

## Tesis de Posgrado

# Preservación por métodos combinados, actividad del agua, pH, aditivos, tratamiento térmico, de suero de quesería concentrado parcialmente hidrolizado

Leiras, María Cecilia

1992

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Leiras, María Cecilia. (1992). Preservación por métodos combinados, actividad del agua, pH, aditivos, tratamiento térmico, de suero de quesería concentrado parcialmente hidrolizado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2544\\_Leiras.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2544_Leiras.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Leiras, María Cecilia. "Preservación por métodos combinados, actividad del agua, pH, aditivos, tratamiento térmico, de suero de quesería concentrado parcialmente hidrolizado". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2544\\_Leiras.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2544_Leiras.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS

PRESERVACION POR METODOS COMBINADOS ( ACTIVIDAD DE AGUA, pH,  
ADITIVOS, TRATAMIENTO TERMICO ) DE SUERO DE QUESERIA  
CONCENTRADO PARCIALMENTE HIDROLIZADO.

MARIA CECILIA LEIRAS

Tesis presentada para optar al  
título de Doctor en Ciencias Químicas.  
Orientación: Tecnología de Alimentos

Directora de Tesis: Dra. Stella Maris Alzamora

- 1992 -

Tesis.  
2544  
pte. 1  
ej. 2.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Stella Maris Alzamora quien dirigió este trabajo, por su dedicación y por toda la ayuda brindada.

Al Dr. Jorge Chirife por su valiosa colaboración y asesoramiento prestados en la realización de este trabajo.

Al Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por facilitar el uso de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, el cual a través del otorgamiento de la beca hizo posible la realización de este trabajo.

A las Doctoras Pilar Buera, Miryam Cassanello, Beatriz Elizalde y Marcela Tolaba y al Ing. Agr. Lucas González que, en forma desinteresada, me asesoraron para el tratamiento de algunos temas de este trabajo.

A Ada Albertoni quien colaboró en las búsquedas bibliográficas realizadas.

A todos mis compañeros de Industrias que, de una forma u otra, me ayudaron y acompañaron durante todo este tiempo.

A los Licenciados Raúl Lichtmann de la empresa Alimtec y Favio Passini de la empresa Biotec, que cedieron la enzima empleada.

A Sancor Cooperativas Unidas Ltda. que facilitó el suero de

QUEEN'S UNIVERSITY

WILSON COLLEGE



No existe ningún problema  
que sea el aporte simultáneamente un don

Busca los problemas  
porque necesitas sus dones

Ilustroee

Richard Bach

## 1. OBJETIVOS

El aprovechamiento del suero de queso es deseable tanto desde el punto de vista nutricional, pues posee proteínas de alto valor biológico y las vitaminas hidrosolubles de la leche, como desde el punto de vista ecológico, ya que su descarga al medio ambiente origina graves problemas de contaminación. Sin embargo, su utilización para alimentación, tanto humana como animal, presenta ciertos problemas principalmente debido a su alto contenido en lactosa (70 % p/p de los sólidos totales).

En la Argentina, el suero de queso es concentrado hasta un 50 % p/p de sólidos aproximadamente y luego secado en spray. Debido al alto costo del secado en spray y a la limitada aplicación del suero en polvo se buscaron métodos alternativos de procesamiento. Kanterewicz (1985b) desarrolló, en este laboratorio, un método de obtención de suero de queso concentrado (50 % p/p de sólidos) estable microbiológicamente a temperatura ambiente. Este método estaba basado en la reducción de la actividad de agua por agregado de solutos, reducción del pH y uso de agentes antimicrobianos. Los inconvenientes que presenta este producto son: su alta concentración de lactosa (35 % p/p), lo cual le da una textura arenosa, su sabor salado y su alta viscosidad, factores que limitan su empleo en determinados productos alimenticios.

Para ampliar las posibilidades de aplicación del suero de queso concentrado se propone hidrolizar enzimáticamente parte de la lactosa presente en el mismo. De esta forma se eliminan los problemas de textura y

viscosidad en el suero de queso concentrado ya que desaparecen los cristales de lactosa. A su vez la reducción de la actividad de agua ( $a_w$ ) que conlleva la hidrólisis de la lactosa facilita la obtención de un suero estable microbiológicamente sin el agregado de sustancias para controlar la  $a_w$  que afecten negativamente la palatabilidad del producto.

El objetivo de este trabajo es la obtención de suero de queso de alta concentración de sólidos (50 % p/p) parcialmente hidrolizado, estable microbiológicamente a temperatura ambiente durante al menos tres meses. Para lograr la reducción necesaria de la  $a_w$ , a fin que la misma sea un factor esencial en la estabilidad microbiológica, se propone realizar la hidrólisis enzimática directa, en ausencia de refrigeración, de la lactosa presente en el suero de queso concentrado (50 % p/p de sólidos). Otros factores que se utilizarán para asegurar la conservación del producto son la reducción del pH y el uso de agentes antimicrobianos.



## 2. INTRODUCCION

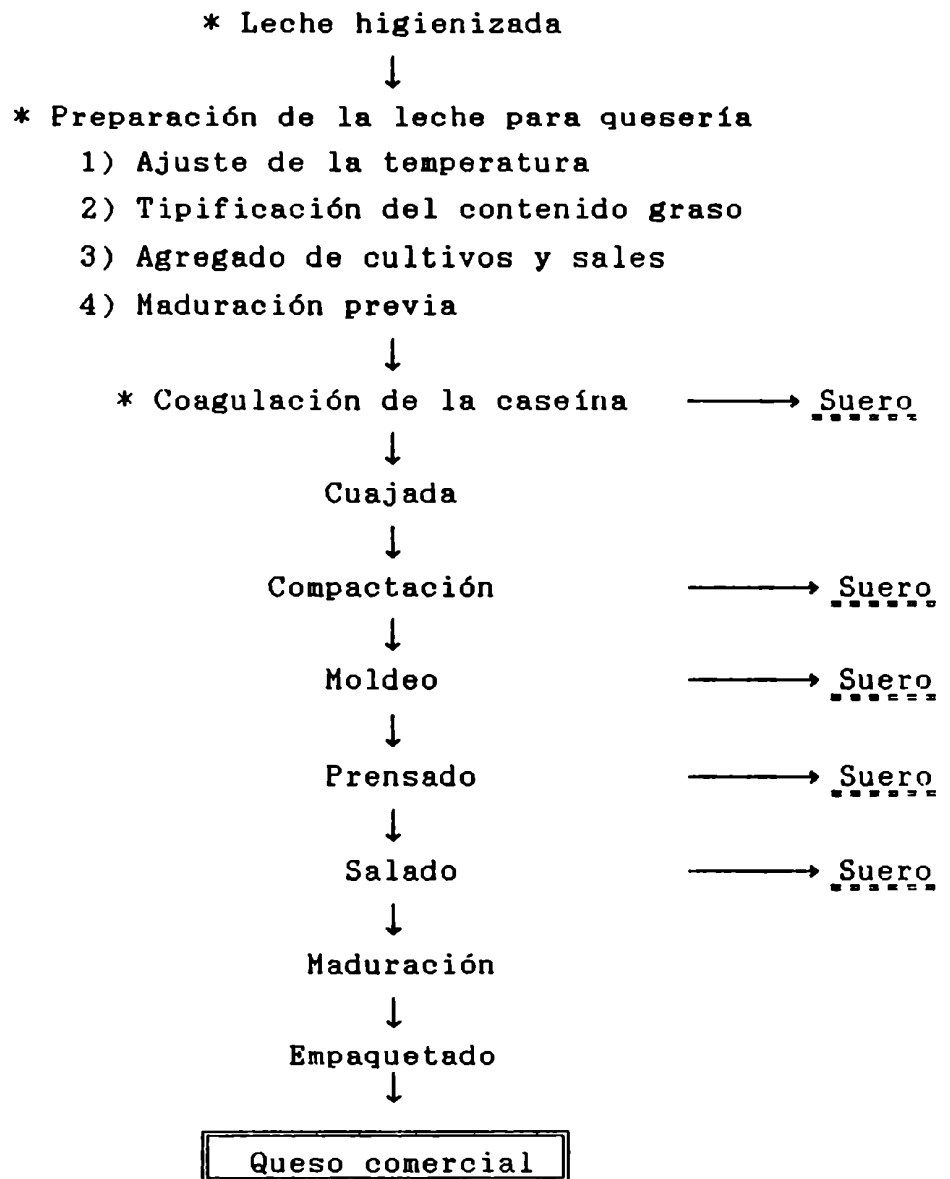
### 2.1. Suero de queso

El suero de queso es el producto que resulta de la separación de la caseína y la grasa de la leche durante la elaboración del queso. La caseína puede separarse por coagulación ó por acidificación, obteniéndose así suero dulce ó suero ácido respectivamente. No es un producto de composición química definida; ésta varía considerablemente según el origen y proceso utilizado para su separación. Diferentes tipos de queso producen diferentes tipos de suero. Pero también un mismo tipo de queso, elaborado en diferentes queserías, da lugar a diferentes composiciones de suero. En la Figura 2.1 se detalla la elaboración de queso por coagulación y la obtención de suero dulce, materia prima utilizada en este trabajo (Spreer, 1973). El rendimiento en suero varía según el tipo de queso. En la obtención de quesos de pasta dura se obtienen aproximadamente 9 kilogramos de suero por kilogramo de queso elaborado. Para quesos de pasta blanda el rendimiento es de 5 a 7 kilogramos de suero por kilogramo de queso. En la Argentina la producción media anual de suero líquido es de aproximadamente 2.100.000 toneladas, de las cuales el 0,8 % es procesada; el resto se desécha o se usa tal cual.

Tradicionalmente el suero de queso ha sido considerado una materia prima de escaso valor, ya que posee una baja concentración de sólidos. Como se produce en grandes cantidades, si se lo quiere desechar, requiere de una alta demanda bioquímica de oxígeno para su tratamiento debido a la alta concentración de lactosa. El suero de

FIGURA 2.1

Elaboración de queso por coagulación (Spreer, 1973).



queso contiene la mitad de los sólidos totales de la leche, lo cual incluye toda la lactosa y las proteínas del suero. Debido a esto se han realizado investigaciones en todo el mundo a fin de implementar nuevos y más valiosos usos para el suero de queso (Gekas y López Leiva, 1985). Los usos más habituales del suero de queso son: en alimentación animal (como suero líquido para cerdos o deshidratado como aditivo en alimentos para otros animales), en alimentación humana (suero deshidratado como aditivo en chacinados, panadería, etc. ó suero deshidratado y desmineralizado para la elaboración de leches maternizadas) y para la obtención de lactosa, la cual se utiliza principalmente en las industrias farmacéutica y alimentaria. Existen varias tecnologías que pueden aplicarse al suero a fin de mejorar el aprovechamiento de sus componentes: fermentación para producir proteínas unicelulares, alcohol ó metano; producción de sustancias químicas como ácido cítrico, ácido láctico, lactulosa, lactitol, detergentes, etc.; ultrafiltración para extraer las proteínas del suero y obtener diferentes tipos de concentrados de proteína de suero; hidrólisis de lactosa para aumentar la dulzura, etc..

Las proteínas del suero son de excelente calidad. Están constituidas por una mezcla de proteínas y glicoproteínas, entre las que se encuentran albúminas y globulinas. Estas se insolubilizan por calentamiento a 80°C y, en contraste con la caseína, son solubles a su pH isoeléctrico. Si están desnaturalizadas (por acción del calor), su solubilidad es baja y coprecipitan con la caseína. Dentro de las proteínas del suero se encuentra una fracción que no coagula por calor pero precipita por acción del ácido tricloroacético, la cual se designa como proteosa

peptona (su peso molecular es intermedio entre las proteínas y los péptidos). Las sustancias nitrogenadas no proteicas son compuestos dializables que permanecen en solución en las distintas condiciones en que se produce la precipitación de las proteínas. Incluyen aminoácidos libres, creatinina, urea, creatina, ácido úrico, amoníaco, nucleótidos, fosfolípidos (Alais, 1971).

Los concentrados de proteína proveen una forma de aprovechar las propiedades tanto nutritivas como funcionales de las proteínas del suero. Las proteínas del suero son de alto valor biológico ya que poseen un alto contenido en triptofano (3,3 % p/p), en lisina (10,9 % p/p) y en aminoácidos azufrados por la presencia de cistina. Su valor nutricional es más alto que el de la caseína, por lo que es deseable su utilización. Los problemas que se deben solucionar en el procesamiento industrial de las proteínas del suero son la desnaturalización durante el procesamiento y las variaciones en composición de los productos que se agrupan bajo el nombre de concentrados de proteína de suero. Estas variaciones en composición son debidas a la fuente de la materia prima, al método de fabricación del queso, al tratamiento térmico previo, a las condiciones de almacenamiento, etc. (Schmidt y col., 1984, Delaney y col., 1972). El proceso de obtención de los concentrados proteicos es caro; por lo tanto es conveniente tratar de utilizar el suero de queso completo, eliminando los problemas que causa la lactosa y aumentando su poder edulcorante (Dicker, 1982).

## 2.2. Hidrólisis de lactosa

### 2.2.1. Generalidades y métodos

Las desventajas de la lactosa como azúcar son: la baja solubilidad (Shah y Nickerson, 1978), su escaso poder edulcorante (Dicker, 1982; Zadow, 1986) y la intolerancia a la misma que presentan algunas personas (Hourigan y Mittal, 1984; Torun y col., 1979). Se han sugerido varios métodos físicos para disminuir la concentración de lactosa en leche y suero: cristalización, diálisis, filtración por geles y ultrafiltración. Otros métodos modifican químicamente a la lactosa: reducción, oxidación, fermentación e hidrólisis. Este último método implica la ruptura de la unión glicosídica  $\beta$ -1-4.

La lactosa es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa y al ser hidrolizada parcialmente se obtiene una mezcla de los tres azúcares. Los efectos de la hidrólisis son varios:

- Uno de los más importante es el aumento de la solubilidad de la mezcla de lactosa, glucosa y galactosa respecto de la lactosa (Dicker, 1982; Harju y Kreula, 1978). Cuando se trabaja con sistemas de una concentración de lactosa mayor que 50 % p/p hay un óptimo en la solubilidad de la mezcla de azúcares cuando se alcanza el 75 % de hidrólisis. A mayor ó menor porcentaje de hidrólisis cristalizan galactosa ó lactosa respectivamente (Guy y Edmonson, 1978).

- Otra de las ventajas de hidrolizar la lactosa es el sabor más dulce del producto. Aparentemente la mezcla de azúcares debida a la hidrólisis de lactosa tiene un efecto sinérgico sobre la dulzura, ya que es mayor que la suma calculada a

partir de los componentes (Guy y Edmonson, 1978). Para el caso de la leche, el aumento en el sabor dulce al hidrolizarse aproximadamente el 70 % de la lactosa presente es equivalente al agregado de 2 % p/p de sacarosa (Zadow, 1986).

■ Para aquellas personas que no pueden digerir la lactosa, la hidrólisis aumenta el valor nutritivo de la leche y el consumo de la misma. También para los cerdos la hidrólisis trae beneficios, ya que permite que puedan ingerir una cantidad mayor de suero de queso por día y el aumento de peso es más rápido que en cerdos con una dieta standard (Mustranta y col. 1979; Alaviuhkola y Harju, 1985).

■ El jarabe que se obtiene a partir de lactosa hidrolizada tiene menor viscosidad, lo cual permite un mejor manejo del mismo y además la baja viscosidad puede contribuir a modificar las propiedades físicas de la preparación a la que se agregue (Nickerson, 1974).

■ Los jarabes de lactosa hidrolizada poseen la propiedad de retener humedad y así evitar la pérdida de agua de los alimentos que los contienen ya que, al ser un sistema menos cristalino, es más higroscópico (Nickerson, 1974). Esta propiedad es importante en confitería, ya que es capaz de retener más humedad que el azúcar invertido (Harju y Kreula, 1978).

■ Para determinados productos, la hidrólisis de lactosa ofrece ventajas desde el punto de vista del pardeamiento no enzimático, ya que a pH neutro la glucosa y galactosa son 2,5 y 5,0 veces más reactivas (en presencia de amino

compuestos), respectivamente, que la lactosa (Pomeranz y col, 1962).

■ La mayor fermentabilidad de la glucosa respecto de la lactosa favorece el proceso de panificación, obteniéndose un mayor volumen de dióxido de carbono.

En la Tabla 2.1 se resumen todas las propiedades y ventajas de la mezcla de azúcares resultante de la hidrólisis de lactosa con respecto a la lactosa sin hidrolizar.

La hidrólisis de lactosa ofrece a la industria lechera la oportunidad de desarrollar nuevos productos destinados a mercados específicos. Esta técnica puede ser aplicada a todos los efluentes que contengan lactosa: leche, suero de queso, permeatos de ultrafiltración de leche o suero y suero de caseína, aumentando el potencial de uso de los mismos.

Existen dos técnicas básicas para hidrolizar la lactosa: hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática.

■ Hidrólisis ácida: Se puede hidrolizar la lactosa con ácido a alta temperatura, pero este procedimiento solamente es viable para efluentes libres de proteína, como es el caso del permeato de ultrafiltración. Si se utilizan ácidos minerales es conveniente emplear bajas temperaturas (50-60 °C) para inhibir las reacciones secundarias y se pueden necesitar hasta 48 horas para llegar a un grado de hidrólisis aceptable (Lin y Nickerson, 1977; Vujicic y col., 1977). El proceso se puede mejorar utilizando resinas de intercambio iónico: no se agrega ácido y se pueden emplear

TABLA 2.1

Propiedades y ventajas de la lactosa hidrolizada ( Nijpels, 1976; Nickerson, 1974; Zadow, 1986; Dicker, 1981).

Solubilidad a 25°C (g/100 g solución):

Lactosa: 17,0

Glucosa: 50,5

Galactosa: 34,0

Lactosa hidrolizada al 80 % : 55,0

Dulzura (relativa a la sacarosa, sacarosa: 100 ):

Lactosa: 20-40

Glucosa: 74

Galactosa: 32

Lactosa hidrolizada al 80% 55-65

Textura:

Lactosa: arenosa debido a los cristales (a concentraciones mayores que la solubilidad).

Lactosa hidrolizada al 80 % suave

Fermentabilidad:

Lactosa: limitada

Lactosa hidrolizada al 80 % : mucho mayor

Caramelización y pardeamiento relativos (a alta temperatura)

Lactosa: 1,0

Glucosa: 2,5

Galactosa: 5,5

} para la mezcla 3,75

Nutrición:

La lactosa hidrolizada no produce trastornos debido



(continuación de la Tabla 2.1)

a intoleranciá en humanos y animales.

**Propiedades físicas:**

La laotosa hidrolizada posee menor punto de congelación  
(puede ser de utilidad en helados y otras  
formulaciones congeladas).

altas temperaturas (90-100 °C) (Demaimay y col., 1978). La velocidad de reacción es mayor y es aplicable a procesos continuos. Los tiempos de operación son de 0,5 a 2 horas (Harju y Kreula, 1978). El producto hidrolizado es marrón y puede necesitar decoloración, desmineralización y neutralización antes de ser utilizado. Si en el sustrato a hidrolizar quedara algo de proteína es muy complejo remover el color y sabor (Lin y Nickerson, 1977). Las desventajas de la hidrólisis ácida son: a) no se puede aplicar a leche u otros efluentes que contengan proteína, b) la presencia de sales inactiva al ácido por lo que se necesita un alto grado de desmineralización, c) el color marrón del producto resultante obliga a la decoloración por carbón activado, d) por lo general se forman productos secundarios indeseables, y e) el alto costo de los materiales necesarios para la construcción de la planta, ya que éstos deben resistir condiciones muy agresivas. Dado que su aplicación es limitada no se utiliza demasiado a nivel comercial (Vujicic y col., 1977; Demaimay y col., 1980; Demaimay y col., 1978; Coughlin y Nickerson, 1975).

■ **Hidrólisis enzimática:** Es el método más utilizado para hidrolizar la lactosa. Las enzimas que se utilizan para la hidrólisis enzimática de la lactosa pueden provenir de diversas fuentes, siendo las más empleadas para productos alimenticios las de *Kluyveromyces* sp. y *Aspergillus* sp.. Las  $\beta$ -galactosidasas catalizan la hidrólisis de  $\beta$ -D-galactósidos y de  $\alpha$ -L-arabinósidos. También son capaces de catalizar la síntesis de ciertos oligosacáridos por medio de la transferencia de residuos de galactósidos. Esta transferencia ocurre preferentemente al alcohol primario de la D-glucosa (Richmond y col., 1981). Las propiedades de las

enzimas dependen de su origen, aunque su especificidad se mantiene esencialmente igual. Las lactasas producidas por levaduras son intracelulares, pero los hongos pueden producir enzimas extracelulares.

Enzimas provenientes de diferentes orígenes e incluso de diferentes fabricantes tienen diferentes óptimos de pH y temperatura. En la Tabla 2.2 se muestran las condiciones recomendadas para el uso de diversas lactasas (Zadow, 1986; Gekas y López Leiva, 1985). Por lo general las enzimas son activas dentro de un rango estrecho de pH. Por ejemplo, de las enzimas descritas en la Tabla 2.2, sólo la proveniente de *Aspergillus oryzae* tiene suficiente actividad como para ser usada ventajosamente en leche y en suero dulce, ambos a su pH original. Las enzimas provenientes de levaduras tienen poca estabilidad térmica en los medios de cultivo habituales, por lo que se deben utilizar por debajo de los 40°C, siendo su óptimo 30-35°C. Su pH óptimo es 6-7,5, por lo que se utilizan preferentemente para leche y suero dulce. Las enzimas fúngicas son estables en un rango de temperatura más amplio. Su óptimo es alrededor de 55°C y pueden ser utilizadas hasta 69°C. Su rango de pH óptimo, más bajo que el de las lactasas de levadura, es 2,5-5,5 (Miller y Brand, 1980; Mustranta y col. 1979).

Para la hidrólisis enzimática se pueden emplear básicamente tres técnicas: enzimas solubles (se usan una sola vez), sistemas con recuperación de la enzima, generalmente por medio de membranas (se usa varias veces) y enzimas inmovilizadas.

■ Enzimas solubles: Para elegir la enzima soluble a emplear

TABLA 2.2  
Propiedades de lactasas provenientes de diversas fuentes.

ORIGEN	pH		TEMPERATURA OPTIMA (°C)	COFACTORES
	OPTIMO	ESTABILIDAD		
<i>Aspergillus niger</i>	3,0-4,0	2,5-8,0	55-60	no
<i>Aspergillus orizae</i>	5,0	3,5-8,0	50-55	no
<i>Kluyveromyces</i> ó <i>Saccha- romyces fragilis</i>	6,6	6,5-7,5	37	Mn <sup>+2</sup> , K <sup>+</sup>
<i>Kluyveromyces</i> ó <i>Saccha- romyces lactis</i>	6,9-7,3	7,0-7,5	35	Mn <sup>+2</sup> , K <sup>+</sup>
<i>Escherichia coli</i>	7,2	6,0-8,0	40	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2-7,1		55	
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	6,5	-	60	no

se deben tener en cuenta el sustrato, el pH de trabajo, la temperatura máxima y el tiempo de contacto, la actividad y el costo de la enzima. Para reducir costos se pueden necesitar tiempos de contacto largos (varias horas) y temperaturas de 37-45 °C. Con la leche como sustrato este proceso da lugar a deterioro microbiano. (Zadow, 1986; Miller y Brand, 1980; Gekas y López-Leiva, 1985).

■ **Sistemas con recuperación de la enzima por medio de membranas:** La base de este proceso es la permeabilidad diferenciada de la enzima y la lactosa a través de membranas de ultrafiltración. La lactosa y sus productos de hidrólisis permean y la enzima queda retenida. A fin de poder recuperar selectivamente la lactasa de la mezcla de reacción se debe pasar el material a hidrolizar previo a la reacción por la misma membrana. Es decir que se deben utilizar sustratos libres de proteína (permeatos). La enzima se recupera por ultrafiltración de la mezcla de reacción. El permeato hidrolizado puede después juntarse con el concentrado de leche ó suero ó sino se puede procesar cada efluente por separado, obteniéndose concentrados de proteína y jarabes de lactosa hidrolizada.. Al ser un proceso complejo no es utilizado comercialmente (Miller y Brand, 1980; Norman y col, 1978; Roger, 1976)

■ **Enzimas inmovilizadas:** Este es el método con mayor potencial de aplicación para operaciones en gran escala, ya sea para hidrolizar leche, suero o permeatos. La lactasa ha sido inmovilizada en varios soportes insolubles, encerrada dentro de membranas semipermeables, colocada entre dos membranas de diálisis y en reactores de fibra hueca. Varios países poseen plantas que trabajan con enzimas

inmovilizadas; sin embargo muchos de los sistemas empleados no son aptos para leche ya que, a pH mayor que 6,0, su actividad es muy baja. En Japón y Australia se desarrolló un sistema para hidrolizar leche y suero que utiliza la lactasa de *Aspergillus oryzae* inmovilizada sobre una resina. Pese a que su pH óptimo es 5,0, a pH 6,8 retiene un 50 % de su actividad. Se trabaja a 35-40 °C y para minimizar el crecimiento microbiano se utilizan tiempos de hidrólisis entre 1 y 5 minutos, dependiendo del sustrato (Zadow, 1986). Aparte de su menor costo respecto de los otros sistemas de hidrólisis de lactosa, el empleo de enzimas inmovilizadas tiene la ventaja que, debido a los cortos tiempos de contacto, no hay problemas de aparición de sabores extraños y que además no se agrega ningún aditivo a la leche. Para evaluar el costo de este proceso se deben considerar la actividad y vida operativa útil de la preparación, el crecimiento microbiano y el diseño del reactor. En bibliografía se han desarrollado numerosos sistemas de enzimas inmovilizadas para la hidrólisis de leche y sueros y permeatos diluïdos (Sprossler y col., 1981; Sprossler y Plainer, 1983; Plainer y col., 1982; Pastore y col., 1974; Okos y col., 1978; Harju y col., 1978; Harju y Heikonen, 1982; Hustad y col., 1973a; Hustad y col., 1973b; Hultin, 1983; Giacín y col., 1974; Jones y White, 1985; Yang y col., 1984; Finocchiaro y col., 1980).

El uso de enzimas solubles tiene ventajas cinéticas respecto de las otras dos técnicas, pero se tiende a prolongar el uso de las mismas mediante el empleo de técnicas de inmovilización. Los costos relativos de los tres procesos han ido cambiando en los últimos años según la evolución la tecnología. El costo de las enzimas solubles

(sin recuperación) ha disminuído considerablemente en los últimos años, lo mismo que el de las enzimas inmovilizadas. Se debe tener en cuenta que el costo de las enzimas solubles está en relación directa con la pureza de las mismas, pero el uso de enzimas más baratas puede dar lugar a la formación de sabores extraños, probablemente debido a la actividad de proteasas.

La velocidad y el grado de hidrólisis alcanzado dependen del origen de la enzima utilizada, su concentración, tiempo y condiciones de reacción y concentración de sustrato. La inhibición por productos reduce la velocidad de la reacción a medida que la hidrólisis avanza y también depende de la fuente de la enzima. Por ejemplo, la enzima de *Aspergillus niger* es más intensamente inhibida por uno de sus productos de reacción, la galactosa, que la de *Aspergillus oryzae* (Sprossler y col., 1983). La lactasa de *Saccharomyces* ó *Kluyveromyces lactis* es, aparentemente, menos inhibida por sus productos que las lactasas provenientes de hongos (*Aspergillus niger* y *oryzae*). Según los datos de Miller y Brand (1980), trabajando con igual concentración de ambas enzimas, cada una a su temperatura y pH óptimo, al cabo de 2 horas con la enzima de *S. lactis* se alcanza un 15 % más de hidrólisis que con la lactasa de *A.niger*. La velocidad de hidrólisis con la lactasa de *S. lactis* está cerca del máximo a concentraciones de lactosa similares a las de la leche (4,5-5 % p/p). En cambio, para la enzima de *A. niger*, la velocidad de hidrólisis sigue aumentando hasta que la concentración de lactosa llega al límite de la solubilidad (Miller y Brand, 1980). Los autores Harju y Heikonen (1982) encontraron que, para la lactasa de *Aspergillus niger*

adsorbida en una resina de fenol-formaldehído, el mejor sustrato desde el punto de vista cinético es el permeato. La constante de velocidad es un 20 % mayor con permeato que con suero desmineralizado y éste a su vez es levemente mejor sustrato que suero entero.

### 2.2.2. Intolerancia a la lactosa

Cuando un ser humano ingiere lactosa, ésta es hidrolizada en el intestino delgado a glucosa y galactosa por acción de una  $\beta$ -galactosidasa que está situada en el epitelio del intestino. En cierta porción de la población mundial, la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa está por debajo de lo normal o puede ser cercana a cero. La tolerancia a la lactosa varía con la raza y población, siendo, en general, la raza blanca muy tolerante y, dentro de las razas negra y amarilla se presenta entre 70 y 100 % de intolerancia (Mustranta y col. 1979). En estos casos al consumirse productos que contienen lactosa, ésta pasa sin digerirse al intestino grueso. Se produce un aumento de la osmolalidad en los fluidos intestinales y aumenta la cantidad de agua que llega al intestino. La lactosa no digerida puede ser fermentada por los microorganismos intestinales generando ácidos, hidrógeno y dióxido de carbono. Estos dos efectos son los responsables de los síntomas que presentan las personas intolerantes a la lactosa: dolor abdominal, flatulencia, náuseas, diarrea y pérdida del apetito (Hourigan y Mittal, 1984; Torun y col., 1979)

### 2.3. Preservación de alimentos por el método de factores combinados



### 2.3.1. Factores que inhiben el crecimiento microbiano

Los procesos de preservación de los alimentos tienen como objetivo primario prolongar la vida útil de los mismos a fin de permitir su almacenamiento y distribución. También deben asegurar sus características organolépticas y su valor nutritivo, que depende, entre otros factores, de las operaciones a las que se someten las materias primas durante su procesamiento y de las condiciones de almacenamiento, tanto de las materias primas como del producto final. Para definir la calidad de un alimento se deben tener en cuenta tres aspectos: el higiénico-sanitario, ya que debe ser inocuo para la salud; el nutritivo, vinculado a la presencia de nutrientes y antinutrientes en el mismo, y la aceptabilidad del producto, la cual está ligada a la percepción psicosensores (Tannenbaum, 1982).

El objetivo primario de un proceso de preservación es lograr la estabilidad microbiológica del alimento, ya que está directamente relacionada la salud humana. Una vez logrado el control de esta forma de deterioro se debe considerar el desarrollo de otras reacciones adversas que pueden ocurrir, tanto durante las operaciones de pre-procesamiento como en el procesamiento y almacenamiento. Es decir, que también debe tenerse en cuenta la estabilidad enzimática y físico-química del alimento durante las etapas mencionadas.

La inhibición del crecimiento de los microorganismos puede lograrse mediante el control de una serie de factores dentro del alimento: actividad de agua ( $a_w$ ), temperatura de almacenamiento, pH, potencial redox, tratamiento térmico,

uso de conservadores, etc.. A continuación se dará una breve descripción de la influencia de algunos de los factores enumerados en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos.

Los microorganismos necesitan para su crecimiento una determinada cantidad de agua en el alimento. También la mayoría de las reacciones de deterioro requiere una cierta cantidad de agua que actúa como solvente de los reactantes y catalizadores. El parámetro que mejor indica la "disponibilidad del agua" en el alimento es la actividad de agua. Se la puede definir como la relación entre la presión de vapor de agua en el alimento respecto de la presión de vapor del agua pura, ambas a la misma temperatura. En la sección 2.3.3 se analizará más extensamente el concepto de actividad de agua y su cálculo en alimentos.

Al estudiar las relaciones entre el crecimiento de los microorganismos y la  $a_w$  se debe considerar que existe una  $a_w$  mínima debajo de la cual un dado microorganismo no crece (Scott, 1957). En la tabla 2.3, recopilada por Troller (1979), se presentan los valores de  $a_w$  mínima de crecimiento de algunos microorganismos de interés en alimentos para el caso en que los demás factores que influyen su desarrollo estén en los valores óptimos para cada microorganismo en particular. Cuando estos y otros factores del medio se desvían respecto del punto óptimo para el crecimiento de un microorganismo determinado, disminuye la resistencia del mismo frente a la  $a_w$  reducida, aumentando la  $a_w$  mínima que permite el crecimiento.

El desarrollo de microorganismos presenta algunas

TABLA 2.3

Actividades de agua mínimas para el crecimiento de microorganismos (Troller, 1979).

$a_w$	BACTERIAS	LEVADURAS	HONGOS
0,98	<i>C. botulinum</i> tipo E <i>Pseudomonas</i> (a)		
0,96	<i>Flavobacterium</i> , <i>Klebsiella</i> <i>Lactobacillus</i> (a), <i>Proteus</i> (a) <i>Pseudomonas</i> , <i>Shigella</i>		
0,95	<i>Alcaligenes</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Proteus</i> <i>Citrobacter</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Serratia</i> , <i>Lactobacillus</i> (a) <i>Clostridium botulinum</i> Tipos A, B y C		
0,94	<i>Lactobacillus</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Aerobacter</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> (a)		<i>Stachybotris</i>
0,93	<i>Lactobacillus</i> (a) <i>Streptococcus</i>		<i>Rhizopus</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Mucor</i>

(continuación de la Tabla 2.3)

0,92		<i>Rhodotorula, Pichia</i>	
0,91	<i>Corynebactrium</i> <i>Staphylococcus</i> (anaerobio) <i>Streptococcus</i> (a)		
0,90	<i>Lactobacillus</i> (a), <i>Vibrio</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Bacillus</i> (a), <i>Pediococcus</i>	<i>Hansenula</i> , <i>Saccharomyces</i>	
0,88		<i>Candida, Debaryomyces,</i> <i>Torulopsis, Hansenias-</i> <i>pora</i>	<i>Clados-</i> <i>porium</i>
0,87		<i>Debaryomyces</i>	
0,86	<i>Staphylococcus</i> (aerobio), <i>Vibrio</i> (a)		<i>Paecilomyces</i>
0,80		<i>Saccharomyces bailii</i>	<i>Aspergillus,</i> <i>Penicillum,</i>
0,75	<i>Halobacterium</i> , <i>Halococcus</i>		<i>Aspergillus,</i> <i>Wallemia</i>
0,70			<i>Cryosporium</i>
0,62		<i>Saccharomyces rouxii</i>	<i>Monascus</i>
0,61			<i>Xeromyces</i>

continuación de la Tabla 23

bisporus

(a) una especie

diferencias según se trate de bacterias, hongos o levaduras, pero en forma general se puede decir que las fases de crecimiento que se observan en cada caso son similares (Troller y Christian, 1978). Existe un primer período de adaptación, conocido como fase "lag", seguido por una fase de crecimiento acelerado (fase exponencial) y finalmente la velocidad de crecimiento disminuye, alcanzándose un equilibrio entre la velocidad de crecimiento y la de muerte (fase estacionaria). Eventualmente la velocidad de muerte puede ser mayor a la velocidad de crecimiento con lo cual se entra en una fase declinante, disminuyendo la población microbiana. A valores de  $a_w$  menores a la mínima para su crecimiento las células pueden permanecer latentes (fase "lag" infinita) ó morir (Sperber, 1983).

No se conoce el mecanismo exacto responsable de la inhibición del crecimiento microbiano a bajas actividades de agua, pero hay dos factores involucrados:

- Las células normalmente sufren plasmólisis cuando se transfieren de un medio de alta  $a_w$  a un medio de baja  $a_w$ , ya que la célula pierde agua. Por ejemplo *S. aureus* pierde alrededor del 50% de su agua intracelular si se lo cambia de un medio de  $a_w$  0,995 a otro de  $a_w$  0,950 (Koujima y col., 1978).

- Cuando la célula se coloca en un medio de  $a_w$  reducida, se pone en marcha un mecanismo celular que produce la regulación del contenido interno de solutos (por síntesis o toma de solutos del medio), de forma tal de justo exceder la osmolalidad externa y mantener constante su contenido de agua. Estos solutos sintetizados no interfieren con el

desempeño normal de las funciones metabólicas de la célula: son solutos "compatibles" (Brown, 1974).

Si la presión osmótica del medio es tan elevada que excede la capacidad osmorreguladora de la célula, se pierde agua irreversiblemente, cesa el crecimiento y se produce la muerte a una velocidad que depende tanto de la  $a_w$  como de otros factores ambientales. Los solutos compatibles más comunes son el ión potasio para bacterias halofílicas, prolina en bacterias osmotolerantes, ácido  $\gamma$ -amino butírico en bacterias moderadamente osmotolerantes y ácido glutámico en bacterias poco osmotolerantes (Troller, 1980). Para las levaduras los solutos compatibles son principalmente polioles, incluyendo glicerol y etanol (Brown, 1974). Las cepas más osmotolerantes, como *Saccharomyces rouxii*, retienen el glicerol con mayor eficacia que otras menos resistentes a la baja  $a_w$ , como *Saccharomyces cerevisiae*. *Debaryomyces hansenii* acumula glicerol en su fase logarítmica y arabitol en la fase estacionaria cuando crece en un medio de alta concentración de cloruro de sodio. La acumulación de arabitol, encontrada en varias levaduras, probablemente actúe como fuente de energía (Corry, 1987). Los hongos, por lo general, también acumulan polioles. *Geotrichum candidum* acumula manitol y arabitol y *Aspergillus niger* glicerol, eritritol y manitol. La lista de solutos compatibles se agranda continuamente a medida que avanza la investigación y es tan diversa que se torna difícil encontrar una relación estructural entre todos ellos. Todo esto indica que los mecanismos de resistencia a la baja  $a_w$  y de osmorregulación son complejos y dependen del microorganismo considerado.

La  $a_w$  mínima de crecimiento de un microorganismos depende del soluto utilizado para disminuir la actividad de agua del medio. Por ejemplo, Scott (1959) encontró que la velocidad de crecimiento de *Paecylomyces amstelodami* es mayor en un medio con glucosa ó sacarosa que en otro con cloruro de magnesio, cloruro de sodio ó glicerol a la misma  $a_w$ . Sperber (1983) realizó una recopilación de datos sobre la influencia de varios solutos sobre la  $a_w$  mínima para el crecimiento de bacterias, la cual se encuentra en la tabla 2.4. Se observa que la  $a_w$  mínima para el crecimiento en presencia de glucosa o cloruro de sodio es más alta que en presencia de glicerol.

El mecanismo de osmorregulación celular funciona para mantener la homeostasis con respecto al contenido de agua. En las células vegetativas el proceso homeostático es activo, por lo tanto requiere energía adicional a la necesaria para el crecimiento celular (Gould, 1985). Si en el medio se limita el aporte de energía, por ejemplo reduciendo la concentración de oxígeno y/o nutrientes, controlando la temperatura tal que no sea la óptima para el microorganismo, reduciendo la  $a_w$  y el pH, el microorganismo no podrá afrontar el requerimiento adicional de energía y por lo tanto su velocidad de crecimiento disminuirá (Gould, 1985).

La temperatura es otro factor de gran importancia para el desarrollo de los microorganismos. Por lo general éstos presentan una mayor tolerancia a la  $a_w$  reducida cuando se encuentran a temperaturas cercanas a las óptimas para su crecimiento. Por ejemplo, *Clostridium botulinum* tipo B incubado a pH = 7,0 y a  $a_w$  0,96 no crece a 20°C; a 30°C se



TABLA 2.4

Influencia del soluto sobre la  $a_w$  mínima de crecimiento de bacterias (Sperber, 1983).

MICROORGANISMO	MINIMA $a_w$ PARA EL CRECIMIENTO EN		
	NaCl	GLUCOSA	GLICEROL
<i>Clostridium perfringens</i>	0,970	0,960	0,950
<i>Clostridium botulinum</i> tipo E	0,970	-	0,940
<i>Clostridium sporogenes</i>	0,945	0,965	0,935
<i>Lactobacillus helveticus</i>	0,963	0,966	0,928
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0,985	0,986	0,947
<i>Streptococcus lactis</i>	0,965	0,949	0,924
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,957	-	0,940

observa crecimiento luego de 8 días y a 40°C crece luego de tres días de incubación (Ohye y Christian, 1966). Para levaduras osmofílicas la  $a_w$  mínima para fermentar glucosa es 0,66 a 30 °C; 0,70 a 20 °C y 0,78 a 10 °C (von Schelhorn, 1950). Los estudios realizados por Ayerst (1966, 1969) confirman que los hongos son más tolerantes a la baja  $a_w$  cuando la temperatura es cercana a la óptima de crecimiento: *Aspergillus ruber* a 5°C crece a  $a_w$  0,85 mientras que a 37°C lo hace a 0,80.

El pH es un factor selectivo importante para el desarrollo de los microorganismos en los alimentos. En general se puede decir que el tipo de microorganismo que crece en un alimento está determinado (a una dada temperatura) principalmente por el pH y la actividad de agua, y ésta influirá sobre el pH mínimo de crecimiento. Por ejemplo en un alimento de pH 4,5 y  $a_w$  reducida sólo crecerán hongos y/o levaduras. A este mismo pH pero a  $a_w$  alta, los microorganismos involucrados en el deterioro son las bacterias ácido-lácticas. Para *Staphylococcus aureus*, los pH mínimo y máximo para su desarrollo en medios de laboratorio son 4,0 y 9,8 respectivamente (Corlett y Brown, 1980; Troller y Christian, 1978) y para los lactobacilos, los valores son 3,8 y 7,2 (Corlett y Brown, 1980). Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces rouxii* y *Saccharomyces bailii* crecen dentro del rango de pH comprendido entre 2,0-2,35 y 8,6 (Corlett y Brown, 1980; Troller y Christian, 1978). Los hongos son los que poseen el mayor rango de pH que permite crecimiento, siendo el valor mínimo 1,9 y el máximo 9,3 (Corlett y Brown, 1980).

Otros factores que tienen influencia sobre el pH

mínimo de crecimiento son el tipo de soluto presente y la especie de microorganismo. Baird Parker y Freame (1967) demostraron que el cloruro de sodio es más inhibitorio que el glicerol a la misma  $a_w$ . Por ejemplo para esporas de *Clostridium botulinum* tipo B, el pH mínimo de crecimiento es 5,3 en un medio con glicerol y 7,0 en un medio con cloruro de sodio, mientras que para esporas de *Clostridium botulinum* tipo A el pH mínimo es 5,3 en glicerol y 5,5 en cloruro de sodio ( $a_w = 0,97$ ).

La concentración de oxígeno también influye sobre el crecimiento microbiano. Los microorganismos facultativos tienen una  $a_w$  mínima de crecimiento menor en condiciones aeróbicas que en condiciones anaeróbicas. Por ejemplo, para *Staphylococcus aureus* la  $a_w$  mínima de crecimiento en presencia de oxígeno es 0,86, mientras que en ausencia de oxígeno es 0,82 (Scott, 1953). Por lo general los microorganismos aerobios se vuelven más sensibles a la falta de oxígeno a menor  $a_w$  y temperatura (Corry, 1987).

Los conservadores o agentes antimicrobianos ayudan a prevenir el crecimiento de los microorganismos en los alimentos. Deben ser capaces de inhibir el crecimiento microbiano, no ser tóxicos, metabolizarse y eliminarse del organismo sin quedar retenidos en el mismo, ser solubles en agua (ya que los microorganismos crecen en la fase acuosa de los alimentos), ser estables en el alimento, no tener olor ó sabor y ser económicos. Es muy difícil encontrar compuestos que cumplan simultáneamente con todos estos requisitos.

Los ácidos orgánicos lipofílicos, preferentemente en

su estado no disociado, presentan actividad antimicrobiana. Según una hipótesis reportada en bibliografía estos compuestos inhiben el crecimiento microbiano por interferir con la permeabilidad de la membrana celular al producir un desacoplamiento entre el transporte de sustratos y la fosforilación oxidativa del sistema transportador de electrones (Baird-Parker, 1980). Las formas no disociadas de ácidos como el sórbico, propiónico y benzoico podrían difundir libremente a través de la membrana celular e ionizarse dentro de la célula dando lugar a protones que acidifican el medio interno del microorganismo, que normalmente es neutro (Corlett y Brown, 1980). El efecto de los conservadores depende del pH a través de la constante de disociación del conservador ya que la forma no disociada es la que presenta mayor actividad antimicrobiana.

Dentro de los conservadores más utilizados dentro de la industria alimentaria se pueden mencionar:

- **Benzoatos:** su actividad antimicrobiana es máxima en el rango de pH 2,5-4,0 ( $pK_a = 4,2$ ); por lo tanto se utilizan más en alimentos ácidos y son más efectivos para hongos y levaduras que para bacterias, ya que a pH mayor que 4,5 su actividad decrece notablemente.
  
- **Parabenos:** son ésteres alcalinos del ácido para-hidroxibenzoico. Como no son ácidos débiles y el grupo carboxilo está esterificado, la molécula activa no disociada está presente en un rango amplio de pH ( $pK_a = 8,5$ ). La actividad antimicrobiana es directamente proporcional a la longitud de la cadena, pero disminuye la solubilidad al aumentar ésta. Por lo general son más activos contra hongos

y levaduras que contra bacterias. Son más caros que otros preservadores y no son muy solubles en agua.

■ Propionatos: son muy efectivos frente a hongos y algo menos frente a bacterias y levaduras. Actúa a pH inferior a 5,5 (pKa= 4,9). Se lo utiliza preferentemente en pan, tortas, quesos procesados y alimentos para animales.

■ Acido sórbico y sorbatos: el sorbato de potasio es el conservador más empleado en alimentos. El ácido sórbico es un ácido graso  $\alpha,\beta$ -insaturado de cadena recta, cuya fórmula molecular es  $\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$ . El grupo carboxilo reacciona fácilmente formando sales y ésteres. De las sales del ácido sórbico, la más importante es la de potasio por su alta solubilidad en agua. Los sorbatos inhiben o retardan el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias, pero generalmente su acción es más pronunciada sobre hongos y levaduras. El valor de su constante de disociación, pKa, es 4,8; por lo tanto tiene mayor poder de inhibición en alimentos ácidos. El pH máximo para su actividad es 6,0-6,5, mayor que para benzoatos ó propionatos. Se lo utiliza para inhibir el crecimiento de microorganismos en quesos, manteca, jamones, embutidos fermentados, jugos y jarabes, alimentos de humedad intermedia, panes, pescado ahumado, vinos, jugos de fruta, aderezos, bebidas carbonatadas, productos derivados del tomate, dulces y jaleas, salchichas, carne, yogur, carne de cerdo, etc. (Sofos, 1989).

### 2:3.2. Método de los factores combinados

El primer método de preservación que utilizó el

hombre, basado en el control de la actividad de agua, fue la deshidratación. Sin embargo, debido a los cambios de textura (baja capacidad de rehidratación) y sabor que sufre el alimento, en las últimas décadas se buscó modificar y mejorar las tecnologías de conservación de los alimentos que se basan en la reducción de la actividad de agua, a fin de obtener productos de mejor calidad.

Así, se desarrollaron entonces los "alimentos de humedad intermedia" (A.H.I.), que basan parcialmente su estabilidad en la reducción de la  $a_w$  por agregado de solutos o por agregado de solutos y deshidratación posterior. Son alimentos estables sin refrigeración ó proceso térmico. El rango de  $a_w$  de estos alimentos es aproximadamente 0,86-0,65, el cual corresponde a una humedad en base seca del 10 al 40 % p/p (Karel, 1976).

Dentro de los A.H.I se encuentran algunos que han sido producidos desde hace muchos años, como los los preservados por adición de azúcar (frutas confitadas, compotas, jaleas, jarabes, etc.), aquellos que han sido secados con el agregado de sal (jamón curado, pescados salados, embutidos crudos) y productos de panadería (tortas de fruta, pasteles rellenos de fruta, etc.). Entre los A.H.I. desarrollados recientemente se encuentran comidas para animales, salsas, pastas secas (ravioles, tortellettis), leche condensada, jugos concentrados, sopas concentradas (Brimelow, 1985).

En los últimos 20 a 30 años se han realizado gran cantidad de trabajos de investigación y de desarrollo en el área de los A.H.I y en la tecnología involucrada en su

formulación y fabricación. Sin embargo al examinar los avances realizados se llega a la conclusión que la mayoría de los A.H.I existentes han sido formulados para fines específicos (fuerzas armadas, programas espaciales, etc.) ó son los alimentos tradicionales ya mencionados anteriormente. Es decir que no hay nuevos A.H.I. que sean de uso masivo. Dada la alta cantidad de humectante que se debe de agregar a los A.H.I a fin de lograr su estabilidad (Benmergui y col., 1979; Chirife y col., 1980; Chirife y Ferro Fontán, 1980), la aceptabilidad de los mismos es baja ya que el cambio en las características organolépticas es bastante pronunciado respecto del alimento original. Otra desventaja que poseen es que, pese a su estabilidad microbiológica, están expuestos a reacciones de pardeamiento no enzimático, reacciones catalizadas por enzimas, pérdida de nutrientes, oxidación de lípidos y otras reacciones producidas por radicales libres, etc. Es bien sabido (Labuza, 1975) que las velocidades de las reacciones de pardeamiento no enzimático y oxidación de lípidos están muy cercanas a sus valores máximos para ciertas formulaciones de los A.H.I. Otra desventaja de este tipo de alimentos es la tendencia de los consumidores hacia productos que posean cada vez menor cantidad de aditivos, lo cual implica una baja aceptación de los A.H.I. Por lo tanto este tipo de alimentos no ha seguido desarrollándose (Troller y Christian, 1978).

