máster es establecer un protocolo para la elaboración de leche de almendra libre de aditivos artificiales, y proponer un método para su conservación mediante métodos no convencionales que facilite su posterior uso. Asimismo, realizar una caracterización nutricional y físico-química y determinar su estabilidad.

2. Material y métodos

2.1. Elaboración de leche de almendra

En la Universidad Prefectural de Yamaguchi (YPU) se estableció un protocolo para la elaboración de leche de almendra (L1), para el cual se utilizaron almendras naturales cuyo proveedor fue D & S Ranches (California, EEUU). Como materia prima, se hidrataron 500 gramos de almendra en agua destilada a 20 °C durante 12 horas, se pelaron y picaron manualmente y finalmente se liofilizaron. La almendra resultante, se almacena en un desecador con un contenido en humedad del 0 % hasta su posterior uso.

Para la obtención de leche de almendra se trituraron mediante mortero 10 gramos de almendra liofilizada, se tamizaron ($\varnothing = 500 \mu\text{m}$) y se mezclaron con 100 ml de agua destilada a 60 °C. Se homogeneizó la mezcla mediante Ultra-Turrax T-25 basic (IKA-Werke; Staufen, Alemania) a 10000 rpm durante 2 min, se comprimió mediante un filtro de papel y se filtró por medio de un tamiz metálico ($\varnothing 106 \mu\text{m}$). Finalmente, se homogeneizó por ultrasonidos Taitec VP-050 (Taitec; Nishikata, Japón), con sonotrodo H7, amplitud del 100 % y un ciclo discontinuo 0,9:0,1 durante 5 minutos. Se determinó el rendimiento del proceso (% masa final/masa inicial) y se conservó la leche resultante a 5 °C hasta su posterior uso. Este proceso se realizó por triplicado.

El protocolo desarrollado en la YPU fue mejorado en la Universidad Pública de Navarra (UPNA). La liofilización inicial de las almendras fue considerada una etapa innecesaria para el objeto de estudio, por lo que se omitió esta etapa.

Para la elaboración de leche de almendra (L2), se emplearon 10 gramos de almendra natural, mezcla de las variedades Carmel y Monterrey, suministradas por Importaco Casa Pons S.A. (California, EEUU), las cuales fueron hidratadas, peladas y picadas en las mismas condiciones establecidas en el protocolo desarrollado en la YPU. Se añadieron 100 ml de agua destilada y se homogeneizaron mediante Ultra - Turrax a 22000 rpm durante 2 minutos. Estas condiciones de homogeneización fueron establecidas después de realizar un diseño factorial variando los factores de tiempo y velocidad (Tabla 1).

Tabla 1

Diseño factorial para homogeneización por Ultra – Turrax

Velocidad (rpm)	Tiempo (min)
11000	2
11000	4
16000	2
16000	4
22000	2

Posteriormente, se realizó una compresión con tela de liencillo, se filtró mediante un tamiz metálico ($\emptyset = 150 \mu\text{m}$) y se homogeneizó por ultrasonidos UP400S (Hielscher; Teltow, Alemania), sonotrodo H7, amplitud del 100 % y ciclo continuo durante 5 minutos. Se determinó el rendimiento del proceso (% masa final/masa inicial) y se conservó la leche resultante a 5 °C hasta su posterior uso. Este proceso se realizó por triplicado.

2.2. Tratamientos de conservación

2.2.1. Liofilización y proceso de reconstitución

Se realizó un tratamiento de conservación de L2 mediante liofilización, Lyobeta 25 (Telstar; Terrasa, España), a una temperatura de congelación de -45 °C y una presión de vacío de 0,25 mbar. Se determinó el rendimiento del

proceso en peso (% pérdida de peso en base seca) y la pérdida de volumen (% volumen final/volumen inicial). La leche de almendra liofilizada (LL) se conservó en un desecador a una humedad relativa del 0 % hasta su posterior uso. Este proceso se realizó por triplicado.

Para su reconstitución, se emplearon 10 gramos de LL y se mezclaron con 100 ml de agua destilada. Se realizó una dispersión mediante Ultra-Turrax durante 1 minuto a 11 000 rpm y se homogeneizó durante 5 min por dos procesos diferentes: Ultra-Turrax a 22000 rpm (LLRUT) y ultrasonidos con sonotrodo H7, amplitud del 100 % y ciclo continuo (LLRUS). Las leches de almendra resultantes se conservaron a 5 °C hasta su posterior uso.

2.2.2. Atomización y proceso de reconstitución

Se realizó un tratamiento de conservación de L2 por atomización, empleando un pulverizador Mini Spray Dryer B-191 (Büchi; Flawil, Suiza), con una aspiración del 100 %, flujo de bomba del 15 % y temperatura de secado de 180 °C. Se cuantificó el rendimiento del proceso (% pérdida de peso en base seca) y se conservó la leche de almendra atomizada (LA) en un desecador a una humedad relativa del 0 % hasta su posterior uso. Debido al bajo rendimiento obtenido, este proceso se realizó una única vez.

Para su reconstitución, se empleó 1 gramo de LA que se mezcló con 10 ml de agua destilada. Se realizó una dispersión mediante Ultra-Turrax durante 1 minuto a 11000 rpm y se homogeneizó por ultrasonidos con sonotrodo H7, amplitud del 100 % y ciclo continuo. La leche de almendra resultante (LARUT) se conservó a 5 °C hasta su posterior uso.

