



## VALORACIÓN DEL CONTENIDO EN LACTOSA EN MUESTRAS DE CHOCOLATE NEGRO Y CHOCOLATE CON LECHE

Carmen Calzón

Memoria de prácticas de laboratorio - 21521 – Bioquímica dels Aliments  
Grado de bioquímica. 2012-2013. Universitat de les Illes Balears

**Palabras clave:**

**lactosa, control de calidad, intolerancia a la lactosa**

### INTRODUCCIÓN

---

El chocolate y los productos de chocolate se elaboran a partir de cacao o derivados del cacao con azúcares, pero además pueden contener otros ingredientes alimentarios como edulcorantes, productos lácteos y sustancias aromatizantes, entre otros [1].

El chocolate con leche se elabora a partir de productos de cacao, azúcares y leche (ya sea en polvo o como leche condensada) y/o derivados lácteos (como es el lactosuero en polvo). Ésta es la característica que lo diferencia de los chocolates negros [2].

La lactosa, el azúcar de la leche, constituye por tanto uno de los componentes del chocolate con leche. El contenido medio de lactosa es del 10% en todos los chocolates con leche de distintas marcas y suele variar poco entre las muestras. En los chocolates negros la lactosa no es un componente natural, y en el caso de que se añada debe indicarse en la etiqueta [3].

La cantidad de lactosa puede servir como indicador de la cantidad de leche en aquellos chocolates que no incorporan derivados lácteos. En estos casos, se puede afirmar que a mayor cantidad de lactosa más leche. Sin embargo, actualmente no es un parámetro recomendado para este fin, pues la mayoría de fabricantes usan, además de la leche en polvo o la leche condensada, derivados lácteos.

No obstante, la determinación resulta útil a la hora de valorar el control de calidad del producto, en la elaboración del mismo y corroboración de que cumple los criterios de calidad exigidos. De esta manera,

permite por ejemplo descartar la posibilidad de adulteración del chocolate (sustitución de la leche por otros componentes) y conocer si el porcentaje de lactosa es el adecuado para el tipo de chocolate y es el especificado por el fabricante.

Por otra parte también es interesante conocer el contenido de lactosa del producto, sobre todo para aquellas personas con intolerancia a la lactosa. Aunque la gran mayoría de estas personas pueden tolerar el chocolate con leche, por su bajo contenido en lactosa, hay algunas que tienen problemas. Por eso, es recomendable que consuman chocolate que no contenga lactosa, como el chocolate negro o chocolate con leche sin lactosa.

El objetivo de esta práctica es determinar el contenido de lactosa en dos tipos de chocolate, negro al 70% y chocolate con leche del 30%, como control de calidad en la elaboración del mismo y ratificación de que cumple los criterios de calidad exigidos y especificados por el fabricante.

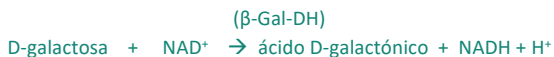
### TÉCNICAS Y MÉTODOS

---

La determinación de lactosa se realizó a través de un método enzimático acoplado en el cual la lactosa es hidrolizada en presencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa para dar los monómeros constituyentes D-glucosa y D-galactosa a pH 6,6 según la siguiente reacción:



Puesto que estos dos metabolitos resultantes no se pueden cuantificar, se acopla otra reacción. Por eso, posteriormente la D-galactosa producida se incuba en presencia de la enzima galactosa deshidrogenasa a pH 8,6 para generar ácido D-galactónico y NADH:



La medición de la cantidad de NADH producida a los 30 minutos de reacción es proporcional a la concentración de galactosa y, por tanto, de lactosa presente en la muestra.

Para ello, se empleó un Kit enzimático preparado para la determinación de lactosa en alimentos **-Kit ENZYPLUS Lactose/D-Galactose (Microplanet)**- El Kit consta de cuatro reactivos: solución 1, Tampón citrato liofilizado (pH 6,6; 35 mg NAD); solución 2,  $\beta$ -galactosidasa (1,7mL 100 U en sulfato de amonio); solución 3, tampón fosfato (34mL de tampón de difosfato de potasio pH 8,6) y solución 4,  $\beta$ -galDH (1,7 ml de suspensión de  $\beta$ -galDH 40U en sulfato de amonio).

Este Kit comercial está destinado principalmente para el control de calidad de alimentos libre de lactosa, característica nutricional de interés para personas que carecen de lactasa y son intolerantes a la lactosa.