Por las razones y limitaciones expuestas es conveniente trabajar a valores de actividad de agua y contenido de humedad mayores que los usuales para los A.H.I., con lo cual se hace necesario agregar factores adicionales a fin de potenciar los efectos de la  $a_w$  para

lograr la estabilidad microbiológica. Es así como surgieron los alimentos de alta humedad (A.A.H.) (Sperber, 1983). La estabilidad microbiológica de dichos alimentos se logra por medio de una combinación de factores que obstaculizan el crecimiento microbiano ("hurdles") (Leistner y Rödel, 1975) que incluyen, entre otros factores, una reducción moderada de la  $a_w$  (en el rango 0,90-0,97), reducción ligera del pH, tratamiento térmico suave, agregados de conservantes, uso de atmósfera controlada en el envase, incorporación de flora competitiva inocua, control del potencial redox, aplicación de técnicas de irradiación, reducción de la temperatura de almacenamiento, escaldado a fin de inactivar enzimas y disminuir la población microbiana inicial, etc.. Entonces un A.A.H. puede definirse como aquel cuya estabilidad microbiológica es lograda por el uso de varios factores, ninguno de los cuales sería letal para los microorganismos si fuera usado individualmente. Estos nuevos alimentos, aparte de ser estables microbiológicamente, tienen buena palatabilidad (Leistner y col., 1981). El efecto de la combinación de los factores de estrés es de fundamental importancia en la preservación de los alimentos, ya que éstos controlan el deterioro no sólo microbiano sino también químico y organoléptico. El concepto de obstáculo, que es solamente una ilustración del hecho ya conocido que la estabilidad microbiológica de los alimentos se logra por complejas interacciones de numerosos factores, se puede utilizar para el diseño y control de alimentos.

Por ejemplo, para la conservación de la carne, se necesitan bajas temperaturas de almacenamiento, lo que implica un consumo de energía importante. Este factor de inhibición del crecimiento microbiano puede reemplazarse por



otro de menor costo, a saber descenso de  $a_w$  o leve descenso del pH, ya que los factores de inhibición de crecimiento microbiano que estabilizan microbiológicamente a un alimento son, hasta cierto punto, intercambiables (Leistner, 1985). Otro de los factores en los que se basa la obtención de nuevos alimentos preservados por métodos combinados es la aplicación de calentamiento suave (70-110°C), de forma tal que los microorganismos y esporas sufran daño subletal. Así, no pueden sobreponerse a la presencia de los demás factores de estrés presentes en el alimento, los que, si la célula estuviera intacta, no serían suficientes para frenar el crecimiento.

Otro factor importante a tener en cuenta es que los factores de estrés pueden no sólo disminuir en el alimento durante el almacenamiento, sino que también pueden aumentar y cambiar durante el proceso y almacenamiento de un producto, como ocurre, por ejemplo, en los embutidos curados y ahumados. En este caso los "hurdles" ocurren en secuencia y son significativos durante cierto período de la maduración del embutido para inhibir el crecimiento de bacterias indeseables (*Salmonella* sp., *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, bacilos gram negativos que producen deterioro y hongos) y para permitir la selección de la flora adecuada (bacterias ácido-lácticas). Así los "hurdles" bajan su concentración durante el almacenamiento (nitritos), son importantes sólo durante un cierto período del proceso (pH), aumentan a lo largo del tiempo ( $a_w$ ) o se aplican preferentemente sobre el producto terminado (ahumado). La secuencia de factores de inhibición del crecimiento microbiano se puede esquematizar de la siguiente manera (Leistner, 1985)

nitrito  $\longrightarrow$  potencial redox  $\longrightarrow$  flora competitiva  $\longrightarrow$  pH  $\longrightarrow$   
 $a_w \longrightarrow$  humo

El nitrito inhibe a *Salmonella* sp; pH y  $a_w$  a *C. botulinum*; pH, refrigeración y potencial redox a *S. aureus* y el humo a hongos superficiales (Leistner, 1985).

Recientemente se ha informado en literatura (Sajur, 1985, Kanterewicz y col., 1985b; Alzamora y col., 1990) el desarrollo de nuevos procesos de conservación de alimentos a partir de los siguientes factores: 1) reducción de la  $a_w$  por agregado de alcoholes polihídricos, azúcares y/o sal; 2) retardo del crecimiento microbiano por adición de agentes antimicrobianos y fundamentalmente antimicóticos, como ácido sórbico, ácido propiónico, ácido benzoico, etc. y 3) reducción del pH del alimento de forma tal que sea compatible con sus características organolépticas. Todos estos factores, combinados, con inclusión o no de un tratamiento térmico suave, permiten la estabilidad microbiológica en el rango de  $a_w$  0,90-0,97.

La calidad de un alimento en dicho rango de  $a_w$  se puede modificar también por reacciones químicas de deterioro. Las que revisten mayor importancia son el pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard) y la degradación de nutrientes. Hasta el momento la mayoría de las investigaciones sobre estas reacciones se realizaron sobre los A.H.I. Recientemente se han empezado a realizar estudios sobre la evaluación de la calidad nutritiva y organoléptica de alimentos a valores de  $a_w$  mayores de 0,90 (Fox y col., 1982; Fox y Loncin, 1982; Petriella y col.,

1985; Cerrutti y col., 1985; Buera, 1988; Mauri, 1988), No obstante las investigaciones sobre este tema son aún escasas.

Es importante hacer notar que pese a que existen en bibliografía numerosos trabajos sobre hidrólisis enzimática de lactosa, todos fueron realizados sobre sistemas modelo (lactosa, agua ó buffer y/o sales), en leche ó en leche concentrada hasta 20-25 % p/p de sólidos y en suero de queso de variadas concentraciones dentro del rango 5-25 % (Mahoney y col., 1991). Por lo tanto es importante realizar un estudio profundo sobre los factores que afectan la hidrólisis enzimática de lactosa en medios altamente concentrados.

### 2.3.3. Actividad de agua en alimentos

Dado que el método de conservación propuesto utiliza como una de los factores de estrés microbiano el control de la actividad de agua, se analizará brevemente el concepto de  $a_w$  y la predicción de la misma en sistemas binarios de electrolitos y de no electrolitos y en sistemas de multicomponentes.

En un sistema líquido-vapor, compuesto por una sustancia pura, la tendencia de escape de las moléculas se mide en términos de la energía libre de Gibbs (G). En un sistema de multicomponentes la tendencia de escape del solvente (componente 1) está dada por su potencial químico,  $\mu_1$ .

$$\mu_1 = \left. \frac{\partial G}{\partial n_1} \right]_{T, P, n_2, \dots, n_i} \quad (2.1)$$

donde  $n_i$  es el número de moles de la especie  $i$ . El potencial químico del solvente, agua en este caso, está dado por

$$\mu_1 = R T \ln f_1 + A_1 \quad (2.2)$$

siendo  $f_1$  la fugacidad y  $A_1$  una constante que depende de la temperatura.

Para un cambio en la concentración del agua a una dada temperatura

$$\mu_1 - \mu_1' = R T \ln ( f_1 / f_1' ) \quad (2.3)$$

donde  $\mu_1'$  y  $f_1'$  son el potencial químico y la fugacidad respectivamente del nuevo estado.

El concepto de actividad de agua ( $a_w$ ) se define como la relación, a una dada temperatura, de la fugacidad de una sustancia en un dado estado ( $f$ ) y su fugacidad en algún estado standard ( $f^\circ$ ). Para el estado standard  $a_w^\circ = 1$  (Lewis y Randall, 1961).

Refiriendo la ecuación anterior (2.3) al estado standard

$$\mu_1 - \mu_1^\circ = R T \ln a_1 \quad (2.4)$$

Si se elige como estado standard el agua pura a presión atmosférica, la actividad del agua en cualquier solución es

$$a_w = f_1 / f_1^{\text{agua pura}} \quad (2.5)$$

En soluciones acuosas y en particular en alimentos, a temperatura y presión normales, la diferencia entre la fugacidad y la presión de vapor es despreciable, con lo cual se puede aproximar

$$f_1^{\text{agua pura}} = p_1^{\text{agua pura}} \quad (2.6)$$

pues la presión de vapor del agua,  $p_1$ , se aproxima a la de un gas ideal. Por lo tanto se puede emplear la siguiente definición operativa de la actividad de agua

$$a_w = p_1 / p_1^{\text{agua pura}} \quad (2.7)$$

donde  $p_1$  es la presión de vapor del agua en la solución ó alimento y  $p_1^{\text{agua pura}}$  es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura y presión. Esta expresión también puede relacionarse con la humedad relativa en equilibrio con el alimento (HRE %) por la ecuación

$$a_w = \frac{\text{H R E \%}}{100} \quad (2.8)$$

Es importante poder predecir la  $a_w$  de un sistema. Para esto se debe conocer la composición del mismo. Para el caso de alimentos procesados se deben considerar dos tipos: a) alimentos de  $a_w$  menor que 0,75, donde debido a la baja proporción de agua los fenómenos de sorción son los principales responsables del descenso de la  $a_w$  y b) los

alimentos de  $a_w$  mayor a 0,75. en los que el agua constituye una proporción considerable del mismo y por lo tanto la depresión de la  $a_w$  se debe principalmente a fenómenos de disolución de solutos. El suero de queso concentrado pertenece a la segunda categoría; por lo tanto se tratará el tema de la predicción de  $a_w$  en estos alimentos.

De acuerdo a la ley de Raoult, para soluciones ideales,

$$p_i = x_i p_i^{\circ} \quad (2.9)$$

Es decir que la presión parcial de cualquier componente de una solución ( $p_i$ ) es igual a la presión parcial del componente puro ( $p_i^{\circ}$ ) por su fracción molar en la solución ( $x_i$ ). Por lo tanto

$$a_w = x_w = \frac{n_w}{n_w + n_s} \quad (2.10)$$

donde  $n_w$  es el número de moles de agua y  $n_s$  el número de moles de soluto. La ley de Raoult sólo es válida para soluciones ideales, y algunos solutos se desvían del comportamiento ideal, siendo este efecto más marcado a altas concentraciones. Sin embargo para soluciones diluidas esta expresión da valores precisos de la  $a_w$  (desviaciones leves de la idealidad) (Ross, 1975).

Generalmente los compuestos iónicos muestran mayores desviaciones que los no iónicos debido a las fuerzas de atracción entre iones y moléculas polares. Las desviaciones de los compuestos iónicos aumentan con el número de iones generado por molécula. Por lo tanto, para calcular los

valores de  $a_w$  para soluciones no ideales se usa un coeficiente osmótico molal  $\phi$ :

$$\ln a_w = \frac{-\nu m \phi}{55,51} \quad (2.11)$$

donde  $\nu$  es el número de iones generados por molécula,  $m$  la concentración molal del soluto y 55,51 el número de moles de agua en un kilogramo de agua. Los valores de  $\phi$  para varios electrolitos han sido reportados por Robinson y Stokes (1965) y para no-electrolitos por Scatchard y col. (1938).

Pitzer (1973) desarrolló un sistema de ecuaciones para las propiedades termodinámicas de los electrolitos sobre un análisis del modelo de Debye-Hückel. Dichas ecuaciones sirven para calcular la  $a_w$  de soluciones hasta una concentración de 6 molal. El coeficiente osmótico está dado por la siguiente expresión (Pitzer, 1973):

$$\begin{aligned} \phi - 1 = & |Z_M Z_X| f + m \left[ \frac{2 \nu_M \nu_X}{\nu} \right] B_{MX} + \\ & + m^2 Z \frac{(\nu_M \nu_X)}{\nu} C_{MX} \end{aligned} \quad (2.12)$$

Donde  $\nu_M$  y  $\nu_X$  son el número de iones M y X de la fórmula y  $Z_M$  y  $Z_X$  son sus respectivas cargas en unidades electrónicas;  $\nu = \nu_M + \nu_X$ . Las otras cantidades se definen como:

$$f = -A \frac{I^{1/2}}{1 + b I^{1/2}}$$

$$B_{MX} = \beta_{MX}^{(0)} + \beta_{MX}^{(1)} \exp(-\alpha I^{1/2})$$

$\beta_{MX}^{(0)}$  y  $\beta_{MX}^{(1)}$  definen el primero y segundo coeficiente virial y  $C_{MX}$  define el tercer coeficiente.  $I$  es la fuerza iónica, definida como:

$$I = \frac{1}{2} \sum m_i z_i^2$$

$A$  es el coeficiente de Debye-Hückel para la función  $\phi$  y tiene un valor de 0,392 a 25 °C. La constante  $b$  se toma igual a 1,2 para todos los solutos (Pitzer, 1973) y  $\alpha = 2$  (Pitzer y Mayorga, 1973).

Bromley (1973) desarrolló un sistema de representación y estimación de las propiedades termodinámicas de electrolitos fuertes que fue descrito por Pitzer y Mayorga (1973) como una simplificación del modelo de Pitzer. El tercer coeficiente del virial es omitido y el segundo coeficiente es modificado a una expresión que depende de la fuerza iónica pero solo con un parámetro ( $B$ ). La ecuación de Bromley, pese a ser menos exacta, es satisfactoria para altas concentraciones de soluto y está dada por la siguiente expresión:

$$\phi = 1 - 2,303 \left\{ A_\nu |z_+ z_-| \frac{I^{1/2}}{3} \sigma(\rho, I^{1/2}) - (0,06 + 0,6 B) \cdot |z_+ z_-| \frac{I}{2} \psi(a, I) - B \frac{I}{2} \right\} \quad (2.13)$$

donde:

$$A_\nu = 0,511 \text{ Kg}^{1/2} \text{ mol}^{1/2} \text{ a } 25^\circ\text{C}.$$



$|Z_+ Z_-|$  es el producto de la carga de los iones.

$$\sigma(\rho, I^{1/2}) = \frac{3}{(\rho I^{1/2})^3} \left[ 1 + \rho I^{1/2} - \frac{1}{1 + \rho I^{1/2}} - 2 \ln(1 + \rho I^{1/2}) \right]$$

$\rho = 1$  para todos los solutos

B es un parámetro para cada soluto.

$$\psi(a, I) = \frac{2}{a I} \left[ \frac{1 + 2 a I}{(1 + a I)^2} - \frac{\ln(1 + a I)}{a I} \right]$$

$$a = \frac{1,5}{|Z_+ Z_-|}$$

Los valores obtenidos del coeficiente osmótico aplicando cualquiera de las dos ecuaciones (Pitzer ó Bromley) se pueden utilizar para calcular la  $a_w$  por medio de la ecuación (2.11).

Para predecir la  $a_w$  de soluciones acuosas de no-electrolitos se ha utilizado con mucho éxito el modelo de Norrish (1966). El mismo se basa en un análisis termodinámico de las soluciones y propone la siguiente correlación para sistemas binarios de no-electrolitos;

$$a_w = x_1 \exp(-K x_2^2) \quad (2.14)$$

donde  $x_1$  y  $x_2$  son las fracciones molares de agua y soluto respectivamente y K es la constante que las correlaciona.

Norrish (1966) reportó los valores de K para sacarosa, azúcar invertido, jarabes de glucosa, glicerol y sorbitol. En los últimos años se han reportado valores de K para diversos solutos de interés en alimentos (Miracco y col., 1981; Chirife y Ferro Fontán, 1980)

Para los sistemas multicomponentes, Ross (1975) desarrolló una ecuación muy simple para estimar la actividad de agua, a través de varias simplificaciones de la ecuación de Gibbs-Duhem:

$$\sum n_i d \ln ( a_i ) = 0 \quad (2.15)$$

donde  $n_i$  es el número de moles del componente  $i$  y  $a_i$  su actividad. Suponiendo que no hay interacción entre los distintos solutos, Ross (1975) llega a la expresión

$$a_w = (a_w^{\circ} ) (a_w^{\circ} ) (a_w^{\circ} ) \dots \dots \dots (a_w^{\circ} ) \quad (2.16)$$

es decir que la  $a_w$  de la mezcla es el producto de la  $a_w$  de cada componente ( $a_{wi}^{\circ}$ ) a la molalidad total del sistema, independientemente de los otros solutos presentes. Esta ecuación se cumple muy bien para no-electrolitos y no-electrolitos y un electrolito fuerte. Para dos ó más electrolitos fuertes comienza a ser menos exacta a valores de  $a_w$  inferiores a 0,85 (Ferro Fontán y col., 1980).

Se han sugerido en bibliografía varias ecuaciones como las de Benmergui y col. (1979), Ferro Fontán y col. (1979), Chirife y col. (1980) para electrolitos, no electrolitos y mezclas de ambos. Estas ecuaciones dan una

muy buena aproximación a la  $a_w$  real y tienen en cuenta que en los alimentos, si bien los componentes de bajo peso molecular como azúcares, sales y polioles son los que más afectan al descenso de la  $a_w$ , el efecto de los componentes de alto peso molecular, como proteínas y otras macromoléculas, no puede ser despreciado. En los componentes insolubles aparentemente hay un efecto capilar y también existen combinaciones particulares de solutos que pueden interactuar entre sí dando actividades de agua mayores o menores que las esperadas. Por lo tanto, cuando se trabaja con sistemas complejos es conveniente controlar con una medida experimental la  $a_w$  predicha a partir de un modelo (Corry, 1987).

### 3. RESUMEN DE LAS EXPERIENCIAS REALIZADAS

A los efectos de lograr los objetivos propuestos el estudio realizado comprendió principalmente tres áreas fundamentales de trabajo, a saber:

- Hidrólisis de lactosa en suero de queso y en sistemas modelo. (punto 4).

#### 1) Suero de queso

Se estudió la influencia de:

la velocidad de agitación  
concentración de enzima  
temperatura y contenido de sólidos  
pH  
variabilidad de la materia prima  
presencia de conservadores  
glucosa y galactosa  
concentración de cristales de lactosa

sobre la velocidad de hidrólisis enzimática de la lactosa.

#### 2) Sistemas modelo

Se estudió la influencia de la temperatura sobre la velocidad de hidrólisis enzimática de la lactosa en sistemas modelo con sacarosa ó glicerol.

- Estabilidad microbiológica del suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado durante su procesamiento y almacenamiento (punto 5).

Se determinaron las condiciones de pH y concentración y tipo

de conservador a fin de retardar ó inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras durante tres meses de almacenamiento a la temperatura óptima de crecimiento de cada microorganismo.

- Estudio de la reología del suero de queso concentrado y del suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado (punto 6)

Se determinaron las curvas de flujo y de esfuerzo de corte en función del tiempo para suero de queso concentrado y suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado a 25°C y 5°C y a pH 6,0 y 5,0.

Dado que los temas tratados pertenecen a áreas bien diferenciadas, a fin de facilitar la lectura de este trabajo de tesis y lograr mayor claridad en la exposición de los temas tratados, se encara cada uno de ellos como una unidad independiente.

#### 4. HIDROLISIS DE LACTOSA EN SUERO DE QUESO Y EN SISTEMAS MODELO

##### 4.1. Objetivos

Uno de los factores de estrés que se utilizarán para preservar el suero de queso concentrado es la reducción de la actividad de agua. En el método de conservación desarrollado por Kanterewicz y col. (1985b), el descenso de la  $a_w$  se logra por medio del agregado de humectantes (cloruro de sodio). Los humectantes tienen la desventaja, para el caso del suero de queso, de acentuar el sabor salado del mismo, limitándose así el empleo del mismo en alimentos dulces. Como tratamiento alternativo para disminuir la  $a_w$  se propone la hidrólisis de la lactosa presente en el suero de queso concentrado, a fin de aumentar la molalidad y el poder de reducción de  $a_w$  de los azúcares presentes en el medio.

En este capítulo se analizará la influencia de varios parámetros en la cinética de hidrólisis enzimática de lactosa en suero de queso concentrado, a fin de determinar cuáles son las condiciones óptimas de trabajo. También se realizará el modelado matemático para predecir la velocidad de hidrólisis de lactosa en el suero de queso a fin de poder aplicar estos resultados al diseño de un reactor. También se analizará la variación de la actividad de agua del suero al proceder la hidrólisis de lactosa. Finalmente se estudiará la hidrólisis de lactosa en dos sistemas modelo, uno con sacarosa y otro con glicerol.

## 4.2. Introducción

### 4.2.1. Reacciones catalizadas enzimáticamente

Las enzimas son catalizadores biológicos que aumentan la velocidad de reacción disminuyendo la energía de activación necesaria para formar el complejo activado. Esto se logra introduciendo dentro del camino de la reacción nuevos intermediarios, de forma tal que el complejo activado de la reacción catalizada por la enzima posea una energía de activación menor dentro del camino de la reacción.

El objetivo de las enzimas es proporcionar grupos dentro de su sitio activo que fuerzan al sustrato a un estado de transición de menor energía.

En las reacciones catalizadas varían los pasos intermedios y las energías de activación entre los mismos, pero el cambio total de energía libre ( $\Delta G$ ) es el mismo que para la reacción no catalizada, por lo tanto la constante de equilibrio de la reacción ( $K$ ) no varía ( $\Delta G = -RT \ln K$ ; donde  $R$  es la constante general de los gases y  $T$  la temperatura absoluta). La enzima no cambia químicamente luego de la reacción pero sí puede sufrir cambios físicos de forma tal que no pueda seguir comportándose como un catalizador.

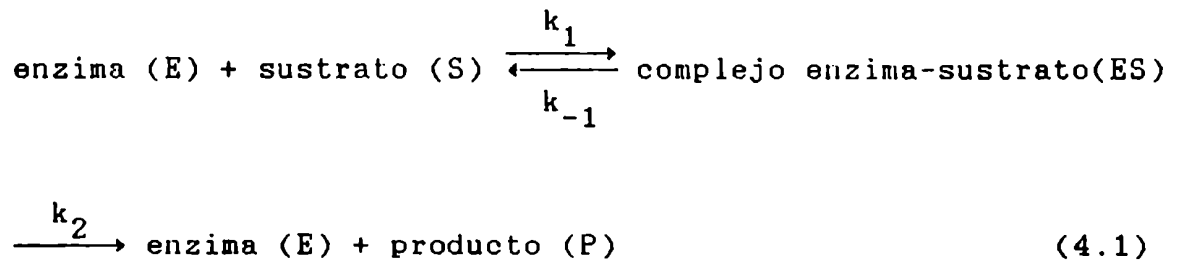
Las características principales de las enzimas son: 1) alta velocidad de reacción, 2) especificidad, 3) formación de cadenas de reacción en caminos metabólicos. Las enzimas son proteínas con una secuencia lineal de aminoácidos (estructura primaria), que se pliega en una estructura secundaria estabilizada por medio de uniones

puente hidrógeno entre el hidrógeno del grupo amida y el oxígeno del carbonilo de la cadena polipeptídica. Por influencia de interacciones iónicas e hidrofóbicas entre las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos, la estructura polipeptídica presenta más plegamientos, lo que da lugar a la estructura terciaria. Esta última estructura es la que posibilita la existencia del sitio activo de la enzima. Este se genera por la interacción de los grupos funcionales como carboxilo, amino, sulfhidrilo, hidroxilo e imidazol. El sitio activo es una estructura altamente organizada, estereoespecífica y tridimensional donde se fija el sustrato para que ocurra la reacción (Roberts, 1977).

#### 4.2.2. Mecanismo de la reacción enzimática con un único sustrato

Los primeros estudios de catálisis enzimática datan de 1902, cuando Brown publicó un trabajo sobre hidrólisis de sacarosa por acción de la invertasa. Demostró que la cinética de la hidrólisis enzimática era marcadamente diferente a la hidrólisis ácida. Sugirió que un paso importante en la reacción catalizada por las enzimas era la formación de un complejo entre la enzima y el sustrato y que con la ruptura de este complejo se obtenía el producto. Encontró que la velocidad aumentaba con concentraciones bajas y medias de sustrato pero que con altas concentraciones la velocidad permanecía constante. Propuso el siguiente mecanismo:





Este mecanismo consiste en tres reacciones elementales. La enzima (E) y el sustrato (S) se combinan para dar el complejo enzima-sustrato (ES), que a su vez se descompone para dar enzima + sustrato (E + S) (reacción inversa) ó enzima + producto (E + P). Michaelis y Menten en 1903 desarrollaron las ecuaciones que representan el mecanismo 4.1, para lo cual consideraron la situación en que  $k_2$  es mucho menor que  $k_{-1}$ . Esto implica que la formación del complejo ES se acerca al equilibrio termodinámico. La ecuación propuesta por Michaelis y Menten es

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad (4.2)$$

donde  $v$  : velocidad inicial de la reacción (mmoles/ l.s).  
 [S]: concentración de sustrato (mmoles/l).  
 $K_s$ : constante de disociación del complejo ES,  
 $K_s = k_1 / k_{-1}$  (mmoles/l).  
 $V$  : velocidad máxima o de saturación,  $V = k_2 \cdot E_0$  (mmoles/ l.s), donde  $k_2$  es la constante de reacción para la descomposición del complejo ES en (enzima + producto) y  $E_0$  la concentración inicial de enzima.

Posteriormente, en 1925, Briggs y Haldane criticaron la hipótesis de equilibrio entre los reactivos y el complejo

ES e introdujeron el concepto de estado estacionario. Al mezclar la enzima con el sustrato comienza a formarse complejo ES y luego de una fase transiente la concentración de complejo ES llega a un nivel estacionario. Luego la concentración de ES decaerá según disminuya la concentración de sustrato. Si la concentración de sustrato es mucho mayor que la concentración inicial de enzima, la concentración de ES disminuirá muy lentamente y se puede decir que permanecerá constante a lo largo del tiempo ( $d[ES]/dt = 0$ ) (Roberts, 1977; Dixon y Webb, 1964). En base a estas suposiciones llegaron a la expresión

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (4.3)$$

donde  $K_m$  = constante de Michaelis y Menten (mnoles/l)  $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

La expresión de Briggs y Haldane es general para el mecanismo de reacción propuesto, mientras que la Michaelis y Menten es un caso límite en donde  $k_{-1} \gg k_2$ . La teoría del estado estacionario ha sido ampliamente utilizada para analizar cinéticas de reacciones que ocurren con diferentes mecanismos. En cuanto a su validez, Wong (1975) ha señalado que plantear  $d(ES)/dt = 0$  no es correcto, ya que para llegar a la expresión de Briggs y Haldane basta con asegurar que  $d[ES]/dt$  es pequeña, es decir que la concentración del complejo ES varía poco en el transcurso de la reacción.

La ecuación 4.3 describe una hipérbola rectangular con asíntotas en  $[S] = -K_m$  y  $v = V$ . Para cinética enzimática solamente interesa la sección de la hipérbola que

corresponde a valores positivos de  $[S]$ . A altas concentraciones de sustrato  $v = V$  y la velocidad es constante e independiente de la  $[S]$  (cinética de orden cero). A bajas  $[S]$ , ( $[S] \ll K_m$ ), la velocidad es  $v = V.[S]/K_m$  (cinética de orden uno) y para concentraciones de sustrato intermedias el orden de la reacción está entre uno y cero.

$K_m$  y  $V$  definen la forma de la hipérbola y son dos parámetros importantes para describir las reacciones catalizadas por enzimas.  $K_m$  es indicativo de la afinidad del sitio activo por el sustrato: a menor  $K_m$  mayor afinidad.  $K_m$  depende del pH, la temperatura, el sustrato, el buffer utilizado, la composición del medio, etc.. Con respecto a la velocidad máxima,  $V = k_2.[E_0]$ ,  $k_2$  representa la eficacia de la enzima para dar producto, ya que es la constante de velocidad para la descomposición del complejo ES para dar enzima libre y producto. Entonces  $V$  indica la cantidad de enzima presente y cuán rápido ésta cataliza la reacción (Bergmeyer, 1983). Sin embargo se debe tener en cuenta que para reacciones que involucren varios intermediarios ó uno o más inhibidores (los productos de la reacción pueden actuar como inhibidores), no es sencillo establecer cuál es el sentido físico de las constantes  $K_m$  y  $V$  pues involucran a varias constantes de reacción. Esto sólo es posible en el caso en que algún término predomine sobre los demás, i. e. cuando una constante es mucho mayor o menor que otras. De esta forma es posible simplificar las expresiones de  $K_m$  y  $V$  y analizar qué pasos de la reacción influyen en ellas. Para los casos de reacciones complejas,  $K_m$  no está directamente relacionado con la afinidad de la enzima por el sustrato. Sin embargo operacionalmente, es decir con fines de cálculo solamente, se define  $K_m$  como la concentración de sustrato

tal que la velocidad sea  $V/2$ .  $K_s$ , la constante de disociación del complejo ES, es la que mide la afinidad de la enzima por su sustrato (Roberts, 1977).

#### 4.2.3. Determinación de las constantes cinéticas de la reacción

Existen, básicamente, dos métodos para el cálculo de las constantes  $K_m$  y  $V$ : el método de las velocidades iniciales y el método integral.

##### ■ Método de las velocidades iniciales

El método de las velocidades iniciales es la forma tradicional de analizar los datos cinéticos de reacciones enzimáticas. Se trabaja con diferentes concentraciones de sustrato y se calcula la velocidad inicial a partir de las curvas de formación de producto versus tiempo para cada caso. Luego, por medio de las ecuaciones de velocidad linealizadas ó por regresión no lineal de la ecuación 4.3 se calculan las constantes de velocidad de la reacción. El análisis de las velocidades iniciales de reacción tiene la ventaja que las concentraciones de sustrato y de otros ligandos están precisamente definidas y que no existe inhibición por productos, lo cual disminuye las fuentes posibles de error. Para estimar la velocidad inicial de la reacción se pueden utilizar métodos visuales ó computacionales. Para curvas de progresión regulares ambos métodos dan resultados similares. Una vez estimadas las velocidades iniciales para una serie de mezclas de reacción que contengan diferentes concentraciones de sustrato, se puede representar gráficamente esta velocidad inicial en función de la concentración de sustrato, obteniéndose la

hipérbola descrita por la ecuación 4.3. Como a partir de la hipérbola es difícil decidir cuál es el valor exacto de la velocidad máxima, tampoco se puede calcular  $K_m$ . Es por esto que se utilizan ecuaciones linealizadas de la hipérbola, como la de Lineweaver y Burk (1934), la de Eadie y Hofstee (1942), la de Hanes (1932) y la de Woolf (1932) (tabla 4.1). A partir de la pendiente y ordenada de cada expresión lineal es posible obtener  $K_m$  y  $V$ . Estadísticamente el método más confiable es utilizar un programa de regresión no lineal para ajustar los datos directamente a la ecuación 4.3 y calcular  $K_m$  y  $V$  por un programa iterativo

Las ventajas de esta forma de evaluar los datos experimentales son las siguientes:

- Se evita tener que considerar que las condiciones de la reacción cambien a lo largo de la misma y se evita el problema de una posible inactivación de la enzima por acción de las condiciones del medio o por la formación de sustancias inhibitoras durante el transcurso de la reacción (Philo y Selwyn, 1973).

- Las ecuaciones de velocidad son sencillas y fáciles de utilizar.

A su vez, presenta las siguientes desventajas:

- No se aprovecha toda la información que ofrece la curva de avance de la reacción.

- Salvo que inicialmente haya una porción lineal de la curva producto versus tiempo, es difícil obtener una medición

TABLA 4.1

Linealizaciones de la ecuación de Michaelis y Menten.

AUTOR	ECUACION
Lineweaver y Burk, (1934)	$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$
Hanes, (1932)	$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{[S]}{V}$
Eadie y Hofstee, (1952)	$\frac{v}{[S]} = \frac{V}{K_m} - \frac{K_m}{v}$
Woolf, (1932)	$v = V - \frac{v \cdot K_m}{[S]}$

objetiva y exacta de la pendiente al origen de la curva (Halwachs, 1970; Hsu y Tsao, 1979).

- Cuando uno de los productos de la reacción inhibe fuertemente a la enzima, la velocidad decrece rápidamente, por lo cual una estimación visual de la velocidad inicial es muy poco aconsejable (Philo y Selwyn, 1973; Cornish-Bowden, 1975).

- Debe realizarse un mayor número de experiencias que cuando se trabaja con ecuaciones integradas.

El método de las velocidades iniciales es el más ampliamente utilizado al trabajar con enzimas en sistemas modelo en los que se puede variar la composición de los mismos.

- Método integral

Como la velocidad de reacción y la concentración de sustrato varían continuamente a lo largo de la reacción, una curva de variación de concentración de sustrato ó producto en función del tiempo da lugar a suficientes puntos de velocidad de reacción y concentración como para que sea posible determinar  $K_m$  y  $V$ . Esto puede realizarse integrando la ecuación 4.3, resultando la siguiente expresión:

$$t = \frac{1}{V} ( [So] - [S] ) - \frac{K_m}{V} \ln \frac{[So]}{[S]} \quad (4.4)$$

donde  $[So]$  es la concentración inicial de sustrato y  $[S]$  la concentración de sustrato al tiempo  $t$ . La expresión

linealizada de esta ecuación integrada es:

$$\frac{[S_0] - [S]}{t} = v - K_m \frac{1}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S]} \quad (4.5)$$

Graficando  $([S_0]-[S])/t$  en función de  $1/t \cdot \ln([S_0]/[S])$  puede calcularse de la ordenada al origen y de la pendiente  $V$  y  $K_m$  respectivamente. Este mecanismo es válido cuando la reacción es irreversible y el producto de la reacción no es inhibidor de la enzima. Para el caso en que haya inhibición por productos (sección 4.2.4) o reacciones reversibles, donde la ecuación 4.3 ya no se puede utilizar tal cual, se pueden deducir las ecuaciones cinéticas que contemplen estas condiciones, integrarlas y linealizarlas, lo mismo que cuando la enzima sufre inactivación de acuerdo a una cinética de primer orden.

Las ventajas del empleo del método de las ecuaciones integradas son:

- Se necesita menor número de experiencias a fin de calcular las constantes cinéticas, ya que cada curva de avance de la reacción contiene toda la información necesaria (Canela y Franco, 1986).
- Es un método adecuado para el análisis de reacciones donde la enzima es fuertemente inhibida por algún producto.
- No hay necesidad de diferenciar los datos (i. e. medir velocidades).
- Cuando se desea estudiar la inhibición por productos no es



necesario agregar dicha sustancia al medio de reacción, pues se genera "in situ". Esto es muy conveniente cuando los productos son inestables o difíciles de preparar o purificar (Duggleby y Morrison, 1977).

A su vez el empleo de ecuaciones integradas presenta algunas desventajas:

- La mayor limitación para el uso de ecuaciones integradas es cuando la enzima, el sustrato o los productos no son estables en las condiciones de trabajo.

- Es un método de análisis poco empleado pese a que su teoría se encuentra bien desarrollada. Una explicación a este hecho es que errores sistemáticos pequeños pueden llevar a grandes desviaciones de los valores de las constantes  $K_m$  y  $V$  (Cornish-Bowden, 1975). Además muchos investigadores se resisten a emplear el método integral para no apartarse de un método ya probado y conocido como el de las velocidades iniciales.

- Un error en la determinación de la concentración inicial del sustrato afecta los valores a lo largo de toda la curva, requiriéndose para evitar este problema técnicas computacionales y matemáticas más complejas que las empleadas por el método de las velocidades iniciales (Canela y Franco, 1986).

- No se pueden utilizar cuando hay un cambio en el mecanismo de la reacción o cambios en las condiciones experimentales a lo largo del tiempo (por ejemplo, cambios de pH).

El uso de las ecuaciones integradas no sólo se limita

al cálculo o estimación de las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V$ , sino que puede calcularse a partir de ellas la velocidad inicial. Efectivamente, algunos autores sostienen que la velocidad inicial estimada a partir de las curvas de avance de la reacción tienen menor error que cuando se calcula a partir de la pendiente al origen de los datos de producto versus tiempo (método de las velocidades iniciales) (Duggleby, 1985; Boeker, 1982; Cornish-Bowden, 1975).

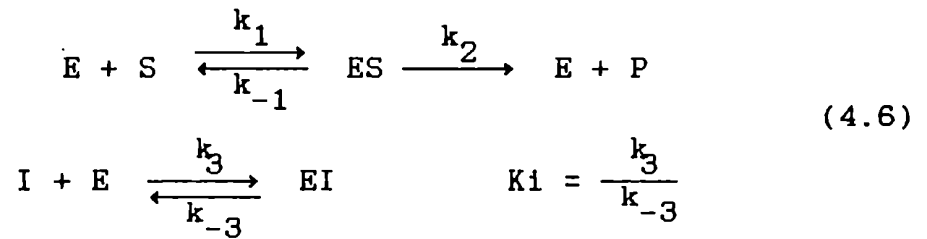
#### 4.2.4. Inhibición enzimática

Las enzimas pueden ser inhibidas por productos, sustratos o alguna sustancia en particular (molécula de estructura química similar al sustrato, iones, etc.). La inhibición puede ser reversible (existe un equilibrio entre enzima e inhibidor que puede desplazarse hacia la enzima eliminando al inhibidor del medio) o irreversible (se pierde la actividad enzimática definitivamente, aún a bajas concentraciones del inhibidor). La inhibición irreversible se cuantifica en términos de velocidad de inhibición mientras que la inhibición reversible se expresa por medio de una constante de inhibición  $K_i$ .

La inhibición reversible puede ser competitiva, no competitiva y acompetitiva. Se analizan a continuación cada uno de estos casos. Se considera que el inhibidor es agregado al medio de la reacción (su concentración permanece constante a lo largo de la reacción), es decir que no es un producto.

■ Inhibición competitiva:

En la inhibición competitiva lineal el sustrato y el inhibidor compiten por el mismo sitio de unión a la enzima. Generalmente la estructura química del inhibidor es semejante a la del sustrato y no puede unirse a moléculas de enzima cuyo sitio activo ya está ocupado por el sustrato. Las siguientes ecuaciones describen el mecanismo (Roberts, 1977):



donde I es el inhibidor y  $K_i$  la constante de inhibición. La expresión para la velocidad de reacción es:

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]} \qquad (4.7)$$

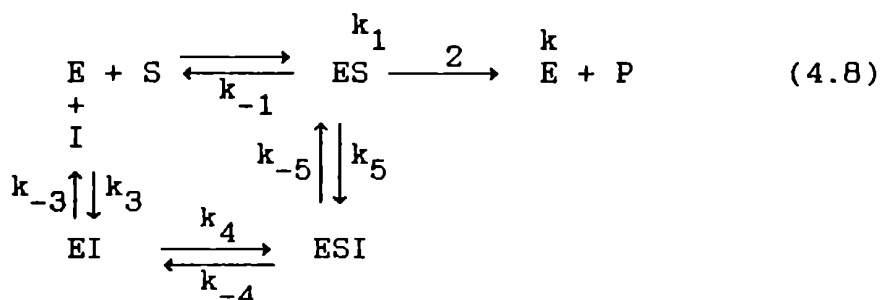
donde [I] es la concentración de inhibidor presente. El efecto del inhibidor competitivo es producir un incremento aparente en el valor de  $K_m$  en un factor  $(1+[I]/K_i)$ , que aumenta a mayor concentración de inhibidor.

Por integración de esta ecuación se obtiene la siguiente expresión:

$$t = \frac{1}{V} ( [S_0] - [S] ) + \frac{K_m}{V} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \ln \frac{[S_0]}{[S]} \qquad (4.7b)$$

■ Inhibición no competitiva:

En este caso el inhibidor se une, no en el sitio activo donde se une el sustrato, sino en otra región de la enzima. Entonces el inhibidor puede unirse a la enzima libre o al complejo ES. El esquema que representa al mecanismo es el siguiente (Roberts, 1977):



Para el caso en que el complejo ESI no pueda dar producto, la velocidad de la reacción se puede expresar como:

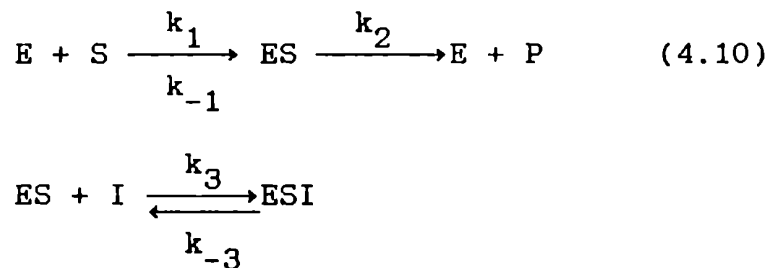
$$v = \frac{V \cdot [S]}{\left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \cdot (K_m + [S])} \quad (4.9)$$

En este caso la presencia del inhibidor afecta la velocidad máxima. Al integrar esta expresión se obtiene:

$$t = \frac{1}{V} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) ( [S_0] - [S] ) + \frac{K_m}{V} \ln \frac{[S_0]}{[S]} \quad (4.9b)$$

■ Inhibición acompetitiva:

El inhibidor sólo es capaz de combinarse con el complejo ES, es decir que hasta que el sustrato no se unió al sitio activo no hay efecto alguno del inhibidor



La ecuación de velocidad toma la siguiente forma (Roberts, 1977):

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S] \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (4.11)$$

En este caso tanto  $K_m$  como  $V$  disminuyen en un factor  $(1 + [I]/K_i)$ . Al integrar esta ecuación se obtiene:

$$t = \frac{1}{V} \left[ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right] ([S_0] - [S]) + \frac{K_m}{V} \left[ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right] \ln \frac{[S_0]}{[S]} \quad (4.11b)$$

Las expresiones linealizadas de las ecuaciones integradas correspondientes a cada tipo de inhibición (ecuaciones 4.7b, 4.9b y 4.11b) se describen a continuación:

Inhibición competitiva

$$\frac{[S_0] - [S]}{t} = V - K_m \left[ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right] \frac{1}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S]} \quad (4.12)$$

Inhibición no competitiva

$$\frac{[S_0] - [S]}{t} = \frac{V}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} - \frac{K_m}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S]} \quad (4.13)$$

Inhibición acompetitiva

$$\frac{[S_0] - [S]}{t} = \frac{V}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} - \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \frac{1}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S]} \quad (4.14)$$

donde  $[S_0]$  es la concentración inicial de sustrato y  $[S]$  la concentración de sustrato al tiempo  $t$ . Graficando en cada caso  $([S_0] - [S])/t$  en función de  $1/t \ln ([S_0]/[S])$  para una serie de concentraciones de inhibidor se obtiene una familia de rectas de las cuales se puede obtener  $K_m$ ,  $V$  y  $K_i$ .

Es muy común el caso de inhibición de la enzima por uno o más productos de la reacción. Por ejemplo, las reacciones hidrolíticas son en realidad reacciones con dos sustratos donde el agua es la segunda molécula que reacciona. Pero la concentración de agua, por lo general, es lo suficientemente alta como para que la reacción de hidrólisis sea considerada virtualmente irreversible. Esto no impide que los productos de la reacción se unan a la enzima para dar complejos enzima-producto (EP), pero sí evita que el complejo EP reaccione en sentido inverso (hacia reactivos para dar  $E + S$ ). Para este tipo de sistemas la ecuación de velocidad para el caso de inhibición competitiva puede escribirse como (Roberts, 1977)

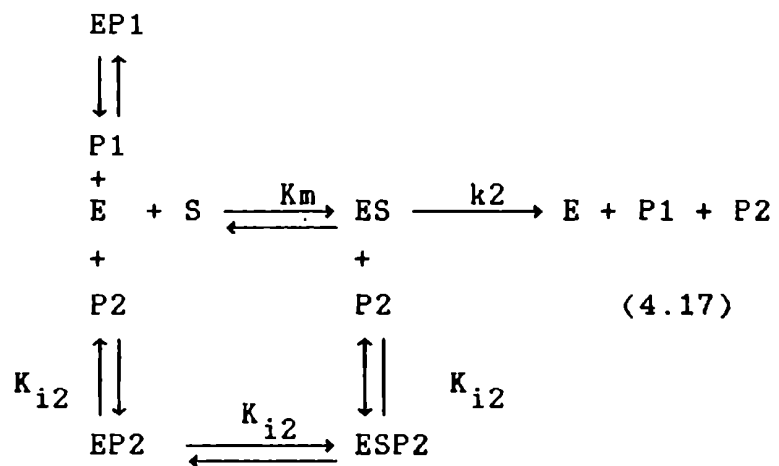
$$v = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{V \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[P]}{K_i}\right) + [S]} \quad (4.15)$$

donde [P] es la concentración de producto,  $[P]=[S_0] - [S]$  y  $K_i$  la constante de inhibición. Integrando y luego linealizando esta ecuación se llega a:

$$\frac{[S_0] - [S]}{t} = \frac{V \cdot K_i}{(K_i - K_m)} - K_m \frac{(K_i + [S_0])}{(K_i - K_m)} \frac{1}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S]} \quad (4.16)$$

Esta es la expresión de una recta, a partir de la cual se pueden calcular  $V$ ,  $K_m$  y  $K_i$ , si se tienen experiencias realizadas a diferentes concentraciones de sustrato.

Una reacción enzimática puede ser inhibida por más de un producto. Uno de los casos posibles es cuando el producto P1 inhibe en forma competitiva y el producto P2 lo hace en forma no competitiva. El esquema que representa este tipo de reacción es el siguiente (Segel, 1975):



donde:

P1: producto que inhibe en forma competitiva

P2: producto que inhibe en forma no competitiva

Ki1 : constante de inhibición competitiva

Ki2: constante de inhibición no competitiva;

La ecuación diferencial que describe esta reacción es:

$$v = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{v \cdot [S]}{K_m \left[ 1 + \frac{P1}{K_{i2}} + \frac{P2}{K_{i2}} \right] + [S] \left[ 1 + \frac{P2}{K_{i2}} \right]} \quad (4.18)$$

e integrando se llega a:

$$t = \left\{ 1 + \frac{[S_0]}{K_{i2}} - \frac{1}{K_m} \alpha \right\} \frac{1}{v} ([S_0] - [S]) + \left\{ \frac{K_m}{v} (1 + [S_0] \alpha) \right\} \ln \frac{[S_0]}{[S]} - \frac{1}{2 K_{i2} v} ([S_0]^2 - [S]^2) \quad (4.19)$$

$$\text{donde } \alpha = \frac{1}{K_{i1}} + \frac{1}{K_{i2}}$$

En la integración de esta ecuación se supone que la concentración de P1 es igual a la de P2 (Segel, 1975). Para determinar todas las constantes cinéticas utilizando esta ecuación se debe emplear un método de regresión no lineal para experiencias realizadas con diferentes concentraciones de sustrato.



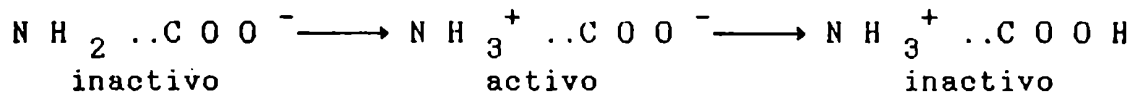
#### 4.2.5. Influencia del pH sobre las reacciones enzimáticas

Todas las enzimas poseen un valor óptimo de pH para su actividad y este rango es a menudo muy estrecho. El pH óptimo no solo depende de la naturaleza y fuerza iónica del sistema buffer, sino que también varía con la temperatura y la concentración de sustrato. Describir completamente los cambios que ocurren en las enzimas debido a cambios de pH es muy complejo. Las enzimas contienen grupos ionizables (residuos de lisina, arginina, ácido aspártico) que pueden participar en la fijación del sustrato durante el proceso catalítico y también tener influencia sobre el plegamiento y configuración de la enzima. Cambios de pH pueden afectar tanto la estructura como la actividad del sitio activo modificando la reacción enzimática. Dado que las reacciones enzimáticas poseen un pH óptimo las curvas de actividad en función del pH son de forma acampanada.

Las enzimas presentan dos comportamientos con respecto al pH, el reversible y el irreversible. Si el pH del medio es extremo hay pérdida irreversible de la actividad ya que se produce desnaturalización proteica. Los cambios reversibles solamente se dan en un rango estrecho de pH donde la actividad de la enzima varía al variar el pH. Laidler (1954) propone un mecanismo muy sencillo para explicar en forma cualitativa estos cambios de actividad reversibles. Para esto considera que la proteína tiene grupos  $\text{-COOH}$  y  $\text{-NH}_2$  que se ionizan respectivamente a  $\text{-COO}^-$  y  $\text{-NH}_3^+$ . Si, por ejemplo, el sitio activo de la enzima necesita grupos ionizados para funcionar correctamente, ambos permaneciendo juntos debido a sus cargas opuestas, se puede representar como



Al agregar ácido o base se pasa por los siguientes equilibrios:



Esta es una explicación sencilla de cómo afecta el pH a las enzimas.

Los grupos ionizables pueden estar en ambientes de diferente polaridad de la enzima, por lo cual el pKa de determinado grupo dependerá de la región en que se encuentre. Esto hace que el pKa de dicho grupo sea diferente del que posee en el aminoácido o en un péptido en solución. Por lo tanto, para poder asignar valores de pKa a un grupo de una enzima, hace falta realizar previamente varios ensayos, lo cual dificulta el estudio riguroso de la influencia del pH. El pH, al afectar la estructura de la enzima afecta los valores de Km y V, que deberán determinarse en cada caso.

Un cambio de pH puede producir cambios en la ionización de (Roberts, 1977; Dixon y Webb, 1964; Laidler y Bunting, 1973):

- Grupos involucrados en la catálisis, con lo cual se puede inhibir por completo la actividad enzimática.
- Grupos que ayudan a la unión del sustrato, lo que puede disminuir la afinidad de la enzima por sus sustratos.

- Grupos dentro del sustrato, lo cual también afectará la afinidad de la enzima por el sustrato.
  
- Otros grupos dentro de la enzima que pueden ocasionar cambios más o menos grandes en la estructura tridimensional de la enzima, lo que podría alterar la estructura del sitio activo.

#### 4.2.6. Influencia de la temperatura en la velocidad de reacción

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas es de sumo interés e importancia. Este efecto puede ser debido a varias causas: 1) un efecto sobre la estabilidad de la enzima, 2) un efecto sobre la velocidad de ruptura del complejo ES (i.e. sobre  $k_2$ ), 3) un efecto sobre la afinidad de la enzima por su sustrato (i.e. sobre  $k_1$  ó  $k_{-1}$ ), 4) a una alteración de los pKa, 5) a un efecto sobre la afinidad de la enzima por sus activadores ó inhibidores, 6) también puede ser un efecto sobre la solubilidad de soluto/s y 7) por cambios en el pH de un buffer. Todo ello sugiere que los efectos de la temperatura pueden ser extremadamente complejos; sin embargo es posible eliminar o cuantificar muchos de los efectos anteriormente citados (Dixon y Webb, 1964).