2.3. Caracterización nutricional

Se realizó un análisis nutricional de la almendra hidratada (AH) y L2 cuantificando el contenido en humedad, lípidos, proteínas, fibra, cenizas y azúcar. Todos los análisis se realizaron por triplicado. No se analizó la composición nutricional de LLRUT, LLRUS y LARUS, ya que se asumió que los procesos de conservación y reconstitución empleados no modificaban el contenido de los compuestos analizados.

2.3.1. Humedad

Se determinó el contenido en humedad según el método oficial de la AOAC 925.40. Para ello se pesaron 2 gramos de muestra y se colocaron en una estufa a una temperatura de 105 °C hasta alcanzar peso constante. A continuación se introdujeron en un desecador y una vez enfriadas se pesaron. El contenido en humedad se determinó mediante la Ecuación 1.

$$\text{Humedad } \% = \left(\frac{m_o - m_f}{m_o} \right) \times 100 \quad (1)$$

Donde m_o representa el peso inicial de la muestra y m_f el peso final.

2.3.2. Lípidos

Se cuantifico el contenido en lípidos según el método oficial de la AOAC 948.22. Para ello, se realizó un pretratamiento deshidratando las almendras por medio de una estufa a una temperatura de 105 °C durante 24 horas y posteriormente pulverizadas mediante mortero. Asimismo, se liofilizó L2, a una temperatura de congelación de -45 °C y una presión de vacío de 0,25 mbar. Las muestras resultantes se conservaron en un desecador con una humedad del 0 % hasta su posterior uso.

Para cuantificar el contenido en lípidos, se empleó un equipo de extracción Soxhlet compuesto por un balón de 250 ml, un cuerpo extractor, refrigerante y éter de petróleo como disolvente orgánico.

Se pesaron 5 gramos de la muestra y se introdujeron en un cartucho de celulosa el cual a su vez fue introducido en el cuerpo extractor. El proceso de extracción tuvo una duración de 8 horas, y a su finalización se colocó el balón en una estufa a una temperatura de 105 °C durante 12 horas para eliminar los restos de disolvente. Finalmente, se introdujo la muestra en un desecador y una vez alcanzada la temperatura ambiente se pesó. El contenido en lípidos se determinó mediante la Ecuación 2.

$$\text{Lípidos } \% = \left(\frac{m_f - m_o}{m} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde m_o representa el peso inicial del balón, m_f es el peso del mismo tras la extracción, y m es el peso de la muestra.

2.3.3. Proteínas

Se determinó el contenido en proteína según el método Kjeldahl que cuantifica el contenido en nitrógeno de la muestra. Para ello, AH y L2 fueron sometidas a un pretratamiento detallado en el apartado 2.3.2. El método Kjeldahl consta de tres etapas:

Digestión

Se introdujeron en un tubo de mineralización 0,1 gramos de muestra junto a 15 ml de H_2SO_4 al 96 % y 9,42 g de catalizador. Seguidamente se colocaron los tubos en el equipo de digestión a 410 °C durante 70 min aproximadamente, hasta adquirir un color verde esmeralda característico.

Destilación

Una vez enfriada la muestra, se añadieron 50 ml de agua destilada y se introdujo en la unidad de destilación. Se adicionaron 45 ml de hidróxido sódico 10 N, produciéndose una alcalinización de la muestra digerida y liberándose el nitrógeno en forma de amoníaco. Éste fue recogido en una solución de ácido bórico al 4 % e indicador mixto.

Valoración

La cuantificación del nitrógeno se realizó por medio de una valoración ácido-base empleando ácido sulfúrico 0,1 N. Los equivalentes de ácido que fueron consumidos corresponden a los equivalentes de amoníaco que fueron destilados (Ecuación 3).

$$N \% = \left(\frac{\text{ml } H_2SO_4 \text{ m} - \text{ml } H_2SO_4 \text{ b}}{\text{peso muestra (mg)}} \times N H_2SO_4 \times 1,4007 \right) \quad (3)$$

Para calcular el porcentaje de proteína de la muestra analizada, se multiplico el porcentaje de nitrógeno por un factor de conversión $K = 5,18$ (Método oficial de la AOAC 950.48).

2.3.4. Fibra

Se cuantificó el contenido en fibra dietética total (TDF) según los métodos oficiales de la AOAC 985.29 y 960.52, mediante un kit de ensayo TDF-100A (Sigma-Aldrich; Saint Louis, USA). Para ello, AH y L2 fueron previamente desgrasadas según el método detallado en el apartado 2.3.2.

Se analizó 1 gramo de muestra, el cual fue sometido a una digestión enzimática. Después, se añadió etanol al 95 % y se dejó la muestra a temperatura ambiente durante 12 horas para que precipitase. Se filtró con etanol y acetona y se secaron los residuos obtenidos durante 12 horas a una temperatura de 105 °C. Por último, se introdujeron estos residuos en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se determinó su contenido en proteína y en cenizas (2.3.3 y 2.3.4). El contenido en TDF se determinó según la Ecuación 5:

$$\% TDF = \frac{R-P-A-B}{SW} \times 100 \quad (5)$$

Donde R representa el peso de residuo, P es el peso de proteína, A es el peso de ceniza y B es el peso del blanco.

2.3.5. Cenizas

Se cuantificó el contenido en cenizas según el método oficial de la AOAC 950.49. Para ello, AH y L2 fueron sometidas a un pretratamiento detallado en el apartado 2.3.2.