Primero, se procedió a la extracción previa de la lactosa. Se homogenizó un 1 g de cada tipo de chocolate en 10mL agua a una temperatura entre 40 y 50° durante 2 minutos empleando un *potter Elvenhjem*. El homogenizado se centrifugó a 1500rpm durante 4 minutos con el fin de eliminar partes no solubles. Se recogieron los sobrenadantes en los cuales se determinó el contenido de lactosa. En nuestro caso, los sobrenadantes no mostraron turbidez por lo que no fue necesaria la desproteización de la muestra con ácido perclórico previa a la determinación para evitar posibles interferencias.

Para la medición del contenido de lactosa, se tomó 0,1mL de cada muestra de chocolate en una cubeta. Para descartar cualquier interferencia de galactosa libre procedente de la producción del producto, se hicieron 2 cubetas, 1 blanco y otra donde se valoró únicamente la galactosa libre.

Se siguió el procedimiento especificado en el Kit: primero, las muestras de valoración de la lactosa se

incubaron con 0,01mL de R2 ( $\beta$ -galactosidasa) y 0,2 mL de R1 (citrato) durante 30 minutos. A continuación, se añadieron a todas las cubetas 0,4 mL de tamón Tris y 0,1mL de R4 (NAD<sup>+</sup>) completando con agua destilada hasta alcanzar un volumen total de 2,8mL. Se esperaron 3 minutos y se realizó una primera lectura de la absorbancia a 340 nm (A1) utilizando el espectrofotómetro.

Luego, se añadieron 0,01 mL de R4 ( $\beta$ -galDH), se esperaron 30 minutos a que tuviera lugar la reacción, y se midió la absorbancia por segunda vez a 340nm (A2). Esta lectura final es la cantidad de NADH+H<sup>+</sup> producto de la segunda reacción, equivalente a la cantidad de galactosa que se consumió.

## RESULTADOS

Los resultados de las absorbancias de las dos lecturas obtenidas del espectrofotómetro se pueden observar en la **tabla 1**.

Chocolate negro		Peso: 0,104g		
	lactosa + galactosa		galactosa	
	B	M	B	M
A1	0,067	0,248	0,052	0,269
A2	0,068	0,265	0,052	0,271

Chocolate con leche		Peso: 0,102g		
	B	M	B	M
A1	0,065	0,213	0,067	0,271
A2	0,065	0,691	0,067	0,201

**Tabla 1.** Absorbancias obtenidas del espectrofotómetro en la primera lectura (A1) y segunda lectura (A2) a 340nm tras utilizar el kit de determinación de la lactosa. B, blanco; M, muestra. Abs en u.d.co.

A partir de estos valores se calculó la cantidad de lactosa de cada muestra.

Primeramente, se hace la diferencia entre las absorbancias de la segunda y primera lectura (A2-A1) (**tabla 2**).

Para obtener la absorbancia neta de cada muestra se resta la diferencia de la absorbancia del blanco respectivo de cada valoración (lactosa o galactosa libre) (**tabla 3**).

Chocolate negro				
	lactosa + galactosa		galactosa	
	B	M	B	M
A2-A1	0,001	0,017	0,0	0,002

Chocolate con leche      Peso: 0,102g				
A2-A1	0,478	0,0	0,036	0,0

Tabla 2. Diferencia de absorbancias entre la segunda y primera lectura. Abs en u.d.o.

Chocolate	Lac+gal	gal
Negro	0,016	0,002
Con leche	0,478	0,036

Tabla 3. Absorbancia neta de lactosa y galactosa y de galactosa libre obtenidas para las muestras de chocolate negro y chocolate con leche. Abs en u.d.o.

Esto nos da para el chocolate negro una diferencia neta de absorbancia de lactosa+galactosa igual a 0,016 (udo) y de galactosa libre igual a 0,002 (udo). Para el chocolate con leche los valores obtenidos son de 0,478 y 0,036, respectivamente.

Para calcular el contenido de lactosa debe restarse la absorbancia de la galactosa libre presente inicialmente en la muestra.

$$dA = dA(lac + gal) + dA(gal)$$

Esta diferencia presentó un valor de 0,014 udo para el chocolate negro y un valor considerablemente mayor para el chocolate con leche, de 0,442 udo. A partir de estos dos valores se calculó la cantidad de lactosa en la cubeta en g/L utilizando la siguiente fórmula:

$$conc. lactosa \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{Vol\ final \times PM \times dA}{\epsilon \times d \times Vm \times 1000}$$

Siendo:

- Volumen final= 3,27mL
- Peso molecular=342,3g/mol
- $\epsilon=6,3 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- D=1cm
- Vm (volumen muestra)=0,1mL

Por último se calculó la cantidad de lactosa por gramo de chocolate, referido tanto en peso de muestra en fresco como en peso seco<sup>1</sup> (gráfica 1).