Si se grafican una serie de curvas de conversión de sustrato versus tiempo a diferentes temperaturas, se obtiene la figura 4.1. En ella puede observarse que, pese a que a mayor temperatura la velocidad inicial es mayor (por ejemplo, para un dado tiempo  $t_1$ ), para tiempos mayores la

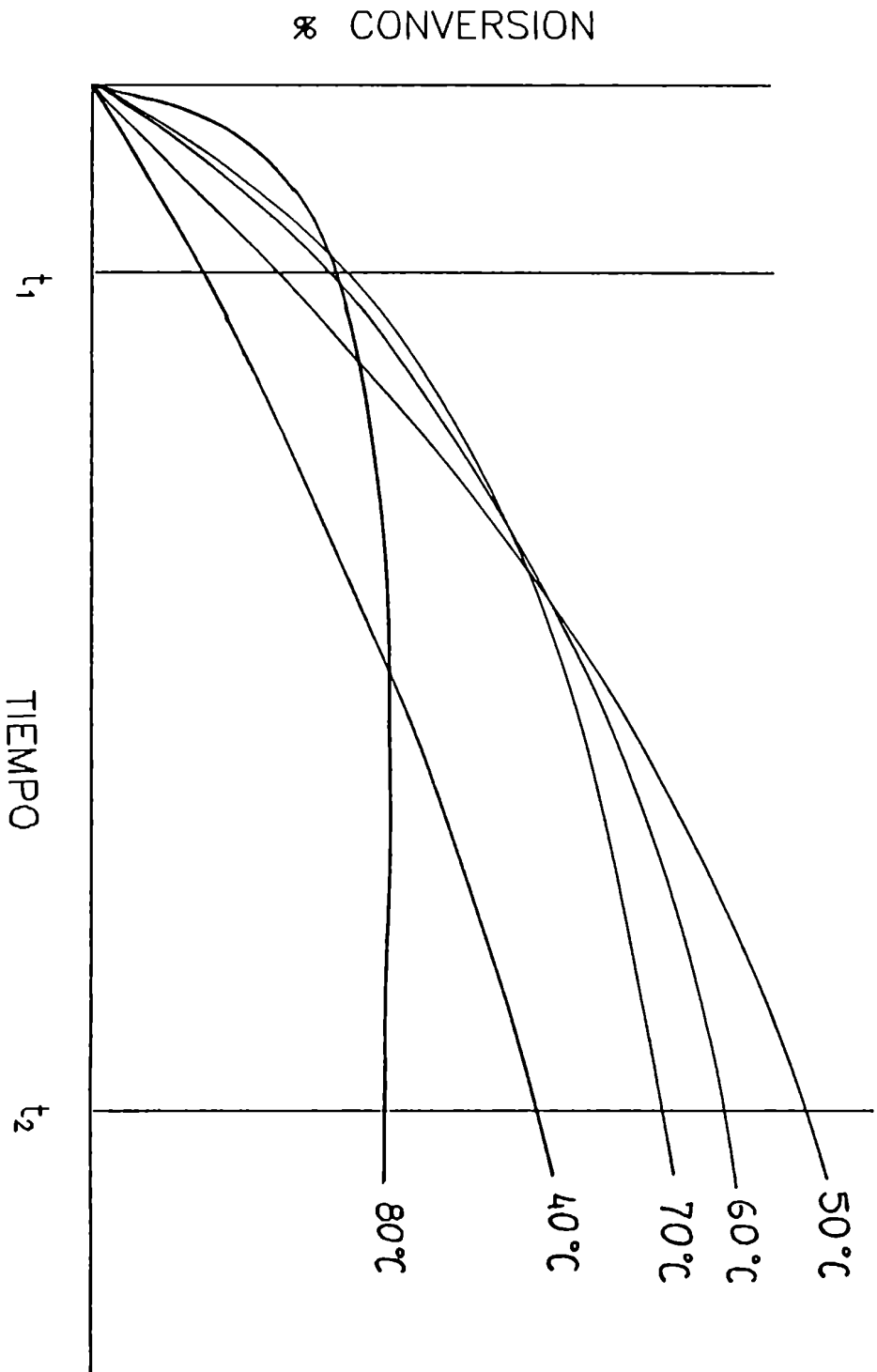


Figura 4.1:

Efecto de la temperatura en la relación conversión-tiempo para una reacción enzimática de temperatura óptima de 50°C.

conversión no es mayor a la temperatura más alta. La temperatura óptima está determinada por un balance entre el efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción y su efecto sobre la inactivación térmica de la enzima (Dixon y Webb, 1984). Esta temperatura óptima dependerá, para una dada enzima, de la concentración de enzima y de sustrato y de otros factores como el pH, fuerza iónica, etc.. (Laidler y Bunting, 1973). En el rango bajo de temperatura (30 °C para una enzima típica), la inactivación enzimática es muy lenta y la velocidad global de la reacción aumenta con la temperatura como lo haría cualquier reacción química. A mayor temperatura, la inactivación térmica se hace cada vez más importante, de forma tal que la concentración de enzima activa disminuye a lo largo del tiempo de reacción. Las energías de activación para la reacción de inactivación térmica son mayores que las de la reacción catalítica; por lo tanto, a mayor temperatura la velocidad de inactivación aumentará más que la velocidad de reacción catalítica.

La inactivación térmica de las enzimas generalmente es debida a la desnaturalización de la proteína y la energía de activación para la desnaturalización es alta. Este valor se debe principalmente a una entropía de activación excepcionalmente elevada y positiva, lo cual ha llevado a interpretar que en la desnaturalización de una proteína se rompen gran número de uniones débiles (puente hidrógeno), produciéndose entonces una apertura de la molécula por desdoblamiento. La inactivación de las enzimas depende mucho del pH, habiendo por lo general una zona de máxima estabilidad, que no es necesariamente cercana al pH isoeléctrico, y luego la velocidad de inactivación por temperatura aumenta hacia las zonas ácida y alcalina. Fuerza iónica, concentración de proteína, presencia de

inhibidores y acción protectora de los sustratos tienen influencia sobre la velocidad de inactivación térmica. La concentración de agua también influye y las enzimas a baja actividad de agua son más termoestables (Dixon y Webb, 1964).

Con respecto a la influencia de la temperatura sobre la reacción enzimática en sí, se debe considerar que esta última consta de varios pasos y que el efecto de la temperatura sobre todo el proceso será la resultante de los efectos sobre cada etapa. Para un análisis adecuado se requiere, idealmente, medir el valor absoluto de cada una de las constantes de reacción que intervienen en el proceso para diferentes temperaturas. Se ha verificado que la ley de Arrhenius se obedece en forma satisfactoria para gran número de enzimas, siempre que se consideren las constantes de reacción individuales. Solamente se cumple la ley de Arrhenius sobre la velocidad global de la reacción cuando una de las constantes individuales predomina sobre las demás de forma tal que se simplifique la expresión de la constante global ó bien cuando la constante de reacción global es, por ejemplo,  $K = k_2 \cdot k_1 / k_{-1}$ . Para este caso

$$\frac{k_2 k_1}{k_{-1}} = \frac{A_2 A_1}{A_{-1}} \exp \left[ \frac{E_2 + E_1 - E_{-1}}{R T} \right] \quad (4.20)$$

y por lo tanto se cumple la ley de Arrhenius pero la energía de activación no corresponde a un paso elemental de reacción, sino que es la suma correspondiente a dos pasos de reacción. Para el caso en que la expresión de la constante global sea más compleja, ya no será posible realizar este tipo de análisis requiriéndose la determinación de las

constantes individuales (Laidler y Bunting, 1973).

#### 4.2.7. Termoestabilidad de las enzimas

La termoestabilidad de las enzimas, es decir su capacidad de conservar su actividad a temperaturas relativamente altas o por períodos prolongados (Wasserman, 1984), es importante en dos sentidos. Primero, al aumentar la temperatura aumentan las velocidades de reacción y se pueden utilizar menores concentraciones de enzima o tiempos de reacción mas cortos para lograr la misma conversión. Segundo, temperaturas mayores pueden llegar a inhibir el crecimiento de microorganismos mesófilos. El deterioro microbiano constituye un problema, sobre todo cuando se trabaja con enzimas inmovilizadas.

Todas las enzimas conocidas se desdoblán al ser expuestas al calor, perdiendo por lo tanto su actividad biológica.

La actividad enzimática está principalmente determinada por las fuerzas no covalentes que dan a las proteínas su conformación secundaria y terciaria (unión puente hidrógeno, unión electrostática e interacciones hidrofóbicas; aparentemente las uniones por puente disulfuro no contribuyen en forma significativa (Singleton y Amelunxen, 1973)). Estas uniones no covalentes dependen directamente de la estructura primaria de las proteínas: pequeños cambios en esta estructura pueden dar origen a grandes cambios conformacionales, dando lugar así a

diferentes resistencias a la temperatura según cual sea la fuente de la enzima (Perutz, 1978).

Otro factor importante que determina la termoestabilidad es la hidrofobicidad (Argos y col, 1979; Merkler y col, 1981). Los residuos hidrofóbicos forman zonas internas dentro de la molécula que impiden la entrada de agua, favoreciéndose así la conservación de la estructura. Otros factores que también influyen en la termoestabilidad son: la unión de metales y la unión de sustrato.

No existe un método simple que prediga si una enzima será termoestable; para cada forma enzimática deberá determinarse el perfil de temperaturas en forma experimental. Sin embargo se sabe que, por lo general, estas enzimas se obtendrán a partir de microorganismos termofílicos. También existen microorganismos que producen enzimas que son estables a temperaturas mayores que la de crecimiento del microorganismo. Por ejemplo *Aspergillus niger* crece a 30-40°C y muchas de sus enzimas extracelulares son estables a 55-60°C (Wasserman, 1984).

Con respecto a las lactasas comerciales, éstas pueden provenir de hongos o de levaduras. Las que provienen de hongos tienen mayor estabilidad térmica que las de levaduras. Pero las lactasas de hongos no pueden ser usadas al pH de la leche o del suero dulce (6,5), ya que su óptimo de pH se encuentra alrededor de 4,0-4,5.

#### 4.2.8. Efecto de la composición del solvente



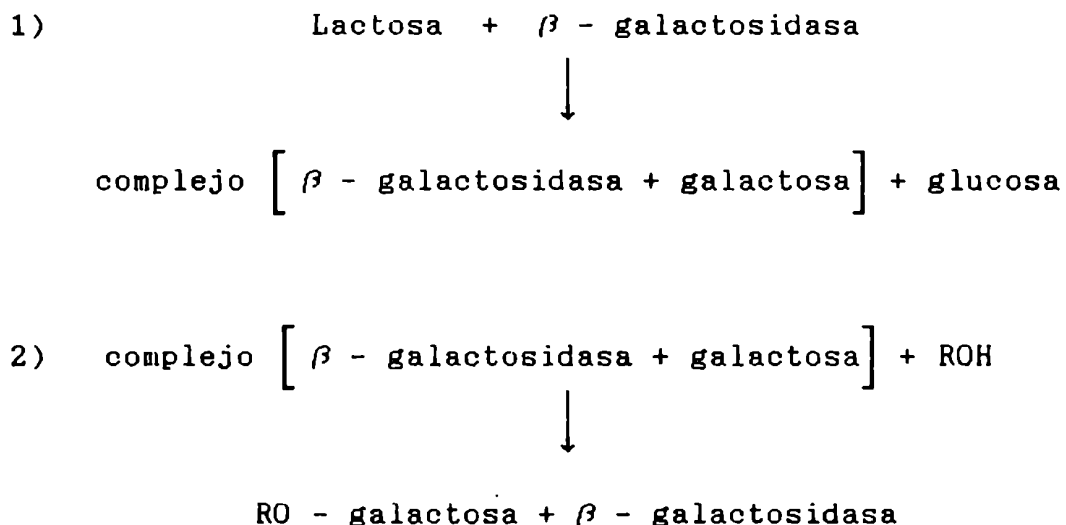
Una forma de modificar la composición del solvente es por agregado de electrolitos, es decir variando la fuerza iónica. Los cambios en la concentración de electrolitos pueden producir modificaciones en la estructura de la enzima, como ser agregación o separación de subunidades, que alteran la actividad enzimática. Los electrolitos pueden también producir efectos iónicos especiales que activan o inhiben la actividad enzimática y por lo tanto una variación en la fuerza iónica puede afectar la velocidad de la reacción.

También puede variarse la composición del solvente por agregado de solventes orgánicos a la mezcla de reacción. Como resultado de ello pueden producirse cambios estructurales, reversibles o irreversibles; también algunas enzimas funcionan a concentraciones tan elevadas de solvente orgánico que si el agua participa como uno de los sustratos la velocidad de reacción puede alterarse debido a la disminución de su concentración. El  $K_m$  de la reacción puede aumentar entre 1000 y 5000 veces en determinados casos al agregar un solvente al medio de reacción. Esta menor afinidad puede explicarse considerando que si el sustrato y la enzima poseen la misma carga neta al pH de la reacción, al disminuir la constante dieléctrica aumenta la repulsión entre ambas especies y la capacidad de fijación del sustrato puede disminuir si el sitio activo sufre solvatación con el solvente agregado (Gutfreund, 1968).

#### 4.2.9. Hidrólisis de lactosa

La lactosa es hidrolizada por la enzima lactasa,

llamada también  $\beta$ -galactosidasa ó  $\beta$ -D-galactósido-galacto hidrolasa, a glucosa y galactosa. Wallenfels (1960) y Shukla (1975) presentaron al mecanismo de la reacción como se describe en la Fig 4.2. Más esquemáticamente el mecanismo puede representarse como



En el caso que ROH represente una molécula de agua, el producto de la reacción será galactosa. Si ROH representa otro azúcar se formarán oligosacáridos por medio de la reacción llamada de transgalactosidación. La cantidad de oligosacáridos formada depende del origen y naturaleza de la enzima, de la concentración del sustrato y de las condiciones y tiempo de hidrólisis (Richmond y col., 1981). Un tiempo de hidrólisis prolongado hará que los oligosacáridos formados vuelvan a desdoblarse (Roberts y Pettinari, 1957).

La galactosa está más involucrada que la glucosa en la formación de oligosacáridos. Utilizando lactasas

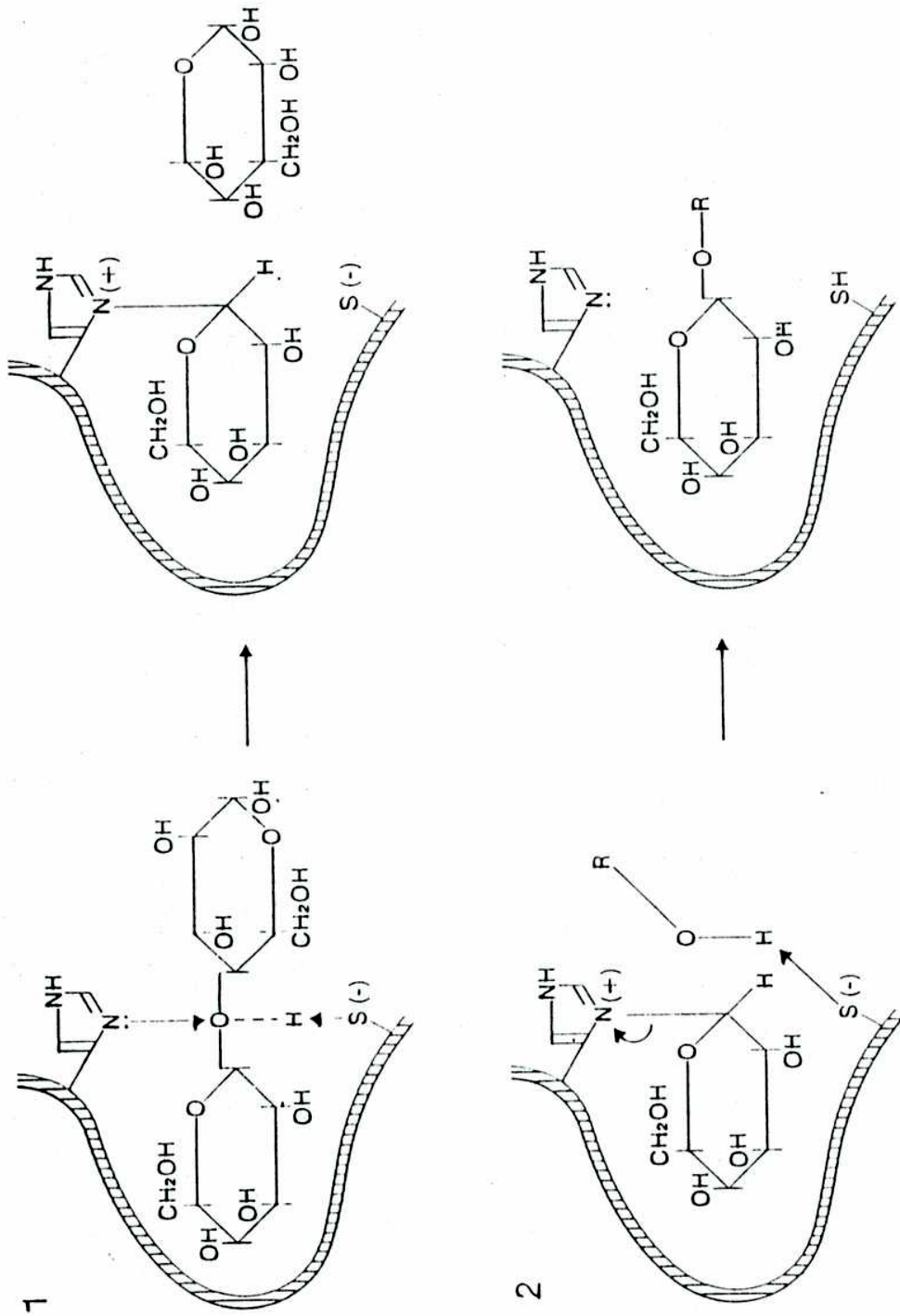


Figura 4.2:  
Mecanismo de la hidrólisis de lactosa por acción de la  $\beta$ -galactosidasa.

solubles se pueden formar entre 5 y 13 % en peso de oligosacáridos respecto del total de lactosa presente (Burvall y col., 1979). Para el caso de la lactasa Maxilact LX 5000, la enzima empleada en este trabajo, la formación de oligosacáridos aumenta con la concentración de lactosa. Esta enzima posee una alta especificidad para la formación de enlaces glicosídicos  $\beta$  (1-6). Estos oligosacáridos fueron todos caracterizados por Asp y col. (1980) y poseen estructuras lineales con 1 ó 2 residuos galactosil unidos por unión  $\beta$  (1-6) a glucosa, galactosa o lactosa.

Estudios realizados en suero de queso (7 % p/p de sólidos totales) y en soluciones de lactosa indican que los factores que más influyen sobre la actividad de la enzima Maxilact LX 5000 son el pH, la temperatura y la presencia de iones (Dalquist y col., 1977; Boletines Técnicos de Gist-Brocades nv). El efecto del pH y la temperatura se discutirá mas adelante. Con respecto a la influencia de los iones se sabe que los metales pesados como el zinc y el cobre (ambos en concentración mayor que  $5 \cdot 10^{-4}$  M) ejercen un efecto fuertemente inhibitor sobre la enzima. El calcio iónico en concentraciones mayores que  $10^{-4}$  M inhibe a la enzima. El ión sodio es otro catión que inhibe a la enzima aunque en menor medida que el calcio. Por el contrario la actividad de la lactasa y también su estabilidad es aumentada por iones magnesio y manganeso en concentraciones de  $10^{-4}$  M y por el ión potasio en concentraciones de  $10^{-1}$  M. Asimismo, el ión fosfato en concentración de hasta  $10^{-2}$  M influencia positivamente la estabilidad pues liga calcio. Un exceso de fosfato ( $10^{-1}$  M) tiene un efecto negativo sobre la actividad de la enzima ya que ésta desciende notablemente (Mahoney y Adamchuk, 1980; Guy y Bingham, 1978; Agbebevi y col., 1987; Dalqvist y col., 1977).

La cinética de hidrólisis de lactosa ha sido descrita en bibliografía utilizando diversos modelos, que se resumen en la Tabla 4.2.

Weetall y col. (1974) trabajaron con una enzima proveniente de una levadura y otra de un hongo (en el trabajo no se especifica el origen de las enzimas utilizadas) en sistemas de buffer fosfato y lactosa. Para determinar las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V$  utilizaron el método de las velocidades iniciales (conversión del sustrato menor al 5%) y el gráfico de Lineweaver y Burk. Para determinar la constante de inhibición de la galactosa,  $K_{i1}$ , agregaron determinada concentración de galactosa a la mezcla de reacción. Establecieron que la enzima proveniente de la levadura es inhibida por la galactosa. Para describir el comportamiento de un reactor de hidrólisis de lactosa de un ultrafiltrado de suero de queso (15 % p/p de sólidos) utilizaron la ecuación integrada de Michaelis y Menten con inhibición competitiva con los valores de  $K_m$ ,  $V$  y  $K_{i1}$  obtenidos por el método de las velocidades iniciales. Asimismo, aclararon que el hecho de que los datos experimentales pudieran ser representados por determinado modelo no prueba la validez de dicho modelo, sino que éste se utilizó para describir matemáticamente la reacción.

Hourigan (1977) estudió el desempeño de las lactasas de *Saccharomyces lactis* y *Aspergillus niger* en leche descremada reconstituida con concentraciones iniciales de lactosa entre 20 y 115 mM. Encontró que la reacción obedece a la ecuación integrada de Michaelis y Menten con inhibición competitiva por galactosa. Para calcular  $K_m$  trabajó con las porciones iniciales de las curvas de concentración de

TABLA 4.2

Cinética de hidrólisis enzimática de lactosa, reportada en bibliografía, en sistemas modelo, leche y suero de queso.

LACTASA (ORIGEN)	SUSTRATO	MODELO CINETICO	AUTOR
Levadura y hongo	Lactosa en buffer fosfato	Velocidades iniciales Inhibición competitiva por galactosa	Weetall y col. (1974)
<i>S. lactis</i> <i>A. niger</i>	leche descrema- da reconstitui- da	Ecuación integrada Inhibición competitiva por galactosa.	Hourigan (1977)
<i>A. oryzae</i> inmovili- zada	lactosa en buffer fosfato	Velocidades iniciales Inhibición competitiva por galactosa	Friend y Shahani (1982)
<i>A. niger</i>	lactosa en buffer	Ecuación integrada Inhibición competitiva por galactosa	Ma y col. (1983)
<i>A. oryzae</i>	Soluciones de lactosa, suero reconstituído y permeatos	Ecuación integrada. Inhibición competitiva por galactosa	van Griethuysen y col. (1985)
<i>A. oryzae</i>	Soluciones de lactosa con agregado de sales	Ecuación integrada. Inhibición competitiva por galactosa	van Griethuysen y col. (1988)

(continuación de la Tabla 4.2)

Células de <i>K. bulgaricus</i> .	Soluciones de lactosa y ONPG suero de queso	Velocidades iniciales. No considera inhibición	Decleire y col. (1985)
<i>S. lactis</i> <i>A. niger</i>	Lactosa en buffer	Velocidades iniciales. No considera inhibición	Peter y col. (1981)
Novozym 231 inmovilizada	Soluciones de lactosa, permeato	Velocidades iniciales No considera inhibición	Agbebavi y col. (1987)
Maxilact inmovilizada y soluble	Soluciones de ONPG	Velocidades iniciales Inhibición competitiva por galactosa.	Kowhley y Cheryan (1981)
<i>A. oryzae</i>	Soluciones de lactosa u ONPG	Velocidades iniciales Inhibición competitiva por galactosa	Park y col. (1979)
<i>A. niger</i>	suero de queso ácido concentrado a varios % sólidos.	Velocidades iniciales. No considera inhibición	Wierzwicki y Kosikowski (1972)
<i>E. coli</i>	Soluciones de ONPG	Velocidades iniciales. Inhibición competitiva por galactosa. Sacarosa y glucosa son inhibidores no competitivos.	Kuby y Lardy (1953)

(continuación de la Tabla 4.2)

<i>A. niger</i>	Soluciones de lactosa	Inhibición competitiva por galactosa	Flaschel y col. (1982)
Células de <i>K. fragilis</i>	Soluciones de lactosa	Inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por glucosa	Cheng y col. (1985)

---



lactosa en función del tiempo obtenidas para diferentes concentraciones iniciales de lactosa. Estas curvas se ajustaron a ecuaciones cuadráticas que, diferenciadas, dieron una estimación de las velocidades iniciales de la hidrólisis en presencia de inhibición severa por un producto. A partir de estas velocidades iniciales calculó  $K_m$  con las ecuaciones de Eadie y Hofstee (1942) (para *S. lactis*  $K_m = 63,7$  mM y  $K_{i1} = 8,55$  mM).

Friend y Shahani (1982) utilizaron la enzima de *Aspergillus oryzae* inmovilizada sobre sefarosa en un medio de lactosa 5 % p/p en buffer acetato (pH = 4,5) o fosfato (pH = 6,5). Para estudiar la cinética de la reacción de hidrólisis utilizaron velocidades iniciales obtenidas a partir de experiencias realizadas con concentraciones de lactosa entre 10 y 100 mM. Calcularon  $K_m$  por el método de Wilkinson (1961). Para determinar el efecto inhibitorio de la galactosa ( $K_{i1}$ ) utilizaron los gráficos de Dixon (inversa de la velocidad inicial versus la concentración de galactosa, (Dixon y Webb, 1964)) con concentraciones de galactosa entre 0 y 20 mM y concentración de lactosa constante. Encontraron que la galactosa es un inhibidor competitivo de la enzima y que la presencia de 5 mM de galactosa en un medio con 200 mM de lactosa como sustrato inhibe la reacción en un 50 %. Estos autores aseguraron que el método de Lineweaver y Burk para estimar  $K_m$  es el más inexacto y que el método de cálculo que se utilice influye en los valores de  $K_m$ ,  $V$  y  $K_{i1}$  obtenidos. Para predecir el funcionamiento de un reactor utilizaron el mismo método que Weetall y col., (1974). Trabajando con enzima soluble obtuvieron buena concordancia entre la curva teórica y los datos experimentales para el rango de conversión 40-60 %. A menores conversiones la desviación fue leve mientras que a altas conversiones los

valores experimentales fueron mucho mayores que los predichos. Estas desviaciones se atribuyeron a reversibilidad de la reacción de hidrólisis, formación de oligosacáridos e inhibición por galactosa.

Ma y col. (1983) investigaron qué modelo permite una mejor descripción de la hidrólisis enzimática de la lactosa. Trabajaron con una lactasa inmovilizada proveniente de *Aspergillus niger* utilizando como sustrato lactosa en solución. La reacción se llevó a cabo en un sistema tanque continuo idealmente agitado. Los modelos que emplearon fueron los siguientes: Michaelis y Menten sin inhibición, con inhibición competitiva por un producto P1, con inhibición no competitiva por producto P2, con inhibición competitiva por P1 e inhibición no competitiva por P2, con inhibición por sustrato, con inhibición por sustrato e inhibición competitiva por P1 y con inhibición por sustrato, inhibición competitiva por P1 y no competitiva por P2. Cada ecuación de velocidad se linealizó respecto de los parámetros cinéticos y se utilizó un método de regresión lineal múltiple. Luego verificaron el ajuste de cada expresión con los datos experimentales y llegaron a la conclusión que el modelo más adecuado para describir la hidrólisis de lactosa es la ecuación que contempla la inhibición competitiva por P1. Es decir que la galactosa inhibe competitivamente a la lactasa.

Scott y col. (1984) utilizaron las conclusiones de Weetall y col. (1974) con respecto a la cinética de hidrólisis de lactosa para estudiar la velocidad de decaimiento de  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada operando en un reactor integral y utilizando como sustrato ultrafiltrado de suero de queso ácido.

Van Griethuysen y col. (1985) postularon también una cinética de Michaelis y Menten con inhibición competitiva para describir el comportamiento de la lactasa proveniente de *Aspergillus oryzae* en soluciones de lactosa, suero reconstituido y permeatos de suero de queso. Estudiaron la influencia de las sales sobre el pH óptimo de trabajo de la enzima. Para describir las curvas de hidrólisis utilizaron la ecuación integrada escrita de la siguiente forma:

$$[Eo] t = \frac{1}{A} ([So] - [S]) - \frac{B}{A} \ln \frac{[So]}{[S]}$$

donde

$$A = k_2 \frac{K_i}{K_i - K_m} \quad B = K_m \frac{K_i + [So]}{K_i - K_m}$$

Calcularon los parámetros A y B por el método de regresión no lineal de Marquardt y analizaron la dependencia de los mismos con el pH. Todas las experiencias las realizaron con una misma concentración de lactosa y no calcularon constantes individuales, sino que sólo analizaron cómo variaban A y B. Van Griethuysen y col. (1988), en un trabajo posterior, desarrollaron un proceso para la hidrólisis de lactosa en suero de queso parcialmente desproteínizado y utilizaron para describir la cinética el modelo desarrollado en el trabajo anterior. Para estimar los valores de las constantes  $K_m$ ,  $K_i$  y  $k_2$  realizaron una serie de experiencias de hidrólisis con soluciones de lactosa con agregado de sales a fin de que el desempeño de la enzima en este medio fuera semejante al comportamiento en suero de queso, y luego aplicaron el algoritmo de Marquardt a todo el conjunto de datos experimentales.

Otro grupo de autores directamente describió la cinética de hidrólisis de la lactosa por medio de la ecuación diferencial de Michaelis y Menten y calcularon solamente  $K_m$ , ya que consideraron que trabajando con velocidades iniciales no es necesario tener en cuenta la inhibición. Declaire y col. (1985) trabajaron con células de *Kluyveromyces bulgaricus* y con extractos sin células en soluciones de lactosa u o-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranos (ONPG) y en suero de queso. Calcularon  $K_m$  a partir de los gráficos de Lineweaver y Burk (1934) y no mencionaron la posibilidad que exista inhibición por galactosa. Peter y col. (1981) trabajaron con una lactasa de *Saccharomyces lactis* y otra de *Aspergillus niger*. Como sustrato emplearon soluciones de lactosa en buffer. Utilizaron el método de las velocidades iniciales a fin evitar el problema de la inhibición por productos. Para calcular las constantes utilizaron varios métodos de linealización de la ecuación de Michaelis y Menten Lineweaver y Burk (1934), Hanes (1932), Eadie y Hoftee (1952) y el gráfico lineal directo. Agbebavi y col. (1987) estudiaron el efecto de los cationes del suero sobre las constantes cinéticas del modelo que describe la hidrólisis de lactosa por acción de una enzima inmovilizada (Novozym 231) en un reactor tipo tanque continuo idealmente agitado. Trabajaron con soluciones de lactosa y con permeato de suero de queso. Compararon los resultados que obtuvieron con los predichos por la ecuación de Michaelis y Menten (sin inhibición por galactosa) utilizando el método de las velocidades iniciales. Mencionaron que la enzima no fue inhibida por sustrato o productos en las concentraciones utilizadas (0,04 a 0,24 M). Kohlwey y Cheryan (1981) estudiaron el desempeño de la enzima Maxilact LX 5000 inmovilizada en un reactor de fibra hueca. Como sustrato

utilizaron ONPG. La cinética de la enzima sin inmovilizar se describió asumiendo el modelo de Michaelis y Menten y usaron el método de las velocidades iniciales trabajando con diferentes valores de concentración inicial de lactosa para calcular las constantes cinéticas por medio de Lineweaver y Burk.

Otro grupo de autores, sin bien utilizaron la ecuación de Michaelis y Menten sin considerar inhibición, estudiaron por separado el efecto de la galactosa sobre la reacción. Park y col. (1979) caracterizaron el comportamiento de la lactasa proveniente de *Aspergillus oryzae* trabajando con soluciones de lactosa u ONPG. Calcularon  $K_m$  y  $V$  a partir de gráfico de Lineweaver y Burk y estudiaron la inhibición competitiva que produce la galactosa comparando las velocidades de reacción con y sin galactosa para diferentes concentraciones iniciales de la misma. También encontraron que la glucosa no inhibe a la enzima. Wierzwicki y Kosikowski (1972a) estudiaron la hidrólisis de suero de queso ácido concentrado a diferentes porcentajes de sólidos de forma tal que la concentración de lactosa variaba de 3,5 a 36%. Utilizaron la enzima de *Aspergillus niger* y midieron la velocidad inicial de la hidrólisis en la porción lineal de la curva de reacción. Mencionaron que probablemente la velocidad de reacción disminuya en el tiempo debido a la inhibición por productos. Kuby y Lardy (1953) estudiaron la purificación y cinética de la lactasa de *Escherichia coli*. Como sustratos utilizaron lactosa, ONPG y azúcares relacionados. Calcularon  $K_m$  y  $V$  con el método de Lineweaver y Burk (1934). Encontraron que la galactosa es un inhibidor competitivo y que la glucosa y sacarosa actúan como inhibidores no competitivos cuando están en altas concentraciones. Por debajo de 0,01 M su

efecto es muy pequeño. Flaschel y col. (1982), trabajando con la enzima de *Aspergillus niger* y soluciones de lactosa de diferentes concentraciones, observaron que debido a la inhibición por la galactosa las curvas de hidrólisis son altamente no lineales, aún para tiempos muy cortos. Por lo tanto postularon que no es correcto utilizar el método de las velocidades iniciales. Afirmaron que para describir en forma adecuada la cinética de esta reacción es necesario considerar el equilibrio de mutarrotación de la galactosa, ya que la enzima que ellos emplearon era capaz de distinguir entre el anómero  $\alpha$  y el  $\beta$  y que la  $\alpha$ -galactosa es un inhibidor más potente.

Finalmente Cheng y col. (1985) postularon que, para describir adecuadamente la cinética de hidrólisis de lactosa, es necesario utilizar un modelo que contemple simultáneamente la inhibición competitiva ejercida por la galactosa y la no competitiva de la glucosa. Trabajaron con soluciones de lactosa y células de *Kluyveromyces fragilis* deshidratadas en acetona. Objetaron la validez del trabajo de Weetall y col. (1974) y describieron la hidrólisis enzimática de la lactosa como una cinética de Michaelis y Menten con inhibición competitiva y no competitiva.

### 4.3. Materiales y métodos

#### 4.3.1. Materiales

Se utilizó como materia prima para este trabajo suero dulce de quesería concentrado (SQC) aproximadamente al 50 % p/p de sólidos totales. Este material fue provisto por Sancor Cooperativas Unidas Ltda. (Santa Fé) y provenía principalmente de la elaboración de quesos de pasta blanda. El suero líquido diluido, cuya composición media se muestra en la Tabla 4.3, se concentraba al vacío en un evaporador de múltiple efecto hasta llegar aproximadamente a un 50 % p/p de sólidos. La temperatura máxima alcanzada durante el proceso era 70°C. La actividad de agua de este suero de queso concentrado estaba comprendida entre 0,940-0,950 y el pH se encontraba en el rango 6,0-6,3. La concentración media de lactosa era 35 g lactosa /100 g suero de queso concentrado. El suero de queso concentrado se mantenía refrigerado hasta su utilización.

El suero de queso concentrado con 50 % p/p de sólidos totales es de color amarillo claro y de olor agradable. Posee cristales de lactosa en suspensión que pueden ser, en algunas partidas de suero de queso, perceptibles al tacto. Debido a la gran viscosidad del suero de queso concentrado los cristales no precipitan ó lo hacen muy lentamente. La viscosidad del suero de queso concentrado y el tamaño de los cristales de lactosa pueden variar de una partida a otra, pero en la mayoría de los casos los cristales son pequeños y la viscosidad alta. La consistencia es la de una crema espesa y en determinadas partidas puede no fluir al inclinar el envase que lo contiene.

Tabla 4.3

Composición media del suero de queso dulce diluído (a)

COMPONENTE	CONCENTRACION (% P/P)
sólidos totales	8-7
lactosa	4,8-4,8
proteínas	0,8-0,9
grasa	0,03
cenizas	0,50
acidez (como ácido láctico)	0,15

(a) Análisis proporcionado por Sancor Cooperativas Unidas Ltda.



Las diferentes partidas de suero de queso concentrado recibidas de Sancor Cooperativas Unidas Ltda. no eran exactamente iguales entre sí. Una de las características que variaba entre cada partida era el contenido de sólidos. A continuación se enumeran los contenidos de sólidos de las partidas recibidas: 49,2; 54,8; 49,1; 45,5; 49,5; 55,8; 50,7; 61,1; 57,0; 51,9; 51,3; 52,0; 51,9; y 49,9 % p/p de sólidos. Para realizar las experiencias solamente fueron utilizadas aquellas partidas cuyo contenido de sólidos estaba comprendido entre 49,5 y 52,0 % p/p, salvo que se especificase lo contrario. De esta forma se lograba cierta homogeneidad en las características del material empleado para cada estudio, ya que era imposible realizar todos los ensayos con la misma partida. Con concentraciones de sólidos mayores o menores que las utilizadas, las características y el comportamiento del suero de queso concentrado variaba en gran medida. Es decir que en este trabajo la concentración del suero de queso concentrado utilizada osciló entre 49,5 y 52,0, salvo que se especifique otra concentración de sólidos.

Los reactivos empleados, todos de calidad analítica, fueron: clorhidrato de metilamina, galactosa y sulfito de sodio anhidro de Farmitalia Carlo Erba (Italia); lactosa, glucosa, ácido fosfotúngstico, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio de Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, MO); ácido acético glacial, ácido fosfórico (85 % p/p), glicerol (87 % p/p) y acetato de zinc de Merck (Darmstadt, Alemania Occidental).

El sorbato de potasio y el propionato de calcio

utilizados eran grado alimentario.

Para realizar la hidrólisis de lactosa se utilizó la lactasa Maxilact LX 5000, de Gist Brocades nv (Delft, Holanda). Esta enzima es obtenida de una cepa especial de *Kluyveromyces* ó de *Saccharomyces lactis*.

#### 4.3.2. Métodos

##### 4.3.2.1. Determinación del pH

El pH de las muestras fue medido con un electrodo de vidrio en un equipo Metrohm E 632, calibrado con buffers de pH 7,00 y 4,00.

##### 4.3.2.2. Determinación de humedad del suero de queso concentrado

La determinación de humedad del suero de queso concentrado se realizó gravimétricamente por secado en estufa de circulación forzada a 100°C durante 5 horas (Kanterewicz, 1985a). Esta es una técnica propuesta por la A.O.A.C. (1980), sección 16032, para determinar humedad en leche. Cada determinación se realizó por triplicado, siendo el error porcentual de 0,70 % (nivel de confianza: 95 %).

##### 4.3.2.3. Determinación de iones de calcio, magnesio y sodio

La determinación de calcio, magnesio y sodio iónicos

se realizó por absorción atómica en el Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Fisicoquímica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).

#### 4.3.2.4. Determinación de actividad de agua

Para la determinación de la actividad de agua ( $a_w$ ) de las muestras se utilizó un higrómetro Novasina Thermoconstanter Humidat TH2, manufacturado por Novasina AG (Zurich, Suiza). El mismo consta de una cámara de medición con temperatura controlada y un sensor de humedad relativa y temperatura modelo BS-3. El sensor de humedad está basado en los cambios de conductividad de un electrolito higroscópico al variar la humedad relativa del ambiente al cual se encuentra expuesto. Las determinaciones de  $a_w$  se realizaron a  $25 \pm 0,05^\circ\text{C}$ . Previo a su medición las muestras eran termostatzadas a  $25^\circ\text{C}$  durante 12 horas. El procedimiento para calibrar el higrómetro fue descrito por Kitic y col. (1986). Para cada serie de mediciones se obtuvo una curva de calibración con soluciones salinas saturadas de  $a_w$  conocida (Greenspan, 1977; Resnik y col., 1984) en el rango de  $a_w$  comprendido entre 0,750 y 0,975. Las soluciones salinas utilizadas y los valores correspondientes de  $a_w$  se detallan a continuación:

sal	$a_w$
sulfato de potasio	0,974
nitrate de potasio	0,925
cloruro de bario	0,902
cloruro de potasio	0,843
sulfato de amonio	0,802

cloruro de sodio

0,752

---

La curva de calibración obtenida se verificaba diariamente y cada muestra se medía por duplicado. El error de la determinación experimental de la  $a_w$  es  $\pm 0,005$  unidades de  $a_w$  (Kitic y col., 1986).

#### 4.3.2.5. Determinación de lactosa

##### 4.3.2.5.1. Elección de la técnica

Para poder conocer el grado de hidrólisis de lactosa en el sistema en estudio, es necesario determinar la disminución de la concentración de lactosa o el aumento en la concentración de galactosa ó glucosa en función del tiempo. Para ello debe contarse con métodos analíticos que determinen un azúcar en presencia de los otros y desafortunadamente existen pocas reacciones que distingan entre ellos. A fin de encontrar un método adecuado que permitiera evaluar lactosa en presencia de glucosa y galactosa o viceversa, se consultaron técnicas propuestas por varios autores. Las técnicas sugeridas por la A.O.A.C. (1980) (método general de Munson-Walker y método volumétrico general de Lane-Eynon) no son experimentalmente sencillas y otros métodos para dosar lactosa, como los que utilizan levaduras (fermentación diferenciada y método manométrico) (Horowitz y col. 1959), son complejos y largos. Se optó por buscar un método colorimétrico que fuera simple y a su vez diera buenos resultados. El método enzimático de Boehringer-Mannheim se basa en la oxidación de la galactosa a ácido galactónico por el dinucleótido nicotinamida-adenina

(NAD) en presencia de galactosa deshidrogenasa y se mide el dinucleótido nicotinamida-adenina reducido (NADH) en un espectrofotómetro (Kleyn, 1985). El método propuesto por Feitosa-Telles y col. (1978) se basa en una reacción combinada entre fenol, hidróxido de sodio, ácido pícrico y bisulfito de sodio con lactosa, la cual origina un complejo de color rosa que se mide en un espectrofotómetro. Pese a ser sencillo no es adecuado para este caso, pues la glucosa interfiere en la formación del color. El método de Toren (1967) mide concentración de glucosa. Esta es oxidada por acción enzimática a ácido glucónico y como producto de la reacción se obtiene o-dianisidina oxidada, que tiene un máximo de absorción a 440 nm. Otro método para medir glucosa es el de Nelson-Somogyi (Nelson, 1944), donde la glucosa reacciona con arsenomolibdato de amonio en medio básico y en presencia de cobre se obtiene un complejo azul. El método de Tauber y Kleiner (1932) determina monosacáridos en presencia de disacáridos. Se mide el azul de molibdeno que se forma en presencia de cobre y glucosa. Este método tiene el inconveniente que, si la concentración de lactosa es mayor que la de glucosa, la lactosa interfiere en la determinación. Otro método espectrofotométrico es el de Griffith y col. (1989), que se basa en la reducción diferenciada de cerio (IV) a cerio (III) por acción de los azúcares en un medio de ácido nítrico. Por último, el método de Nickerson y col. (1976) utiliza la reacción de Fearon (1942) para determinar lactosa, es decir, la reacción de metilamina con los enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos en medio básico para dar un complejo rosa. Varios autores emplearon el método de Nickerson para medir lactosa en soluciones de lactosa, leche o suero de queso de diversas concentraciones: Whalen y col. (1988), Chiu y Kosikowski (1985), Baer y

Lowenstein (1979), Fain y col. (1980), Griffith y Miur (1980), Chen y Zall (1983), Lin y Nickerson (1977) y Vujicic y col. (1977). En base al trabajo de Chen y col. (1981), que analizaron la confiabilidad del método de Nickerson y col. (1976), éste fue elegido para determinar lactosa en suero de queso concentrado y en otros sistemas empleados en este trabajo.

#### 4.3.2.5.2. Descripción de la técnica

El método de Nickerson y col. (1976) se basa en la determinación colorimétrica del producto de la reacción de lactosa y clorhidrato de metilamina en medio básico. Al cabo de 25 minutos de calentamiento a 65°C y 2 minutos de enfriamiento en un baño de hielo se obtiene un complejo rosa que se mide en un espectrofotómetro a 540 nm. Galactosa y glucosa no interfieren en la reacción.

Para analizar la factibilidad del método analítico de determinación de lactosa en presencia de galactosa y glucosa se realizaron las experiencias que se detallan a continuación.

#### ■ Curva de calibración

Se realizaron una serie de 10 curvas de calibración con patrones de lactosa de la siguiente concentración: 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 y 1,50 mg lactosa/ml. En base a las indicaciones de Chen y col. (1981), se tomaron las siguientes precauciones: a) secar el clorhidrato de metilamina una hora a 100°C en estufa de circulación forzada y preparar la solución de este reactivo cada vez en el

momento de usarlo; b) leer las muestras en el espectrofotómetro dentro de los dos minutos luego de retirarlas del hielo (se miden tres tubos cada vez) ya que el complejo rosa formado es algo inestable. Tomando en cuenta estas precauciones y respetando los tiempos de calentamiento y enfriamiento se obtenían resultados muy reproducibles. Una curva de calibración típica obtenida es la siguiente:

concentración de lactosa (mg/ml)	Absorbancia
0,50	0,038
0,75	0,158
1,00	0,314
1,25	0,403
1,50	0,620

Para todos los casos se obtuvieron coeficientes de correlación mayores que 0,98.

#### ■ Influencia de la presencia de galactosa y glucosa

Se determinó la influencia que ejerce sobre la formación del complejo coloreado la presencia de galactosa y glucosa formadas en el medio de la reacción al progresar la hidrólisis de lactosa. Para esto se prepararon soluciones de lactosa, galactosa y glucosa en proporciones que simulaban diferentes grados de hidrólisis. Las concentraciones utilizadas y los resultados obtenidos en las determinaciones analíticas se encuentran en la Tabla 4.4.

En base a estos resultados se puede concluir que el método de Nickerson y col. (1976) es adecuado para medir sistemas de lactosa que posean hasta el 80 % de la lactosa

Tabla 4.4

Influencia de las concentraciones de galactosa y glucosa en la determinación de lactosa.

<b>%HIDROLISIS<sup>a</sup></b>	<b>LACTOSA<sup>b</sup></b> (mg/ml)	<b>GLUCOSA<sup>b</sup></b> (mg/ml)	<b>GALACTOSA<sup>b</sup></b> (mg/ml)	<b>LACTOSA CALCULADA<sup>c</sup></b> (mg/ml)
0	1,5000	0	0	1,54
10	1,3500	0,0789	0,0789	1,40
30	1,0500	0,2368	0,2368	1,08
50	0,7500	0,3947	0,3947	0,76
80	0,3000	0,6316	0,6316	0,28
90	0,1500	0,7105	0,7105	amarillo
100	0	0,7894	0,7894	amarillo

a) % de hidrólisis al que fueron preparadas las soluciones.

b) Concentraciones a las que fueron preparadas las soluciones.

c) Concentración de lactosa calculada a partir de la determinación analítica utilizando el método de Nickerson y col. (1976).



presente hidrolizada. Con porcentajes de hidrólisis mayores al 85 % la glucosa y la galactosa formadas interfieren en la determinación, ya que el color amarillo que dan estos dos azúcares con los reactivos es lo suficientemente intenso como para enmascarar el color rosa dado por la lactosa. Esta experiencia fue realizada por duplicado informándose un promedio de los datos obtenidos.

#### 4.3.2.5.3. Técnica de medición de lactosa en suero de queso diluido, en suero de queso concentrado y en soluciones de lactosa

Para la determinación de lactosa en suero de queso se realizaron algunas modificaciones en la cantidad de muestra utilizada y en las diluciones realizadas con respecto al método propuesto por Nickerson y col. (1976).

Para determinar lactosa en suero de queso diluido se pesaba entre 7 y 9 gramos de suero de queso diluido (según el grado de hidrólisis alcanzado) en un matraz de 10 ml, el cual contenía 1 ml del agente desproteinizante. El agente desproteinizante (ZAPT) estaba compuesto por ácido fosfotúngstico y acetato de zinc disueltos en un medio de ácido acético (25,0 g de acetato de zinc, 12,5 g de ácido fosfotúngstico y 20 ml de ácido acético glacial diluidos a 100 ml). Luego de diluir el suero desproteinado a 10 ml se lo dejaba una hora agitándolo ocasionalmente y se filtraba. 1 ml de este filtrado más 1 ml de hidróxido de sodio 1 N se diluía a 25 ml, se filtraba y sobre este filtrado se determinaba lactosa por duplicado. Para la determinación de lactosa se tomaban 5 ml del filtrado, se colocaban en un

tubo de ensayo y se agregaban 5 ml de un buffer glicina-hidróxido de sodio (pH=12,8). Luego se preparaba una solución acuosa de clorhidrato de metilamina (previamente secada una hora a 100°C) 5 % p/p y una solución acuosa de sulfito de sodio 1 % p/p. Se agregaba 0,5 ml de cada una de estas soluciones a la muestra con el buffer. Se agitaba y colocaba durante 25 minutos a 65°C. Una vez transcurrido este tiempo se enfriaba la mezcla de reacción durante 2 minutos en un baño de agua y hielo y se medía el color rosa del complejo formado a 540 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21 (Baush y Lomb). Para cada serie de mediciones se realizaba una curva de calibración por duplicado a fin de verificar el buen funcionamiento de la técnica.

Para la determinación de lactosa en suero de queso concentrado se empleaban entre 0,5 y 2,5 gramos de muestra, según el grado de hidrólisis alcanzado, siendo el resto de la técnica empleada igual a la descripta para suero de queso diluido.

Para la determinación de lactosa en soluciones acuosas, si la solución era concentrada (15 % p/p ó más), se empleaban 0,5 a 3 gramos de muestra y si se trabajaba con soluciones diluidas se empleaban de 5 a 8 gramos de muestra y el resto de la técnica era igual a la descripta para suero de queso diluido.

#### 4.3.2.5.4. Error del método de determinación de lactosa en suero de queso concentrado

Para estudiar el error del método de determinación de lactosa en suero de queso concentrado se utilizaron dos partidas de suero de queso diferentes y se determinó lactosa en 10 muestras de cada una de ellas mediante la técnica descrita en el punto anterior. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 4.5. Cada determinación de lactosa se realizó por duplicado. En base a los resultados obtenidos se calculó:

Partida A: concentración promedio de lactosa: 34,7 % p/p  
desviación standard: 1,07

Partida B: concentración promedio de lactosa: 31,7 % p/p  
desviación standard: 1,11

La diferencia entre las desviaciones standard de las dos partidas se debe a la heterogeneidad del suero de queso concentrado y a las diferencias que existen entre las distintas partidas del mismo (viscosidad, tamaño de cristales de lactosa, etc.).