Se colocaron 5 g de muestra en un crisol y se introdujeron en un horno de mufla (Heron HK-11) a una temperatura de 550 °C durante 5 horas. A continuación se introdujeron las muestras en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesaron. El contenido en cenizas se realizó según la Ecuación 4.

$$\text{Cenizas \%} = \left(\frac{m_f - m_c}{m_o} \right) \times 100 \quad (4)$$

Donde m_c representa el peso del crisol, m_f es el peso del crisol con la muestra calcinada, y m_o es el peso del crisol con la muestra inicial.

2.3.6. Azúcar

El contenido en azúcar se cuantificó mediante un refractómetro de digital automático RX-7000α (ATAGO CO; Tokio, Japón) con un rango de medición de 0,0 a 100,0 °Brix.

2.4. Caracterización física y estructural

2.4.1. Propiedades ópticas

Se determinaron las propiedades ópticas de L2, LL, LA, LLRUT, LLRUS y LARUT mediante un espectrofotómetro portátil CM-2500d (MINOLTA Co, Osaka, Japón). Los parámetros de color fueron obtenidos utilizando el espacio CIE $L^*a^*b^*$, un observador de 10° y un iluminante D65.

La caracterización se realizó mediante los siguientes parámetros: L^* (claridad), a^* (valores negativos corresponden al color verde y positivos al rojo), b^* (valores negativos corresponden al azul y valores positivos al amarillo), C^* (croma o saturación), h° (tono o viveza del color) e WI (índice de blancura) empleando las Ecuaciones 6, 7 y 8. Asimismo, se determinó la diferencia de color (ΔE) entre L2 y LALRUT, LALRUS y LAARUS según la Ecuación 9.

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (6)$$

$$h_{ab^*} = \arctan \frac{b^*}{a^*} \quad (7)$$

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (8)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (9)$$

Se realizaron 3 mediciones en cada una de las muestras obteniendo finalmente su valor medio. Éste análisis se realizó por triplicado.

2.4.2. pH y densidad

Se cuantificó el pH de L1, L2, LLRUT, LLRUS y LARUS mediante un pH-metro Basic 20 (Crison Instruments S.A.; Barcelona, España). Para la determinación de la densidad se empleó un densímetro manual de escala 1000 - 1100 kg/m³ (PROTON). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.4.3. Distribución del tamaño de partícula y ζ -potencial

Para la determinación de la distribución del tamaño de partícula y ζ -potencial de L2, LLRUT, LLRUS y LARUS se empleó un difractor láser Mastersizer (Malvern Instruments Ltd; Worcestershire, UK). Para ello, se empleó un índice de refracción de 1,46 y una absorción de 0,1. Debido a la alta concentración de la

muestra, se realizó una dilución de 0,1 ml en 20 ml de agua destilada.

Se realizaron 3 mediciones en cada una de las muestras obteniendo finalmente su valor medio. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.4.4. Estabilidad coloidal

2.4.4.1. Estabilidad en almacenamiento. Se determinó la estabilidad en condiciones de almacenamiento a 5 °C y 20 °C. Para ello se introdujeron 2 muestras de 10 ml cada una en tubos de ensayo y se cuantificó el índice de cremado (IC) y el índice de sedimentación (IS) (Ecuación 10 y 11). Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

$$IC = \frac{h_c}{h_t} \times 100 \quad (10)$$

$$IS = \frac{h_s}{h_t} \times 100 \quad (11)$$

Donde h_c representa la altura de cremado, h_s es la altura de sedimentación y h_t es la altura total.

2.4.4.1. Estabilidad en condiciones forzadas. Se determinó la estabilidad en unas condiciones de 1500 × g a 20 °C durante 45 min empleando una centrífuga 7780 (KUBOTA corporation; Tokio, Japón) en la YPU y Medifriger-BLS (Selecta; Abrera, Barcelona) en la UPNA. Para ello, se introdujeron por triplicado 20 ml en tubos de ensayo de 25 mm de diámetro. Finalizado el tratamiento, se cuantificó el volumen de cremado (ml cremado/ml totales), se retiró la parte líquida y se cuantificaron los sedimentos (mg sedimentos/mg totales).

2.5. Caracterización y análisis de leche de almendra comercial.

Como referencia comercial se seleccionaron y caracterizaron (pH, color y densidad) dos marcas de leche de almendra UHT: Mandorla Original (LC1) suministrada por Ecomil Nutriops S.L y Almendrola Original (LC2) suministrada por Liquats Vegetals S.A.

2.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza simple con un intervalo de confianza del 95 % utilizando el programa estadístico Stagraphics (Warrenton, Virginia, USA).

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización de L1

Siguiendo el protocolo de elaboración establecido en la YPU, se obtuvieron 95,4 ml de L1, con un rendimiento del proceso de elaboración del 86,7 % y pH 6,5. En condiciones de almacenamiento a 5 °C, presentó separación de fases a las 48 horas de su elaboración con un IC del 3 % y un IS del 2,1 %, mientras que a 20 °C fue inestable a las 24 horas presentando valores del 28,1 % y 6,1 % respectivamente. En condiciones de estrés, presentó un IC del 5,1 % y un IS del 0,8 %.

3.2. Conservación y reconstitución de L2

En la UPNA se mejoró el protocolo establecido en la YPU, obteniéndose 95,8 ml de leche de almendra (L2), con un rendimiento del proceso de elaboración del 87,1 %.