La concentración se multiplicó por los 10mL del homogenizado teniendo en cuenta el peso de la muestra en el volumen final.

$$\left(\frac{\text{mg lactosa}}{\text{g chocolate}}\right) = \frac{mg}{mL} \times \frac{10mL + p(g)}{p(g)}$$

Siendo el peso fresco de chocolate negro 0,104g y chocolate con leche 0,102g. Conociendo el %HR, se calculó el peso seco, siendo 0,102 g en el chocolate negro y 1,0g en el chocolate con leche.

También se calculó el % de lactosa referido a peso fresco y peso seco. Los resultados se recogen en la tabla la gráfica 2. Como puede observarse, la cantidad de lactosa es mínima en el chocolate negro mientras que en el chocolate con leche es considerable.

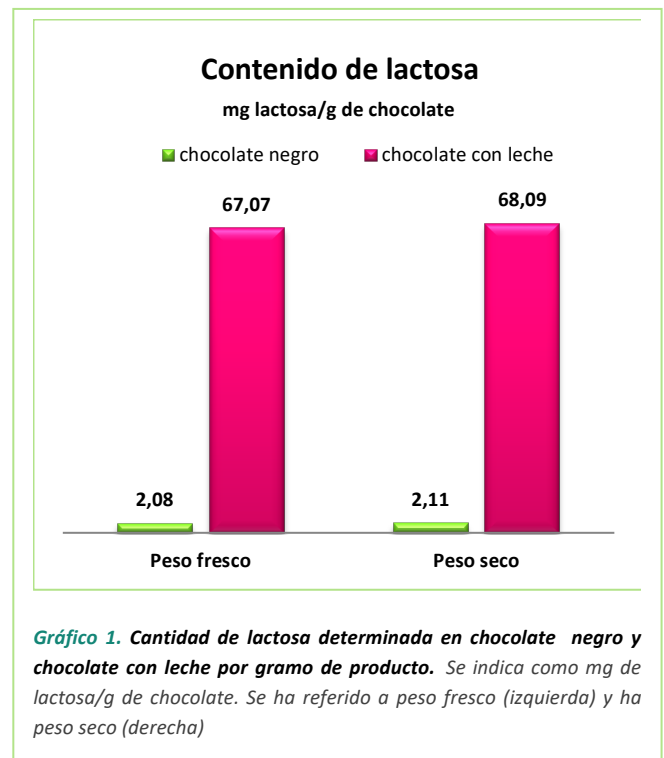
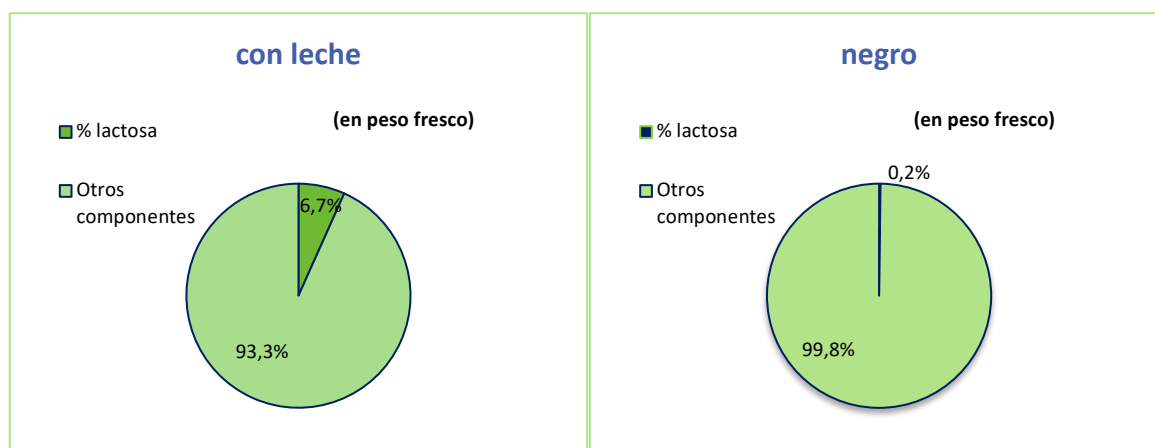


Gráfico 1. Cantidad de lactosa determinada en chocolate negro y chocolate con leche por gramo de producto. Se indica como mg de lactosa/g de chocolate. Se ha referido a peso fresco (izquierda) y ha peso seco (derecha)

1. Se refirió a los valores de peso seco obtenidos en la práctica de la determinación de la humedad en muestras de chocolate. %HR: 1,5 % para el chocolate con leche y 1,4% para el chocolate negro.