#### 4.3.2.5.5.. Porcentaje de recuperación de lactosa

Se estudiaron los porcentajes de recuperación en la determinación de lactosa en suero de queso concentrado. Para ello se agregaron al suero diferentes cantidades de lactosa. Se utilizó suero de queso concentrado con 35,5 % p/p de lactosa, determinada por este método. Se diluía el suero de queso concentrado a 7 % p/p de sólidos totales, se pesaba la cantidad estipulada de lactosa en un matraz de 25 ml y se llevaba a volumen con el suero diluido. Luego de

Tabla 4.5

Determinación de lactosa en dos partidas de suero de queso concentrado

MUESTRA	PARTIDA A % P/P LACTOSA	PARTIDA B % P/P LACTOSA
1	35,3	31,4
2	33,7	30,9
3	32,7	31,5
4	34,9	32,6
5	35,9	31,5
6	36,4	30,6
7	34,4	30,8
8	35,1	32,8
9	34,2	33,0
10	34,7	31,0

agitar bien se determinaba lactosa según la técnica descripta para suero de queso diluido (sección 4.3.2.5.3). Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 4.6. Cada muestra se preparó por duplicado y todas las determinaciones de lactosa también se realizaron por duplicado. Como se puede observar, los porcentajes de recuperación son altos, lo cual indicaría que el método permite determinar toda la lactosa presente en el suero. El agregado de lactosa se hizo a suero de queso diluido, pues si se agregaba más lactosa al suero de queso concentrado se dificultaba el manejo del mismo por la alta viscosidad obtenida.

En base a todas las experiencias realizadas, se concluye que el método de determinación de lactosa propuesto por Nickerson y col. (1976) para suero diluido es adecuado para medir el contenido de lactosa en suero de queso concentrado siempre que el porcentaje de hidrólisis alcanzado no supere el 80-85 %.

#### 4.3.2.6. Hidrólisis de lactosa

La hidrólisis de lactosa se llevó a cabo utilizando la enzima Maxilact LX 5000 (Gist Brocades nv, Delft, Holanda).

Las condiciones experimentales en que se realizaron todas las experiencias de hidrólisis de lactosa, ya sea en suero de queso como en otros sistemas, fueron las siguientes:

Tabla 4.6

Porcentajes de recuperación de lactosa (a).

<b>% LACTOSA VERDADERO</b>	<b>% LACTOSA CALCULADO</b>	<b>% RECUPERACION</b>
42,2	41,7	98,83
48,0	45,8	93,16
55,8	55,3	99,19
62,2	62,2	99,97
68,8	69,8	101,34

(a) Los porcentajes de lactosa se calcularon sobre la base de suero de queso concentrado.

**■ Equipo:**

Se utilizó como reactor para la hidrólisis un recipiente cilíndrico de vidrio de 500 ml de capacidad, 7 cm de diámetro interno y 14 cm de altura. La muestra utilizada, que ocupaba aproximadamente un tercio del volumen total del reactor, se agitaba con una paleta que giraba a 7 revoluciones por segundo. A su vez, durante la hidrólisis el recipiente permanecía bien tapado para evitar cambios en la  $a_w$  de la muestra debido a la evaporación. Todo el equipo se termostataba en un baño de agua a la temperatura de trabajo.

**■ Metodología de trabajo:**

Para cada corrida se utilizaron 300 g de la muestra a hidrolizar. El día anterior a la realización de la experiencia se ajustaba el pH con ácido fosfórico 85 % p/p ó con hidróxido de potasio 40 % p/p (se utilizó hidróxido de potasio en vez de hidróxido de sodio pues el ión sodio inhibe a la lactasa). Este pH se verificaba en el momento de utilizar la muestra. Al final de cada experiencia se medía el pH para determinar si el mismo había variado. En ningún caso, salvo cuando se estudió la influencia del pH, se ajustó el pH durante la hidrólisis.

Antes de agregar la enzima para comenzar la reacción se termostataba todo el equipo y la muestra a la temperatura de trabajo. La reacción de hidrólisis se iniciaba por el agregado de la enzima a la muestra ya en agitación. Se tomaban muestras periódicamente, por duplicado, las cuales se desproteinizaban inmediatamente con

ZAPT a fin de inactivar la enzima. La cantidad de muestra pesada dependía de la concentración inicial de lactosa y del grado de hidrólisis alcanzado en ese sistema, de forma tal que luego de las diluciones necesarias, la cantidad de lactosa presente estuviera dentro del rango de la curva de calibración. Una vez desproteinizadas las muestras, se determinaba lactosa mediante el método de Nickerson y col. (1976). Cada experiencia se realizó por duplicado (i.e. dos corridas de hidrólisis para las distintas condiciones estudiadas). Para cada duplicado se tomaban dos muestras a cada tiempo y en cada una de ellas se determinaba lactosa por duplicado. En la Figura 4.3 se muestran los resultados obtenidos cuando se trabajó a 37°C, pH=6,0 y con 0,1 % p/p de lactasa. La experiencia se realizó por duplicado (o: corrida 1; Δ: corrida 2); para cada duplicado se tomaron a cada tiempo dos muestras y en cada una de ellas se determinó lactosa por duplicado. Los datos están representados como % hidrólisis versus tiempo, siendo el % hidrólisis el grado de conversión porcentual de la lactosa, es decir:

$$\% \text{ Hidrólisis} = \frac{[\text{lactosa}]_{\text{inicial}} - [\text{lactosa}]_{\text{final}}}{[\text{lactosa}]_{\text{inicial}}} \times 100$$

En la Figura 4.3 se puede observar que a tiempos menores que 80 minutos, la dispersión de los valores de % hidrólisis (dentro de la misma corrida y comparando las dos corridas entre sí) es mucho mayor que a tiempos mayores donde, para una misma corrida, los valores obtenidos son muy semejantes entre sí.

Considerando una desviación standard promedio de 1,1 y que cada determinación de lactosa se realizó por



cuatriplicado el intervalo dentro del cual está comprendido el valor verdadero de la determinación analítica es de  $\pm 1,2$  % p/p lactosa (nivel de confianza: 95 %).

#### 4.3.2.7. Determinación de la actividad de agua de soluciones de galactosa y de manosa

Para la determinación de la capacidad de reducción de la  $a_w$  de la galactosa y de la manosa se prepararon soluciones del azúcar en agua destilada. Los azúcares eran previamente desecados en estufa de vacío en presencia de perclorato de magnesio a 40°C. Cada solución se preparaba por duplicado e inmediatamente se le determinaba su  $a_w$  por la técnica anteriormente descripta.

#### 4.3.2.8. Determinación de la actividad de agua del suero de queso concentrado en función del grado de hidrólisis

Para determinar la  $a_w$  del suero de queso concentrado con diferentes grados de hidrólisis era necesario evitar completamente la evaporación de agua. Por lo tanto, se trabajó de la siguiente manera: se tomaron 300 g de suero a pH=6,0 y a una temperatura de 5°C y se le agregó 0,1 % p/p de lactasa. Se homogeneizó bien la muestra y se colocaron 20 g en frascos de polietileno con cierre hermético. Se cerraron los frascos y se colocaron en un baño termostático con agitación a 37°C. Periódicamente se tomaba uno de ellos y se calentaba 2 minutos a 80°C (Guy y Bingham, 1978) a fin de inactivar la enzima y frenar la hidrólisis. Se tomó una

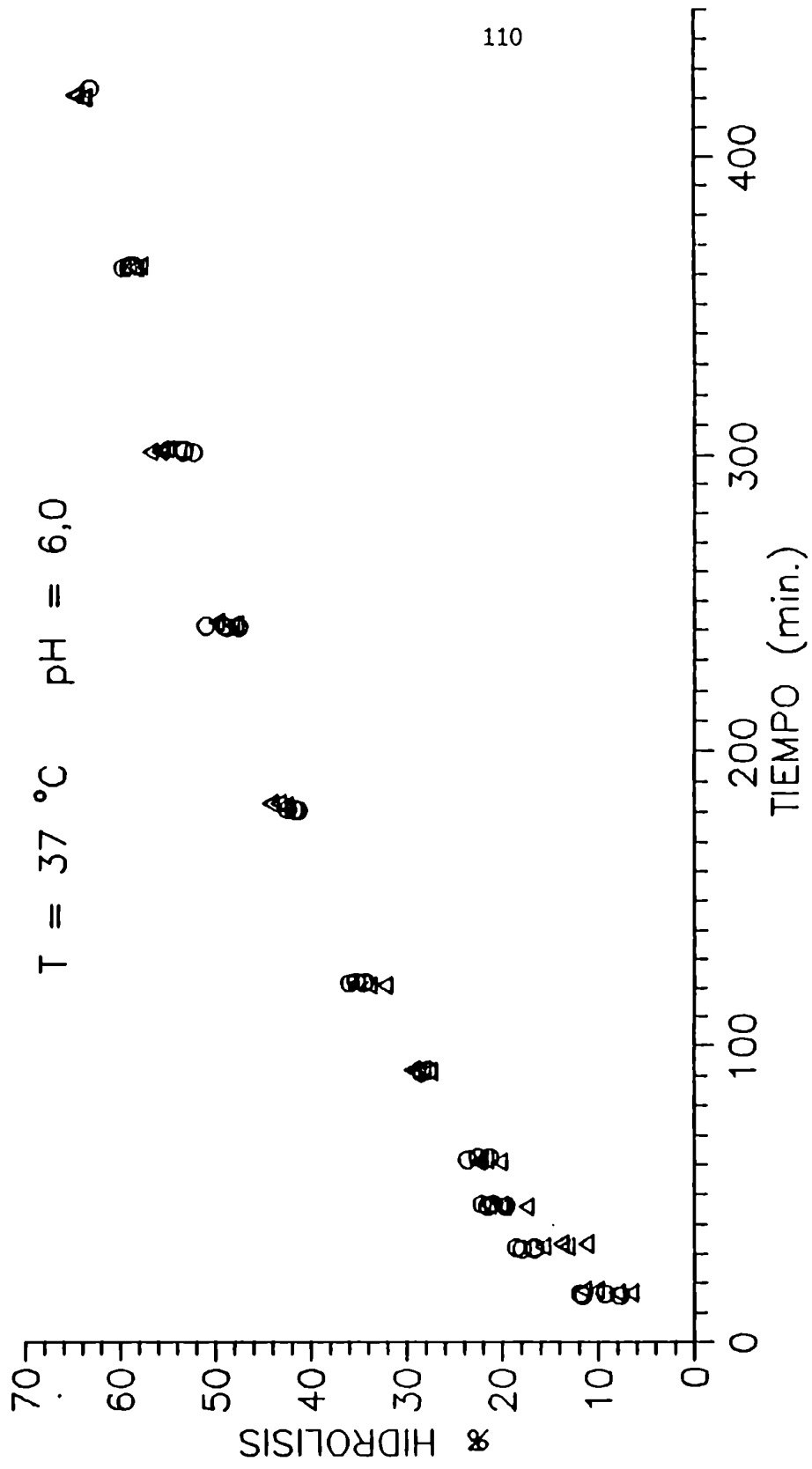


Figura 4.3:  
 Puntos experimentales de porcentaje de hidrólisis en función del tiempo, obtenidos para la hidrólisis de lactosa en suero de queso concentrado. o experiencia 1, Δ experiencia 2.

muestra de 2 g de cada frasco para la determinación de lactosa y el resto de la muestra se congeló hasta el momento de determinar la actividad de agua, lo que se realizaba de acuerdo a la técnica ya descripta.

#### 4.3.2.9. Hidrólisis de lactosa en sistemas modelo

Los sistemas modelo utilizados, compuestos por soluciones de lactosa en buffer fosfato de pH=6,0 con el agregado de sacarosa ó glicerol, se detallan en la Tabla 4.7. Todos los reactivos empleados fueron provistos por Merck Química Argentina. Los sistemas se prepararon por pesada de cada uno de los componentes. La actividad de agua inicial se midió en forma experimental según la técnica detallada en la sección 4.3.2.4. Dada la mayor capacidad del glicerol con respecto a la sacarosa para disminuir la  $a_w$ , las soluciones de sacarosa tenían mayor contenido de sólidos que las de glicerol. En los sistemas utilizados se mantuvo constante la relación lactosa/buffer. En todos ellos se utilizó 0,02 % p/p de lactasa. Se trabajó a tres temperaturas: 37°C, 47°C y 53°C. La metodología de hidrólisis y de determinación de lactosa fueron las descriptas en las secciones 4.3.2.6 y 4.3.2.5.3 respectivamente. Las  $a_w$  elegidas para los sistemas modelo fueron del mismo orden que las que posee el suero de queso concentrado al ir procediendo la hidrólisis, salvo en el sistema 1 (control) y el sistema 2. Todas las experiencias se realizaron por duplicado.

Tabla 4.7

Composición y actividad de agua inicial de los sistemas modelo.

SISTEMA	LACTOSA (g)	SACAROSA (g)	GLICEROL (g)	BUFFER (g)	$a_w$ inicial
1	10	-		90	0,993
2	10	20		90	0,981
3	10	70		90	0,945
4	10	130	-	90	0,894
5	10	-	25	90	0,941
6	10		47	90	0,888

#### 4.4. Resultados y discusión

##### 4.4.1. Influencia de la velocidad de agitación en la velocidad de hidrólisis de lactosa

El suero de queso concentrado es un medio de viscosidad relativamente alta. Por lo tanto es necesario agitar el reactor durante la hidrólisis para que la reacción entre la enzima y la lactosa no esté controlada por la etapa difusional. Asimismo al agregar la enzima Maxilact a medios viscosos, por ejemplo leche concentrada, es necesario agitar regularmente a fin de mantener homogénea la concentración de enzima; en caso contrario ocurre aglomeración de la misma, disminuyendo así su actividad (Nijpels, 1976a).

Para encontrar el nivel de agitación adecuado se utilizaron dos velocidades de rotación de la paleta: 7 y 20 revoluciones por segundo (r.p.s). Se trabajó a 37°C, pH=6,0 y 0,1 % p/p de lactasa. Los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 4.4. Se puede observar que las curvas resultantes para las dos condiciones de agitación son muy semejantes. Por lo tanto se puede concluir que en este rango de trabajo no existe resistencia difusional a la transferencia de masa. Para las restantes experiencias se trabajó a 7 r.p.s., ya que a mayor velocidad se forma espuma y se dificulta la toma de muestra para la determinación de lactosa.

##### 4.4.2. Influencia de la concentración de enzima en la velocidad de hidrólisis de lactosa

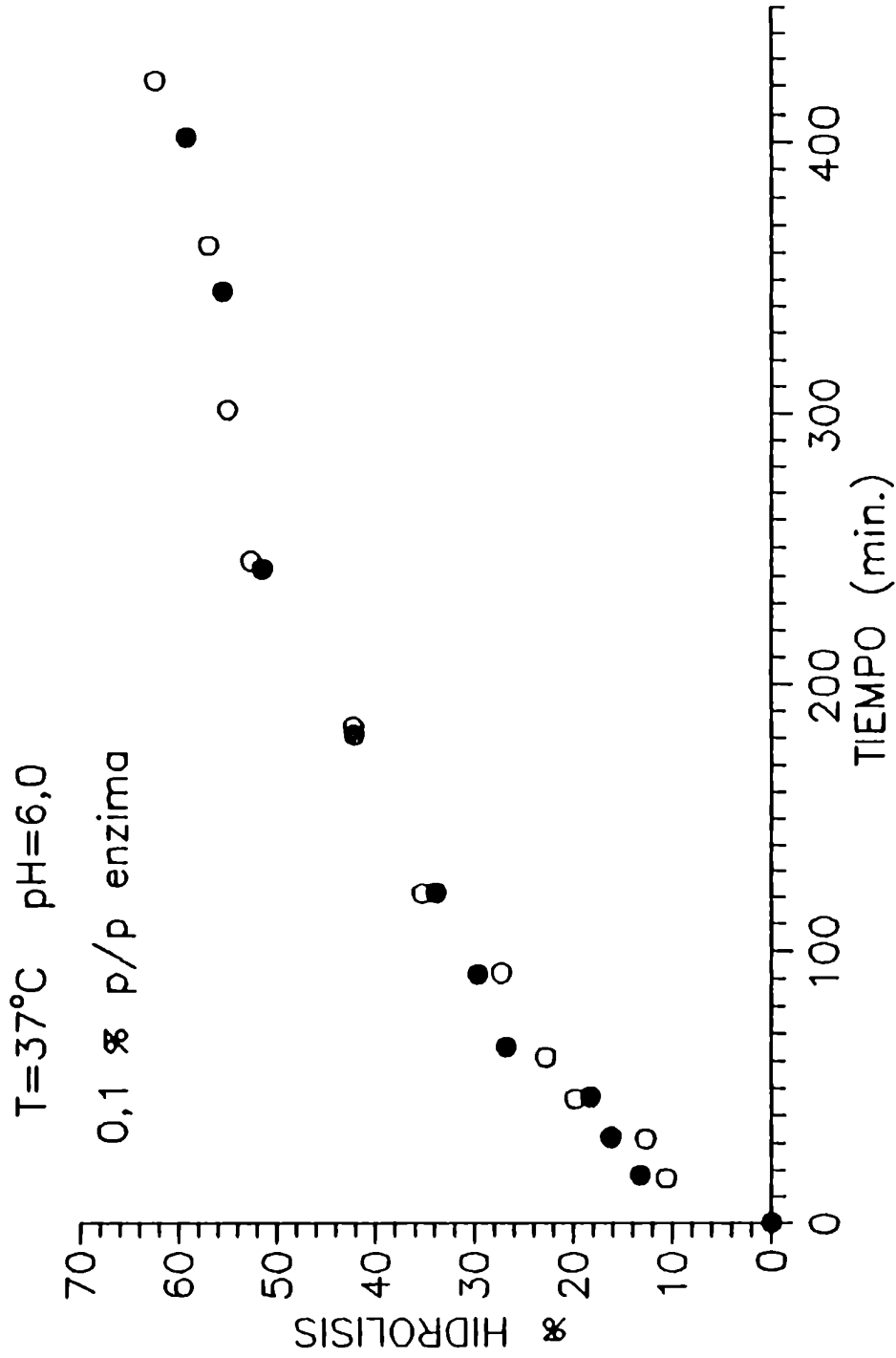


Figura 4.4:  
Influencia de la velocidad de agitación en la velocidad de hidrólisis de lactosa en suero de queso concentrado. ○ 7 rps, ● 20 rps.

La enzima Maxilact fue utilizada por varios autores en diferentes sustratos. En los boletines técnicos de Gist Brocades nv se recomienda utilizar entre 0,02 y 0,04 g enzima/100 g suero de queso diluído (7 % sólidos totales) para lograr un 80 % de hidrólisis luego de 2,5-5 horas de reacción, trabajando en las condiciones óptimas de la enzima ( $T=37^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH}=6,5$ ). Los autores Chiu y Kosikowski (1985) utilizaron para suero desproteínizado y desmineralizado, concentrado hasta un 30 % p/p de lactosa, 0,33 % p/p de la lactasa Maxilact LX 5000 para conseguir 80 % de hidrólisis trabajando a  $40^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH}=6,5$  durante 5 horas. Guy y Bingham (1978), en leche concentrada (41 % p/p sólidos totales) con 0,16 % p/p de la enzima Maxilact 40000 ONPG a  $\text{pH}=6,5$  y  $T=30^{\circ}\text{C}$ , llegaron a un 70 % de hidrólisis en 2 horas. Guy y Edmonson (1978), trabajando con 0,1 % p/p de enzima Maxilact 40000 ONPG en soluciones de lactosa (18,5 % p/p) a  $30^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH}=6,4$ , lograron un 75 % de hidrólisis en 2 horas. Giec y Kosikowski (1983) encontraron que, trabajando a  $4^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH}=6,8$  en permeatos de suero de queso concentrado al 25 % p/p de sólidos, en 25 horas se alcanza un 58 % de hidrólisis con 0,7 % p/p de Maxilact 40000 ONPG.

Pese a que existen en bibliografía numerosos trabajos en los que se utilizó la enzima Maxilact, en muchos de ellos la actividad de la lactasa empleada era diferente de la que se empleó en este trabajo y el sustrato utilizado en bibliografía no era suero de queso concentrado. En este último la concentración de lactosa y de calcio y sodio (ambos inhibidores de la enzima) son mayores que en los ejemplos citados. Debido a esto es difícil realizar comparaciones o extrapolar resultados.

Para determinar la concentración adecuada de enzima necesaria para la hidrólisis de la lactosa en el suero de queso concentrado se hicieron experiencias usando concentraciones en el rango de 2,2 a 0,8 % p/p de enzima a pH=6,0 y T=37°C. A las 1,5-2 horas aproximadamente de reacción en estas condiciones habían desaparecido los cristales de lactosa para las concentraciones de enzima empleadas. Como estos tiempos fueron relativamente cortos, se decidió emplear una menor concentración de lactasa. Se realizaron entonces una serie de experiencias en las que se utilizaron las siguientes concentraciones de enzima: 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 y 0,05 % p/p. Se trabajó a T=37°C y pH=6,0. Los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 4.5. Cuando se trabajó con 0,4 y 0,5 % p/p de lactasa, las curvas obtenidas en ambos casos fueron coincidentes y a los 130 minutos se logró más de un 80 % de hidrólisis. Esto indica que el agregado de una concentración de enzima mayor no aumentaría la velocidad de hidrólisis. Al utilizar 0,3 % p/p de enzima la hidrólisis fue bastante rápida llegándose a un 77,0 % de hidrólisis a los 100 minutos. Con 0,2 y 0,1 % p/p de lactasa para alcanzar un 60 % de hidrólisis fueron necesarios 150 y 350 minutos respectivamente. Con 0,05 % de enzima sólo se alcanzó un 45 % de hidrólisis luego de 420 minutos de reacción.

Dado que el proceso propuesto no plantea la recuperación de la enzima, para elegir la concentración adecuada de la misma se debe tener en cuenta su costo y minimizar la cantidad de lactasa utilizada. Sin embargo, como la hidrólisis se lleva a cabo a 37°C de temperatura, es necesario evitar una excesiva proliferación de la flora microbiana presente en el mismo, durante el tiempo de



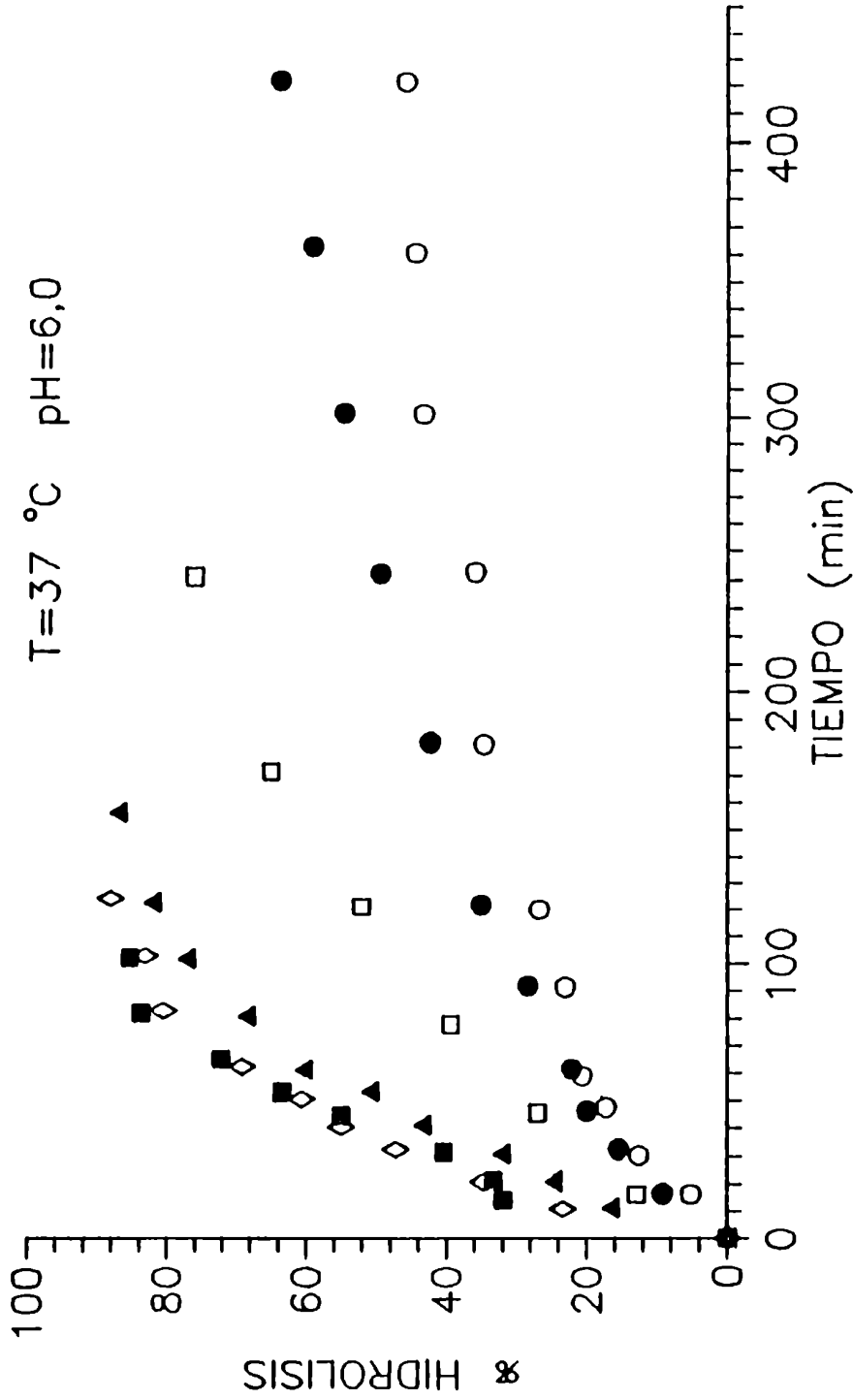


Figura 4.5:

Influencia de la concentración de enzima en la velocidad de hidrólisis de lactosa en suero de queso concentrado. Concentraciones de enzima utilizadas: ◻ 0,05 % p/p, ● 0,1 % p/p, ◻ 0,2 % p/p, ▲ 0,3 % p/p, ◇ 0,4 % p/p, ■ 0,5 % p/p.

reacción, cuando todavía el pH no ha sido ajustado al valor final de almacenamiento (5,5 ó 5,0), utilizando tiempos de hidrólisis no excesivamente largos.

Con respecto al porcentaje de hidrólisis necesario que debe alcanzar el suero de queso concentrado hay varios factores a considerar:

■ El suero de queso concentrado (50 % p/p de sólidos totales) tiene alrededor de 35 % p/p de lactosa. Este contenido de lactosa excede la solubilidad (solubilidad de lactosa en agua pura: 17,66 g lactosa anhidra/100 g solución a 25°C (Shah y Nickerson, 1978)) y parte de la misma se encuentra suspendida en el suero de queso concentrado en forma sólida. La alta viscosidad del suero de queso concentrado posibilita que los cristales permanezcan en suspensión. La presencia de estos cristales en el suero de queso es una gran desventaja debido a que no sólo contribuyen a aumentar la viscosidad, sino que también causan problemas texturales cuando el suero de queso concentrado se agrega a cualquier formulación alimentaria. Durante la hidrólisis, el suero de queso se examinó periódicamente al microscopio verificándose que al alcanzar aproximadamente un 60 % de hidrólisis no había más cristales de lactosa en suspensión (para suero de queso concentrado con 49,5-52 % p/p de sólidos), siendo este hecho coincidente con la obtención de un jarabe de textura suave y cremosa. La concentración de lactosa en este jarabe fue 11-13 % p/p (corresponde a 18-20 g lactosa/ 100 g agua + lactosa), semejante al valor de la solubilidad. Por lo tanto, para lograr la desaparición de los cristales es necesario alcanzar como mínimo un 60 % de hidrólisis.

■ Dada la forma de las curvas de hidrólisis, la obtención de una alta conversión del sustrato (mayor a 80-90 %) sería un proceso excesivamente costoso, ya sea porque debería agregarse una alta concentración de enzima o porque los tiempos de reacción serían muy prolongados.

■ A bajos porcentajes de hidrólisis la lactosa está en suspensión pero a altos porcentajes de hidrólisis precipita la galactosa, cuya solubilidad es menor que la de la glucosa (solubilidad de la galactosa en agua pura: 34,0 g galactosa anhidra/100 g solución; solubilidad de la glucosa en agua pura: 50,5 g glucosa anhidra/100 g solución (Shah y Nickerson, 1978)). Guy y Edmonson (1978) encontraron que en jarabes de lactosa, galactosa y glucosa almacenados a 23°C (preparados a partir de la hidrólisis de soluciones de lactosa con la enzima Maxilact 40000 ONPG y con 60 % p/p de sólidos totales) ocurría precipitación de la galactosa dentro de los 7 días en el caso de haberse alcanzado un 95 % de hidrólisis. Para jarabes con 75 % de hidrólisis, el tiempo de almacenamiento sin que ocurriera cristalización fue de más de 250 días.

■ El proceso de hidrólisis disminuye la concentración de lactosa presente en el suero de queso concentrado a fin de evitar los problemas que causa en personas que son intolerantes a la misma. Estudios realizados por diferentes autores (Nijpels, 1976b; Miller y Brand, 1980) indican que dichas personas toleran unos pocos gramos de lactosa por día. Para el caso de la leche se considera que un 60-80 % de hidrólisis de lactosa es suficiente en la mayoría de los casos. Sin embargo, para el caso de suero de queso, se debe

tener en cuenta que pese a que su contenido de lactosa es mucho mayor que el de la leche, sería incorporado como parte de la formulación de un determinado producto, por lo cual un alto porcentaje de hidrólisis (mayor al 60-70 %) no es necesario desde este punto de vista.

Cuando se trabaja con 0,05 % de enzima, al cabo de 7 horas de reacción se llega a un 45 % de hidrólisis y aún quedan cristales de lactosa presentes, lo cual no es deseable desde el punto de vista de la textura del suero de queso. Como tiempos de reacción mayores son inconvenientes pues favorecerían el crecimiento de la flora microbiana, es necesario emplear una mayor concentración de lactasa. Teniendo en cuenta estas consideraciones, las características de textura y aspecto del suero de queso concentrado con varios porcentajes de hidrólisis se eligió una concentración de 0,1 % p/p de lactasa como la más adecuada para realizar los ensayos posteriores. Con esta concentración de enzima se alcanza un 64-66 % de hidrólisis en 7 horas trabajando a  $T=37^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH}=6,0$ . El suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado obtenido en estas condiciones no presenta cristales, es de color amarillo y textura suave y cremosa. Además, durante un almacenamiento de 3 meses a  $25^{\circ}\text{C}$ , no presenta visualmente separación de fases.

#### 4.4.3. Influencia de la temperatura y del contenido de sólidos en la velocidad de hidrólisis de lactosa

La temperatura de hidrólisis es un parámetro muy importante a estudiar, ya que influye significativamente en

la velocidad del proceso. La mayoría de los autores que trabajaron con la enzima Maxilact usaron temperaturas entre 37°C y 41°C. Los boletines técnicos de Gist Brocades nv informan que el rango de temperaturas entre las cuales puede trabajar la enzima es de 4°C a 37°C, según el sustrato y la metodología de trabajo, siendo el óptimo de temperatura 37°C. Por ejemplo, para hidrolizar la lactosa de la leche recomiendan realizar la incubación a 4°C utilizando tiempos largos de hidrólisis. No hacen referencia al empleo de la misma a temperaturas mayores que la óptima. Otros autores, como Baer y Loewenstein (1979), Gekas y López Leiva (1985), Guy y Bingham (1978) y Nijpels (1976a) sugirieron valores similares. Chiu y Kosikowski (1985) encontraron que en permeatos de suero con 15 % p/p de lactosa la temperatura óptima es de 40°C. Dalquist y col. (1977), Miller y Brand (1980) y Kohlwey y Cheryan (1981) informaron que a temperaturas mayores de 40°C la enzima Maxilact comienza a desactivarse cuando se la utiliza en leche o en soluciones diluídas de lactosa. Sin embargo, Mahoney y Wilder (1987, 1989) establecieron que la lactasa proveniente de *Escherichia coli* tiene mayor estabilidad térmica en leche ó en suero de queso que en medio buffer.

Ya que ninguno de los autores mencionados trabajó con suero de queso concentrado, se estudió el comportamiento de la enzima a diferentes temperaturas. Se trabajó primero con suero de queso concentrado de 49,5 % p/p de sólidos y las siguientes temperaturas: 25°C, 37°C, 43°C, 47°C, 50°C, 53°C y 58°C. Como la concentración de sólidos del suero no es la misma para las diferentes partidas, se estudió también cómo se ve afectada la velocidad de hidrólisis, a 37°C y 47°C, cuando se utiliza suero de 48,0; 51,9 y 57,0 % p/p de

sólidos. En todas las experiencias se trabajó a pH=6,0 con 0,1 % p/p de enzima. También se estudió la velocidad de hidrólisis en suero de queso diluido a 37°C, 43°C y 47°C.

En la Figura 4.6 se presentan los resultados obtenidos para suero de queso concentrado de 49,5 % p/p de sólidos totales a 25°C; 37°C; 43°C; 47°C; 50°C; 53°C y 58°C. A 37°C, la temperatura más utilizada para reacciones catalizadas por enzimas, para alcanzar un 60 % de hidrólisis se necesitan 8,5 horas, pero si se aumenta la temperatura a 47°C se logra dicho porcentaje de hidrólisis al cabo del 4 horas de reacción. Un mayor aumento de la temperatura tiene un efecto adverso sobre la velocidad de hidrólisis, ya que ésta disminuye notablemente. A 50°C se alcanza un 30 % de conversión a los 100 minutos de reacción, la cual ya no varía con el tiempo de reacción debido a la inactivación de la enzima. Por lo tanto, para esta partida de suero de queso concentrado de 49,5 % p/p de sólidos la temperatura óptima de trabajo (entre los valores ensayados) de la lactasa es 47°C ya que a mayor temperatura hay desactivación.

Se sugieren dos factores posibles para explicar este óptimo de temperatura, tan diferente al reportado en otros sistemas:

- El alto contenido de sólidos del suero de queso concentrado. Esto implica también un relativamente alto contenido de proteínas (7 % p/p). Mahoney y Wilder (1987) encontraron que la desnaturalización de la lactasa de *E. coli* en buffer fosfato es de primer orden con una vida media de 1,16 minutos a 60°C, mientras que en leche la vida media

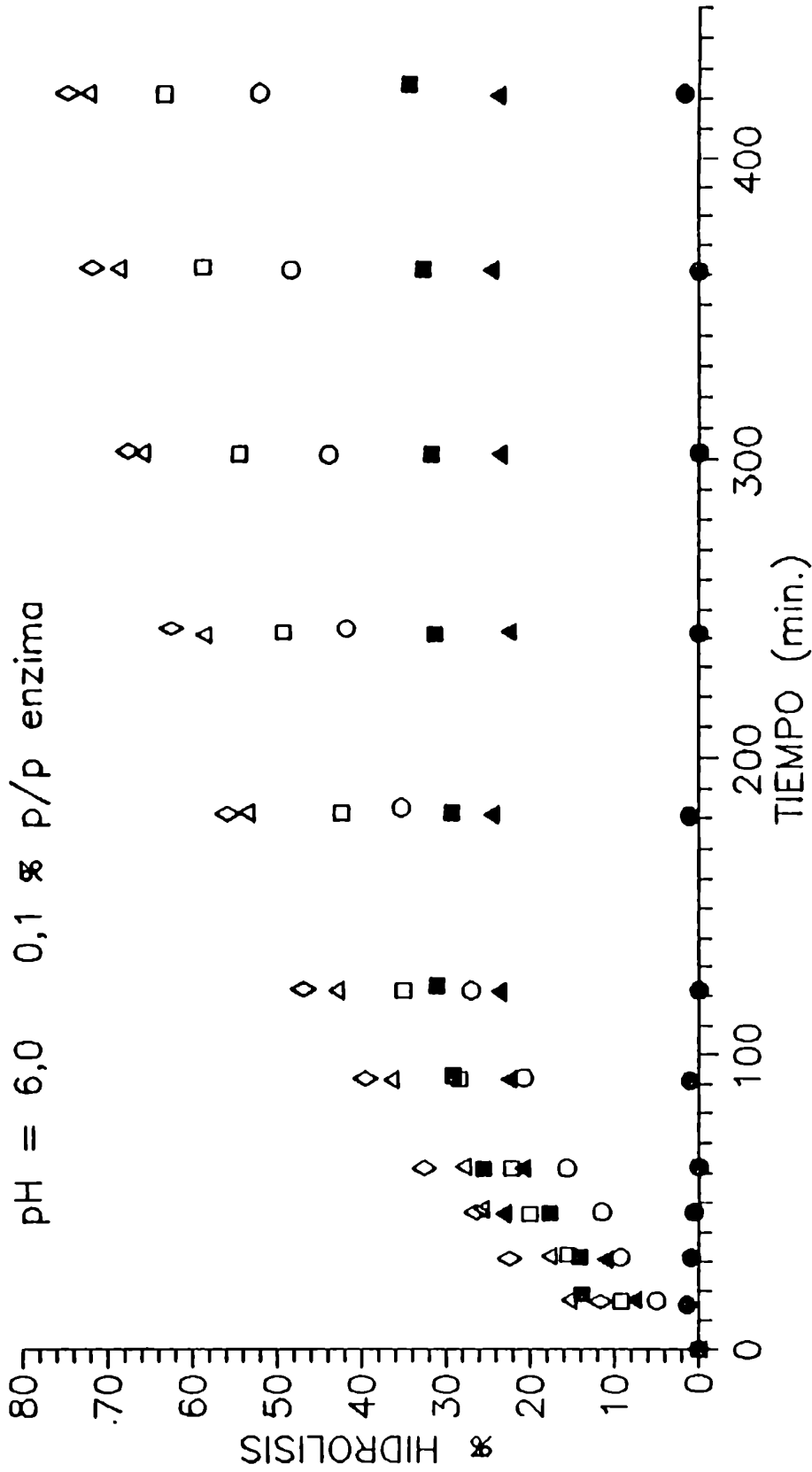


Figura 4.6:  
Influencia de la temperatura en la velocidad de hidrólisis de lactosa en suero de queso concentrado con 49,5 % p/p de sólidos. ○ 25°C, □ 37°C, ▲ 43°C, ◇ 47°C, ■ 50°C, △ 53°C, ● 58°C.

es de 115 minutos a la misma temperatura. Es decir, la lactasa de *E. coli* es mucho más estable en leche de lo que sería previsible en base a los resultados obtenidos en la solución buffer. Recientemente estos mismos autores (Mahoney y Wilder, 1989) realizaron un estudio más amplio sobre diversas sustancias que estabilizan térmicamente a la lactasa de *E. coli*. Encontraron que la mayor estabilidad de la enzima en leche se debe principalmente a la presencia de caseína y lactosa y a su vez depende de la concentración de ambas. Otro azúcar que agregado a la leche dializada aumenta el tiempo de vida media de la lactasa, aunque no en el mismo grado que la lactosa, es la galactosa. No observaron el mismo efecto con la glucosa. Sugirieron que la estabilización con proteínas depende de la presencia de azúcares que puedan unirse a la enzima, ya sea como sustrato (lactosa) o como inhibidor (galactosa) y que el efecto del azúcar es específico y no un efecto osmótico general. Observaron además, que la lactosa sola (sin la presencia de proteína) no es capaz de estabilizar a la lactasa de *E. coli*, aunque sí estabiliza a lactasas de otros orígenes, como las de *Kluyveromyces marxianus* (Mahoney y Wilder, 1985) y de *Streptococcus thermophilus* (Greenberg y col. 1985). Para la lactasa de *E. coli*, la estabilidad térmica en suero de queso diluido (7 % p/p sólidos totales) es cinco veces menor que en leche, aunque treinta veces mayor que en buffer. De las proteínas del suero, agregadas individualmente a un sistema con 5 % p/p de lactosa y sales de la leche, la seroalbúmina bovina es la que muestra mayor efecto estabilizador, aumentando casi cuatro veces el tiempo de vida media con respecto al sistema sin proteína.

No se encontraron datos sobre los factores que



influyen sobre la estabilidad térmica de la lactasa Maxilact; solamente se menciona en el trabajo de Dalquist y col (1977) que la seroalbúmina humana actúa como un estabilizador de la enzima durante el almacenamiento.

■ La baja actividad de agua del suero de queso concentrado y del suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado. El suero de queso concentrado (aproximadamente 50 % sólidos totales) tiene una actividad de agua de 0,94-0,95 y al final de la hidrólisis la misma desciende a 0,89-0,90. Estos valores de  $a_w$  son menores que la de los de los sistemas empleados en los trabajos anteriormente citados. La estabilidad de las proteínas y por lo tanto de las enzimas es influenciada por la actividad de agua. Por ejemplo, para la lipasa pancreática porcina una disminución en el contenido de agua del medio aumenta notablemente el tiempo de vida media de la enzima (Hahn-Hagerdal, 1985). Multon y Guilbot (1975) estudiaron la inactivación de la enzima ribonucleasa en granos de trigo enteros ( humedad (base seca) = 4,5 a 45 % p/p) y en ribonucleasa cristalizada (humedad (base seca) = 0 a 45 % p/p). En base a sus resultados concluyeron que el agua juega un importante papel catalítico en la reacción al disminuir la energía de activación.

El grado de concentración alcanzado por el suero de queso determina sus propiedades: contenido de sólidos, pH,  $a_w$ , viscosidad, fuerza iónica, etc.; por lo tanto es necesario conocer cómo influye dicha variable en la velocidad de hidrólisis de lactosa.

Luego, se analizó también el comportamiento de la

lactasa Maxilact en sueros con diferentes contenidos de sólidos totales: 48,0; 51,9 y 57,0 % p/p trabajando a 37°C y 47°C. El suero de 48,0 % de sólidos fue obtenido por dilución y el de 57,0 corresponde a una partida que fue concentrada en la industria un tiempo mayor que el standard.

En la Figura 4.7 se encuentran representados los resultados obtenidos a 37°C y a 47°C para las tres concentraciones de sólidos utilizadas. En todos los casos se trabajó con 0,1 % p/p de enzima y el pH se ajustó a 6,0 previamente a la hidrólisis y no fue corregido durante la experiencia. En los sueros con 48,0 y 51,9 % p/p de sólidos, éste se mantenía constante, pero en el suero con 57,0 % p/p de sólidos al final de la hidrólisis el pH era 5,70, cercano al pH inicial (este pH no fue corregido durante la hidrólisis). Los resultados obtenidos muestran que, para una misma temperatura, cuanto más concentrado es el suero de queso, menor es la velocidad de hidrólisis de lactosa. Resultados semejantes fueron encontrados por Jackson y Jelen (1989) trabajando con sueros de queso de 7 a 25 % p/p de sólidos: a mayor contenido de sólidos la velocidad de hidrólisis es menor. Aunque, en el caso del suero de queso concentrado con 57 % p/p de sólidos, al efecto del contenido de sólidos se superpone el efecto de la disminución del pH, que también afecta negativamente la velocidad de hidrólisis. Para los sueros con 48 y 51,9 % p/p de sólidos al aumentar la temperatura aumenta el grado de hidrólisis alcanzado. Para suero de queso concentrado de 57 % p/p de sólidos hay un aumento al principio de la reacción pero el porcentaje de hidrólisis alcanzado luego de las 7 horas de reacción es menor a mayor temperatura.

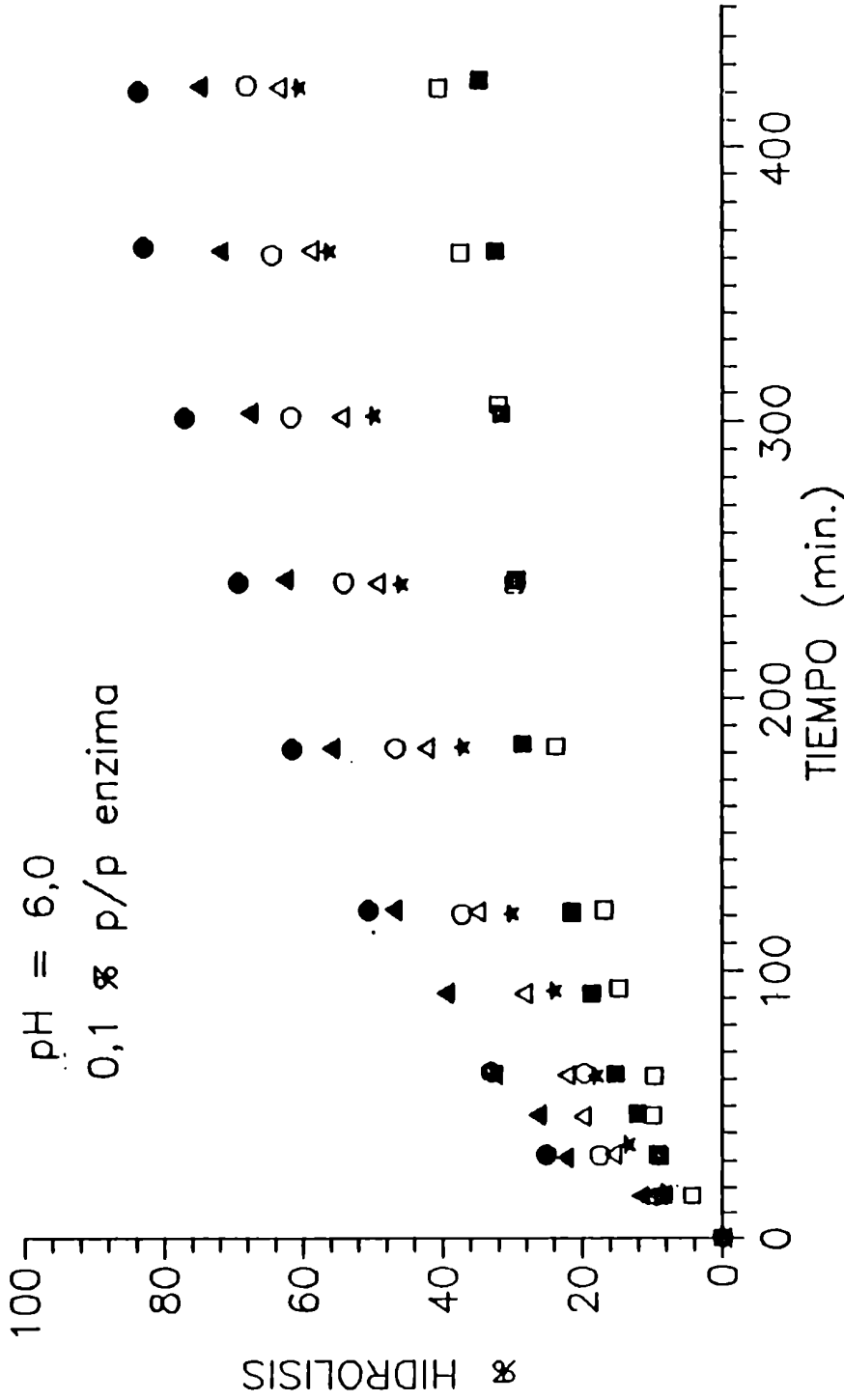


Figura 4.7:  
Influencia de la temperatura en la velocidad de hidrólisis de lactosa para suero de queso concentrado con 48,0, 51,9 y 57,0 % p/p de sólidos. Temperatura= 37°C: ○ 48,0 % p/p, △ 51,9 % p/p, □ 57,0 % p/p. Temperatura= 47°C: ● 48,0 % p/p, ▲ 51,9 % p/p, ★ 57,0 % p/p, + 0,5 % p/p de E.D.T.A.

Al variar el contenido de sólidos, aún dentro de un rango pequeño, hay cambios en el suero:

- Una viscosidad mucho mayor en el suero de 57,0 % de sólidos con respecto al de 48,0 %.
- El pH inicial del suero más concentrado es 5,6 mientras que para las otras dos concentraciones es 6,3.
- A mayor porcentaje de sólidos la concentración total de lactosa aumenta (34 % p/p para suero de queso concentrado con 48,0 % de sólidos y 40 % para suero de queso concentrado con 57,0 % de sólidos).

De acuerdo a lo reportado en bibliografía, la concentración total de lactosa ejercería cierta influencia sobre la velocidad de hidrólisis. Chiu y Kosikowski (1985) reportaron que existe una concentración óptima de lactosa. Trabajando con permeatos desmineralizados de diferentes porcentajes de sólidos de forma tal que las concentraciones de lactosa fueran 7,5; 15,0; 22,5 y 30 % p/p encontraron que la velocidad de hidrólisis máxima corresponde al permeato con 15,0 % p/p de lactosa. Con respecto a la posibilidad que, a altas concentraciones de lactosa, se produzca inhibición de la enzima por sustrato, Dalquist y col. (1977) encontraron que, trabajando con soluciones de suero en polvo desmineralizado de diferentes concentraciones hasta un 30 % p/p de lactosa, no hay inhibición por sustrato. Este resultado fue corroborado por Giec y Kosikowski (1983) utilizando permeato concentrado.

- A mayor porcentaje de sólidos la concentración iónica es mayor. Dentro de los iones presentes en el suero de queso

los que están en mayor concentración son el calcio y el sodio (aproximadamente 0,30 y 0,84 % p/p respectivamente en un suero de queso de 49,5 % p/p de sólidos) y ambos son inhibidores de la enzima (Agbeebavi y col., 1987; Boletines Técnicos de Gist Brocades nv). Por lo tanto la hidrólisis de la lactosa debería ser más lenta cuanto más alto es el contenido de sólidos.

■ Al aumentar el porcentaje de sólidos y por ende el de lactosa, manteniendo constante la concentración de enzima, disminuye la relación enzima/lactosa y por lo tanto la velocidad.