3.2.1. Liofilización

La conservación de L2 por liofilización tuvo un rendimiento del 85 % y una disminución del volumen inicial del 23,1 %. La leche de almendra resultante (LL), con un contenido en humedad de 5,2±0,2 %, consistía en una lámina blanca continua y porosa con unos parámetros de color $L^* = 93,1 \pm 0,1$; $C^* = 11,4 \pm 0,0$; $h^\circ = 92,8 \pm 0,0$ y $W.I = 86,7 \pm 0,1$. La manipulación de LL producía su desmenuzamiento en copos (flakes), asimismo, debido a su carácter higroscópico, fue conservada en unas condiciones de baja humedad para evitar que se rehidratara.

3.2.2. Atomización

El proceso de conservación de L2 por atomización tuvo un rendimiento del 3,2 %. La leche de almendra resultante (LA), con un contenido en humedad de 3,6 %, era de aspecto pulverulento y color blanco, con unos parámetros de color $L^* = 90,89 \pm 0,05$; $C^* = 8,82 \pm 0,02$; $h^\circ = 89,20 \pm 0,10$ y $W.I = 87,32 \pm 0,05$. En el colector de recogida de LA se detectaron pequeños

aglomerados blancos, pudiendo ser debidos a su carácter higroscópico, por lo que fue conservada en unas condiciones de baja humedad.

Durante el proceso de atomización, se observó gran parte de la muestra adherida a las paredes del ciclo de recuperación, donde las altas temperaturas del proceso pudieron causar reacciones de Maillard confiriéndole un color pardo-amarillento sin llegar a alcanzar el colector. El bajo rendimiento del tratamiento de conservación, imposibilitó la realización de aquellos análisis en los que se requirió una cantidad de muestra superior a la que se disponía.

3.3. Composición química/nutricional

En la Tabla 2 aparece reflejado al análisis nutricional de AH y L2 observándose la evidente diferencia en su contenido en materia seca (MS). El contenido en lípidos fue el mayoritario en ambos superando el 50 %, seguido de proteínas (23,53 % y 25,95 % respectivamente) y fibra (12,74 % y 11,07 %). El contenido en cenizas y azúcar fue muy inferior, no superando el 5 %. Asimismo, se observó como la filtración durante el proceso de elaboración de la leche de almendra retuvo una mayor proporción de fibra y cenizas respecto al resto de nutrientes.

Tanto AH como L2 poseen un alto contenido en lípidos, de los cuales según Gallier, Gordon, & Singh, 2012, un 91,33 % corresponderían a ácidos grasos insaturados (66,58 % de ácido oleico y 24,34 % de ácido linoleico). Si se compara la composición nutricional de AH (Tabla 2) con los resultados obtenidos por Yada, Huang, & Lapsley, 2013, el contenido en lípidos, proteínas, cenizas y azúcar obtenido fue ligeramente superior (52,24-51,40 %; 21,06-22,16 %; 3,02-3,12 % y 3,55-3,85 % respectivamente), mientras que el contenido en fibra se encontró dentro del rango de valores proporcionados (13,03-12,28 %).

El contenido nutricional de L2 es similar al obtenido por Bernat, Cháfer, & Rodríguez-García, 2015 (59,64 % lípidos, 20,63 % proteínas, 8,73 % fibra, 0,45 % azúcar, 4,89 % ceniza.) Asimismo, este análisis pone de manifiesto las diferencias nutricionales existentes con las leches de almendra

comerciales (LC1 Y LC2), presentando un mayor contenido en lípidos, proteínas y fibra (hasta 6 veces más) y un contenido en azúcar despreciable.

Tabla 2

Composición nutricional (g/100 g) de AH y L2. Valor medio y desviación estándar (n=3).

Composición (g/100 g)	AH	L2
Materia seca	69,25±0,03 ^b	5,78±0,01 ^a
Lípidos (% MS)	53,44±0,12 ^a	59,17±0,03 ^b
Proteínas (% MS)	23,53±0,12 ^a	25,95±0,05 ^b
Fibra (% MS)	12,74±0,09 ^b	11,07±0,01 ^a
Azúcar (% MS)	4,04±0,27 ^b	< 0,40 ^a
Cenizas (% MS)	3,19±0,10 ^b	2,77±0,00 ^a

^{a, b} Diferentes letras en una misma fila indican diferencias significativas entre muestras para un nivel del 95 % de confianza.

3.4. Color

En la Tabla 3 aparecen reflejados los valores L*, C*, h°, WI y ΔE para la leche de almendra (L2) y las leches reconstituidas por distintos métodos de conservación (LLRUT, LLRUS y LARUS).

Los tratamientos de conservación y reconstitución influyeron significativamente en los parámetros de color ($p < 0,05$), estableciéndose cuatro grupos. Para L* y WI, con un rango de 0 a 100 (color blanco), LLRUS presentó los valores más elevados (89,1 y 87,3 respectivamente) mientras que los valores más pequeños correspondieron a LLRUT seguida de LARUS.

Para el parámetro C*, cuyo rango es de 0 a 100, todos presentaron valores muy bajos, siendo el más pequeño para L2 (5,0) y el más alto para LLRUT (8,5). El tono, con rango de 0° a 360°, se situó en todos los casos en el segundo cuadrante, obteniendo el ángulo más elevado para L2 (102,1°).

La diferencia de color entre L2 y LLRUS y LARUS fue poco representativa, sin embargo si se observaron diferencias respecto a LLRUT obteniendo un valor de ΔE superior a 3, a partir del cual las diferencias de color pueden ser detectadas con facilidad por el ojo humano (Francis, 1983).