## % de lactosa en chocolate



**Grafico 2. Representación de % de lactosa en chocolate. Ambos se refieren a producto fresco (A) En chocolate con leche.** La lactosa representa un 6,7% del total. En peso seco se calculó que es un 6,8%. **(B) En chocolate negro:** el porcentaje de lactosa (0,2%) es insignificante. Referido a peso seco la lactosa representa un 2,1%.

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran un contenido en lactosa insignificante en chocolate negro en contraste con el chocolate con leche (gráfica1), tal y como se esperaba.

En el chocolate negro la presencia de lactosa debería ser nula, mientras que en el caso del chocolate con leche, la cantidad de lactosa debería ser considerable [1].

Sin embargo, se ha detectado en torno a un 0,2% de lactosa en el chocolate negro (gráfica 2B). Seguramente se deba a errores experimentales cometidos durante el procedimiento de la determinación y podría considerarse que el chocolate valorado carece de lactosa. Por este motivo, sería recomendable repetir de nuevo la prueba. No obstante, no puede descartarse la posibilidad que se haya sido adulterado añadiendo una pequeña cantidad de leche o productos derivados. En este caso, la presencia de leche podría descartarse realizando una determinación del extracto seco magro de la leche o de la materia grasa de ésta en la muestra de chocolate [1]

Por otra parte, los resultados reflejan que el chocolate con leche valorado en fresco contiene en

torno a un 6,7% de lactosa (gráfica 2A). En el chocolate con leche, el mínimo especificado de extracto seco de leche es del 12 al 14% incluyendo entre un 2,5-3,5% de materia grasa de la leche [1]. Esto implica debe tener un contenido en lactosa en torno al 10% de lactosa. El porcentaje en lactosa obtenido es algo bajo en contraste con lo que se establece en la normativa de control de calidad. Sin embargo, la legislación aprueba un cierto margen de error por lo cual este contenido en lactosa podría considerarse aceptable ya que es un valor bastante alto que se aproxima al exigido.

No obstante, el la lactosa como tal no nos aporta información directa sobre el contenido de leche añadida para la elaboración del chocolate, pues debe tenerse en cuenta que también puede añadirse derivados lácteos como el lactosuero. Por tanto, puede afirmarse que cumple los requisitos en cuanto a contenido en lactosa pero no disponemos de información suficiente para confirmar que tiene el contenido en leche exigido (siempre y cuando no se asegure que el fabricante no haya añadido derivados lácteos). Con este fin, podría realizarse la determinación del extracto seco magro de la leche y/o de la materia grasa de la leche [1] lo que nos permitiría afirmar si además el contenido de leche añadido es el adecuado

Por otro lado, no se muestran diferencias significativas entre el contenido de lactosa referido a peso en fresco y en peso seco (**gráfica 1 y gráfico 2**). Se observa una mayor cantidad cuando se refiere a peso seco de chocolate lo cual es de esperar, pues se ha eliminado el contenido de agua libre del producto y hay más lactosa por masa de chocolate.

## CONCLUSIÓN

---

La lactosa, el azúcar de la leche, constituye por tanto uno de los componentes del chocolate con leche y su determinación es utilizada como indicador de control de calidad del mismo, de su elaboración y para ratificar que cumple con los niveles exigidos por la normativa y son coincidentes con los criterios especificados por el fabricante.

Se ha demostrado que el chocolate con leche contiene un contenido en lactosa importante (en torno al 6,7%) y que cumple con las normas de calidad establecidas por el departamento de control de los alimentos.

Por otro lado, se ha detectado una pequeña cantidad de lactosa en el chocolate negro cuando debería ser nula. De aquí se deduce que probablemente haya sido adulterado incluyendo en su elaboración leche o productos derivados. Aún y así sigue siendo un alimento tolerable para personas intolerantes a la lactosa.

Como conclusión, puede decirse que el chocolate con leche satisface los requisitos exigidos por la normativa vigente de control de calidad para el chocolate y productos del chocolate. Sin embargo, esto no puede afirmarse con seguridad para el caso del chocolate negro que puede haber sido adulterado. Por este motivo, sería recomendable realizar de nuevo la determinación o bien hacer una determinación del extracto seco magro de la leche y/o de la materia grasa de la leche para descartar que se haya añadido una pequeña cantidad de leche.

## REFERENCIAS

---

- [1] **Norma para el chocolate y los productos del chocolate** (CODEX STAN 87-1981)
- [2] **Análisis comparativo. Chocolate con leche.** <http://revista.consumer.es/web/es/20040201/actualidad/analisis1/67844.php>
- [3] **Hersheys Center For Health and Nutrition,** <http://www.hersheys.com/nutrition-professionals/chocolate/composition/chocolate-types.aspx>