Uno de los posibles factores que afectarían el comportamiento de la enzima en el suero de queso con 57,0 % p/p de sólidos es el mayor contenido de calcio. Para analizar este fenómeno, se realizó una experiencia agregando a dicho suero de queso concentrado, previo a la hidrólisis, 0,5 % p/p de E.D.T.A. (ácido etiléndiamino tetracético), a fin de complejar parte del calcio y otros iones divalentes presentes (relación molar entre el calcio y el E.D.T.A.: 0,075/0,013). No se agregó mayor cantidad de E.D.T.A. pues una mayor concentración del mismo en el suero de queso concentrado produce una separación de fases que dificulta la hidrólisis. Se trabajó a pH=6,0, T=47°C, 0,1 % p/p de enzima y 0,5 % p/p de E.D.T.A.. El resultado obtenido se encuentra también en la Figura 4.7. Al cabo de 7 horas de reacción se llega a un 59,6 % de hidrólisis, casi un 100 % más que sin quelante. En esta experiencia el pH también disminuyó durante la hidrólisis hasta 5,7. Pese a que la relación calcio/E.D.T.A. no es equimolar, el quelante agregado es suficiente para mejorar el desempeño de la

enzima en el suero de queso con 57,0 % p/p de sólidos. Estos resultados indicarían la fuerte influencia inhibidora y desestabilizadora del calcio sobre la lactasa.

El hecho de que el valor óptimo de temperatura obtenido trabajando con suero de queso concentrado sea 47°C podría deberse a un efecto específico del suero sobre la enzima, el cual, estabilizando su estructura, le permita reaccionar a una temperatura mayor que la esperada. O a que esta enzima en particular tuviera una mayor termoestabilidad que las utilizadas en otros trabajos.

Para analizar qué hipótesis justifica mejor el comportamiento de la enzima, se realizaron experiencias con suero de queso concentrado (de 49,5 % p/p de sólidos) diluido a 7 % p/p sólidos totales a tres temperaturas: 37°C, 43°C y 47°C. Se trabajó a pH=6,0 y con 0,02 % p/p de enzima (se trató de mantener la misma relación enzima/lactosa que en el resto de las experiencias). Los resultados se encuentran en la Figura 4.8. Como puede observarse, trabajando a 43°C al cabo de 30 minutos la enzima se inactiva y a 47°C ya a los 10 minutos no hay más actividad enzimática. Esto demostraría que el suero de queso concentrado tiene un efecto estabilizador sobre la lactasa, permitiendo que la enzima hidrolice lactosa a temperaturas óptimas mayores que en suero de queso diluido.

Es evidente la fuerte influencia que ejerce el contenido de sólidos en la velocidad de hidrólisis. En muchas de las partidas de suero de queso concentrado recibidas se verificó que la temperatura óptima era 47°C. Sin embargo, en alguna de ellas a 47°C la hidrólisis

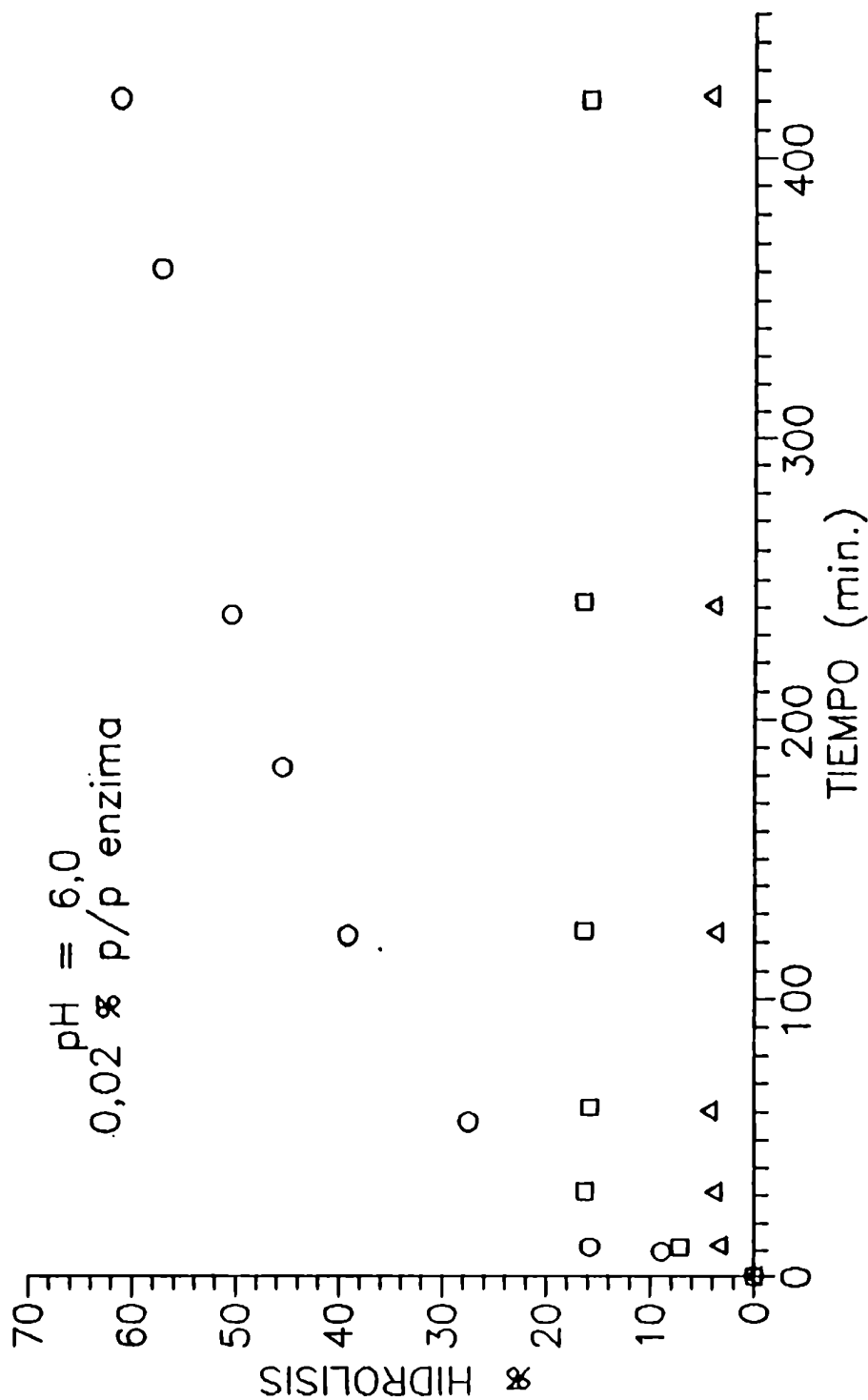


Figura 4.8:  
Influencia de la temperatura en la velocidad de hidrólisis de lactosa en suero de queso diluido (7 % p/p sólidos). ○ 37°C, □ 43 °C, Δ 47°C.

procedía más lentamente que a 37°C y no se pudo establecer la causa. Para evitar el problema de la desestabilización de la enzima dependiendo de la partida de suero utilizada, se trabajó para todas las experiencias realizadas con suero de queso concentrado de 49,5-52,0 % p/p de sólidos y a 37°C, salvo que se indicaran otras condiciones.

#### 4.4.4. Influencia del pH en la velocidad de hidrólisis de lactosa

El pH es otro factor que influye notablemente sobre la actividad enzimática, ya que la mayoría de las enzimas poseen un valor óptimo de pH donde su actividad es máxima. La actividad de muchas enzimas varía con el pH de la misma forma en que lo hacen la ionización de ácidos y bases, pues en los sitios activos generalmente hay grupos ácidos o básicos que tienen efecto catalítico solamente para determinada conformación. También el contenido de iones del medio en que se encuentra el sustrato afecta marcadamente el pH de máxima actividad de la enzima (Van Griethuysen y col., 1985), variando éste según el medio en que se encuentre el sustrato.

Para la enzima Maxilact, los boletines técnicos de Gist Brocades nv informan que el rango de pH óptimo es 6,5-7,0. A pH 5,5 la inactivación es casi total y a pH 6,0 se retiene un 60 % de la actividad. Estos ensayos fueron realizados con suero diluido (7 % sólidos totales) a 37°C con 0,01 % p/p de enzima y el tiempo de hidrólisis fue de 4 horas. Con respecto a los pH utilizados por otros autores con esta lactasa, Guy y Edmonson (1978) trabajaron con soluciones de lactosa a pH=6,4; Chiu y Kosikowski (1985)



trabajaron con permeatos de suero de queso con pH 6,5; Giec y Kosikowski (1982) emplearon la enzima en permeatos de suero concentrado (15 % p/p lactosa) a pH 6,8; Gekas y López (1985) en suero de queso informaron un pH óptimo de 6,7. Roger y col. (1976), utilizando ultrafiltrados con 5 % de lactosa, trabajaron a pH 6,8. Dalquist y col (1977) dieron como pH de óptima estabilidad y actividad para esta lactasa un valor de 7,0, trabajando en leche y suero desmineralizado.

Como el comportamiento de la enzima al estudiar el efecto de la temperatura sugiere que existen ciertas interacciones entre los componentes del suero de queso y la enzima, se procedió a verificar cuál es el pH óptimo para la hidrólisis de lactosa en el suero de queso concentrado. Se trabajó a los siguientes valores de pH: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 y 7,0. Todos los ensayos fueron realizados a 37°C, con 0,1 % p/p de enzima y suero de queso concentrado de 50,7 % p/p de sólidos. En la Figura 4.9 se encuentran los resultados obtenidos. El pH al cual se logra un mayor porcentaje de hidrólisis al final del tiempo de reacción es 6,0. Sin embargo, a pH 6,5 y a tiempos cortos, la hidrólisis procede más rápido que a pH 6,0. Pero hacia el final de la experiencia, para conversiones mayores, la enzima pareciera perder actividad obteniéndose así un porcentaje de hidrólisis final menor que a pH 6,0. Algo similar ocurre a pH 7,0 a muy baja conversiones. A pH 5,5 y 5,0 la actividad de la enzima disminuye notablemente con respecto a pH 6,0.

Cuando se trabajó a pH mayores que el normal del suero (6,1-6,3), es decir pH 6,5 y 7,0, fue necesario

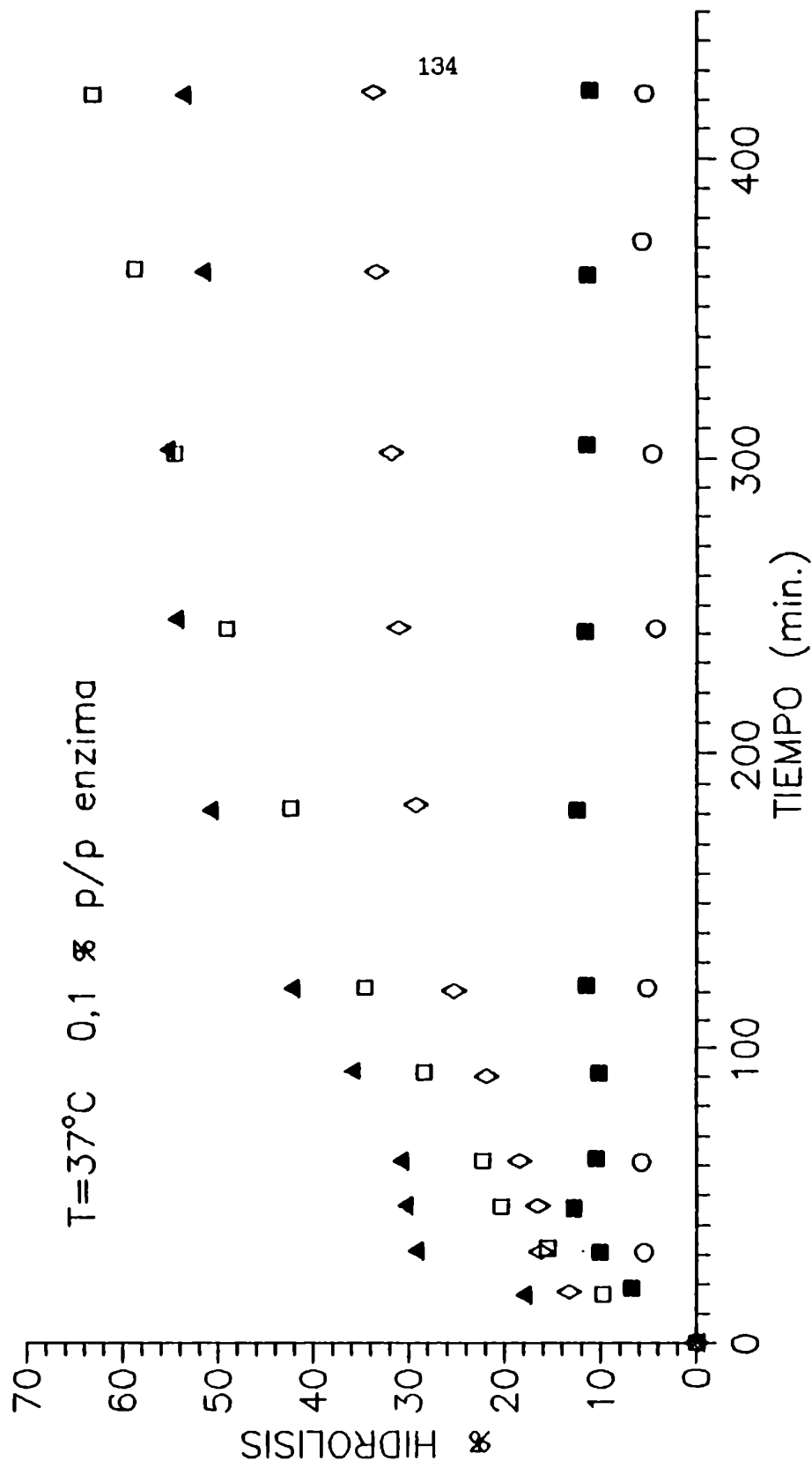


Figura 4.9:

Influencia del pH en la velocidad de hidrólisis de lactosa en suero de queso concentrado. ○ pH=5,0, ■ pH=5,5, □ pH=6,0, ▲ pH=6,5, ◇ pH=7,0.

ajustar el pH continuamente durante la experiencia ya que el mismo tendía a descender. Esto indicaría que se produciría alguna reacción donde participaría el álcali agregado. No fue posible establecer qué fenómeno era responsable de este hecho. Cuando se partió de un pH inicial de 6,5 ó 7,0 (ajustado con hidróxido de potasio) y no se lo ajustó constantemente a lo largo de la hidrólisis, el pH del suero disminuyó en función del tiempo hasta llegar al valor normal del suero de queso y las curvas obtenidas eran semejantes a las obtenidas a pH 6,0.

Podría considerarse, en base a estos resultados, la posibilidad de trabajar primero a pH 6,5 hasta conversiones cercanas al 50 % y luego trabajar a pH 6,0, pero el ajuste continuo del pH es un problema adicional que complica el proceso y la disminución conseguida del tiempo de reacción no es tan significativa frente al tiempo total de reacción a pH 6,0. Teniendo en cuenta estos resultados se eligió 6,0 como valor de pH para realizar la hidrólisis de lactosa en el suero de queso concentrado.

Si se utiliza suero de queso concentrado de pH natural 6,1-6,3 (i.e. sin ajuste inicial de su pH), también es posible realizar la hidrólisis llegando a resultados semejantes a los de pH 6,0.

#### 4.4.5. Influencia de la variabilidad de distintas partidas de suero de queso concentrado en la hidrólisis de lactosa

Diferentes partidas de suero de queso concentrado

presentan pequeñas variaciones en su composición, debidas principalmente a que no siempre reciben exactamente el mismo procesamiento en la planta industrial. Es así como diferentes partidas pueden presentar diferencias en la viscosidad, el tamaño y distribución de los cristales de lactosa, el contenido de sólidos, la composición iónica, etc.. Todos los factores enumerados pueden ejercer cierta influencia sobre el comportamiento de la lactasa, de forma tal que los resultados obtenidos para las diferentes partidas no sean similares.

Para estudiar el efecto de las diferencias entre las distintas partidas en la conducta de la enzima, se analizó la velocidad de hidrólisis para sueros cuyo contenido de sólidos estaba entre 49,5 y 52,0 % p/p. La experiencia de hidrólisis de lactosa se realizó en las siguientes condiciones:  $T=37^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH}=6,0$  y 0,1 % p/p de enzima. En la Tabla 4.8 se comparan, para cada tiempo, el porcentaje de hidrólisis alcanzado en las distintas partidas de suero ensayadas.

Los resultados obtenidos indican que la hidrólisis de lactosa procede aproximadamente a la misma velocidad en diferentes partidas de suero con 49,5-52,0 % p/p de sólidos. Por lo tanto, las conclusiones obtenidas para una partida se pueden aplicar para cualquier suero de queso concentrado con ese rango de concentración de sólidos. Asimismo se debe tener en cuenta que los diferentes sueros hidrolizados no evidencian diferencias visuales en su aspecto, textura, color, viscosidad, etc..

#### 4.4.6. Influencia de los agentes antimicrobianos utilizados

Tabla 4.8

Porcentajes de hidrólisis en función del tiempo de reacción en diferentes partidas de suero de queso concentrado (49,5-52,0 % p/p sólidos totales) a  $T=37^{\circ}\text{C}$  ;  $\text{pH}=6,0$  y  $0,1$  % p/p de enzima. Las concentraciones de sólidos de las diferentes partidas utilizadas son: 1) 49,5, 2) 50,7, 3) 51,9, 4) 51,3, 5) 52,0, 6) 51,9; 7) 49,9 % p/p de sólidos.

% HIDROLISIS							
PARTIDA	1	2	3	4	5	6	7
<b>TIEMPO</b> (min)							
0	0	0	0	0	0	0	0
15	9,2	7,5	8,9	10,2	12,6	10,6	11,6
30	15,5	17,7	10,5	17,4	18,2	16,2	14,6
45	20,1	19,8	14,4	21,1	19,5	20,8	18,7
60	22,3	20,5	20,3	22,8	21,7	21,8	21,4
90	29,0	23,5	23,8	28,2	27,9	26,6	28,6
120	35,1	29,6	29,4	32,8	30,7	32,0	35,2
180	42,4	45,7	43,2	41,8	38,2	37,4	42,7
240	49,4	53,5	50,5	49,2	47,5	43,3	48,2
300	54,6	61,3	58,6	55,5	56,5	55,5	56,5
360	59,0	62,9	60,2	59,9	60,0	60,7	58,5
420	63,7	65,4	64,1	66,4	65,6	64,2	63,9

#### en la velocidad de hidrólisis de lactosa

Para la obtención de suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado estable microbiológicamente a temperatura ambiente se utilizaron dos agentes antimicrobianos: sorbato de potasio (SK) y propionato de calcio (PCa). Ambos conservadores se emplearon en una concentración máxima de 0,2 % p/p. Pese a que esta cantidad es pequeña, como el agregado del conservador se debe hacer antes de realizar la hidrólisis, se analizó si el sorbato de potasio y/o el propionato de calcio ejercen algún efecto sobre la actividad de la enzima. Se realizaron dos experiencias, con suero de queso concentrado, en las siguientes condiciones: T=37°C, pH=6,0, 0,1 % p/p de enzima y 0,2 % p/p de SK ó PCa. En la Figura 4.10 se encuentran los resultados obtenidos, comparados con los del control (sin conservador). Se puede observar que ninguno de los dos agentes antimicrobianos ejerce una influencia notable en la velocidad de hidrólisis y por lo tanto en la actividad de la enzima. Se concluye que ambos pueden ser agregados al principio del proceso a fin de retardar y/o inhibir el crecimiento microbiano.

#### 4.4.7. Influencia de la galactosa y de la glucosa en la velocidad de hidrólisis de lactosa

Galactosa y glucosa son los productos resultantes de la hidrólisis de lactosa por acción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Varios autores (Van Griethuysen y col., 1985, Friend y Shahani, 1982; Hourigan, 1985, Park y col., 1979, Van Griethuysen y col., 1988, Ma y col., 1983, Weetall

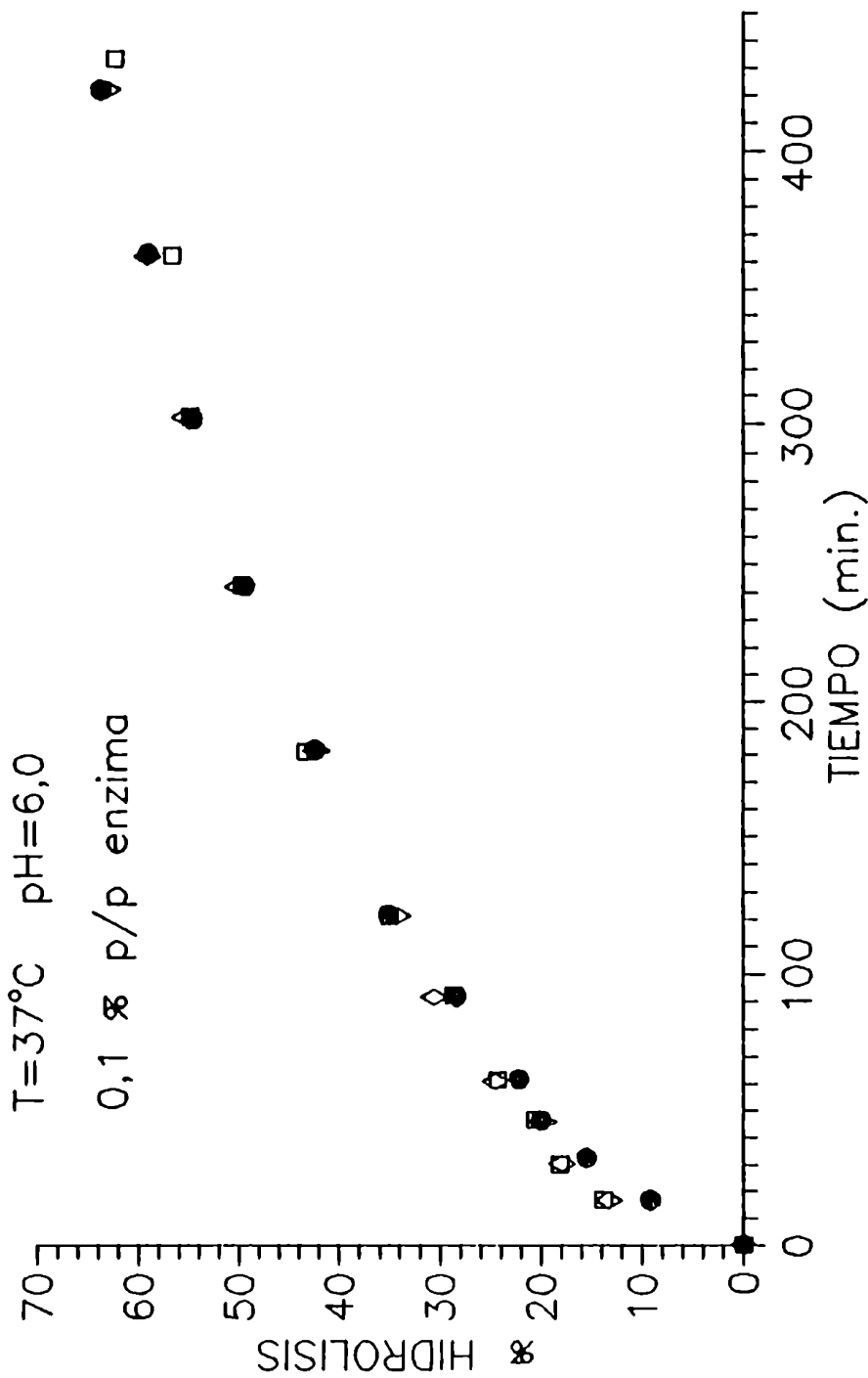


Figura 4.10:  
Influencia de los conservadores utilizados en la velocidad de hidrólisis de lactosa en suero de queso concentrado. ◻ 0,2 % p/p sorbato de potasio, ◇ 0,2 % propionato de calcio, ● control (sin conservador).

y col., 1974, Scott y col., 1984, Flaschel y col., 1982) coinciden en que la galactosa inhibe en forma competitiva la reacción de hidrólisis de lactosa. Cheng y col. (1985) afirman, además, que un tratamiento correcto de dicha cinética debe incluir la inhibición no competitiva de la glucosa. En la sección 4.4.9. se discute con más detalle la cinética de esta reacción.

A fin de verificar la posible inhibición por ambos azúcares y de establecer su importancia relativa, se determinaron las curvas de hidrólisis sobre suero de queso concentrado, agregando inicialmente 5 % p/p de galactosa ó 5 % p/p de glucosa. La hidrólisis se realizó en las siguientes condiciones:  $T=37^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH}=6,0$  y 0,1 % p/p de enzima. En la Figura 4.11 se encuentran los resultados obtenidos. Cuando inicialmente hay glucosa presente, se llega hasta un 49 % de hidrólisis, 14 % menos que en el control (suero sin agregado de glucosa o galactosa), al cabo de 420 minutos de hidrólisis; mientras que en presencia de galactosa, la reacción procede solamente hasta un 28 % de conversión de la lactosa al cabo del mismo tiempo. La gran diferencia en la capacidad inhibitoria de ambos azúcares justificaría el hecho de que la mayoría de los autores sólo tengan en cuenta la inhibición competitiva de la galactosa despreciando la acción de la glucosa. Por ejemplo, Friend y Shahani (1982), reportaron que la galactosa es un inhibidor muy eficaz de la lactasa. Encontraron que, trabajando con soluciones de lactosa 200 mM a  $\text{pH}=6,5$  con la enzima de *Aspergillus oryzae*, la presencia inicial de 5 mM de galactosa en el sistema disminuye la actividad de la enzima en un 50 %.



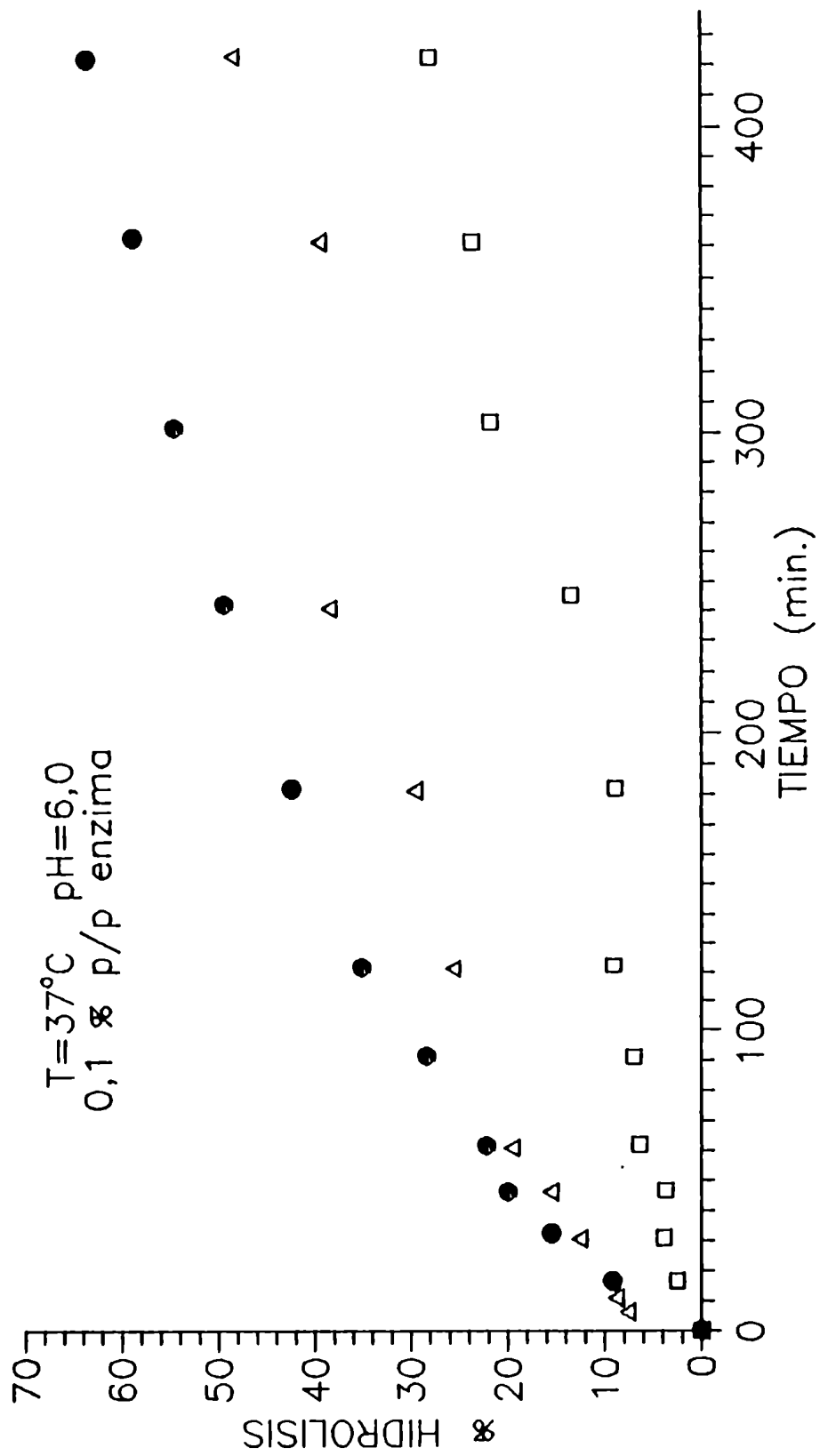


Figura 4.11:  
Influencia de la presencia de glucosa ó galactosa en la velocidad de hidrólisis de lactosa en suero de queso concentrado. ▲ 5 % p/p glucosa, □ 5 % p/p galactosa, ● control (sin azúcar agregado).

#### 4.4.8. Evolución de la concentración total de lactosa y de la concentración de lactosa soluble durante la hidrólisis

El suero de queso concentrado sin hidrolizar presenta gran cantidad de cristales de lactosa en suspensión que desaparecen durante la reacción de hidrólisis. Se analizó la variación de la concentración total de lactosa y la concentración de lactosa soluble a lo largo del proceso. Se hidrolizaron 600 g de suero de queso concentrado. A cada tiempo se tomaron muestras de aproximadamente 40 g de suero, en las que se inactivaba la enzima ajustando el pH a 5,0. Se separaba una muestra de 2 g para la determinación de lactosa total y el resto se centrifugaba 30 minutos a 2000 rpm a fin de lograr una completa precipitación de los cristales. En el sobrenadante se determinaba lactosa soluble. Los resultados se encuentran en la Figura 4.12. donde se puede observar que, dentro del error, la concentración de lactosa soluble permanece aproximadamente constante hasta transcurridos unos 220-240 minutos de reacción, mientras que la concentración de lactosa total decrece más rápidamente. Al final de la hidrólisis ambas concentraciones coinciden.

Debido a estos resultados, se planteó el interrogante si la enzima es capaz de actuar sobre los cristales de lactosa, además de la lactosa en solución. En bibliografía no fue encontrada ninguna referencia al respecto, aunque debe tenerse en cuenta que por lo general se trabaja con concentraciones de lactosa menores que la saturación. Una hipótesis para explicar porqué la concentración de lactosa total decrece mucho más rápido que la de lactosa soluble es

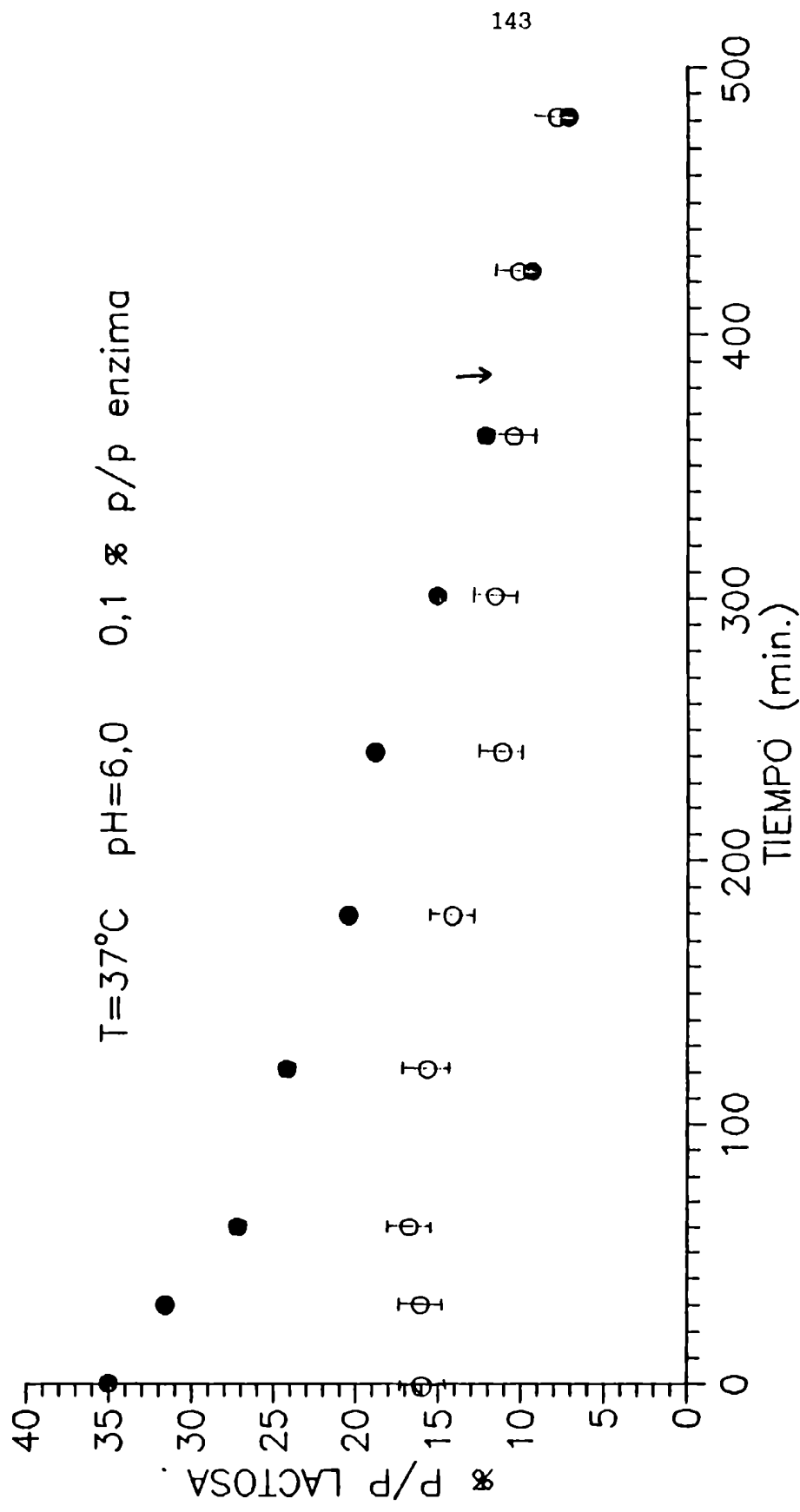


Figura 4.12:  
 Variación de la concentración de lactosa soluble y de lactosa total del suero de queso concentrado en función del grado de hidrólisis. ● lactosa total, ○ lactosa soluble. ↓ indica el tiempo de desaparición de los cristales, observado en el microscopio (40X).

que la enzima hidroliza preferentemente a la lactosa en solución y los cristales se van disolviendo a una velocidad suficiente de forma tal de mantener una concentración de lactosa soluble cercana a la saturación (es decir que la velocidad global de reacción esté controlada por la etapa de reacción química). El leve descenso de la concentración de lactosa soluble a porcentaje de hidrólisis altos se debería a que el aporte de lactosa por disolución de cristales es menor que el consumo por reacción química. Por otra parte, a los 390 minutos aproximadamente se observaba al microscopio (40X) la desaparición de los cristales de lactosa en suspensión.

Para esclarecer un poco más este hecho, se trabajó en sistemas con diferentes concentraciones de lactosa total. Para variar la concentración total de lactosa se podría diluir el suero de queso concentrado a diferentes concentraciones de sólidos. Sin embargo de esta forma no sólo variaría la concentración total de lactosa sino que también la viscosidad, fuerza iónica,  $a_w$ , pH, concentración de inhibidores y activadores de la enzima, factores todos que afectan a la reacción enzimática. Por lo tanto un sistema diluido no sería comparable al suero de queso concentrado. También se debe considerar que el suero de queso concentrado posee cristales de lactosa en suspensión. Cuando se diluye el suero a un contenido de sólidos menor, disminuirá el contenido de cristales de lactosa y la concentración de lactosa soluble será la de saturación. Es decir, no se podría variar la concentración de lactosa soluble, que sería la atacada por la enzima. Esto se verifica siempre que no se diluya al punto en que la concentración de lactosa total sea menor a la solubilidad

(este punto corresponde a un suero de 30 % p/p de sólidos aproximadamente).

Una alternativa para el análisis sería variar la concentración de cristales de lactosa, manteniendo la concentración de lactosa soluble constante. Si la lactasa solamente hidrolizara a la lactosa en solución, no deberían existir diferencias entre experiencias realizadas con diferentes concentraciones totales de lactosa (manteniendo la concentración total de lactosa por encima de su valor de solubilidad).

Así, se realizaron una serie de experiencias utilizando diferentes concentraciones totales de lactosa. Se procedió de la siguiente manera: el suero de queso concentrado se centrifugó 30 minutos a 2000 rpm hasta la completa precipitación de los cristales y se separó el sobrenadante. A una masa fija de sobrenadante se agregó cantidades crecientes de cristales de lactosa (precipitado) a fin de aumentar la concentración de lactosa total. Se homogeneizó y se determinó la concentración de lactosa para cada caso, siendo los valores: 13,4 % p/p (sin cristales), 17,1 % p/p, 24,1 % p/p y 28,9 % p/p. De esta forma se pudo variar la concentración total de lactosa sin variar otras características del suero de queso concentrado. Cada uno de estos sistemas se hidrolizó según el método ya descrito. Para todos los casos se trabajó a 37°C, pH=6,0 y 0,1 % p/p de enzima. En la Figura 4.13 se presentan los resultados obtenidos. Las curvas de hidrólisis para 24,1, 28,9 y 35,8 (suero sin centrifugar) % p/p de lactosa coinciden, indicando que las conversiones que se logran en cada caso son iguales (dentro del error experimental). Esto indicaría

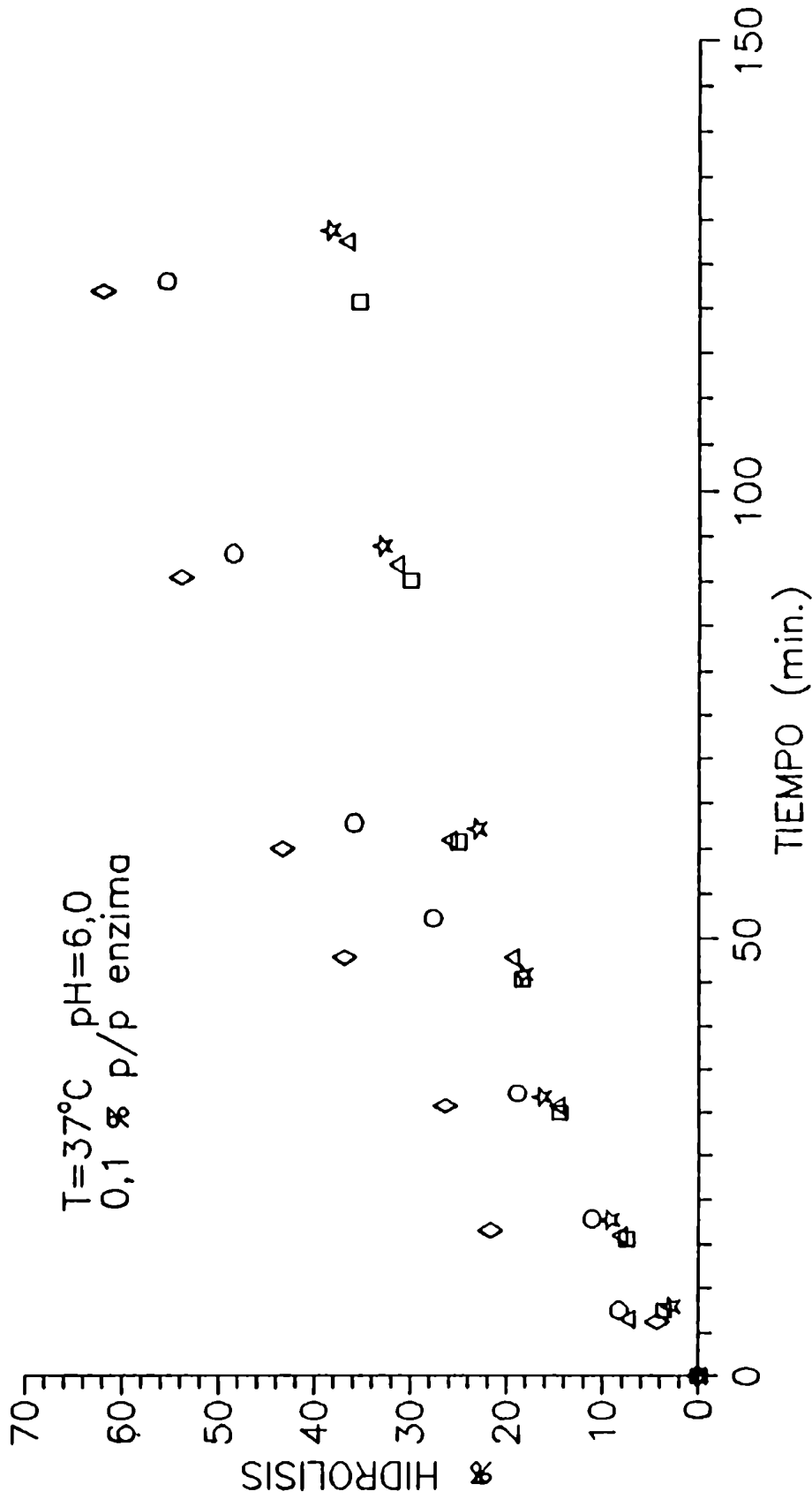


Figura 4.13:  
 Influencia de la concentración de cristales de lactosa en la velocidad de hidrólisis de lactosa en suero de queso concentrado. Concentraciones de lactosa utilizadas: ◇ 13,4 % p/p, ○ 17,1 % p/p, △ 24,1 % p/p, □ 28,9 % p/p y ☆ 35,8 % p/p.

que la presencia de los cristales de lactosa no afecta la velocidad de hidrólisis. La curva del sistema con 17,1 % p/p de lactosa, pese a tener cierta cantidad de cristales, no se superpone a las demás, probablemente pues al ser muy pequeña la cantidad de cristales agregados éstos se solubilizaron en las primeras etapas de la reacción pasando a ser un sistema sin cristales. Estas experiencias refuerzan la hipótesis de que la enzima hidrolizaría preferentemente la lactosa soluble.

#### 4.4.9. Análisis cinético de la hidrólisis de lactosa

##### 4.4.9.1. Modelos aplicados

Como se mencionó anteriormente, existen diversos enfoques en la bibliografía para describir la cinética de hidrólisis enzimática de lactosa. Para el caso particular en el que el sustrato es lactosa en suero de queso y la enzima Maxilact LX 5000, el modelo utilizado en bibliografía para describir la cinética de hidrólisis enzimática de lactosa, cuando se emplean ecuaciones integradas, es el de Michaelis y Menten con inhibición competitiva de la galactosa. También por lo general el efecto inhibitor de la glucosa no se toma en cuenta.

Cuando se plantea un modelo matemático para ajustar los datos experimentales de una dada reacción, no debe olvidarse que el hecho de que haya acuerdo entre la predicción teórica y los datos experimentales no prueba que el mecanismo del modelo sea necesariamente válido, sino que simplemente sugiere que en ese caso en particular dicho modelo puede ser utilizado como herramienta matemática para

predecir el desempeño del reactor.

En el punto 4.4.7 se estudió la inhibición relativa de la galactosa y la glucosa en la reacción de hidrólisis. Si bien la inhibición que ejerce la glucosa es menor que la que ejerce la galactosa, ambas deberían, en principio, ser tomadas en cuenta al postular un modelo para predecir el desarrollo de la reacción. En la sección 4.4.8 se estudió la evolución de la concentración de lactosa soluble y total a lo largo del tiempo de hidrólisis. La lactosa soluble permanece aproximadamente constante durante 220-240 minutos cuando se trabaja a 37°C; en la misma sección (4.4.8) se vió también que distintas concentraciones de cristales de lactosa no afectan la velocidad de hidrólisis. Por ello, es probable que el reactor se comporte como un reactor semi-batch, es decir, a medida que se consume lactosa soluble por hidrólisis enzimática, se disuelven cristales para mantener la concentración de lactosa soluble constante e igual a la solubilidad. Por lo tanto en la postulación de un modelo se deberían tener en cuenta estos fenómenos

Por otro lado un modelo que considere que la concentración de lactosa soluble permanece constante no puede ser utilizado para describir toda la curva de hidrólisis y para cada condición experimental en la que se trabaje se debe determinar el rango de validez de dicho modelo. Para facilitar la descripción de la reacción de hidrólisis para que pueda ser utilizada con fines industriales, tomando en cuenta lo expresado por la bibliografía, se emplearon también modelos que poseen la misma funcionalidad que la ecuación de Michaelis y Menten, considerando la variación de la concentración de lactosa total. Es decir, se trata como si la misma estuviera



disponible en su totalidad para reaccionar con la enzima, independientemente de si está solubilizada o precipitada.

Es importante tener en cuenta que la materia prima que se empleó en este trabajo es muy compleja, habiendo muchos factores que pueden influir en el mecanismo de acción de la enzima, a saber: la presencia de proteínas que afectan la estabilidad de la enzima (Mahoney y col., 1989; Dalquist y col., 1974; Declaire y col., 1985); la presencia de sales que activan o inhiben a la enzima, por ejemplo Agbebavi y col. (1987) encontraron que las sales del suero ejercen inhibición incompetitiva sobre la lactasa; Flaschel y col. (1982) encontraron que la velocidad de hidrólisis por la lactasa de *Aspergillus niger* se ve afectada por el equilibrio de mutarrotación de los azúcares.

Resumiendo, para describir matemáticamente las curvas obtenidas se utilizaron los siguientes modelos:

- Cinética de Michaelis y Menten con inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por glucosa considerando que la concentración de lactosa soluble se mantiene constante durante un largo lapso de la reacción.
- Modelo con la misma funcionalidad que la cinética de Michaelis y Menten con inhibición competitiva por galactosa considerando que la variación de la concentración de sustrato es igual a la variación de la concentración de lactosa total.
- Modelo con la misma funcionalidad que la cinética de Michaelis y Menten con inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por la glucosa, considerando que la

variación de la concentración de sustrato es igual a la variación de la concentración de lactosa total.

No se consideró una posible inhibición por sustrato, ya que trabajando con leche concentrada con 30 % p/p de lactosa la enzima no se vió inhibida por la lactosa (Dalquist y col., 1977). Tampoco se consideró la inhibición de las sales presentes en el suero de queso para evitar complicaciones excesivas en el modelo matemático utilizado.

#### 4.4.9.2. Problemas específicos del suero de queso concentrado para el tratamiento matemático de la cinética de hidrólisis

El análisis de los datos experimentales de hidrólisis de lactosa en función del tiempo se realizó utilizando ecuaciones integradas pues existen problemas que impiden realizar un análisis basado en velocidades iniciales, a saber:

- La imposibilidad de variar la concentración total de lactosa sin que varíen otros factores. Efectivamente, para variar la concentración total de lactosa es necesario diluir el suero de queso concentrado, con lo cual no sólo varía la concentración del azúcar sino también la viscosidad, fuerza iónica,  $a_w$  y pH del suero de queso, factores que afectan la actividad y estabilidad de la enzima, resultando así un sistema diferente del que se desea estudiar.

- Al ser la enzima fuertemente inhibida por uno de sus productos, es difícil realizar una determinación exacta de

la velocidad inicial, pues ésta decrece muy rápidamente. Salvo que una curva de concentración de producto en función del tiempo presente una porción lineal significativa, es difícil medir en forma exacta las velocidades iniciales y cualquier error sistemático que resulte de una apreciación subjetiva equivocada es muy difícil de detectar (Van Griethuysen y col., 1985; Cornish-Bowden, 1975). Weetall y col. (1974) han recomendado que, para utilizar el método de las velocidades iniciales, los ensayos de hidrólisis de lactosa se realicen en condiciones tales que menos de un 5% del sustrato sea convertido en producto, pues si la conversión es mayor la actividad de la enzima varía mucho debido a la inhibición por la galactosa.

■ Dada la alta viscosidad del suero, al agregar la enzima para iniciar la reacción se requiere un cierto tiempo para que ésta se distribuya homogéneamente en todo el suero. Por lo tanto muestras tomadas a tiempos muy cortos no son representativas del verdadero grado de avance de la reacción.

Todas estas consideraciones hacen inconveniente el uso del método de las velocidades iniciales, por lo que se analizaron los datos experimentales de concentración de sustrato versus tiempo de reacción por medio de ecuaciones de velocidad integradas.

#### 4.4.9.3. Procedimientos matemáticos utilizados para calcular los parámetros cinéticos de la reacción

Para calcular los parámetros de las ecuaciones

cinéticas por medio de ecuaciones integradas se puede proceder de diferentes formas. Se pueden aplicar métodos de regresión no lineal o sino linealizar la ecuación y aplicar regresión lineal para el cálculo de la ordenada al origen y la abcisa. Este último método es el más sencillo para obtener una estimación de las constantes, pero es aplicable solamente cuando la función es linealizable y algunos autores consideran más confiable el uso de un método de regresión no lineal (Wilkinson, 1961; Colquhoun, 1969; Matiska y Kovar, 1985). Los métodos de regresión no lineal son más versátiles para trabajar con ecuaciones cinéticas y generalmente dan una mejor estimación de los parámetros (Atkins y Nimmo, 1975). Respecto de los numerosos métodos de regresión no lineal que existen, es difícil decidir 'a priori' cuál se ajustará mejor a las ecuaciones que se emplearán.