El índice de blancura (WI) de las cuatro muestras fue superior a los presentados por las leches comerciales, LC1 (69,80) y LC2 (82,01).

3.5. pH y densidad

El proceso de conservación y reconstitución influyó significativamente en el pH de la leche ($p < 0,05$) estableciéndose tres grupos L2, LLRUT y LLRUS-LARUS (Tabla 3). A pesar de estas diferencias, todas las muestras presentaron un pH poco ácido e inferior a la leche comercial LC1 (6,6). y LC2 (7,7).

L2 presentó una densidad de $1000,5 \text{ kg/m}^3$, mientras que todas las leches reconstituidas obtuvieron un valor de 1006 kg/m^3 . De este modo, se observaron diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$) estableciéndose ambos grupos (Tabla 3). Estos valores están muy alejados de los que presentaron la leche comercial. LC1 y LC2 ($1027,1$ y $1033,8 \text{ kg/m}^3$).

3.6. Estabilidad Física

3.6.1. Distribución del tamaño de partícula

Los tratamientos de conservación y reconstitución influyeron significativamente en el tamaño medio de partícula ($p < 0,05$). Asimismo, las leches reconstituidas presentaron una desviación superior a la de L2 (Tabla 4).

LARUS, con un tamaño de partícula de $412,8 \text{ nm}$, se reconstituyó con un mayor contenido de fase continua (1:100), lo que pudo influir en la reducción de su tamaño. L2 presentó un tamaño de partícula de $558,5 \text{ nm}$ seguida de LLRUS con $Z = 643,8 \text{ nm}$. Por el contrario, LLRUT con un tamaño de partícula de $917,8 \text{ nm}$ presentó el valor más elevado.

En la Figura 1 aparecen representadas las curvas de distribución del tamaño de partícula para L2, LLRUT, LLRUS y LARUS. En todas ellas, las curvas indican que todas las muestras son emulsiones polidispersas, con una distribución monomodal y picos bien definidos. L2 presenta un segundo pico de menor tamaño a la derecha del pico central asociado a sedimentos que pudieron depositarse durante el almacenamiento previo al análisis. Este pico no se considera significativo por lo que se desprecia.

3.6.2. ζ -potencial

El tratamiento de conservación y reconstitución afectó significativamente ($p < 0,05$) en el ζ -potencial, estableciéndose dos grupos: un primero formado por L2, LLRUS y LARUS y un segundo formado por LLRUT (Tabla 4). L2, LLRUS y LARUS presentaron un ζ -potencial alejado de la zona de inestabilidad de -30 mV (Noomhorm, Ahmad, & Anal, 2014), mientras que LLRUT con un ζ -potencial de $-23,7 \text{ mV}$, fue inestable.

Tabla 4

Valor medio y desviación estándar para tamaño medio de partícula y ζ -potencial en L2, LLRUT, LLRUS y LARUS ($n=3$).

	Z (nm)	ζ -potencial (mV)
L2	$558,5 \pm 3,1^b$	$-30,3 \pm 0,8^a$
LLRUT	$917,8 \pm 15,1^d$	$-23,7 \pm 0,3^b$
LLRUS	$643,8 \pm 19,4^c$	$-29,9 \pm 0,1^a$
LARUS	$412,8 \pm 19,8^a$	$-30,1 \pm 0,8^a$

^{a, b, c, d} Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas entre muestras para un nivel del 95 % de confianza.

Tabla 3

Valor medio y desviación estándar de los parámetros de color, pH y densidad para L2, LLRUT, LLRUS, LARUS ($n=3$).

	L*	C*	h°_{ab}	W.I.	ΔE	pH	ρ (kg/m^3)
L2	$87,8 \pm 0,0^c$	$5,0 \pm 0,0^a$	$102,1 \pm 0,2^d$	$86,9 \pm 0,0^c$	-	$6,4 \pm 0,0^b$	$1000,5 \pm 0,0^a$
LLRUT	$86,5 \pm 0,0^a$	$8,5 \pm 0,0^d$	$94,7 \pm 0,0^b$	$84,0 \pm 0,0^a$	3,9	$6,3 \pm 0,0^a$	$1006,0 \pm 0,0^b$
LLRUS	$89,1 \pm 0,0^d$	$6,5 \pm 0,0^c$	$96,1 \pm 0,1^c$	$87,3 \pm 0,0^d$	2,1	$6,5 \pm 0,0^c$	$1006,0 \pm 0,0^b$
LARUS	$86,8 \pm 0,3^b$	$5,2 \pm 0,0^b$	$93,2 \pm 0,1^a$	$85,9 \pm 0,1^b$	1,3	$6,5 \pm 0,0^c$	-

^{a, b, c, d} Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas entre muestras para un nivel del 95 % de confianza.