Los siguientes métodos de cálculo fueron empleados para estimar los coeficientes de las ecuaciones cinéticas:

#### ■ Regresión no lineal

Se utilizaron dos métodos de regresión no lineal: el método de Marquardt (Apéndice 1) y la rutina para regresión no lineal del Departamento de Biomatemática de la Universidad de California, Los Angeles, USA (BMDP AR) (Apéndice 2). El método de Marquardt se usó para ajustar los coeficientes de las ecuaciones a dos parámetros del tipo

$$t = \mathcal{P}1 f([S]) + \mathcal{P}2 g([S]) \quad (4.21)$$

donde  $\mathcal{P}1$  y  $\mathcal{P}2$  son los coeficientes de la ecuación que representan las constantes cinéticas agrupadas y los parámetros que se ajustarán por el método de regresión no

lineal;  $f([S])$  y  $g([S])$  representan funciones de la concentración de sustrato que dependerá del modelo que se considere. Por medio de esta ecuación se puede representar al modelo de igual funcionalidad que la cinética de Michaelis y Menten con inhibición competitiva y también al modelo que considera que la concentración de lactosa soluble no varía durante un lapso de la reacción. Cuando se aplicó el método de Marquardt a los resultados experimentales para calcular  $\mathcal{P}1$  y  $\mathcal{P}2$  el valor encontrado de estos parámetros era independiente del valor inicial con que se comenzara la iteración. Matyska y Kovar (1985) compararon diferentes métodos de regresión no lineal para ajustar los datos experimentales de la ecuación de Michaelis y Menten y calcular los parámetros de la ecuación. Recomendaron el empleo del método de Marquardt para análisis de rutina y sugirieron el uso de 10 a 15 datos para obtener mejores resultados.

La rutina BMDP AR se empleó para ecuaciones del mismo tipo que la anterior pero con un término más

$$t = \mathcal{P}1 f([S]) + \mathcal{P}2 g([S]) + \mathcal{P}3 h([S]) \quad (4.22)$$

de forma tal que quedan tres parámetros a ajustar. Esta ecuación representa el caso en que se considera inhibición simultánea de galactosa y glucosa teniendo en cuenta la variación de lactosa total. Se intentó ajustar esta ecuación con el método de Marquardt pero los resultados obtenidos dependían fuertemente del valor inicial dado a los parámetros para comenzar a iterar. Con una mínima variación en el valor inicial de uno de ellos el valor final de los tres parámetros variaba mucho, llegando incluso a producirse cambios de signo en los mismos. El motivo de esto

probablemente sea que no se tiene una buena estimación inicial de los parámetros para comenzar a iterar. Con la rutina BMDP AR este problema no existía y por lo tanto se la utilizó para este caso. Por lo general cuanto mayor es el número de parámetros de una ecuación, se dificulta el ajuste de los datos experimentales dado que se requiere de una muy buena estimación del valor inicial de los parámetros para favorecer una rápida convergencia del método de regresión.

#### ■ Regresión lineal

Las ecuaciones cinéticas que corresponden al modelo con inhibición competitiva por galactosa y con concentración de lactosa soluble constante pueden ser linealizadas (ver secciones 4.2.4 y 4.4.9.5) y los parámetros  $\mathcal{P}1$  y  $\mathcal{P}2$  calcularse a partir de la ordenada y abcisa de la recta. Pese a que teóricamente esta regresión no es válida, pues el tiempo es la variable independiente y la concentración de sustrato la dependiente (es decir, se trata de una ecuación implícita), Fisher y Nimmo (1972) encontraron que las estimaciones de los parámetros que se obtienen no presentan desviaciones y son precisas. Atkins y Nimmo (1973) utilizaron este método para ajustar curvas simuladas de avance de reacción en función del tiempo y comparan estos resultados con los obtenidos por regresión no lineal. Su conclusión es que, pese a no ser teóricamente correcto, la estimación que se obtiene de los parámetros es buena, siempre que los datos que se utilicen sean suficientemente precisos y las concentraciones iniciales de sustrato mayores que  $K_m$ .

#### 4.4.9.4. Descripción matemática de las curvas de hidrólisis

En las secciones 4.4.3 y 4.4.4 se presentaron las curvas de hidrólisis de lactosa obtenidas a diferentes temperaturas y pH en suero de queso concentrado. En esta sección se analizará la descripción matemática de las mismas utilizando los diferentes modelos propuestos.

4.4.9.4.1. Modelo cinético con concentración de sustrato soluble constante, inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por glucosa

Se verificó experimentalmente que para las condiciones en que se realiza la hidrólisis del suero de queso concentrado, en este trabajo, la concentración del sustrato en solución, es decir de lactosa, permanece aproximadamente constante durante 220-240 minutos cuando la reacción transcurre a 37°C (ver sección 4.4.8). Además la glucosa y galactosa inhiben la reacción de hidrólisis (ver sección 4.4.7). En vista de estos resultados se dedujeron las ecuaciones matemáticas que contemplan estos fenómenos.

La ecuación de velocidad de Michaelis y Menten con inhibición competitiva y no competitiva puede integrarse considerando que la concentración de lactosa soluble no varía a lo largo del tiempo, y que la enzima sólo es capaz de actuar sobre la lactosa que está soluble. La ecuación de velocidad para la reacción es:

$$v = \frac{d[P1]}{dt} = - \frac{d[Sr]}{dt} = \frac{V \cdot [Ss]}{K_m \left[ 1 + \frac{[P1]}{K_{i1}} + \frac{[P2]}{K_{i2}} \right] + [Ss]} \quad (4.23)$$

donde

[S $\tau$ ]: es la concentración de sustrato total.

[Ss]: es la concentración de sustrato soluble.

[P1]: es la concentración del producto que inhibe en forma competitiva.

Ki1: es la constante de inhibición debida a P1.

[P2]: es la concentración del producto que inhibe en forma no competitiva.

Ki2: es la constante de inhibición debida a P2.

Si se considera que [P1] = [S $\sigma\tau$ ] - [S $\tau$ ], donde [S $\sigma\tau$ ] es la concentración de lactosa total inicial y [S $\tau$ ] es la concentración de lactosa total a un tiempo t de reacción (por concentración de lactosa total se entiende a la lactosa soluble más la cristalizada) y se reemplaza la expresión de P1 en la ecuación de velocidad se llega a:

$$-\frac{d[S\tau]}{dt} = \frac{V \cdot [Ss]}{K_m \left\{ 1 + ([S\sigma\tau] - [S\tau]) \left( \frac{1}{K_{i1}} + \frac{1}{K_{i2}} \right) \right\} + [Ss]} \quad (4.24)$$

Separando variables se integra esta ecuación considerando [Ss] constante, obteniendo la siguiente expresión:

$$t = \frac{K_m + [Ss]}{V [Ss]} ([S\sigma\tau] - [S\tau]) + \frac{1}{2 V [Ss]} \cdot K_m \left[ \frac{1}{K_{i1}} + \frac{1}{K_{i2}} \right] ([S\sigma\tau] - [S\tau])^2 \quad (4.25)$$



La ecuación 4.25 se puede escribir en función de los parámetros  $\mathcal{P}_1$  y  $\mathcal{P}_2$  de la siguiente manera:

$$t = \mathcal{P}_1 ( [S_{O\tau}] - [S_{\tau}] ) + \mathcal{P}_2 ( [S_{O\tau}] - [S_{\tau}] )^2 \quad (4.26)$$

$$\text{donde } \mathcal{P}_1 = \frac{K_m + [S_s]}{V [S_s]} \quad [\mathcal{P}_1] \quad \text{min/ mM}$$

$$\mathcal{P}_2 = \frac{1}{2 V [S_s]} \cdot K_m \left[ \frac{1}{K_{i1}} + \frac{1}{K_{i2}} \right] \quad [\mathcal{P}_2] \quad \text{min/ mM}^2$$

La ecuación 4.25 puede también ser linealizada y se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{t}{[S_{O\tau}] - [S_{\tau}]} = \frac{K_m + [S_s]}{V [S_s]} + \frac{1}{2 V [S_s]} \cdot K_m \left[ \frac{1}{K_{i1}} + \frac{1}{K_{i2}} \right] \cdot ([S_{O\tau}] - [S_{\tau}]) \quad (4.27)$$

Para este caso se define  $\mathcal{P}_1$  y  $\mathcal{P}_2$  igual que para la ecuación 4.26.

Los parámetros  $\mathcal{P}_1$  y  $\mathcal{P}_2$  se calcularon por el método de Marquardt y por regresión lineal de la ecuación linealizada. Los resultados se encuentran en la Tabla 4.8. Se analizó por este método sólo la experiencia realizada a 37°C y pH 6,0 ya que fue en estas condiciones en las que se estudió la evolución de la concentración de la lactosa soluble. Los parámetros obtenidos por el método de Marquardt son

Tabla 4.8

Parámetros de la ecuación que describe la hidrólisis de lactosa considerando la concentración de lactosa soluble constante, inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por glucosa, a  $T = 37^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH} = 6,0$ .

T ( $^{\circ}\text{C}$ )	MARQUARDT				R. LINEAL	
	P1		P2		P1	
37 $^{\circ}\text{C}$	$7 \cdot 10^{-4}$	$\bar{+}10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$\bar{+}9 \cdot 10^{-8}$	$0,08\bar{+}9 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-4} \bar{+}3 \cdot 10^{-5}$

diferentes que los encontrados por regresión lineal. En la Figura 4.14 se encuentran las predicciones teóricas y los puntos experimentales. Cuando se calculan los parámetros de la ecuación por el método de Marquardt (Figura 4.14a) el ajuste de los datos experimentales con la predicción teórica es muy bueno. Lo mismo ocurre cuando se calculan por regresión lineal (Figura 4.14b).

Al utilizar este modelo para representar los datos experimentales se debe tener en cuenta que solamente es válido mientras la concentración de lactosa soluble permanezca aproximadamente constante. Dado que para alcanzar un porcentaje de hidrólisis del 60-65 %, necesario para la desaparición de los cristales, es necesario utilizar tiempos de hidrólisis mayores se emplearon otros modelos para describir la hidrólisis que son válidos para todo el tiempo de reacción.

Para todos los casos en el cálculo de los parámetros se emplearon las siguientes unidades: minutos para el tiempo y mM para la concentración de lactosa.

#### 4.4.9.4.2. Modelo cinético con inhibición competitiva por galactosa y concentración de sustrato igual a la concentración de lactosa total

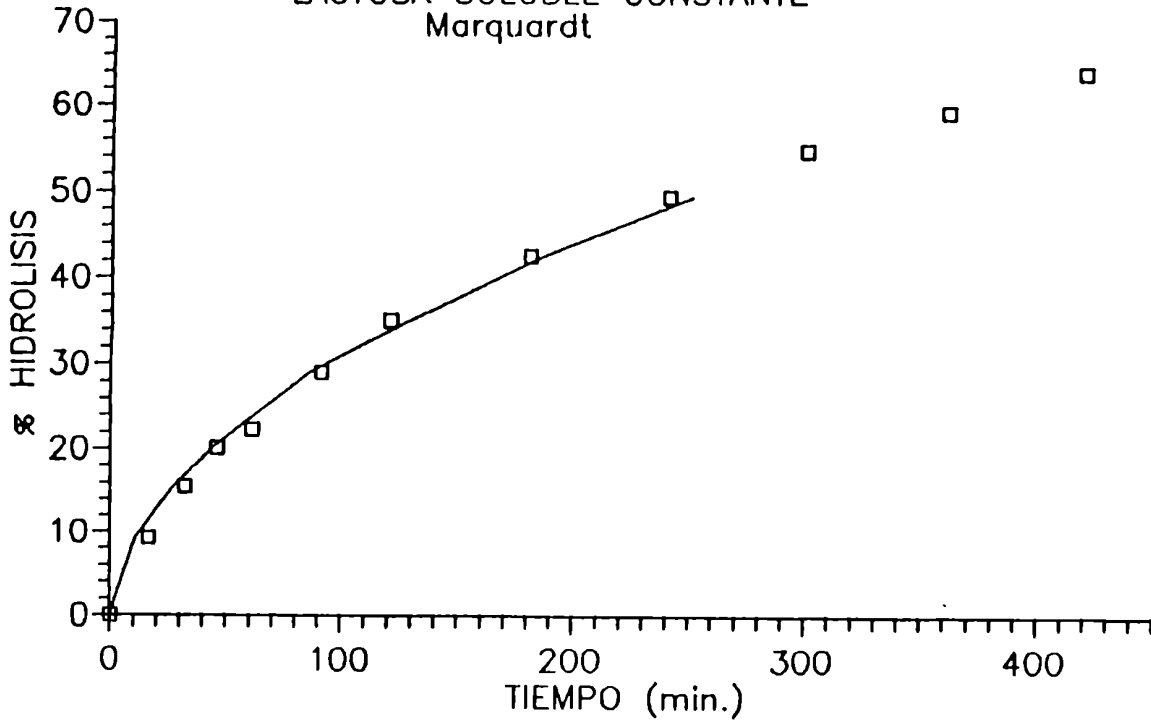
La ecuación que representa la cinética tipo Michaelis y Menten con inhibición competitiva por la galactosa y concentración de sustrato igual a la concentración total de lactosa (ecuación 4.7b ), escrita en función de los parámetros  $\mathcal{P}'_1$  y  $\mathcal{P}'_2$ , es:

**Figura 4.14:**

Predicción de la curva de hidrólisis de lactosa en suero de queso concentrado, mediante el modelo que considera concentración de lactosa soluble constante, inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por glucosa, obtenida a  $T = 37^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH} = 6,0$ . Los parámetros de la ecuación se calcularon por: a) método de Marquardt y b) regresión lineal. □ datos experimentales; — predicción teórica.

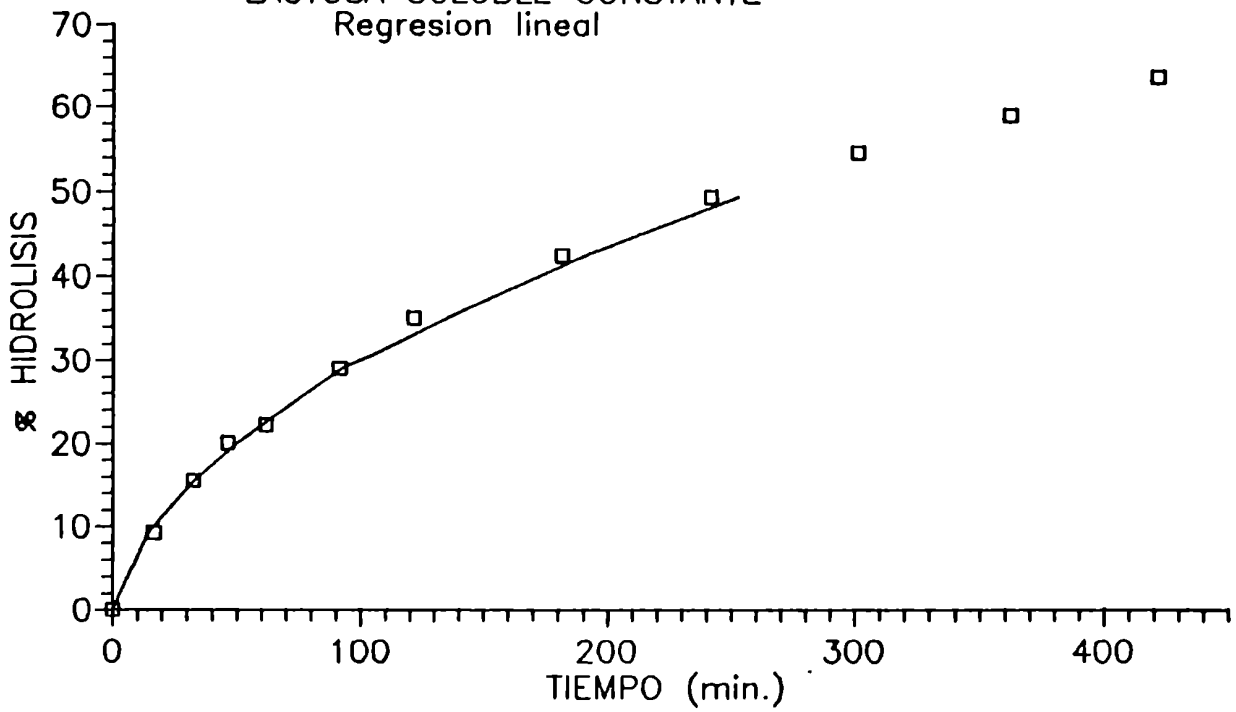
a)

T = 37 °C    pH = 6,0  
 LACTOSA SOLUBLE CONSTANTE  
 Marquardt



b)

T = 37 °C    pH = 6,0  
 LACTOSA SOLUBLE CONSTANTE  
 Regresion lineal



$$t = \mathcal{P}'1 ( [S_{0T}] - [S_T] ) + \mathcal{P}'2 \ln \frac{[S_{0T}]}{[S_T]} \quad (4.28)$$

donde  $[S_{0T}]$  y  $[S_T]$  representan la concentración de lactosa total, inicial y al tiempo  $t$ , respectivamente. La ecuación 4.29 es la expresión linealizada para este modelo, puesta en función de  $\mathcal{P}'1$  y  $\mathcal{P}'2$ :

$$\frac{t}{( [S_{0T}] - [S_T] )} = \mathcal{P}'1 + \frac{\mathcal{P}'2}{( [S_{0T}] - [S_T] )} \ln \frac{[S_{0T}]}{[S_T]} \quad (4.29)$$

Los parámetros  $\mathcal{P}'1$  y  $\mathcal{P}'2$  se calcularon por regresión no lineal según el método de Marquardt y por regresión lineal. No se analizan las curvas a partir de los tiempos de reacción a los cuales es evidente la inactivación de la enzima, es decir, a partir de los cuales el grado de avance permanece sin variación (caso de las curvas a pH 6,5 y 37°C. En las Tablas 4.9 y 4.10 se presentan los valores de  $\mathcal{P}'1$  y  $\mathcal{P}'2$  obtenidos y en las Figuras 4.15, 4.16 la representación del modelo y los puntos experimentales cuando se analiza la influencia de la temperatura y el pH por el método de Marquardt y por regresión lineal. Cabe aclarar que la partida de suero de queso concentrado utilizada para analizar la influencia de la temperatura es diferente de la utilizada para analizar la influencia del pH, por lo tanto los resultados obtenidos a 37°C y pH 6,0 difieren levemente para ambos casos. Para el análisis de la influencia del pH no se consideraron los tres últimos puntos de la curva obtenida a pH 6,5 pues hubo inactivación de la enzima. En todos los casos se obtiene buena concordancia entre el modelo teórico y los datos experimentales.

TABLA 4.9

Parámetros para la ecuación que describe la hidrólisis de lactosa considerando inhibición competitiva por la galactosa y concentración de sustrato igual a la concentración de lactosa total. Influencia de la temperatura (pH = 6,0).

T (°C)	MARQUARDT		R. LINEAL	
	$\mathcal{P}'1$	$\mathcal{P}'2$	$\mathcal{P}'1$	$\mathcal{P}'2$
25°C	-1,11±0,28	1346±212	-0,89±0,10	1182±174
37°C	-0,68±0,07	874±52	-0,77±0,03	952±55
43°C	-0,51±0,08	608±50	-0,62±0,07	688±103
47°C	-0,50±0,04	573±23	-0,45±0,04	541±56

TABLA 4.10

Parámetros de la ecuación que describe las curvas de hidrólisis de lactosa considerando inhibición competitiva de la galactosa y concentración de sustrato igual a la concentración de lactosa total. Influencia de pH (T = 37°C).

pH	MARQUARDT		R. LINEAL	
	$\mathcal{P}'1$	$\mathcal{P}'2$	$\mathcal{P}'1$	$\mathcal{P}'2$
6,0	-0,58±0,06	874±54	-0,82±0,04	994±60
6,5	-0,87±0,40	1051±202	-1,51±0,22	1488±252

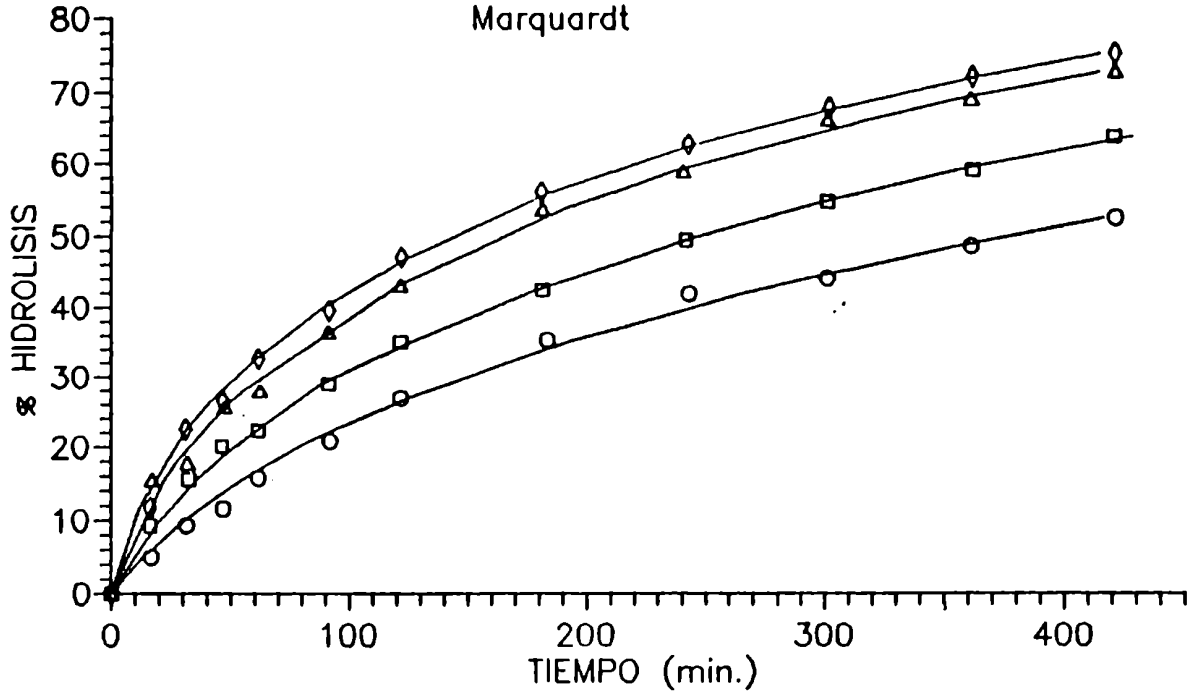
**Figura 4.15:**

Predicción de la curva de hidrólisis de lactosa en suero de queso concentrado por medio de un modelo tipo Michaelis y Menten con inhibición competitiva por galactosa considerando que la variación de la concentración de sustrato es igual a la variación de la concentración de lactosa total. Influencia de la temperatura (pH = 6,0). Los parámetros de la ecuación se calcularon por: a) método de Marquardt y b) regresión lineal. o T=25°C; □ T=37°C; Δ T=43°C; ◇ T=47°C;  
—— predicción teórica.



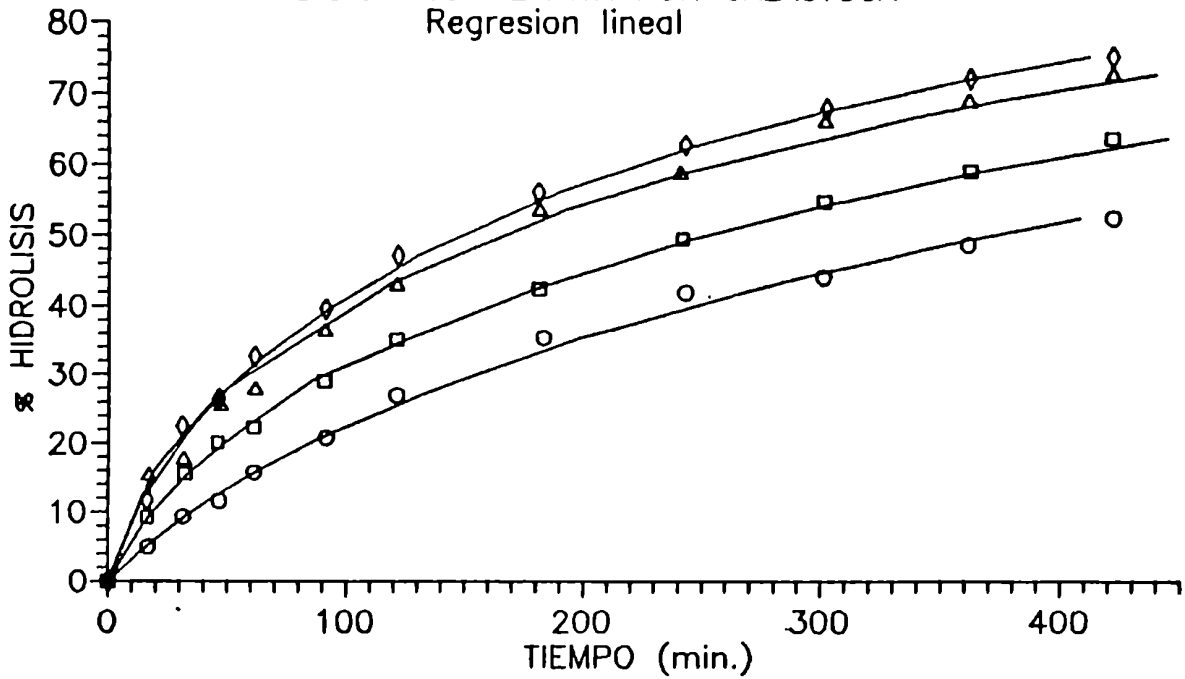
a)

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA  
INHIBICION COMPETITIVA POR GALACTOSA  
Marquardt



b)

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA  
INHIBICION COMPETITIVA POR GALACTOSA  
Regresion lineal

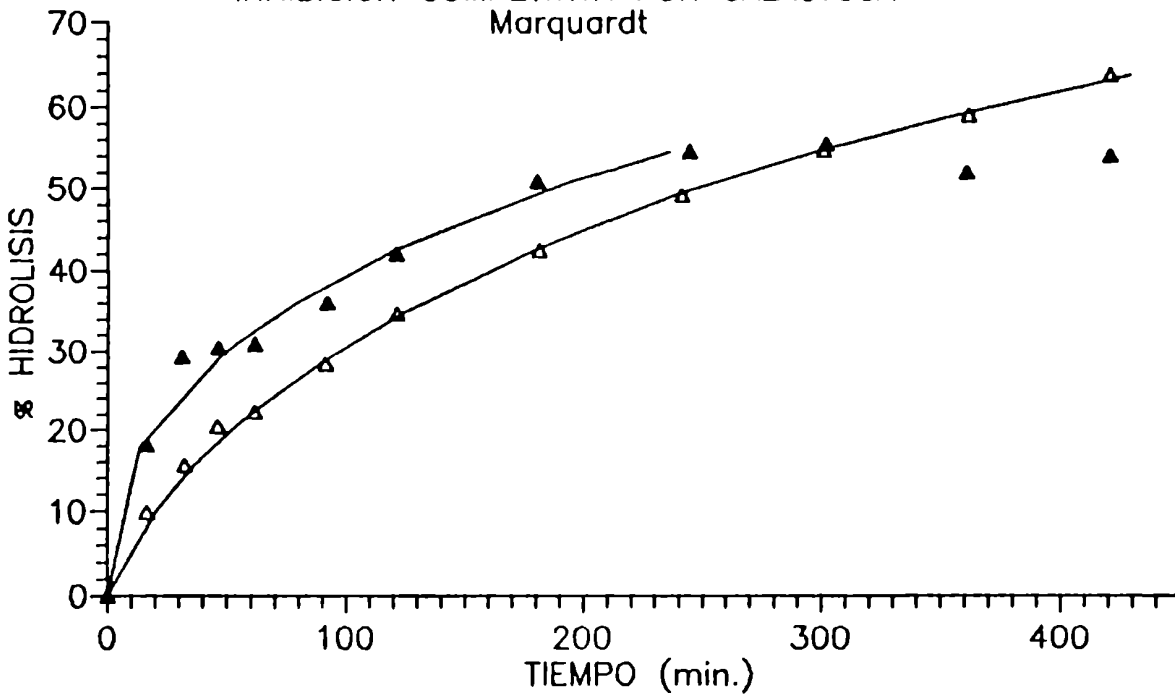


**Figura 4.18:**

Predicción de la curva de hidrólisis de lactosa en suero de queso concentrado por medio de un modelo tipo Michaelis y Menten con inhibición competitiva por galactosa considerando que la variación de la concentración de sustrato es igual a la variación de la concentración de lactosa total. Influencia del pH ( $T=37^{\circ}\text{C}$ ). Los parámetros de la ecuación se calcularon por: a) método de Marquardt y b) regresión lineal.  $\Delta$  pH=6,0;  $\blacktriangle$  pH=6,5; — predicción teórica

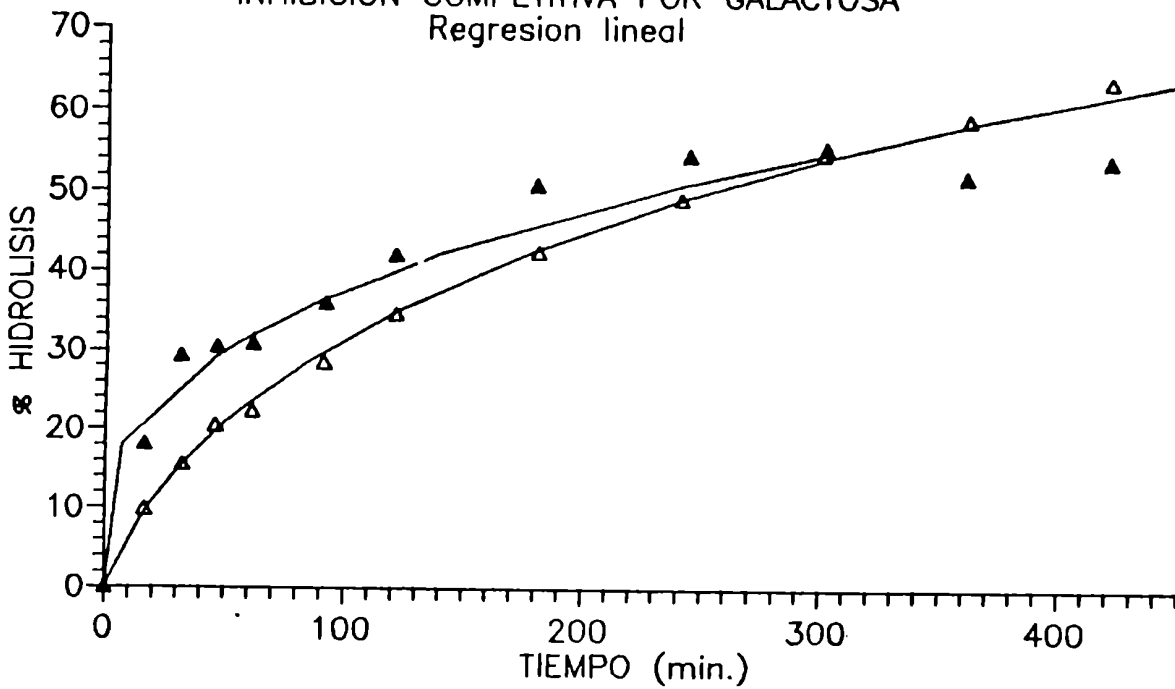
a)

INFLUENCIA DEL PH  
INHIBICION COMPETITIVA POR GALACTOSA  
Marquardt



b)

INFLUENCIA DEL PH  
INHIBICION COMPETITIVA POR GALACTOSA  
Regresion lineal



Se puede observar que los parámetros dependen del método utilizado para su cálculo, lo cual es razonable. Es importante notar que todos ellos siguen la misma tendencia con la temperatura, independientemente del método de cálculo utilizado, y pese a las discrepancias que presentan los valores entre sí todos están dentro del mismo orden; el valor absoluto de  $\mathcal{P}'1$  y el valor de  $\mathcal{P}'2$  disminuyen con la temperatura. Se realizó una recopilación de datos de bibliografía (Tabla 4.11) a fin de verificar si las tendencias entre dichos datos y los obtenidos en este trabajo eran las mismas. En esta tabla se encuentran valores de  $K_m$  y  $K_{i1}$  obtenidos por diferentes autores. Salvo un autor, todos trabajaron con soluciones de agua-lactosa y enzimas ó preparados enzimáticos de diversos orígenes. Todos los resultados de esta tabla coinciden en que  $K_{i1}$  es menor que  $K_m$ , lo que da cuenta de la fuerte inhibición que ejerce la galactosa sobre la lactasa. Si  $K_{i1}$  es menor que  $K_m$  el parámetro  $\mathcal{P}'1$

$$\mathcal{P}'1 = \frac{1}{V} \left[ 1 - \frac{K_m}{K_{i1}} \right] \quad [\mathcal{P}'1] \quad \text{min/ mM}$$

es menor que cero y  $\mathcal{P}'2$

$$\mathcal{P}'2 = \frac{K_m}{V} \left[ 1 + \frac{[So]}{K_{i1}} \right] \quad [\mathcal{P}'2] \quad \text{min}$$

es positivo, siendo estos los signos de los parámetros encontrados para la hidrólisis de lactosa en suero de queso concentrado en este trabajo.

La influencia de la temperatura en los parámetros  $\mathcal{P}'1$  y  $\mathcal{P}'2$  coincide con lo reportado por Ma y col. (1983).

Tabla 4.11

Valores de bibliografía de Km y Ki determinados en diferentes sistemas.

Km (mM)	Ki (mM)	CONDICIONES	REFERENCIA
63,7	8,6	Leche, [lactosa]= 20-115 mM T = 35°C. Lactasa de <i>Saccharomyces lactis</i> .	Hourigan (1977)
62,5	77	Soluciones buffer-lactosa, [lactosa]= 5 % p/p. T = 37°C, pH = 7,0. Células de <i>Kluyveromyces fragilis</i> .	Cheng y col. (1985)
30°C: 53,6 40°C: 51,9 50°C: 53,3	3,2 5,3 9,5	Soluciones agua-lactosa, [lactosa]= 5-10 % p/p T = 30, 40 y 50 °C, pH = 4,5. Lactasa de <i>Aspergillus niger</i> .	Ma y col. (1983)
112	9,5	Soluciones agua-lactosa, [lactosa]= 10-100 mM. T = 50°C, pH = 6,5. Lactasa de <i>Aspergillus oryzae</i> .	Friend y Shahani (1982)
41,1	1,4	Soluciones de agua-lactosa, [lactosa]= 5 % p/p T = 50°C, pH = 6,0 Lactasa de <i>Aspergillus oryzae</i> .	van Griethuysen y col. (1988)

(continuación de la Tabla 4.11)

112

0,7

Soluciones de buffer-lactosa Weetal y  
[lactosa]= 5 % p/p. col. (1974)  
T = 37°C

Trabajando a tres temperaturas estos autores, obtuvieron los valores de las constantes cinéticas. Con estos valores se calcularon los parámetros  $\mathcal{P}'1$  y  $\mathcal{P}'2$ , siendo éstos:

TEMPERATURA	$\mathcal{P}'1$	$\mathcal{P}'2$
30 °C	-8,15	894,98
40 °C	-3,47	409,91
50 °C	-1,54	205,73

Pese a que trabajaron con lactasa de *Aspergillus niger* y soluciones de agua-lactosa, los valores de  $\mathcal{P}'2$  son comparables a los obtenidos en este trabajo con suero de queso concentrado (para el modelo con inhibición competitiva de galactosa y los parámetros calculados por el método de Marquardt) y también disminuyen con la temperatura. En cuanto a  $\mathcal{P}'1$ , el signo es el mismo y su valor absoluto también disminuye con la temperatura. En la Figura 4.17 se comparan la variación con la temperatura de los parámetros  $\mathcal{P}'2$  obtenidos para este trabajo y los calculados a partir de los datos del trabajo de Ma. y col. (1983). Como puede observarse ambos tienen la misma tendencia, corroborándose los resultados obtenidos en suero de queso concentrado.

#### 4.4.9.4.3. Modelo cinético con inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por glucosa y concentración de sustrato igual a la concentración de lactosa total

La ecuación que representa esta cinética (ecuación

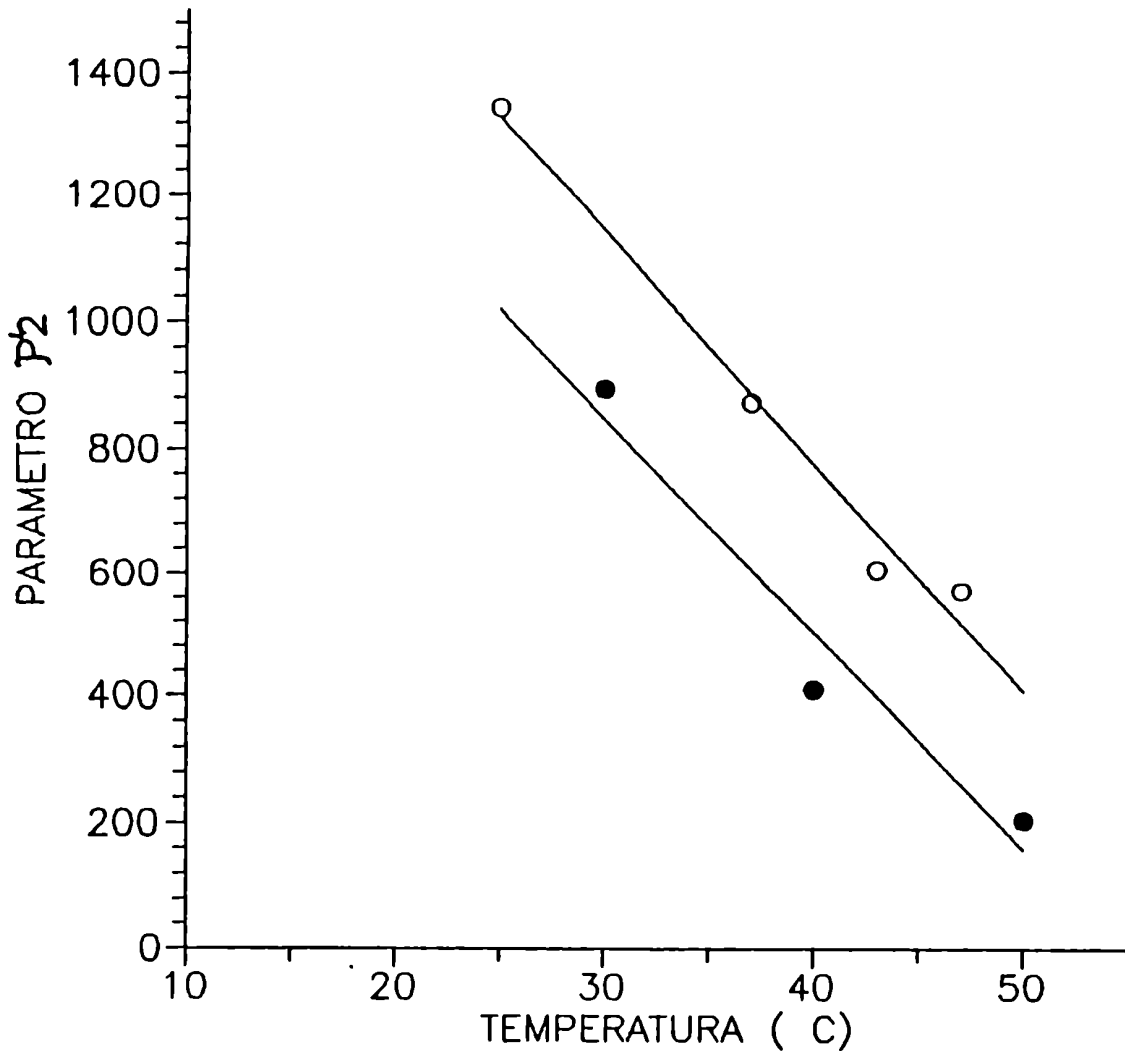


Figura 4.17:

Comparación de las tendencias de los parámetros  $P'2$  obtenidos en este trabajo a diferentes temperaturas, utilizando el modelo tipo Michaelis y Menten con inhibición competitiva por galactosa (parámetros calculados por el método de Marquardt), con los calculados a partir de los datos obtenidos por Ma y col. (1983) (Tabla 4.13). o este trabajo; ● Ma y col. (1983).



4.19) escrita en función de los parámetros  $\mathcal{P}'1$ ,  $\mathcal{P}'2$  y  $\mathcal{P}'3$  es:

$$t = \mathcal{P}'1 ( [So] - [S] ) + \mathcal{P}'2 \ln \frac{[So]}{[S]} - \mathcal{P}'3 ( [So]^2 - [S]^2 ) \quad (4.30)$$

Los tres parámetros fueron ajustados utilizando la rutina para regresión no lineal BMDP AR. Los valores encontrados para los parámetros se encuentran en las Tablas 4.12 y 4.13 y el ajuste del modelo a los datos experimentales en las Figuras 4.18 y 4.19, para analizar la influencia de la temperatura y del pH respectivamente. Se puede observar que para todos los casos el ajuste del modelo a los datos experimentales es bueno.

Comparando los valores de las Tablas 4.12 y 4.13 con los de las tablas 4.9 y 4.10, para la ecuación con dos parámetros, se ve que los valores absolutos de  $\mathcal{P}'1$  y  $\mathcal{P}'2$  son muy semejantes a  $\mathcal{P}1$  y  $\mathcal{P}2$ .  $\mathcal{P}'3$  es muy pequeño o cero, por lo que el último término de la ecuación tiene poco peso.

#### 4.4.9.4.4. Comparación de los ajustes obtenidos por cada modelo

La comparación de los ajustes obtenidos con cada modelo se realizó por medio del error standard de la estimación (S.E) definido como:

$$S. E. = \frac{\sum ( y_i - Y_i )^2}{N_x - N_p} \quad (4.31)$$

donde  $y_i$  : datos experimentales

TABLA 4.12

Parámetros de la ecuación que describe la cinética de hidrólisis de lactosa considerando inhibición competitiva y no competitiva y concentración de sustrato igual a la concentración de lactosa total. Influencia de la temperatura (pH = 6,0).

TEMPERATURA	$\mathcal{P}' '1$	$\mathcal{P}' '2$	$\mathcal{P}' '3$
25°C	-1,11 $\bar{+}$ 0,09	1349 $\bar{+}$ 71	8 $\cdot 10^{-20}$ (*)
37°C	-0,13 $\bar{+}$ 0,02	600 $\bar{+}$ 63	2 $\cdot 10^{-4} \bar{+} 10^{-5}$
43°C	-0,53 $\bar{+}$ 0,03	622 $\bar{+}$ 20	2 $\cdot 10^{-19}$ (*)
47°C	-0,50 $\bar{+}$ 0,01	573 $\bar{+}$ 7	2 $\cdot 10^{-19}$ (*)

TABLA 4.13

Parámetros de la ecuación que describe la cinética de hidrólisis de lactosa considerando inhibición competitiva y no competitiva y concentración de sustrato igual a la concentración de lactosa total. Influencia del pH (T = 37°C).

pH	$\mathcal{P}' '1$	$\mathcal{P}' '2$	$\mathcal{P}' '3$
6,0	0,62 $\bar{+}$ 0,04	845 $\bar{+}$ 24	4 $\cdot 10^{-6} \bar{+} 2,3 \cdot 10^{-6}$
6,5	1,01 $\bar{+}$ 0,08	1051 $\bar{+}$ 67	2 $\cdot 10^{-32}$ (*)

(\*) El programa considera que este parámetro es cero, por lo tanto no calcula su desviación standard.

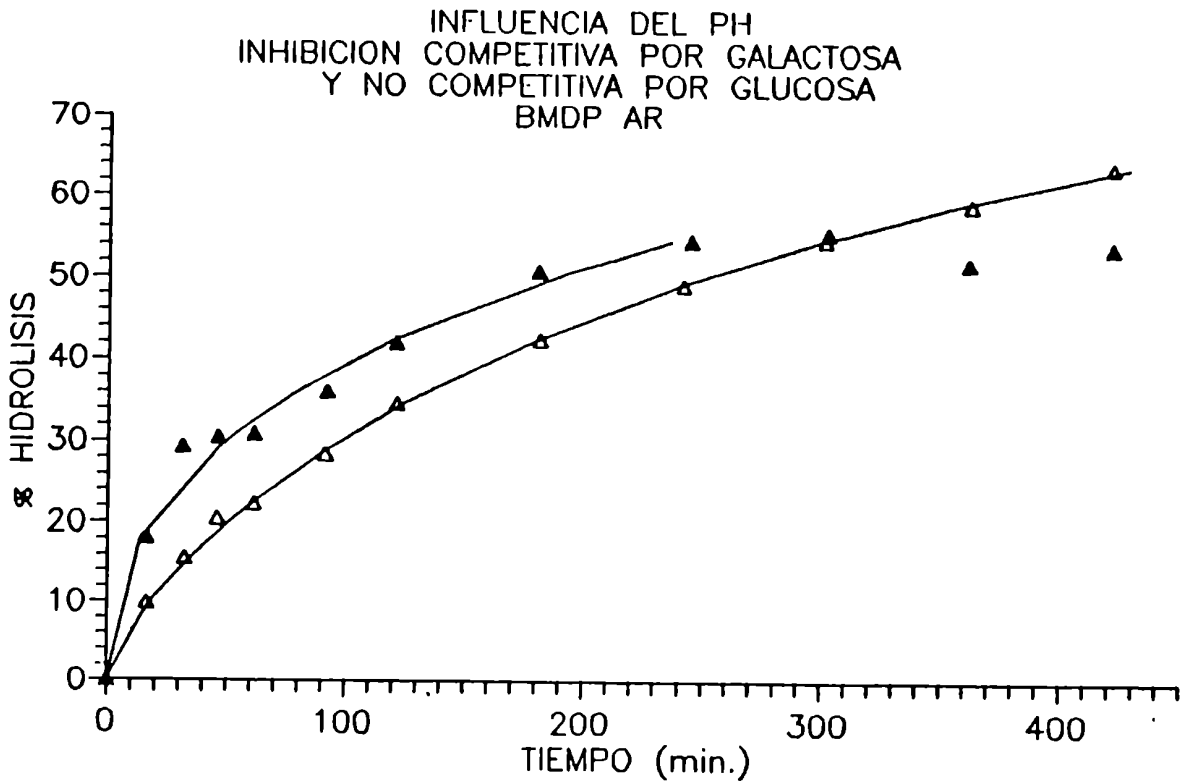


Figura 4.19:

Predicción de la curva de hidrólisis de lactosa en suero de queso concentrado por medio de un modelo tipo Michaelis y Menten con inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por glucosa considerando que la variación de la concentración de sustrato es igual a la variación de la concentración de lactosa total. Influencia del pH ( $T=37^{\circ}\text{C}$ ).

$\Delta$  pH = 6,0;  $\blacktriangle$  pH = 6,5; — predicción teórica.

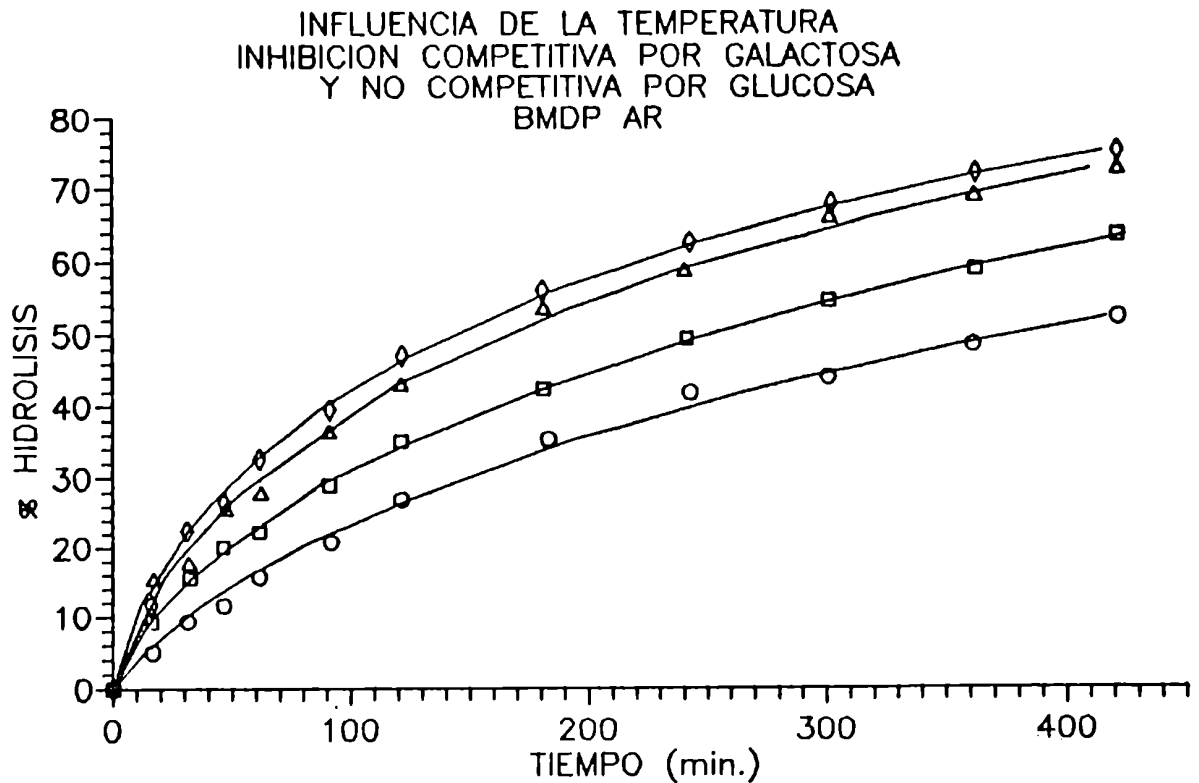


Figura 4.18:

Predicción de la curva de hidrólisis de lactosa en suero de queso concentrado por medio de un modelo tipo Michaelis y Menten con inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por glucosa considerando que la variación de la concentración de sustrato es igual a la variación de la concentración de lactosa total. Influencia de la temperatura (pH=6,0). o T = 25°C; □ T = 37°C; Δ T = 43°C; ◇ T = 47°C; — predicción teórica.

$Y_i$     valor dado por el modelo  
 $N_x$  : número de datos  
 $N_p$  : número de parámetros

En la tabla 4.14 se detallan los valores de S.E. encontrados para todos los modelos utilizados.

Para el modelo que contempla que la concentración de lactosa se mantiene constante a lo largo de cierto período de la reacción el ajuste para la curva obtenida es levemente mejor por el método de Marquardt que por el de regresión lineal. Sin embargo de las representaciones gráficas se puede ver que los dos modelos son potencialmente útiles para describir la hidrólisis.

Para el modelo con inhibición competitiva por la galactosa se puede ver que con el método de Marquardt se obtiene un menor valor de S.E.

Los valores de S.E. obtenidos para el modelo con tres parámetros son muy similares a los obtenidos para el método de Marquardt con dos parámetros.

Con respecto a la experiencia a  $\text{pH}=6,5$  los datos experimentales presentan mayor dispersión que los obtenidos en iguales condiciones a  $\text{pH } 6,0$ , lo cual se ve reflejado en los mayores valores de S.E. encontrados.

De los resultados presentados en la Tabla 4.14 y en las Figuras 4.14, 4.15, 4.16, 4.18 y 4.19 se puede concluir que cualquier modelo es adecuado para representar los datos experimentales de hidrólisis enzimática de lactosa en suero de queso concentrado. Sin embargo para poder representar

TABLA 4.14

Errores standard de la estimación (S.E.) para los diversos modelos utilizados para representar las curvas de hidrólisis. Influencia de la temperatura y del pH<sup>(1)</sup>.

MODELO CON CONCENTRACION DE LACTOSA SOLUBLE CONSTANTE <sup>(2)</sup>		
	MARQUARDT	R. LINEAL
<b>TEMPERATURA</b>		
37 °C (pH=6,0)	45,4	60,6
<b>MODELO CON INHIBICION COMPETITIVA POR GALACTOSA Y            CONCENTRACION DE SUSTRATO IGUAL A LA CONCENTRACION            DE LACTOSA TOTAL.</b>		
	MARQUARDT	R. LINEAL
<b>TEMPERATURA</b>		
25 °C (pH=6,0)	99,8	129,1
37 °C (pH=6,0)	18,9	50,9
43 °C (pH=6,0)	54,2	245,4
47 °C (pH=6,0)	15,2	30,1
<b>pH</b>		
6,0 (T=37 °C)	23,1	108,1
6,5 (T=37 °C)	77,6	739,3

(continuación de la Tabla 4.14)

MODELO CON INHIBICION POR GALACTOSA Y GLUCOSA Y CONCENTRACION DE SUSTRATO IGUAL A LA CONCENTRACION DE LACTOSA TOTAL	
BMDP AR	
TEMPERATURA	
25 °C (pH=6,0)	99,7
37 °C (pH=6,0)	11,8
43 °C (pH=6,0)	74,2
47 °C (pH=6,0)	15,2
pH	
6,0 (T=37°C)	19,8
6,5 (T=37°C)	77,5

(1) Para los resultados obtenidos a pH 6,5 no se consideran los tres últimos puntos.

(2) Los valores de S.E. se calculan considerando los datos obtenidos hasta un 55% de hidrólisis.

toda la reacción por una misma ecuación se prefieren los dos modelos que contemplan la variación de la concentración de lactosa total. Otro hecho a tener en cuenta para elegir el modelo a utilizar es la sencillez matemática de los mismos. De todos los casos considerados, los modelos linealizables permiten determinar muy fácilmente los parámetros de las ecuaciones. El ajuste obtenido por medio de estas ecuaciones es lo suficientemente bueno como para que puedan ser utilizadas para describir los datos experimentales si no es posible determinar los parámetros por medio de un método de regresión no lineal.



#### 4.4.10. Predicción de la actividad de agua del suero de queso concentrado durante la hidrólisis de la lactosa

La hidrólisis de lactosa del suero de queso concentrado produce un descenso de la actividad de agua a medida que avanza la reacción. Este descenso se produce, en parte, porque la lactosa parcialmente cristalizada presente en el suero de queso concentrado se hidroliza a galactosa y glucosa, aumentando de esta forma la molalidad de los azúcares en el suero. Este aumento no sólo es debido a la aparición de nuevas especies químicas en el medio sino también a la mayor solubilidad en agua de la galactosa y la glucosa comparada con la de la lactosa (Nijpels, 1976b; Shah y Nickerson, 1978). También contribuye al descenso de la  $a_w$  la mayor capacidad de reducción de la  $a_w$  que poseen la galactosa y glucosa respecto de la lactosa. Por lo tanto, a medida que avanza la hidrólisis del suero de queso concentrado, desciende la  $a_w$  llegando hasta un valor final de aproximadamente 0,90 (valor correspondiente a un 65 % de hidrólisis).

Se estudió la variación de la  $a_w$  del suero de queso concentrado durante el avance de la reacción de hidrólisis de la lactosa. Asimismo se intentó predecir, en forma aproximada, la  $a_w$  del suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado a partir de su composición.

##### 4.4.10.1. Descenso de la actividad de agua durante la hidrólisis

Siguiendo la metodología detallada en las secciones 4.3.2.4. y 4.3.2.5., se determinaron la  $a_w$  y la concentración de lactosa del suero de queso con diferentes grados de avance de la reacción de hidrólisis. En la Figura 4.20 se encuentran los resultados obtenidos. En la parte a) de la figura se representa la variación de la  $a_w$  y de la concentración de lactosa en función del tiempo y en la parte b) la variación de la  $a_w$  en función del porcentaje de hidrólisis. Como puede observarse existe una relación lineal entre la  $a_w$  y el porcentaje de hidrólisis dada por la siguiente ecuación:

$$a_w = 0,942 - 6,70 \cdot 10^{-4} \times \% \text{ hidrólisis} \quad r_o^2 = 0,993$$

(4.31)

Esta relación lineal facilitaría el control del porcentaje de hidrólisis en forma rápida a través de la determinación de la  $a_w$  del suero de queso concentrado.

#### 4.4.10.2. Predicción de la actividad de agua del suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado a partir de la composición del mismo

##### 4.4.10.2.1. Determinación de la capacidad de reducción de la actividad de agua de la galactosa

Para poder predecir la  $a_w$  del suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado, es necesario conocer la capacidad de reducción de la  $a_w$  de sus constituyentes, entre ellos los diferentes azúcares involucrados. Dado que para la galactosa no se encuentran datos en bibliografía, se

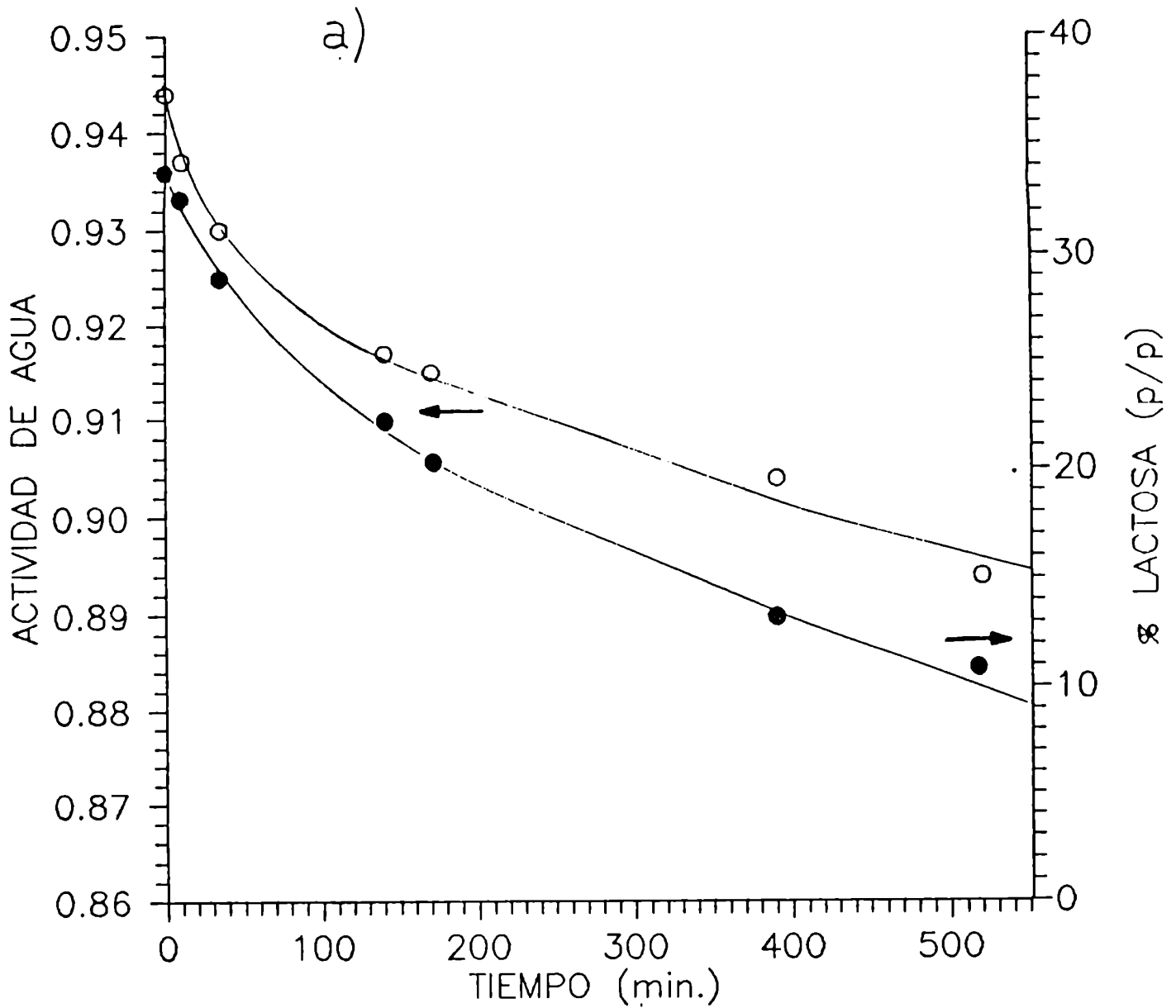


Figura 4.20:

a) Actividad de agua del suero de queso en función del tiempo de hidrólisis (○) y variación de la concentración de lactosa (% p/p) en función del tiempo de hidrólisis (●).

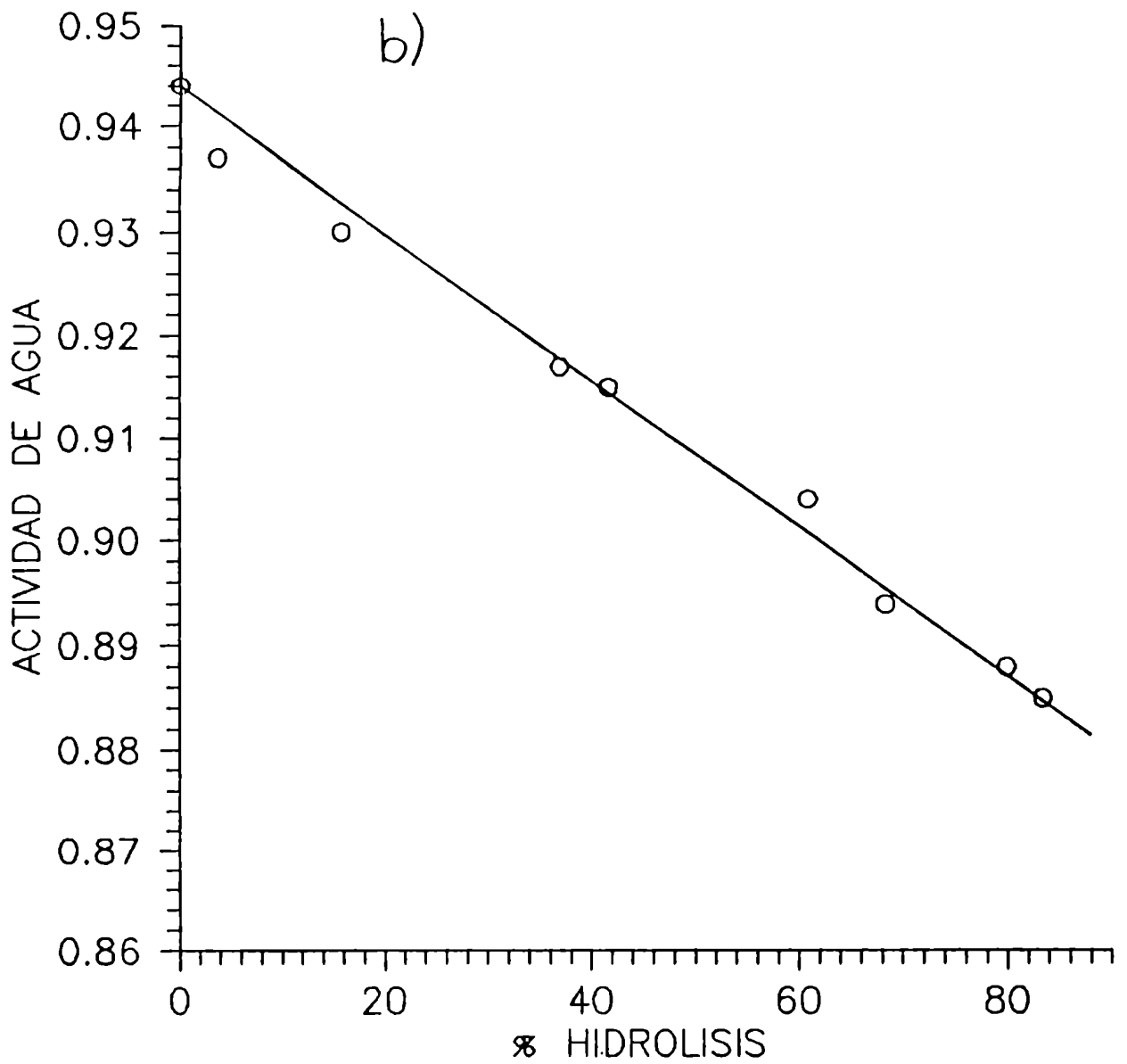


Figura 4.20:

b) Actividad de agua del suero de queso en función del porcentaje de hidrólisis.

determinó experimentalmente la  $a_w$  de soluciones acuosas de galactosa y también, con fines comparativos, la  $a_w$  de soluciones de manosa.

En la Figura 4.21 se muestran los datos experimentales de  $a_w$  en función de la concentración (% p/p) de las soluciones de galactosa. Se observa que su comportamiento es similar al que presentan la mayoría de los no-electrolitos, incluyendo otros azúcares, mostrando desviaciones negativas de la ley de Raoult (Chirife y col., 1980; Chirife y col., 1982; Miracco y col., 1981).

Los datos experimentales obtenidos fueron correlacionados por la ecuación de Norrish (1966):

$$a_w = x_1 \exp ( - K x_2 ) \quad (4.32)$$

donde  $x_1$  es la fracción molar del agua,  $x_2$  la del soluto (en este caso galactosa) y  $K$  la constante de Norrish. La constante  $K$  fue calculada por medio de un programa de regresión no lineal, resultando su valor  $2,24 \pm 0,07$  (para un nivel de confianza del 95 %). En la Figura 4.21 se encuentra representada la curva predicha por la ecuación 4.32, observándose la bondad del ajuste.

Este valor de  $K$  es prácticamente el mismo que el encontrado por Chirife y col. (1982) para glucosa y fructosa, i. e.,  $2,15 \pm 0,05$  y  $2,11 \pm 0,11$  respectivamente (para un nivel de confianza del 95 %). Una característica en común que poseen estos azúcares es que son todos hexosas (glucosa y galactosa son aldosas y fructosa es una cetosa). Para verificar si otro azúcar de 6 átomos de carbono poseía

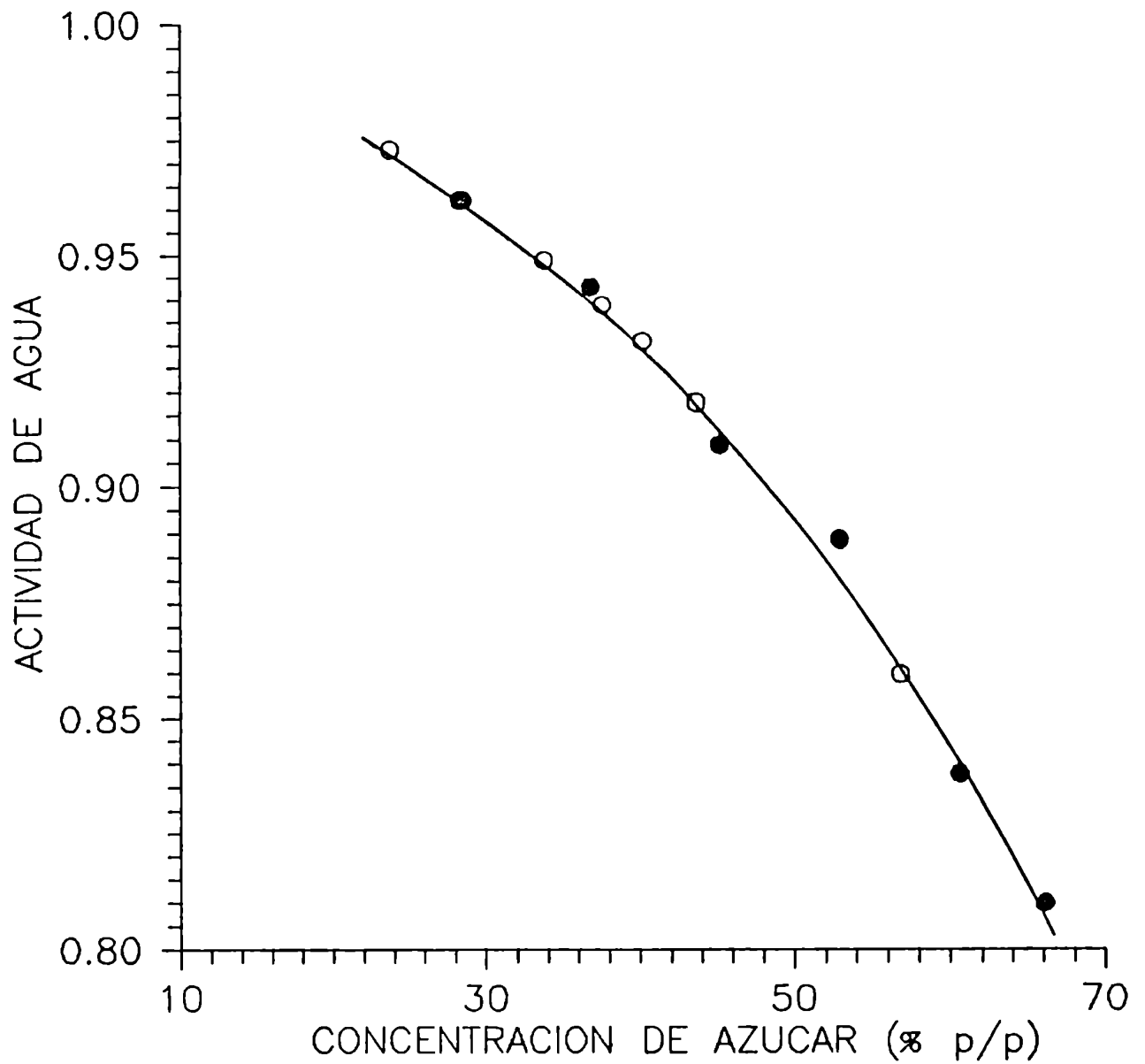


Figura 4.21:

Determinación de la constante de Norrish para la galactosa y la manosa. Variación de la actividad de agua en función de la concentración del azúcar:  $\circ$  galactosa,  $\bullet$  manosa, (—) ecuación de Norrish ( $k = 2,24$ ).

también un valor de K similar se midió la  $a_w$  de soluciones de manosa. Los datos experimentales se encuentran también en la Figura 4.21 y fueron ajustados por la ecuación de Norrish (ecuación 4.32), siendo el valor de la constante  $2,28 \pm 0,22$  (para un nivel de confianza del 95 %).

Estos resultados llevan a la conclusión de que glucosa, fructosa, galactosa y manosa tienen el mismo comportamiento respecto a su capacidad de disminuir la  $a_w$ . Se puede explicar este hecho considerando que:

- Los cuatro azúcares poseen igual número de grupos hidroxilo en la molécula y el otro grupo funcional presente (aldehído para glucosa, galactosa y manosa y cetona para fructosa) es semejante para todos ellos.
- Los cuatro azúcares presentan, preferentemente, una conformación tipo silla cuando están en solución (Morrison y Boyd, 1976).
- Salvo la fructosa, los otros tres azúcares son epímeros entre sí, difiriendo tan sólo en la posición de un grupo hidroxilo.

En consecuencia los factores que pueden modificar la estructura del agua (i. e. número y tipo de grupo funcional, estereoquímica de los azúcares considerados, impedimentos estéricos y efectos de grupos vecinos (Di Paolo y Belleau, 1977)) son similares para glucosa, fructosa, galactosa y manosa.

#### 4.4.10.2.2. Cálculo de la actividad de agua del suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado

De acuerdo a lo visto en la introducción, para predecir la  $a_w$  de un sistema de multicomponentes se puede utilizar la ecuación de Ross (1975) (ecuación 2.16).

El suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado está compuesto por lactosa, galactosa, glucosa, proteínas, sales y agua. Cada uno de estos componentes contribuye al descenso de la  $a_w$  del suero; por lo tanto, su  $a_w$  se puede expresar como:

$$a_w = (a_w^{\circ})_{\text{lactosa}} (a_w^{\circ})_{\text{galactosa}} (a_w^{\circ})_{\text{glucosa}} (a_w^{\circ})_{\text{proteínas}} (a_w^{\circ})_{\text{sales}} \quad (4.33)$$

Se analiza a continuación la contribución de cada componente al descenso de la  $a_w$ :

■ **Proteínas:** La Tabla 4.15 muestra la composición y los pesos moleculares de las proteínas del suero (Bernal y Jelen, 1985). Dado el alto peso molecular de las mismas, su aporte al descenso de la  $a_w$  es despreciable. Efectivamente, 100 g de suero de queso concentrado con 50 % p/p de sólidos contienen 50 g de agua. A su vez, basándose en la composición media del suero de queso diluido (7 % p/p de sólidos, Tabla 4.2), el contenido de proteínas del suero de queso concentrado es de 6,43 % p/p. Tomando como peso molecular de las proteínas del suero un promedio pesado entre los pesos moleculares medios de la  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbúmina, albúmina, inmunoglobulinas y fracción



TABLA 4.15

Proteínas del suero: composición y pesos moleculares.

PROTEINA	% P/P	PESO MOLECULAR (g/mol)
$\beta$ -lactoglobulina	50	36.000
$\alpha$ -lactalbúmina	12	14.400
Albúmina	5	66.000
Inmunoglobulinas	10	160.000-1.000.000
Fracción proteosa-peptona	22	4000-22000

proteosa-peptona se obtiene:

$$\overline{PM} = (0,5 \times 36.000 + 0,12 \times 14.400 + 0,05 \times 66.000 + 0,10 \times 580.000 + 0,22 \times 13.000) \text{ g/mol}$$

$$\overline{PM} = 83.888 \text{ g/mol}$$

Suponiendo que las proteínas presentes sean totalmente solubles en agua, utilizando la ecuación de Raoult, se puede calcular la  $a_w$  de una solución con 50 g de agua y 6,43 g de proteínas del suero

$$a_w = x_1 = \frac{50/18}{50/18 + 6,43/83.888} = 0,9999$$

En el caso que la concentración de proteína soluble sea menor a la utilizada para realizar este cálculo, la  $a_w$  del sistema sería aún mayor.

Por lo tanto, es correcto considerar que dado su alto peso molecular las proteínas del suero no contribuyen significativamente al descenso de la  $a_w$  del suero de queso concentrado. Los azúcares y las sales son las principales sustancias responsables de la disminución de la  $a_w$ .

■ **Azúcares:** Los valores de  $a_w$  para las diferentes concentraciones de los azúcares en agua se obtuvieron mediante la ecuación de Norrish (1966) (ecuación 4.32). El valor de K utilizado para la lactosa fue 10,2 (Miracco y col., 1981) y el de la glucosa 2,25 (Chirife y col., 1982). Como valor de K para la galactosa se empleó, de acuerdo a lo determinado en este trabajo, 2,24.

En cada muestra extraída a un dado tiempo, se midió

$a_w$  y se determinó contenido de lactosa. Conociendo la concentración inicial de lactosa en el suero de queso concentrado y suponiendo que toda la lactosa que se hidroliza se convierte en una mezcla equimolar de galactosa y glucosa, se puede conocer la composición de azúcares de cada muestra. En realidad, debido a que la galactosa vuelve a reaccionar para dar origen a oligosacáridos (reacción de trasgalactosidación (Jeon y Mantha, 1985; Mozzafar y col., 1985)), la concentración de la misma es siempre algo menor que la de glucosa. Sin embargo, a los fines de simplificar los cálculos, se considera que ambas concentraciones son iguales (Cheng y col., 1985).

Con respecto a la lactosa se debe considerar que el descenso de  $a_w$  que produce es debido a la lactosa soluble (sección 4.4.8).

■ Sales: dado que no fue posible realizar un análisis cuantitativo de todas las especies iónicas presentes en el suero de queso concentrado, se estimó la  $a_w$  de las mismas de la siguiente forma. Se centrifugó el suero de queso, precipitando todos los cristales de lactosa y quedando en el sobrenadante (38 % p/p de sólidos y 62 % p/p de agua) solamente lactosa en solución y otros componentes solubles. La concentración de lactosa en el sobrenadante se determinó experimentalmente, siendo su valor 20,2 g lactosa / 100 g agua. Con esta concentración de lactosa soluble, se calculó por medio de la ecuación de Norrish (ecuación 4.32) la  $a_w$  de esta solución de lactosa, siendo su valor 0,988. La  $a_w$  del suero de queso concentrado antes de la hidrólisis, basándose en la ecuación de Ross (ecuación 4.33), puede expresarse como:

$$(a_w)_{\text{suero de queso concentrado}} = (a_w)_{\text{lactosa}} \times (a_w)_{\text{sales}}$$

Conociendo la  $a_w$  inicial del suero de queso concentrado ( $a_w = 0,944$ , determinada en forma experimental) y la de la lactosa ( $a_w = 0,988$ , determinada en base a su concentración), puede establecerse que la  $a_w$  de las sales es de 0,955.

A fin de corroborar la factibilidad de este valor se estimó la contribución de las sales a la reducción de la  $a_w$  en base a una composición iónica para el suero de queso concentrado reportada en bibliografía (Buera y col., 1990). En la Tabla 4.16 se encuentra detallada la concentración de cada sal, el valor calculado de su  $a_w$  y la ecuación utilizada para el cálculo.

En base a las  $a_w$  individuales de cada solución y utilizando la ecuación de Ross (ecuación 2.16) puede calcularse que la  $a_w$  determinada por todas las sales presentes en el suero de queso concentrado es 0,941. Este valor es semejante al calculado anteriormente ( $a_w = 0,955$ ), lo cual avalaría el procedimiento seguido. La contribución a la reducción de la  $a_w$  dada por las sales permanece constante a lo largo de la hidrólisis.

A medida que transcurre la reacción de hidrólisis la  $a_w$  disminuye en forma constante. Suponiendo que la velocidad de disolución de los cristales de lactosa es lo suficientemente alta como para que la concentración de lactosa soluble se mantenga aproximadamente constante hasta la desaparición de los cristales (ver sección 4.4.8), la contribución al valor de la  $a_w$  dada por la lactosa será

TABLA 4.16

Composición iónica media del suero de queso concentrado (50 % p/p de sólidos) y descenso de  $a_w$  producido por cada uno de los solutos.

ESPECIE	% p/p	$a_w$ ESTIMADA	MODELO EMPLEADO
$\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,25	0,988	Pitzer (1973)
KCl	2,48	0,978	Pitzer (1973)
Acido cítrico. $\text{H}_2\text{O}$	0,80	0,998	Bromley (1973)
Citrato de sodio	0,80	0,999	Bromley (1973)
$\text{CaCl}_2$	1,00	0,991	Pitzer (1973)
$\text{MgCl}_2$	0,27	0,999	Pitzer (1973)
$\text{KHCO}_3$	0,18	0,999	Raoult
$\text{K}_2\text{SO}_4$	0,15	0,999	Raoult

constante e igual a 0.988 hasta que el porcentaje de hidrólisis sea mayor a 60 %, donde desaparecen los últimos cristales de lactosa. De esta forma se puede establecer, para cada porcentaje de hidrólisis, la  $a_w$  debida a cada especie soluble presente en el suero de queso concentrado. En la Tabla 4.17 se encuentran las concentraciones de lactosa, galactosa y glucosa, la  $a_w$  calculada de las mismas y la  $a_w$  determinada experimentalmente y la calculada del suero de queso concentrado. Esta última se predijo de acuerdo a la ecuación 4.33. Dado que el aporte al descenso de la  $a_w$  por la lactosa es pequeño, un posible error en cuanto al punto en que la misma deja de estar saturada introduce una muy pequeña desviación en los valores de  $a_w$  predichos.

Otra posible fuente de error es considerar que por la hidrólisis de lactosa se obtiene una mezcla equimolar de glucosa y galactosa. De acuerdo a la bibliografía (Asp y col., 1980; Burvall y col., 1979) la galactosa interviene en reacciones de transgalactosidación, por lo tanto la concentración de galactosa es menor que la de glucosa. Como el aporte al descenso de la  $a_w$  de los oligosacáridos es menor que el de la galactosa la  $a_w$  calculada, considerando la presencia de oligosacáridos, sería mayor que suponiendo que la mezcla de galactosa-glucosa es equimolar.

Se puede observar la excelente concordancia entre el valor medido y el valor calculado de la  $a_w$  del suero de queso concentrado durante el proceso de hidrólisis, pese a las fuentes de error comentadas. En la Figura 4.22 se observa que al graficar el valor calculado de la  $a_w$  versus el real se obtiene una recta de pendiente 1,10 y ordenada al origen - 0,09 y con un buen coeficiente de correlación (0,997).

TABLA 4.17

Concentración (% p/p) de lactosa, glucosa y galactosa del suero de queso concentrado,  $a_w$  correspondiente a cada una de las concentraciones de azúcar,  $a_w$  calculada y  $a_w$  medida experimentalmente para distintos porcentajes de hidrólisis del suero de queso concentrado.

%	% p/p	% p/p	$a_w$	$a_w$	$a_w$	$a_w$
HIDROLISIS	LACTOSA	GALACTOSA	LACTOSA	GALACTOSA	CALCULADA	MEDIDA
		GLUCOSA (a)	(b)	GLUCOSA	(c)	
0	34,9	0	0,988	1	0,944	0,944
3,7	33,0	1,0	0,988	0,999	0,941	0,937
4,7	33,4	0,8	0,988	0,998	0,940	0,940
15,7	29,4	2,9	0,988	0,994	0,932	0,930
15,8	29,4	2,9	0,988	0,994	0,932	0,931
36,9	22,0	6,8	0,988	0,985	0,916	0,917
41,6	20,4	7,6	0,988	0,983	0,912	0,915
60,8	13,7	11,2	0,988	0,975	0,898	0,904
68,3	11,1	12,5	0,986	0,972	0,891	0,894
79,9	7,0	14,7	0,991	0,967	0,887	0,890
83,3	5,8	15,3	0,993	0,966	0,885	0,888

(a) Se ha considerado que la concentración de galactosa es igual a la de glucosa.

(b) Los cristales desaparecen a partir de un 60 % de hidrólisis: hasta ese punto se considera que la concentración de lactosa soluble es constante. A partir de allí comienza a disminuir.

(c) La  $a_w$  debida a las sales, constante a lo largo de la





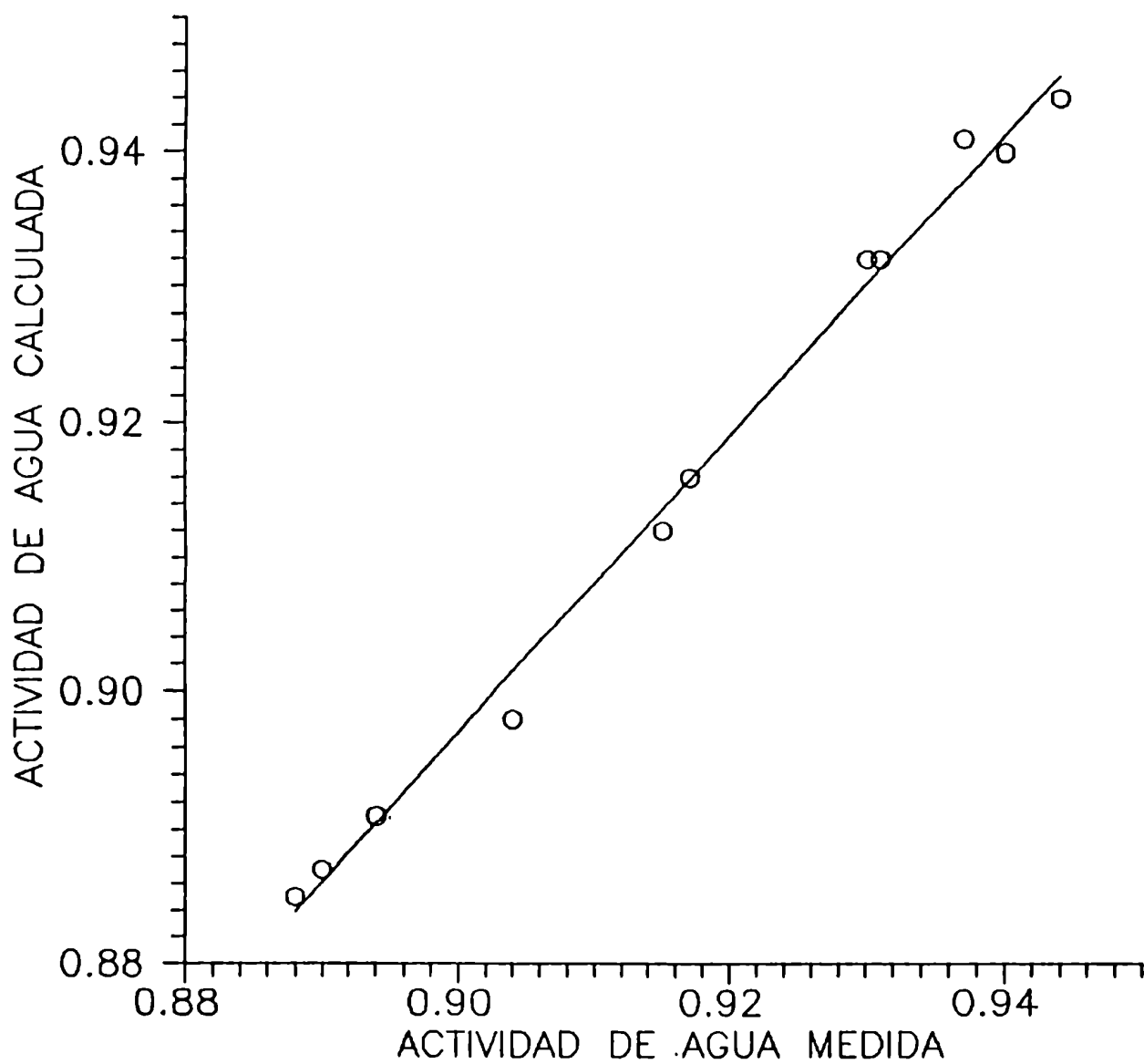


Figura 4.22:

Actividad de agua predicha en función de la actividad de agua medida del suero de queso concentrado durante la hidrólisis de lactosa.

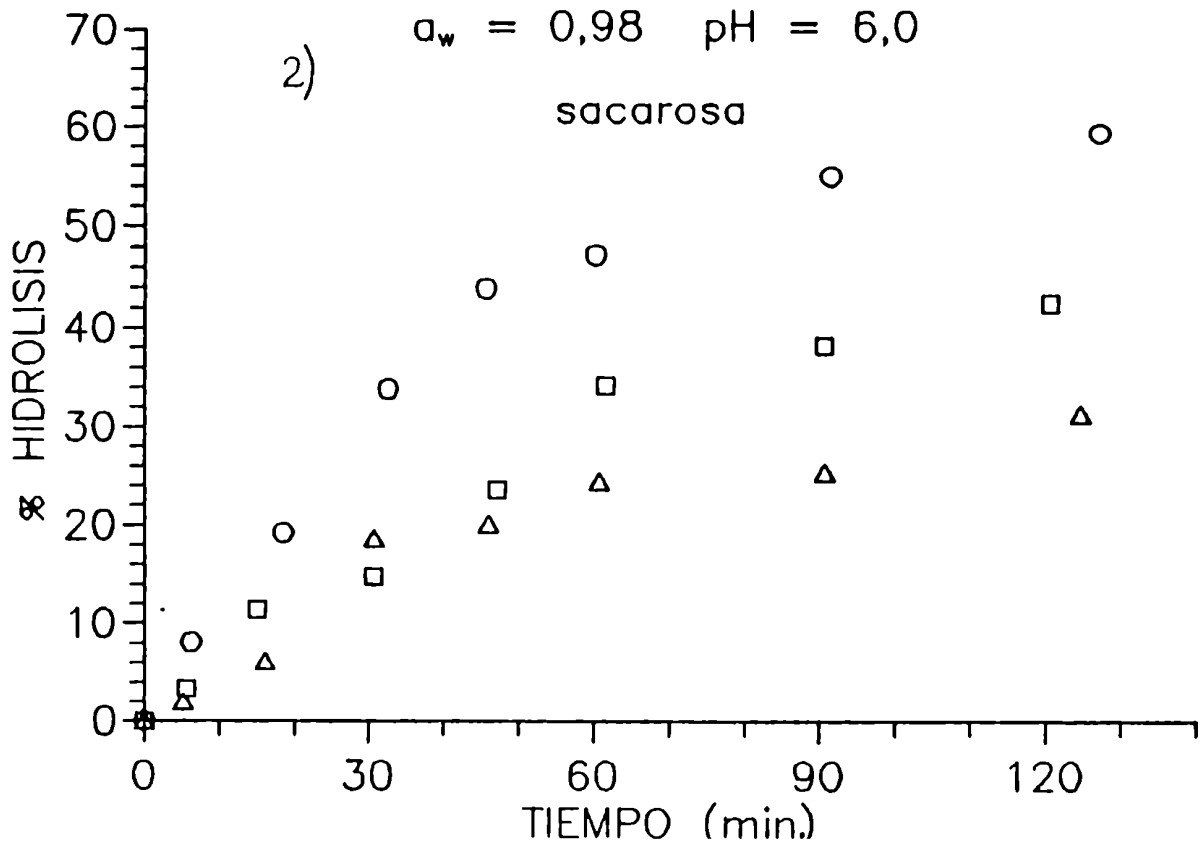
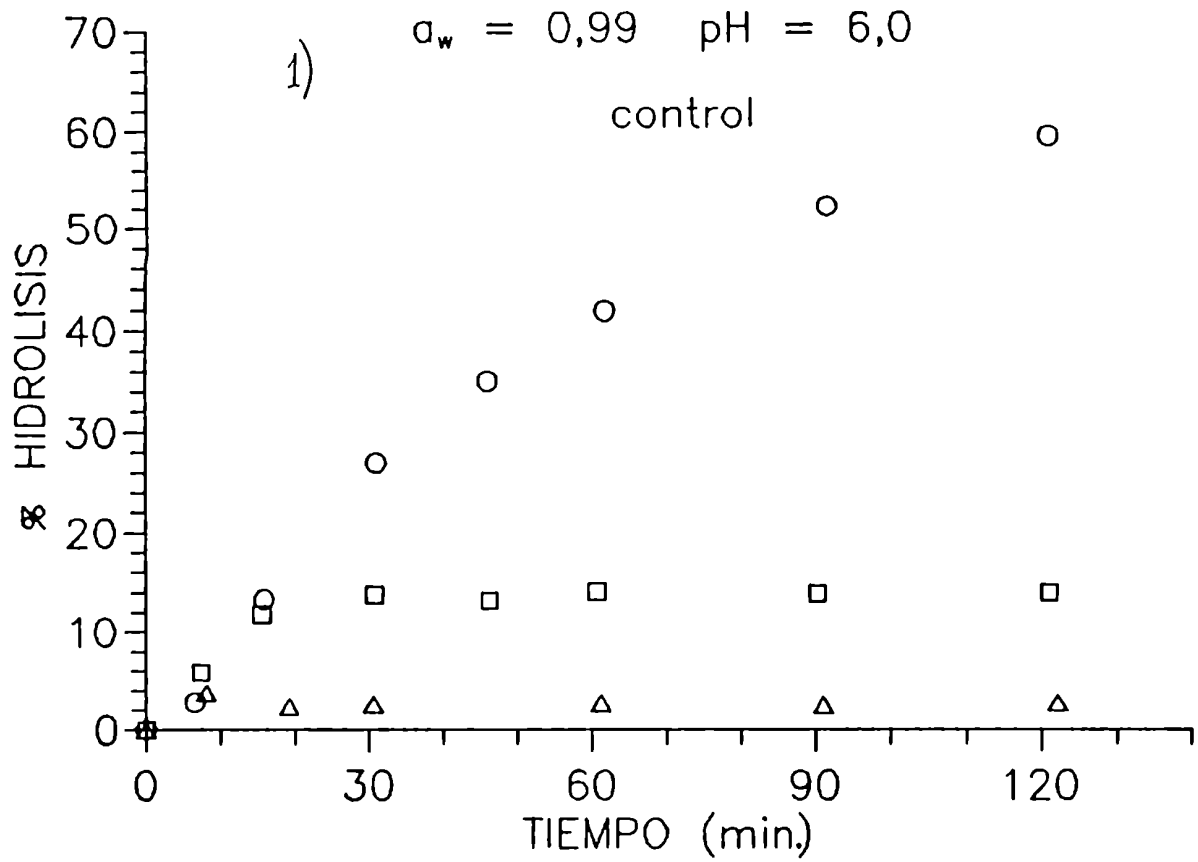
#### 4.4.11. Hidrólisis de lactosa en sistemas modelo

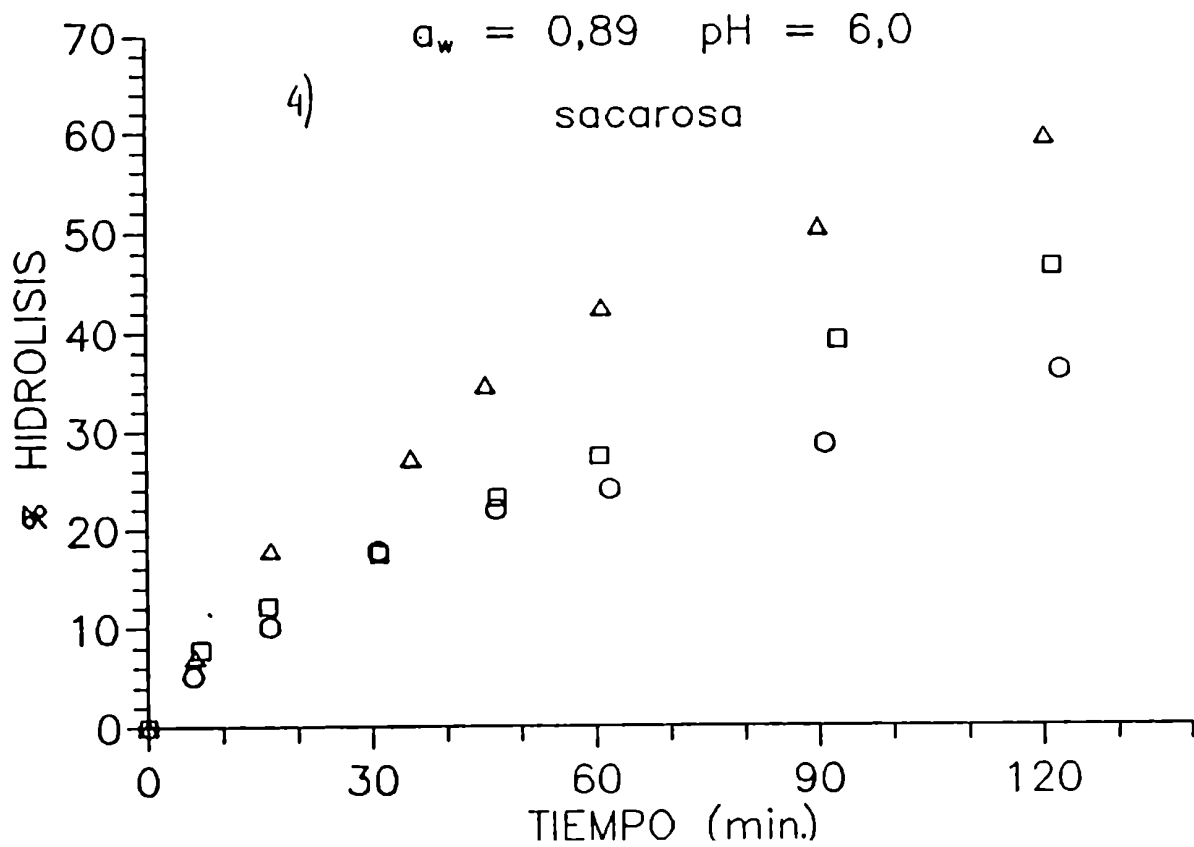
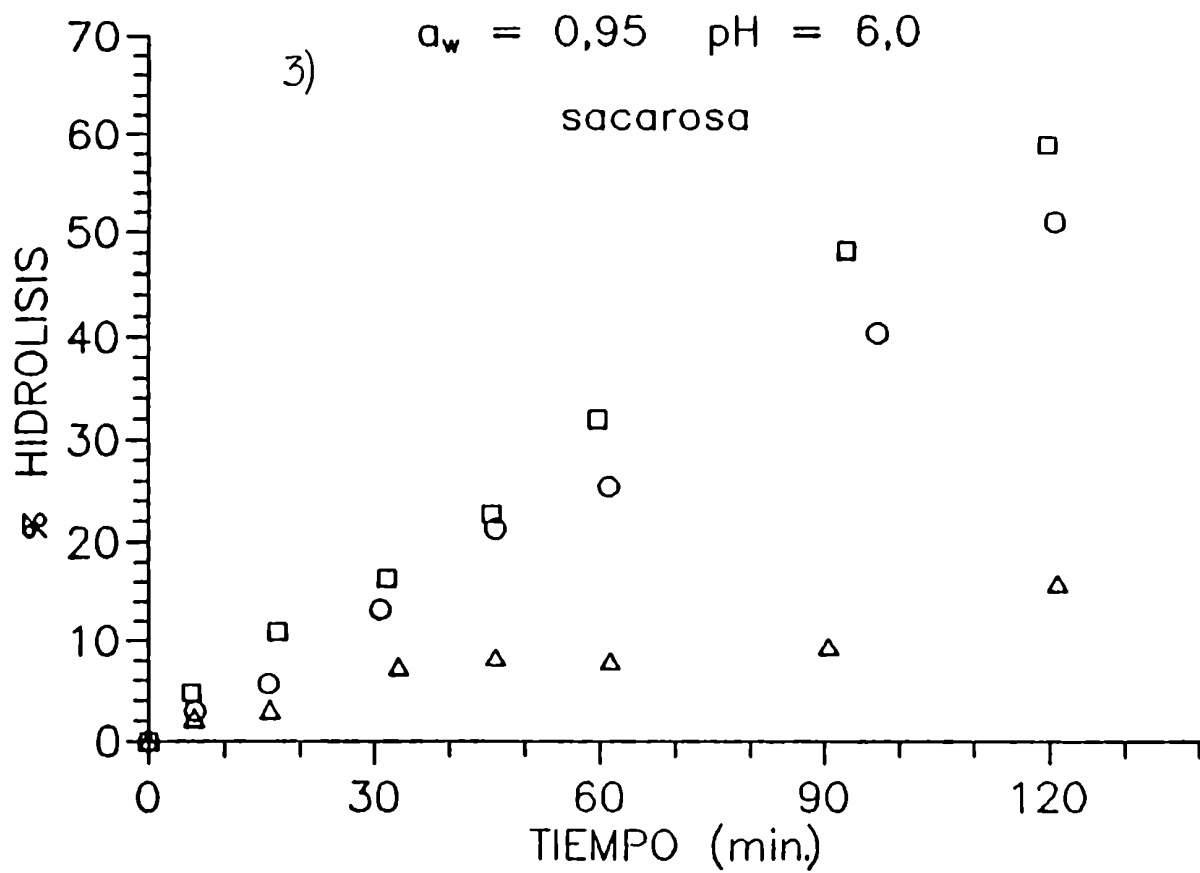
Cuando se estudió la dependencia de la velocidad de hidrólisis enzimática de lactosa con la temperatura en suero de queso concentrado, se observó que la máxima velocidad se obtenía, en muchas de las partidas analizadas, cuando la hidrólisis se realizaba a 47°C. Como hipótesis para explicar este hecho se postuló que tanto la baja actividad de agua como la alta concentración de sólidos del suero de queso concentrado podrían ser los factores que ayudan a estabilizar térmicamente a la enzima, de forma tal que pueda actuar a mayores temperaturas respecto de su óptimo tradicional. Para tratar de ampliar un poco más la información acerca de los factores que son capaces de estabilizar a la lactasa, se analizó la influencia de la temperatura en la velocidad de hidrólisis de lactosa en sistemas modelo de  $a_w$  controlada, más sencillos que el suero de queso concentrado, compuestos por lactosa, buffer fosfato y sacarosa ó por lactosa, buffer fosfato y glicerol.