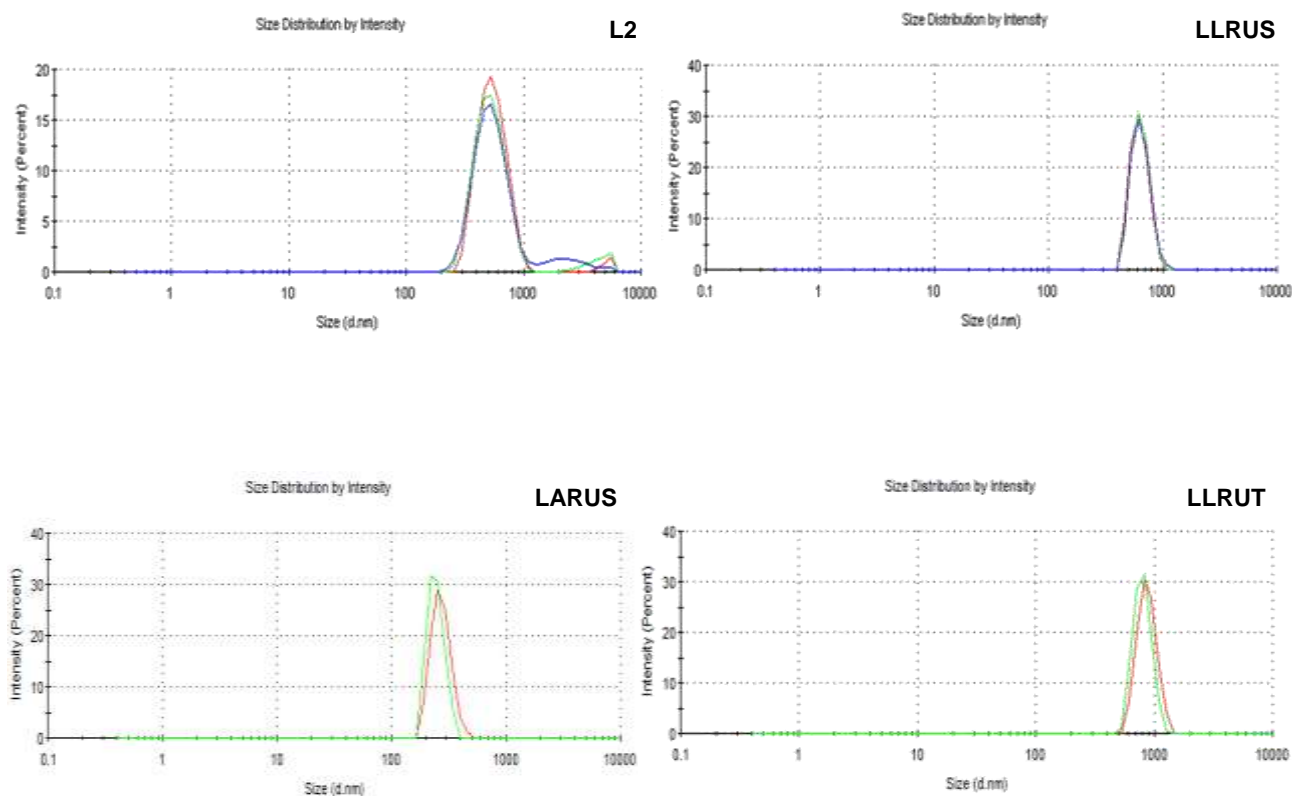


Figura 1. Curvas de distribución del tamaño de partícula en L2, LLRUT, LLRUS y LARUS.

3.6.3. Estabilidad en condiciones forzadas

L2, LLRUT y LLRUS fueron sometidas a condiciones extremas mediante una centrifuga. A pesar de que la sedimentación y el cremado por centrifugación no son medidas directas para determinar la estabilidad real, este tratamiento nos permite tener una idea de la estabilidad potencial de la emulsión (Valencia, Hernández, Guamis, & Ferragut, 2013).

De este modo, todas las muestras presentaron separación de fases y sedimentos en la parte inferior de los tubos (Tabla 5). Ambos indicadores aumentaron de manera significativa tras la conservación y reconstitución ($p < 0,05$), obteniendo el valor más elevado LLRUT.

3.6.4. Estabilidad en almacenamiento

Durante el almacenamiento a 5 °C, en todos los casos se observaron sedimentos un día después de su elaboración (Tabla 6).

Por el contrario, LARUS y LLRUT presentaron altos porcentajes de IC e IS el segundo y tercer día respectivamente, manteniéndose estos valores hasta el día 13. L2 presentó cremado el día 6 manteniéndose constante hasta el día 13 cuya inestabilidad se vio acentuada. LLRUS no presentó separación de fases a lo largo de todo el periodo de almacenamiento.

Tabla 5

Valor medio y desviación estándar para los parámetros de estabilidad en condiciones forzadas de L2, LLRUT y LLRUS ($n=3$).

	% Cremado	% sedimentos
L2	$3,0 \pm 0,0^a$	$0,7 \pm 0,1^a$
LLRUT	$6,0 \pm 0,0^b$	$2,8 \pm 0,3^c$
LLRUS	$6,0 \pm 0,0^b$	$1,7 \pm 0,2^b$

^{a,b} Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas entre muestras para un nivel del 95 % de confianza.

Tabla 6

Valor medio y desviación estándar para los parámetros de estabilidad coloidal en almacenamiento a 5 °C en L2, LLRUT, LLRUS y LARUS (n=3).

Día	IC					IS				
	1	2	3	6	13	1	2	3	6	13
L2	-	-	-	7,5±0,0	16,4±3,9	0,7±0,0	1,5±0,0	1,5±0,0	2,2±0,0	14,9±3,9
LLRUT	-	-	38,6±2,8	38,6±2,8	38,6±2,8	5,6±1,1	6,0±1,7	9,4±2,8	9,4±02,8	9,4±02,8
LLRUS	-	-	-	-	-	4,8±0,8	6,3±0,8	6,3±0,8	6,3±0,8	6,3±0,8
LARUS	-	18,7±1,8	23,7±2,8	23,7±2,8	23,7±2,8	3,6±1,1	34,5±0,4	34,5±0,4	34,5±0,4	34,5±0,4

En condiciones de almacenamiento a 20 °C, un día después de su elaboración, todas las muestras presentaron en su superficie un color amarillento acompañado de pequeñas burbujas, sedimentos y un olor desagradable. Asimismo, L2 Y LLRUT presentaron un “cuajado” de la fase de cremado, mientras que LLRUS no presentó separación de fases durante los 13 días de almacenamiento (Tabla 7).

Tabla 7

Valor medio y desviación estándar para los parámetros de estabilidad en almacenamiento a 20 °C en L2, LLRUT y LLRUS (n=3).

Día	IC		IS	
	1	2	1	2
L2	27,1±2,2	27,1±2,2	5,8±0,0	5,8±0,0
LLRUT	37,7±2,5	37,7±2,5	14,0±3,3	14,0±3,3
LLRUS	-	-	5,0±0,7	6,5±0,7

La temperatura de almacenamiento condicionó la estabilidad de las muestras. Así, en condiciones de refrigeración (5 °C), la inestabilidad podría deberse a fuerzas gravitacionales típicas de emulsiones con un tamaño $r > 100\text{nm}$, (McClements, 2011), en la que las partículas de mayor tamaño, muestran una velocidad de cremado más alta debido a la ley de Stokes, explicando la rápida inestabilidad de LLRUT. Este cremado inicial estaría constituido por una fase rica en lípidos, de densidad inferior a la emulsión (Piorkowski, & McClements, 2014), mientras que los sedimentos corresponderían a una contracción de la fase dispersa junto a agregados de proteína y lípidos con un ratio proteína – lípido superior al de la propia emulsión (Bernat et al., 2015).

Sin embargo, a 20 °C la rápida inestabilidad de LLRUT y L2 podría deberse a una degradación de la leche de almendra por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico), los cuales son muy susceptibles a la oxidación. Su almacenamiento en condiciones de no refrigeración y luz habrían favorecido la degradación química y las reacciones enzimáticas

así como el crecimiento microbiano acelerando las reacciones de coalescencia, floculación o sedimentación de las emulsiones (McClements & Decker, 2000).

A pesar que LARUS presentó un tamaño de partícula pequeño y un ζ -potencial alejado de la zona de inestabilidad, durante su almacenamiento a 5 °C inestable y sus valores de L^* y WI fueron muy bajos. La atomización puede causar una desnaturalización de las proteínas debido a las altas temperaturas empleadas, ocasionando la pérdida parcial o total de sus propiedades emulsificantes (McClements, 2004). De este modo, esta pérdida no habría sido compensada durante su reconstitución.

LLRUT presentó los valores de L^* y WI más pequeños, un tamaño de partícula más elevado, y un valor de ζ -potencial dentro de la zona de inestabilidad. Estos indicadores junto un IC del 38,6 % el tercer día de almacenamiento indican que la reconstitución por Ultra-Turrax fue insuficiente para conseguir su estabilidad.

L2 obtuvo el menor tamaño de partícula y un ζ -potencial alejado de la zona de inestabilidad, permaneciendo estable durante 5 días. Asimismo, el aumento progresivo de su inestabilidad junto a una disminución del pH y un abombamiento de los tapones de los tubos de ensayo, podría indicar un posible aumento de la población microbiana. Esta disminución del pH habría ocasionado una reducción de la repulsión electrostática de las proteínas, provocando un aumento de la inestabilidad de la emulsión y observándose la floculación de las gotas (McClements, 2004).

LLRUS permaneció estable durante los 13 días. Este proceso de conservación y reconstitución permitió alargar la estabilidad de la leche de almendra, sin modificar en gran medida las propiedades físico-químicas de L2. LLRUS presentó un ζ -potencial alejado de la zona de inestabilidad, concordando con los resultados obtenidos por Bonsegna, Bettini, & Pagano, 2010

(-30 mV a pH 7) y Gallier et al., 2012 (-29,9 mV) y un color blanco similar a L2.

4. Conclusiones

Se ha desarrollado un nuevo protocolo para la obtención de leche de almendra, únicamente bajo la acción emulsificante de sus propias proteínas manteniendo su estabilidad durante 5 días. Esta leche se caracteriza por un contenido en lípidos, proteínas y fibra superior a las leches comerciales y unas propiedades ópticas apropiadas, presentando un intenso color blanco.

Los tratamientos de conservación así como la reconstitución influyen de manera significativa en las propiedades físico-químicas y en la estabilidad de la leche. La combinación de un tratamiento de liofilización junto a un proceso de reconstitución por ultrasonidos permiten obtener una leche de almendra estable a lo largo de 13 días sin verse modificadas sus propiedades ópticas y nutricionales. Asimismo, la conservación de la leche de almendra mediante liofilización supondría un ahorro económico en el transporte y en el almacenamiento, reduciendo su peso y eliminando los costes de refrigeración.

Referencias

- Adhikari, K., Dooley, L. M., Chambers, E., & Bhumiratana, N. (2010). Sensory characteristics of commercial lactose-free milks manufactured in United States. *LWT—Food Science and Technology*, 43, 113–118.
- AOAC (2005). "Method 925.40", section 40.1.04. Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemist. (18th ed.). Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC (2005). "Method 948.22", section 40.1.05. Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemist. (18th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC (2005).
- AOAC (2005). "Method 950.48", section 40.1.06. Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemist. (18th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC (2005).
- AOAC (2005). "Method 950.49", section 40.1.08. Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemist. (18th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC (2005).
- AOAC (1997). "Method 960.52", section 12.1.07. Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemist. (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC (2005).
- AOAC (1997). "Method 985.29", section 45.4.07. Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemist. (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC (2005).
- Bernat, N., Cháfer, M., Rodríguez-García, J., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2015). Effect of high pressure homogenization and heat treatment on physical properties and stability of almond and hazelnut milks. *LWT – Food Science and Technology*, 62, 488–496.
- Bonsegna, S., Bettini, S., Pagano, R., Zacheo, A., Vergaro, V., Giovinazzo, G., Caminati, G., Leporatti, S., Valli, L., & Santino, A. (2010). Plant oil bodies: novel carriers to deliver lipophilic molecules. *Appl Biochem Biotechnol*, 163, 792–802.
- Caffarelli, C., Baldi, F., Bendandi, B., Calzone, L., Marani, M., & Pasquinelli, P. (2010). Cow's milk protein allergy in children: a practical guide. *Italian Journal of Pediatric*, 36, 5.
- Carmona, I. (2013). Situación actual y perspectivas del Mercado para productos especiales. *Agrimundo. Reporte N°8*.
- Chen, C. Y., Lapsley, K., & Blumberg, J. (2006). A nutrition and health perspective on almonds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(14), 2245–2250.
- Francis, F. J. (1983). Colorimetry of foods. In M. Peleg, & E. B. Bagley (Eds.), *Physical Properties of Foods* (pp. 105–123). Westport, CT: AVI Publishing Co.
- Gallier, S., Gordon, K. C., & Singh, H. (2012). Chemical and structural characterization of almond oil bodies and bovine milk fat globules. *Food Chemistry*, 132(4), 1996–2006.
- Jenkins, D., Kendall, C., Marchie, A., Parker, T., Connelly, P., & Qian, W. (2002). Dose response of almonds on coronary heart disease risk factors – blood lipids, oxidized LDL, Lp(a), homocysteine and pulmonary nitric oxide: a randomized controlled cross-over trial. *Circulation*, 106, 1327–32.
- Karel, M., & Lund, D. B. (2003). Physical principles of food preservation. *Food Science Technologies*, 129, 360–441.
- Luengo, M. (2009). *La almendra y otros frutos secos: Castaña, pistacho, piñón, nuez*. (Primera ed.) Barcelona: Océano AMBAR.
- Mäkinen, O. E., Uniacke-Lowe, T., O'Mahony, J. A., & Arendt, E. K. (2015). Physicochemical and acid gelation properties of commercial UHT – treated plant based milk substitutes and lactose free bovine milk. *Food Chemistry*, 168, 630–638.
- Maguire, L. S., O'Sullivan, S. M., Galvin, K., O'Connor, T. P., & O'Brien, N. M. (2004). Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(3), 171–178.
- Mendosa, D. (2008). Revised international table of Glycemic Index (GI) and Glycemic Load (GL) values. Mendosa website

- <http://www.mendoza.com/gilists.htm>. Published December 2008. Accessed 06.09.15.
- Noomhorm, A., Ahmad, I., & Anal, A. K. (2014). Functional foods, and dietary supplements: Processing Effects and Health Benefits. (1st ed.). Thailand: Wiley Backwell.
- McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil in water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270–1282.
- McClements, D. J. (2004) Protein-stabilized emulsions. Current Opinion in *Colloid & Interface Science*, 9, 305–313.
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297–2316.
- Onning, G., Wallmark, A., Persson, M., Åkesson, B., Elmståhl, S., & Öste, R. (1999). Consumption of oat milk for 5 weeks lowers serum cholesterol and LDL cholesterol in free – living men with moderate hypercholesterolemia. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 43, 301–309.
- O’Sullivan, J., Murray, B., Flynn, C., & Norton, I. (2015). The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food Hydrocolloids*, 30, 1–14
- Piorkowski, D., & McClements, D. J. (2014). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42, 5–41.
- Sampson, H. A. (2004). Update on food allergy. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 113, 805–819.
- Swieca, M., Seczyk, L., Gawlik-Dziki, U., & Dziki, D. (2014). Bread enriched with quinoa leaves e the influence of proteinephenolics interactions on the nutritional and antioxidant quality. *Food Chemistry*, 162, 54–62.
- Tamime, A. Y. (2009). Dairy powders and concentrated products. (1st edition). UK: Wiley-Blackwell, (Chapter 3).
- Tarantola, J., & Wujastyk, L. (2009). Alternative milk beverages. *Journal of Renal Nutrition*, 19, 1–10.
- Toro, N., Bosch, J., Veciana, M. T., & Vidal, M. C. (2014). Influence of Ultra – High – Pressure homogenization treatment on the phytosterols, tocopherols, and polyamines of almond beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 9539–9543.
- Valencia, D., Hernández, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2013). Comparing the effects of Ultra – High – Pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical, and chemical quality of almond beverages. *Journal of Food Science*, 78(2), 199–205.
- Verma, A., & Vir, S. (2013). Spray Drying of fruit and vegetable juices: a review. *Food Science and Nutrition*, 55(5), 701–719.
- Yada, S., Huang, G. & Lapsley, K. (2013). Natural variability in the nutrient composition of California – grown almonds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30, 80–85.
- Zeiger, R. S., Sampson, H. A., Bock, S.A. Burks, A. W., Harden, K., Noone, S., Martin, D., Leung, S., & Wilson, G. (1999). Soy allergy in infants and children with IgE-associated cow’s milk allergy. *The Journal of Pediatrics*, 134, 5.