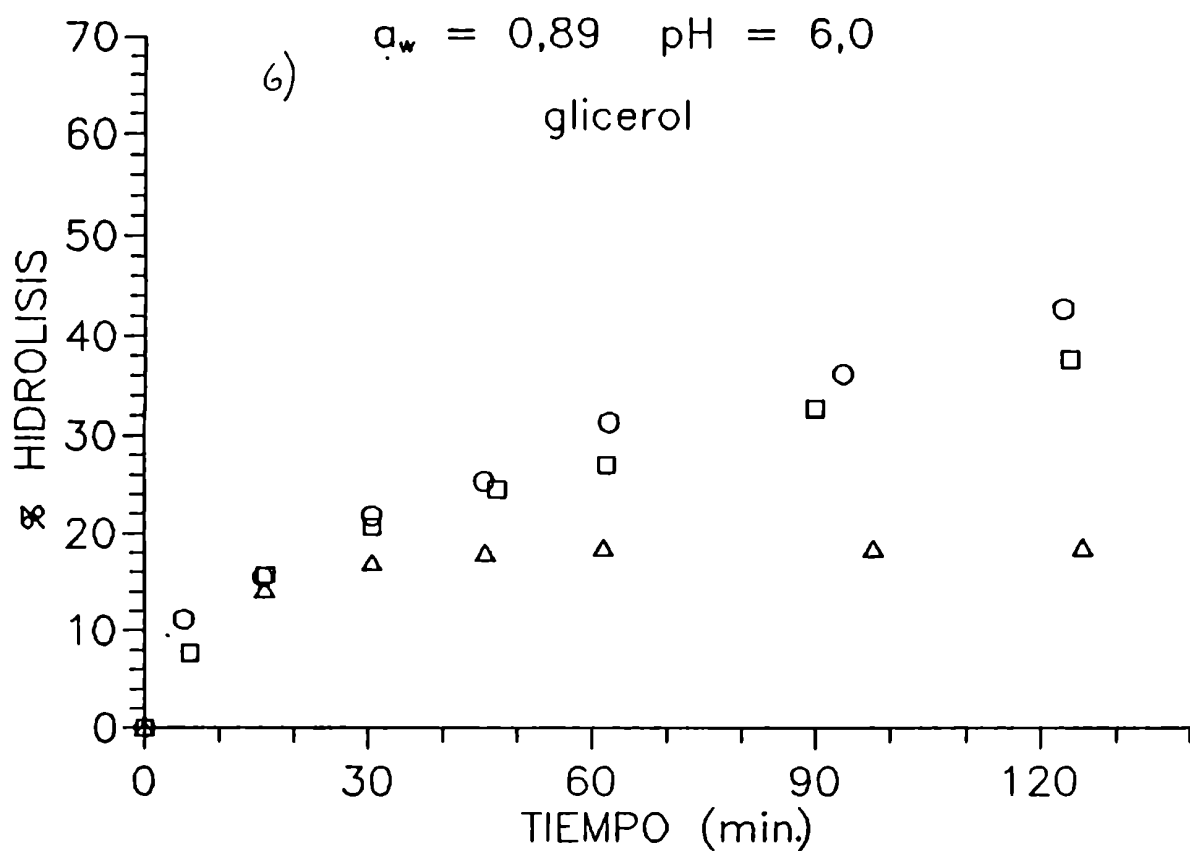
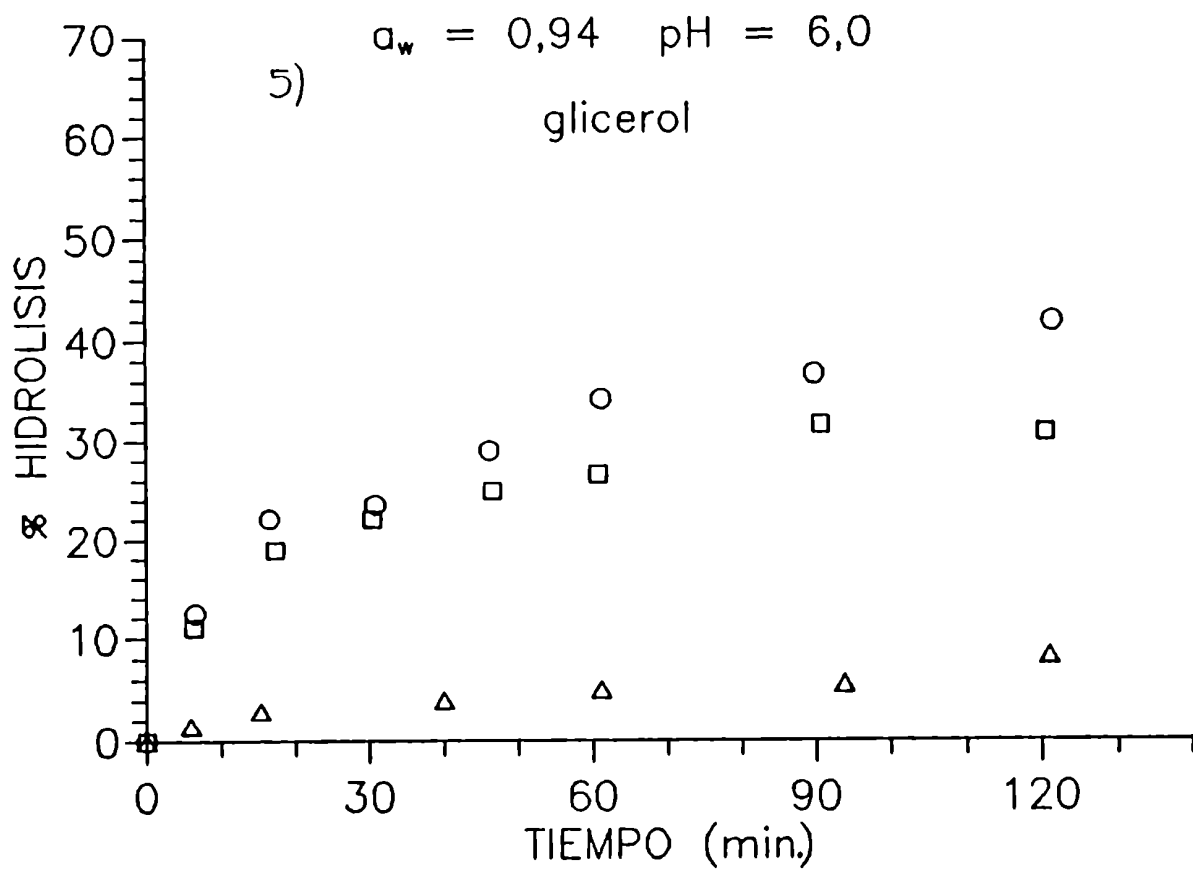
Los resultados obtenidos para los distintos sistemas modelo y a las tres temperaturas se muestran en la Figura 4.23. Se representa el porcentaje de hidrólisis obtenido versus el tiempo de reacción para los sistemas con sacarosa y glicerol respectivamente. Para el control (buffer y lactosa) la temperatura óptima (entre las tres temperaturas ensayadas) de la enzima es 37°C. En los sistemas modelo con sacarosa, cuando se disminuye la  $a_w$  a 0,981 (sistema 2), la enzima es más estable a 47°C y 53°C con respecto al control, aunque la temperatura óptima sigue siendo 37°C. Para el sistema de  $a_w$  0,945 (sistema 3), el óptimo de temperatura pasa de 37°C a 47°C y cuando la  $a_w$  es 0,894 (sistema 4), el

**Figura 4.23:**

Influencia de la temperatura en la velocidad de hidrólisis de la lactosa en sistemas modelo sacarosa-lactosa-buffer y glicerol-lactosa-buffer. 1) control (buffer-lactosa), 2) 20 % p/p sacarosa, 3) 70 % p/p sacarosa, 4) 130 % p/p sacarosa, 5) 25 % p/p glicerol y 6) 47 % p/p glicerol.  $\circ$  37°C,  $\Delta$  47°C y  $\square$  53°C.







óptimo es 53°C, si bien para las tres  $a_w$  la conversión máxima alcanzada es de 60 %. En cuanto al glicerol, se observa que al disminuir la  $a_w$  del sistema a 0,941 ó a 0,888, si bien el óptimo de temperatura permanece en 37°C, las conversiones de lactosa obtenidas a 47°C y 53°C son mayores que para el control. Las conversiones que se obtienen para los sistemas con glicerol a 37°C son menores que las del control a la misma temperatura, fenómeno que no ocurre para los sistemas con sacarosa; esto indicaría un posible efecto inhibitor 'per se' del glicerol sobre la enzima.

De estos resultados se puede concluir que en los sistemas con sacarosa ó glicerol, al disminuir la  $a_w$  (mayor contenido de sólidos), la enzima es más termoestable que en el control. Sin embargo la sacarosa estabiliza más a la enzima contra la desnaturalización por temperatura que el glicerol para la misma  $a_w$ . Aunque para el caso del glicerol se debe tener en cuenta que se están evaluando dos efectos opuestos, la estabilización térmica y el posible efecto inhibitor "per se" de dicho soluto.

Es sabido que las enzimas son más resistentes a la desnaturalización si están en presencia de su sustrato (Dixon y Webb, 1964). No se ha encontrado en bibliografía que el glicerol ejerza algún efecto específico sobre la lactasa (activador, inhibitor o sustrato). Con respecto a la sacarosa, Dalquist y col. (1977) informan que la enzima Maxilact 40000 ONPG, tiene un 10-20 % de actividad de sacarasa. Sin embargo este autor trabajó con una enzima menos pura que la empleada en este trabajo. A fin de verificar si la lactasa Maxilact LX 5000, utilizada en este

trabajo, tiene actividad de sacarasa se realizó la siguiente experiencia: se preparó una solución de sacarosa y buffer fosfato de pH=6,0 (53 % p/p de sólidos totales) y se midió su actividad de agua; este valor fue 0,925. Luego se agregó 1,0 % de enzima y se incubó 24 horas a 37°C. Se utilizó una alta concentración de enzima fin de detectar más fácilmente la actividad de sacarasa. Junto con esta muestra se incubó un control al que no se le agregó enzima. Luego de las 24 horas se le midió la  $a_w$  a ambas muestras por la técnica descrita anteriormente (sección 4.3.2.4). Los resultados obtenidos fueron:

Actividad de agua del control: 0,924

Actividad de agua de la muestra con enzima: 0,915

Considerando que el error en las mediciones de actividad de agua es  $\pm 0,005$  (Kitic y col., 1986) no se puede asegurar, por medio de este método, que la lactasa tenga también actividad de sacarasa. Sin embargo, este caso particular, dado que la enzima tiene mucha mayor especificidad por la lactosa que por la sacarosa, es posible que el aporte de esta última en la estabilización de la enzima sea de otra índole.

Los resultados obtenidos se pueden explicar parcialmente analizando cuáles son los factores que estabilizan a las proteínas, ya que las enzimas son proteínas con actividad catalítica. En su estado nativo las proteínas son estructuras tridimensionales estabilizadas por fuerzas no covalentes (uniones puente hidrógeno, fuerzas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y fuerzas tipo Van der Waals, con contribuciones adicionales, para



determinadas proteínas, de entrecruzamientos por puentes disulfuro, formación de complejos con metales y uniones de iones y cofactores), que son muy sensibles a la temperatura, pH y composición del solvente. Los estados activados necesarios para que ocurra una reacción se forman en agua y solamente en determinadas condiciones de composición del medio y condiciones externas. Pequeños cambios pueden producir inactivación. Moléculas ó iones que se comportan como especies hidrofóbicas en solución acuosa son capaces de estabilizar los estados nativos contra la desnaturalización por efecto de altas temperaturas, posiblemente por medio de interacciones hidrofóbicas que involucran residuos de aminoácidos apolares localizados sobre la superficie de la molécula (Franks, 1984).

La geometría única del agua y su capacidad de participar en estructuras tridimensionales da características especiales a las soluciones acuosas. Cuando se introduce un soluto en agua, la forma en que la estructura del agua se modifica (direccionalidad e intensidad de las fuerzas de unión entre las moléculas de agua) determina las propiedades del sistema solvente-soluto resultante. Si se adiciona a un medio acuoso un soluto hidrofóbico los mismos tienden a interactuar entre sí, en un fenómeno llamado de interacción hidrofóbica, a fin de minimizar las interacciones agua-soluto desfavorables (Franks, 1984). Estas interacciones hidrofóbicas son una contribución importante a la estabilización de las macromoléculas "in vivo".

Al introducir en agua un soluto altamente polar, por ejemplo un azúcar, el comportamiento de la solución está

gobernado por las uniones puente hidrógeno entre el agua y el soluto. Todos los puentes hidrógeno (agua-agua, agua-soluto, soluto-soluto) tienen igual fuerza e igual posibilidad de ocurrir. Sin embargo azúcares muy semejantes tiene diferentes propiedades en agua. Esto es debido a las orientaciones y espaciamientos de los grupos que forman el puente hidrógeno. La capacidad de hidratación de una molécula depende enormemente de su conformación. Por lo tanto el número de moléculas de agua que lleve consigo un azúcar depende no sólo del número de grupos oxhidrilo que posea, sino también de sus orientaciones (axial o ecuatorial). Los oxhidrilos ecuatoriales se hidratan preferentemente a los axiales pues existe compatibilidad espacial y direccional con la estructura del agua. Esto lleva a que cuando un azúcar está en solución se favorezca el confórmero que posea mayor número de oxhidrilos ecuatoriales.

Por lo tanto los efectos de solvatación contribuyen significativamente a las energías libres conformacionales de las moléculas polares y el agua da lugar a estructuras preferenciales que son diferentes a las que se obtienen en otros solventes (Franks, 1984). Por lo tanto puede establecerse que los azúcares y moléculas relacionadas son capaces de alterar la estructura del agua y en consecuencia afectar la estabilidad y propiedades de otros solutos presentes, en este caso de las proteínas.

Ball y col. (1943) estudiaron el efecto de la sacarosa, glucosa, manosa, arabinosa y manitol sobre ciertas proteínas. Encontraron que la coagulación por calor de la ovoalbúmina y de las proteínas del suero se retarda en

presencia de los mismos, ya que se inhibe la formación de grupos sulfhidrilo.

Laksmi y Nandt (1976) profundizaron sobre los mecanismos que estabilizan a las proteínas con respecto a la temperatura cuando se encuentran en presencia de sacarosa y glucosa. En una proteína nativa la mayoría de las cadenas laterales de los aminoácidos permanece en el interior de la molécula; al ocurrir desnaturalización, éstos son expuestos al solvente aumentando así la concentración de los mismos. Los grupos no polares de la proteína encuentran más desfavorable a un medio con azúcar que al agua; por lo tanto, su resistencia a verse expuestos (fenómeno que ocurre al desnaturalizarse la proteína) es mayor. Esto induciría una estabilización de las proteínas en un medio con azúcar. Asimismo se comprobó que en presencia de azúcares aumentan las interacciones hidrofóbicas entre los residuos no polares de la proteínas (Gratzer y Bevan, 1969), favoreciendo su estabilidad.

Giles y McKay (1962) analizaron interacciones entre proteínas (gelatina, plasma, albúmina bovina) y azúcares (xilosa, ribosa, glucosa, galactosa, sacarosa, lactosa, maltosa). Concluyeron que entre las proteínas y los azúcares estudiados existen uniones puente hidrógeno con el azúcar como donador de protón.

Back y col., (1979) midieron el aumento de la temperatura de desnaturalización de varias proteínas (ovoalbúmina, lisozima, conalbúmina y quimotripsinógeno) al ser calentadas en presencia de varios azúcares y polioles (glucosa, sacarosa, sorbitol y glicerol). Este aumento de

temperatura aparentemente estaría relacionado con cambios en las propiedades del solvente. Con respecto al poder de estabilización, glucosa y sorbitol son igualmente efectivos para aumentar la temperatura de desnaturalización de las proteínas. Sacarosa lo es un poco menos, mientras que glicerol estabiliza muy poco a las proteínas con respecto al calentamiento. Para sacarosa y sorbitol estos autores analizan el efecto de la concentración de los mismos, siendo mayor la temperatura de desnaturalización a mayor concentración de azúcar. Otros azúcares y polioles que también estabilizan a las proteínas son: galactosa, fructosa, arabinosa, manosa, maltosa, rafinosa, eritritol, sorbitol y manitol. También encontraron que sacarosa y glicerol fortalecen las interacciones hidrofóbicas que, como ya se ha discutido, es uno de los factores más importantes en la estabilidad de la estructura de las proteínas.

Oakenfull y Fenwick (1979) demostraron que las máximas interacciones hidrofóbicas ocurren en mezclas de solventes o soluciones de solutos que permiten un máximo desarrollo de la estructura tridimensional del agua. Así, el efecto que ejercen los azúcares y polioles sobre la estabilidad térmica de las proteínas depende también del efecto que ejerzan sobre la estructura del agua.

Lo explicado en los párrafos anteriores sugiere que la sacarosa es un soluto que favorece más la estabilidad térmica de las proteínas, y por lo tanto de las enzimas, que el glicerol, lo cual explicaría los resultados obtenidos.

Durante la hidrólisis de lactosa en suero de queso se encontró que al pasar de suero diluido (7 % p/p de sólidos)

a suero concentrado (50 % p/p de sólidos) hay un aumento en la estabilidad térmica de la enzima, lo cual permite trabajar a temperaturas mayores que 37°C. Este aumento en la estabilidad es probablemente debido a la menor  $a_w$  del suero concentrado y a la mayor concentración de lactosa (Mahoney y Wilder, 1989). Dado que el mismo efecto fue encontrado al trabajar con los sistemas modelo se puede inferir la importancia de la concentración de solutos en la estabilidad térmica de la enzima. Sin embargo, al aumentar aún más la concentración de sólidos en el suero de queso concentrado el óptimo de temperatura para la enzima es 37°C, posiblemente debido al aumento de la concentración de calcio iónico, inhibidor y desestabilizador de la enzima como pudo comprobarse en la sección 4.4.3.

Una explicación rigurosa de las diferencias en los efectos estabilizadores de la sacarosa y del glicerol y porqué en el suero de queso concentrado (50 % p/p de sólidos) la enzima es más estable térmicamente que en suero diluido, pero por encima de cierto límite de concentración hay una desestabilización de la enzima, requiere de un análisis más extenso y específico que el aquí realizado. También se debe considerar la complejidad de la composición del suero de queso concentrado que dificulta establecer las causas del comportamiento de la lactasa.

#### 4.4.12. Conclusiones

La lactosa presente en el suero de queso concentrado, parte en forma soluble y parte en forma cristalizada, puede ser hidrolizada enzimáticamente por medio de la enzima Maxilact LX 5000 para obtener un jarabe. Este jarabe no tiene cristales en suspensión, por lo tanto su textura es suave, su viscosidad es menor que la del suero de queso concentrado y debido a su menor  $a_w$  es más fácil de lograr la estabilidad microbiológica evitando el agregado de humectantes.

En las experiencias realizadas se definieron las condiciones para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de la lactosa en el suero de queso concentrado. La hidrólisis se realizó por medio de un reactor batch agitado. Previo a la hidrólisis el suero debe ser llevado al pH de trabajo y se debe agregar el agente antimicrobiano seleccionado. Este último no afecta el desarrollo de la reacción de hidrólisis.

■ La concentración de enzima y tiempo de hidrólisis a utilizar están relacionados. A mayor concentración de enzima se necesita un menor tiempo de hidrólisis para lograr un determinado porcentaje de hidrólisis y viceversa. Hubiera sido deseable utilizar una alta concentración de enzima a fin que los tiempos de hidrólisis fueran cortos. Sin embargo dado que el método propuesto no recupera la enzima se debe utilizar la menor cantidad posible de la misma. Tanto una alta concentración de enzima, como un tiempo largo de hidrólisis tienen desventajas económicas. También se debe considerar que un tiempo de hidrólisis demasiado largo podría perjudicar el estado microbiológico

del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado y preservado. Se eligió una concentración de enzima de 0,1 % p/p. Cuando se trabajó a 37°C y pH = 6,0, al cabo de 7 horas de hidrólisis se lograron porcentajes de hidrólisis mayores al 60 % con lo cual se aseguraba la desaparición de los cristales de lactosa.

■ La temperatura óptima de la reacción depende del contenido de sólidos del suero de queso. Cuando la concentración de sólidos estaba comprendida entre 48,0 y 52,0 % p/p la temperatura óptima era de 47°C, salvo para algunas partidas de suero concentrado. Esto determinó que todas las experiencias restantes se realizaran a 37°C.

■ El pH óptimo para la hidrólisis de lactosa es 6,0, cuando se trabajó con tiempos de reacción de 7 horas. A tiempos más cortos la reacción procede más rápido a pH 6,5, aunque se debe tener en cuenta que es necesario ajustar continuamente el pH del suero, lo que constituye una complicación adicional. Es importante considerar que pequeñas desviaciones del valor óptimo de pH no afectan los resultados finales. Esto permite trabajar sin ajustar el pH original del suero de queso concentrado, siempre que el mismo se encuentre comprendido entre 6,0 y 6,3.

■ Los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extrapolar a otras partidas de suero de queso concentrado, siempre que las características del mismo estén comprendidas dentro de las descriptas.

■ La concentración de lactosa soluble permanece aproximadamente constante durante los primeros 220-240 minutos de la reacción de hidrólisis. Este hecho fue tomado

en cuenta al postular los modelos para describir la hidrólisis. En base a lo expresado en bibliografía se eligió el modelo de Michaelis y Menten para la descripción de la hidrólisis. El modelo se modificó para tener en cuenta que la concentración de lactosa soluble se mantenía constante durante cierto tiempo y también para considerar la inhibición que ejercen los productos de la reacción. Según fue discutido en la sección 4.4.9, el modelo más sencillo de utilizar es el que plantea una cinética tipo Michaelis y Menten con inhibición competitiva por la galactosa y considerando la variación de la concentración de lactosa total (sin tomar en cuenta si está precipitada ó solubilizada). El cálculo de los parámetros se puede realizar tanto por regresión no lineal como por regresión lineal. Este último método es el más sencillo, sin embargo el ajuste a los datos experimentales es levemente peor.

■ El descenso que se produce en la actividad de agua facilita el logro de la estabilidad microbiológica del suero hidrolizado, sin necesidad del agregado de humectantes. La correlación lineal que existe entre el descenso de la  $a_w$  y el porcentaje de hidrólisis brinda un método sencillo para estimar el avance de la reacción. Como la  $a_w$  del suero de queso durante el proceso de hidrólisis puede ser predicha, utilizando los modelos de Norrish (1966) y de Ross (1975), conociendo la concentración de lactosa a cada momento de la reacción es posible calcular la  $a_w$ .

■ La estabilidad térmica que la lactasa demostró tener en suero de queso concentrado es excepcional para este tipo de enzimas, por lo tanto se estudió en sistemas modelo algunos de los factores que podrían influir en la misma. Los resultados encontrados indican que tanto la concentración



como el tipo de soluto utilizado influyen en la estabilidad térmica de la misma, cuando se trabaja a la misma  $a_w$ . Asimismo a menor  $a_w$  el efecto estabilizador del soluto es mayor.

■ Con respecto a las precauciones que se deben tomar en un proceso industrial de obtención de suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado, se recomienda controlar cuidadosamente la concentración de sólidos del suero de queso concentrado a fin que no exceda un 50 % p/p. En caso de cumplirse esta última condición y que el agregado de calcio haya estado dentro de los límites normales, se puede trabajar a 47°C. En caso de trabajar a esta temperatura, la misma se debe controlar en forma estricta durante la hidrólisis de la lactosa ya que a 50°C se produce inactivación parcial de la enzima. Si las condiciones del proceso de concentración del suero no han sido cuidadosamente controladas ó existen dudas en cuanto a la concentración de calcio presente se recomienda trabajar a 37°C. El tiempo de hidrólisis es mayor, sin embargo se evitarán problemas en la hidrólisis de lactosa por inactivación de la enzima. Una forma sencilla de controlar si la hidrólisis está procediendo en forma adecuada es mirar al microscopio los cristales de lactosa. En el suero de queso concentrado los cristales de lactosa presentan la forma característica y sus aristas son agudas y bien definidas. A medida que avanza la reacción de hidrólisis los bordes de los cristales aparecen irregulares y su tamaño va disminuyendo hasta desaparecer. También el control del avance de la reacción de hidrólisis se puede realizar midiendo el descenso de la actividad de agua, aunque este método es más lento y se necesita el equipo adecuado.

La hidrólisis de la lactosa del suero de queso concentrado es un método sencillo y fácil de implementar que permite la obtención suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado cuyas propiedades y posibilidades de utilización son mayores que para el suero concentrado.

## 5. ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DEL SUERO DE QUESO CONCENTRADO Y PARCIALMENTE HIDROLIZADO DURANTE SU PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO

### 5.1. Objetivos

La estabilidad microbiológica del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado fue estudiada en dos etapas: durante la hidrólisis de la lactosa y durante el almacenamiento del suero de queso concentrado ya hidrolizado.

Una de las características del proceso de hidrólisis, desde el punto de vista microbiológico, está dada por el descenso de la actividad de agua que se produce debido al desdoblamiento de la lactosa en glucosa y galactosa. La  $a_w$  desciende de 0,94-0,95 a 0,90-0,89 al final de la hidrólisis (65 % de conversión de lactosa). Este factor es fundamental para lograr la estabilidad microbiológica del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado, ya que hace innecesario el agregado de humectantes para disminuir la  $a_w$ .

Dado que el manejo industrial del suero no se realiza en forma estéril es importante conocer cómo se comporta este material frente a contaminaciones que ocurran durante su elaboración, transporte y almacenamiento.

El objetivo de esta parte del trabajo fue determinar las condiciones de pH, así como el tipo y concentración de conservador a utilizar, a fin de lograr una vida útil de tres meses del suero de queso concentrado, parcialmente hidrolizado y preservado, cuando se lo almacena a

*Tesis.  
2544  
pte. 2*

temperatura ambiente. Dos factores influyeron en la determinación del tiempo de almacenamiento: 1) Buera y col. (1990) determinaron que en un tiempo de almacenamiento mayor de tres meses a 25°C el cambio de color en el suero hidrolizado, por pardeamiento no enzimático, afecta el aspecto del mismo y 2) se consideró que como el suero hidrolizado es un producto de uso principalmente industrial no es necesario que tenga una vida útil mayor a tres meses.

## 52. Elección de los microorganismos a utilizar

Kanterewickz y col. (1985a) realizaron un estudio sobre la carga microbiana de suero de queso concentrado, provisto también por Sancor S.A., al igual que el suero de queso concentrado utilizado para este trabajo. En la Tabla 5.1 se encuentran los resultados de dicho estudio. Inicialmente existe una baja contaminación, atribuible al tratamiento térmico que el suero recibe durante su concentración (calentamiento a 70°C durante 8 horas). En efecto, según Kanterewickz y col. (1985a), en varias partidas de suero de queso concentrado analizadas, el recuento total inicial promedio de bacterias mesófilas fue de  $10^3$ - $10^4$  UFC/g de suero de queso concentrado; el de *Staphylococcus aureus* fue de 10 UFC/g de suero de queso concentrado y no se encontraron hongos ni levaduras. Estos bajos valores iniciales favorecen la obtención de un suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado con una baja carga microbiana y en consecuencia con una mayor vida útil. Sin embargo hay que tener en cuenta que, durante el proceso de hidrólisis de la lactosa, se trabaja a la temperatura óptima para el crecimiento de los microorganismos mesófilos,

Tabla 5.1

Carga microbiana inicial de suero concentrado comercial  
(Kanterewicz, 1985a).

MICROORGANISMO	UFC/g
Mesófilas aerobias	10 <sup>4</sup>
<i>Micrococcaceae</i>	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>Enterobacteriaceae</i>	10
Coliformes	25
Estreptococos fecales	25
Esporulados aerobios	25
Esporulados anaerobios	10 <sup>2</sup>
Hongos	--
Levaduras	

37°C, a fin de lograr una mayor velocidad de reacción. Por lo tanto los microorganismos presentes pueden multiplicarse y/o el suero puede contaminarse accidentalmente, lo que podría deteriorar al mismo durante su almacenamiento.

Dadas las características del suero de queso concentrado ( $\text{pH}=6,0$ ;  $a_w=0,95$  al principio y  $a_w=0,90$  al final de la hidrólisis) y del proceso de hidrólisis de la lactosa (se realiza en forma aeróbica), el patógeno con más posibilidades de crecer en el suero de queso es el *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* puede crecer y producir enterotoxina en gran cantidad de sustratos y bajo diferentes condiciones del medio, como pH, temperatura y  $a_w$  (Tatini, 1973). En aerobiosis puede crecer hasta  $a_w$  tan bajas como 0,86 (Vaamonde y col., 1982; Lotter y Leistner, 1978). Debido a esta causa fue elegido para ser inoculado con el fin de estudiar su crecimiento durante el proceso de hidrólisis y el almacenamiento del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado.

Otras bacterias con posibilidades de crecimiento en el suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado son los lactobacilos. Su  $a_w$  límite de crecimiento, en sistemas modelos salinos, es 0,91 (Christian, 1987); por lo tanto la  $a_w$  del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado no es óptima para su desarrollo. También se debe considerar el efecto de los conservantes utilizados. Sofos (1989) reportó que el crecimiento y producción de ácido de varias especies de lactobacilos son inhibidas por concentraciones de sorbato de potasio mayores a 0,1 % p/p. La  $a_w$  del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado es 0,90-0,89, cercana al límite de crecimiento, y recibe un tratamiento

térmico previo, con lo cual la contaminación inicial es baja. Estos factores limitan la posibilidad de crecimiento de este tipo de microorganismo en el suero hidrolizado preservado.

Los estreptococos y micrococos pueden crecer a la  $a_w$  final del suero de queso; sin embargo las características de pH y los conservadores utilizados inhiben su crecimiento. Los bacilos tienen  $a_w$  límite de crecimiento alrededor de 0,93, es decir que podrían crecer solamente durante la hidrólisis del suero y no en el suero ya preservado.

Otros tipos de microorganismos que crecen en el suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado y cuyas posibilidades de contaminación a partir del medio ambiente son amplias, son los hongos y las levaduras. Existen aproximadamente diez especies de levaduras responsables del deterioro de alimentos procesados y envasados (Pitt y Hocking, 1985).. De todas ellas se seleccionaron cuatro en base a su capacidad de crecer a bajas  $a_w$  y en productos azucarados: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces bailii* y *Debaryomyces hansenii*.

*Saccharomyces cerevisiae* es un contaminante ubicuo que fermenta fácilmente productos azucarados, jugos de fruta y sus concentrados. Puede crecer hasta  $a_w$  0,89 en un medio de glucosa y a pH=6,0 (Juven y col., 1978). *Saccharomyces rouxii* (también *Zygosaccharomyces rouxii* según Barnett y col. (1983)) fermenta y deteriora jugos concentrados, mieles, mermeladas, productos azucarados, etc.. Es el segundo microorganismo más xerofílico que se conoce pudiendo crecer hasta  $a_w$ =0,62 en soluciones de fructosa (von

Schelhorn, 1950) y hasta  $a_w=0,65$  en soluciones de sacarosa y glicerina (Tilbury, 1980). El hecho que crezca a  $a_w$  muy bajas, conjuntamente con su habilidad de fermentar hexosas, la convierten en la segunda responsable, luego de *Saccharomyces bailii*, de deterioros fermentativos de alimentos. Aún una pequeña contaminación inicial de *S. rouxii* puede llegar a producir grandes daños en alimentos almacenados, ya que es capaz de liberar considerables cantidades de dióxido de carbono. Los conservadores más usuales son eficaces para detener el crecimiento de *S. rouxii*, la que también se inactiva fácilmente por calor. *Saccharomyces bailii* (también *Zygosaccharomyces bailii* según Barnett y col. (1983)) fermenta soluciones de glucosa a dióxido de carbono y no es inhibida fácilmente por el exceso de gas presente. Puede fermentar glucosa en presencia de 400 mg/kg de ácido sórbico o ácido benzoico. En ausencia de dióxido de carbono *S. bailii* puede crecer bien a bajos pH y  $a_w$  (Pitt, 1974). Esta levadura tiene la capacidad de adaptarse a bajas concentraciones de conservador, y luego de la adaptación puede sobrevivir y crecer a concentraciones mucho mayores de conservador que las anteriores (Warth, 1977). La  $a_w$  mínima de crecimiento es 0,80 y es una levadura contaminante típica en la industria alimentaria. Puede crecer en una amplia variedad de productos como salsas de tomate, mayonesa, aderezos, jugos y concentrados de frutas, etc. *Debaryomyces hansenii* es capaz de crecer hasta  $a_w=0,84$  en soluciones salinas y utiliza una amplia variedad de fuentes de carbono. Aparte de crecer en productos salados también se la encuentra en jugos de fruta, yogur y quesos (Barnett y col., 1983).

En lo que respecta a los hongos también fueron



seleccionados en base a su capacidad de crecer en productos azucarados y a bajas  $a_w$ ; así todos los hongos empleados fueron aislados de dulce de leche. *Penicillium roquefortii* crece en un amplio rango de pH y su  $a_w$  mínima de crecimiento está alrededor de 0,80. Está ampliamente distribuido y su facilidad para crecer a bajas temperaturas lo hace uno de los principales contaminantes de productos refrigerados (Pitt y Hocking, 1985). *Penicillium funiculosum* es una especie que tolera muy bien los ácidos y crece hasta  $a_w=0,89$  (Milisvec y Tuite, 1970). Se encuentra frecuentemente en nueces, cereales y frutas secas. *Eurotium herbariorum* es un hongo xerofílico que puede crecer hasta  $a_w=0,74$  a pH=3,8 (Pitt y Christian, 1968). Es una especie muy difundida y produce deterioro en frutas secas, quesos, carnes y arroz. *Eurotium amstelodami* puede crecer hasta  $a_w=0,70$  pero su crecimiento es máximo a  $a_w=0,90$ . Es también un hongo muy común y se lo encuentra en quesos, pan, carnes y dulces. *Paecylomyces variotti* es levemente xerofílico pudiendo crecer hasta  $a_w=0,84$ . Se lo encuentra como contaminante de alimentos, materias primas y medios de cultivo (Pitt y Hocking, 1985). Con respecto a *Aspergillus niger*, se encontró que puede crecer a  $a_w=0,85$  en un medio de glicerol a una temperatura de 30°C (González, 1984) y es un contaminante de nueces, dulces y frutas. *Wallemia sebi* puede crecer en un rango muy amplio de  $a_w$ , entre 0,99 y 0,69, en medios azucarados (glucosa y fructosa) (Pitt y Hocking, 1985). Se encuentra diseminado muy ampliamente especialmente en frutas secas, arroz, leche condensada, etc..

### 5.3. Materiales y Métodos

### 5.3.1. Medios de cultivo y reactivos

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo para el estudio microbiológico del suero de queso (todos ellos fueron provistos por Merck Química Argentina):

- Agar Baird-Parker, composición (g/l): peptona de caseína 10,0; extracto de carne 5,0; extracto de levadura 1,0; piruvato de sodio 10,0; glicina 12,0; cloruro de litio 5,0; agar 15,0; emulsión de yema de huevo 50 ml; telurito de potasio 0,105; pH del medio preparado a 37°C, 6,8 $\pm$ 0,2.
- Agar para Recuento en Placa, composición (g/l): peptona de caseína 5,0; extracto de levadura 2,5 ; D(+) glucosa 1,0; agar 14,0; pH del medio preparado a 37°C, 7,0  $\pm$ 0,1.
- Agua peptona, composición (g/l): peptona de carne 10,0.
- Caldo Infusión Cerebro-Corazón, composición (g/l): infusión de cerebro 12,5; infusión de corazón 5,0; proteosa peptona 10,0; D(+) glucosa 2,0; cloruro de sodio 5,0; disodio hidrógeno fosfato 2,5; pH del medio preparado a 37°C, 7,4 $\pm$ 0,1.
- Agar Papa-Glucosa, composición (g/l): infusión de papa (preparada a partir de 200 g de papa) 4,0; D(+) glucosa 20,0; agar 15,0; pH del medio preparado a 37°C, 5,6 $\pm$ 0,1.
- Caldo Glucosa 2% según Sabouraud, composición (g/l): peptona de carne 5,0; peptona de caseína 5,0; D(+) glucosa 20,0; pH del medio preparado a 37°C, 5,6 $\pm$ 0,1.

Los reactivos utilizados fueron: sorbato de potasio propionato de calcio, ambos grado alimentario; ácido fosfórico (85 % p/p) y Tween 80 (polioxi-etilen-sorbitano-monooleato), ambos provistos por Merck Química Argentina.

### 5.3.2. Microorganismos utilizados

Se utilizaron los siguientes microorganismos:

■ Bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P y C-243, ambas provistas por el Instituto Nacional de Microbiología "Dr Carlos G. Malbrán".

■ Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* MI, donada por la cátedra de Microbiología Industrial de la Facultad de Ingeniería (UBA); *Saccharomyces rouxii* ATCC 8383; *Saccharomyces bailii* NRRL 7239 y *Debaryomyces hansenii* NRRL 1448.

■ Hongos: *Penicillium roquefortii*, *Penicillium funiculosum*, *Eurotium herbariorum*, *Eurotium amstelodami*, *Paecylomyces variotti*, *Aspergillus niger* y *Wallemia sebi*. Todos ellos fueron aislados a partir de muestras de dulce de leche contaminado e identificadas por el Ing. Agr. Lucas H. González de la cátedra de Microbiología Industrial de la Facultad de Ingeniería (UBA).

### 5.3.3. Determinación de la estabilidad microbiológica del suero de queso concentrado durante la hidrólisis de lactosa

Para estudiar la evolución de la carga microbiana a lo largo de la hidrólisis de la lactosa, dicha reacción se llevó a cabo a 37°C con 0,1 % p/p de lactasa y el pH ajustado a 6,0 con ácido fosfórico 85 % p/p. En todos los casos el suero de queso concentrado utilizado para los ensayos de microbiológicos fue suero recién recibido de la planta de fabricación, a fin de que el tipo y el número de los microorganismos presentes no se viera afectado por el almacenamiento bajo refrigeración.

Se analizó el recuento total aeróbico y el recuento de *S. aureus* (previa inoculación) a lo largo de la hidrólisis.

Se sembraron en el suero de queso concentrado dos cepas de *S. aureus*: ATCC 6538 P y C-243, en una concentración de  $10^4$ - $10^5$  bacterias/g de suero de queso concentrado. El inóculo provino de incubar cada cepa por separado en caldo BHI durante 24 horas a 37°C. Una vez inoculado el suero de queso concentrado, se agregó la enzima y se realizó la hidrólisis siguiendo el método descrito anteriormente. La reacción duró 7 horas y se alcanzó aproximadamente un 65 % de hidrólisis. A las 0, 3, 5 y 7,0 horas se tomaron muestras para realizar en ellas el recuento aeróbico total y el de *S. aureus*. El recuento aeróbico se realizó en Agar para Recuento en Placa y el de *S. aureus* en Agar Baird-Parker. Para esta experiencia se utilizó suero de queso concentrado sin conservador (control), suero de

queso concentrado con 0,2 % p/p de sorbato de potasio (SK), suero de queso concentrado con 0,2 % p/p de propionato de calcio (PCa) y suero de queso concentrado con 0,1 % p/p de sorbato de potasio + 0,1 % p/p de propionato de calcio. Las experiencias fueron realizadas por duplicado al igual que los recuentos.

#### 5.3.4. Determinación de la estabilidad microbiológica del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado

##### Bacterias

Se analizó en suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado, previa inoculación con *Staphylococcus aureus*, la evolución de los recuentos de *S. aureus* y de bacterias aerobias propias del suero. Por otro lado en suero de queso concentrado deteriorado e hidrolizado se analizó la evolución de los recuentos de las bacterias aerobias propias del suero.

En la primera experiencia, el suero concentrado (recién recibido de la planta de fabricación) se hidrolizó siguiendo la metodología descrita en el ítem anterior. El conservador se agregó 24 horas antes de realizar el proceso. Una vez hidrolizado el suero se ajustó el pH al valor deseado (5,0 ó 5,5) para el almacenamiento. Los conservadores y las concentraciones utilizadas de los mismos fueron: 0,2 % p/p de sorbato de potasio, 0,2 % p/p de propionato de calcio y 0,1 % p/p de sorbato de potasio + 0,1 % p/p de propionato de calcio. Como controles se utilizó: suero de queso concentrado sin hidrolizar a pH=6,0 y dos controles de suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado (sin agregado de conservante), uno a pH=6,0 y

otro a pH=5,0.

Para obtener el inóculo de *S. aureus* se preparó una suspensión de cada cepa en caldo BHI y se incubó 24 horas. Para preparar las muestras a ser almacenadas se colocaron, en forma estéril, 50 g de cada suero en frascos de vidrio estériles con cierre hermético. Estas muestras se inocularon con 0,5 ml de cada cepa de *S. aureus* de forma tal de obtener un recuento inicial de  $10^4$ - $10^5$  UFC/g suero. Se mezclaron en forma estéril, se cerraron y se almacenaron los frascos a 37°C. Se realizó periódicamente el recuento aeróbico total y el de *S. aureus*. Para esto se diluía 1 g o más de cada suero en 9 ml de agua peptona estéril, se agitaba bien, se hacían las diluciones necesarias y se realizaba el recuento aeróbico total en Agar para Recuento en Placa (Elliot y col., 1987) y el recuento de *S. aureus* en Agar Baird-Parker (Baird-Parker, 1969).

En la segunda experiencia se analizó la evolución de los recuentos de la flora nativa del suero. Para esto se dejó 3 semanas a temperatura ambiente suero de queso concentrado. Al cabo de este tiempo se obtuvo un recuento de bacterias aerobias de  $3,5 \cdot 10^5$  UFC/g. Este suero se hidrolizó según la técnica descripta anteriormente, previo agregado de 0,2 % p/p de sorbato de potasio ó 0,2 % p/p de propionato de calcio ó 0,1 % p/p de sorbato de potasio + 0,1 % p/p de propionato de calcio y ajuste del pH a 6,0 en cada caso. Una vez alcanzado aproximadamente un 65 % de hidrólisis se llevó a pH=5,0 y se almacenó de la misma forma que las muestras del párrafo anterior (todas las muestras se almacenaron por duplicado). Como controles se utilizó: suero de queso concentrado a pH 6,0 y suero de queso

concentrado parcialmente hidrolizado a pH 5,0, ambos sin conservador. Los recuentos de bacterias aerobias se realizaron por duplicado en Agar para Recuento en Placa.

### Levaduras

El inóculo de levaduras se obtuvo por incubación de una suspensión de células de cada levadura en Caldo Glucosa 2 % p/p, según Sabouraud, durante 24 horas a 25°C. Se estimó el crecimiento de las mismas por medio de la cámara de Neubauer. Una vez obtenido el inóculo, la forma de operación fue la misma que la empleada para *S. aureus*. En este caso se trabajó con suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado preservado a pH=5,0 y como controles se utilizó suero sin hidrolizar a pH=6,0 y suero hidrolizado sin conservador a pH=5,0. Los recuentos se realizaron en Agar Papa-Glucosa y se incubaron 3-4 días a 25°C. Todas las experiencias se realizaron por duplicado, como así también los recuentos.

### Hongos

Para obtener la suspensión de esporas de hongos a ser inoculadas, se incubaron durante 7-10 días estrías en Agar Papa-Glucosa inclinado para cada hongo. Una vez que los hongos esporularon se tomó el inóculo con 5 ml de agua y glicerol al que se había agregado 0,5 ml de Tween 80 (Horner y Anagnostopoulos, 1973). La  $a_w$  de esta solución fue 0,90, igual a la del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado. De esta forma se evitaba crear, al inocular, una zona de mayor actividad de agua dentro del suero que pudiera favorecer la germinación de las esporas de los hongos en el lugar de la siembra. Se colocaron 20 g de:

suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH=5,0 preservado con 0,2 % p/p de sorbato de potasio, 0,2 % p/p de propionato de calcio ó 0,1 % p/p de sorbato de potasio + 0,1 % p/p de propionato de calcio, y de los controles (suero de queso concentrado y suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado ambos a pH 5,0 y Agar Papa-Glucosa) en cajas de Petri. Se inoculó el centro de cada caja con 20  $\mu$ l de la suspensión de esporas cuya concentración fue  $10^6$ - $10^7$  esporas/ml, calculado por medio de la cámara de Neubauer. Las placas inoculadas se almacenaron a 25°C, envasadas herméticamente en polietileno a fin de evitar la pérdida de humedad de las placas. El crecimiento de las placas fue definido como la formación de una colonia superficial lo suficientemente grande como para ser visible a simple vista. Todas las placas fueron sembradas por duplicado.

El tiempo de almacenamiento para todos los casos fue de tres meses a la temperatura óptima de crecimiento para el microorganismo en estudio.

#### 5.4. Resultados y discusión

##### 5.4.1. Estabilidad microbiológica del suero de queso concentrado durante la hidrólisis

Dado el valor de la actividad de agua del suero de queso concentrado (que varía de 0,94-0,95 a 0,90-0,89 al principio y fin de la hidrólisis respectivamente) y a las características aeróbicas del proceso de hidrólisis, no es posible el crecimiento de otro patógeno que no sea *Staphylococcus aureus* (Vaamonde y col., 1982; Lotter y Leistner, 1978). Por lo tanto en esta parte del trabajo se



estudió cómo evolucionó la flora aeróbica nativa y un inóculo de *S. aureus* durante el proceso de hidrólisis.

En las Figuras 5.1, 5.2 y 5.3 se representa la evolución del recuento total aeróbico y de *S. aureus* a lo largo de las 7 horas de hidrólisis para suero sin conservador y para suero con 0,2 % p/p de sorbato de potasio, 0,2 % p/p de propionato de calcio ó 0,1 % p/p de sorbato de potasio + 0,1 % p/p de propionato de calcio respectivamente. Para las figuras se utilizó la siguiente nomenclatura: SQC: suero de queso concentrado, SCQH: suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado, SK: sorbato de potasio, PCa: propionato de calcio. Cuando se trabajó sin conservador, al cabo de 7 horas de hidrólisis, la población de *S. aureus* y de bacterias aerobias aumentó su concentración en aproximadamente 0,3 ciclos logarítmicos. Al utilizar cualquiera de las combinaciones propuestas de conservador, los recuentos se mantuvieron aproximadamente estables, es decir que no hubo crecimiento de bacterias mesófilas ni de *S. aureus* durante la hidrólisis de lactosa.

Como conclusión, puede decirse que una contaminación accidental con *S. aureus* no tendrá consecuencias graves sobre la estabilidad microbiológica del suero hidrolizado preservado durante el tiempo que dura la hidrólisis. Sin embargo, sí puede verse afectado el suero hidrolizado sin conservador. Asimismo se concluye que, pese a que el suero permanece 7 horas a 37°C, los recuentos de bacterias mesófilas y de *S. aureus* no sufren gran variación en presencia de sorbato de potasio, propionato de calcio y/o la combinación de ambos.

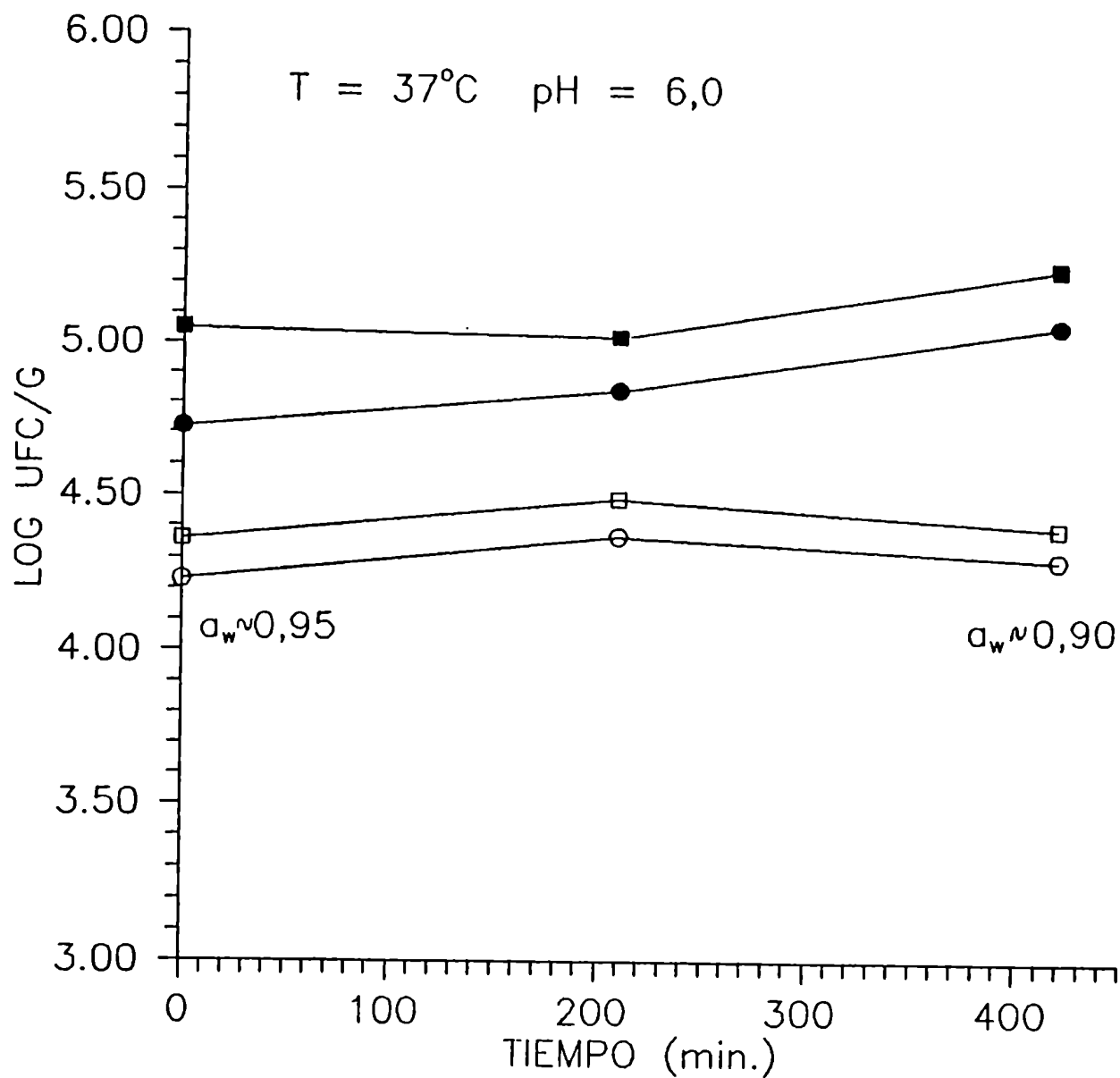


Figura 5.1:

Evolución del recuento total aeróbico y de *S. aureus*, en presencia de 0,2 % p/p de SK, durante la hidrólisis de lactosa en SQC. □ Recuento total aeróbico, 0,2 % p/p de SK; ■ Recuento total aeróbico, control; ○ *S. aureus*, 0,2 % p/p SK; ● *S. aureus*, control.

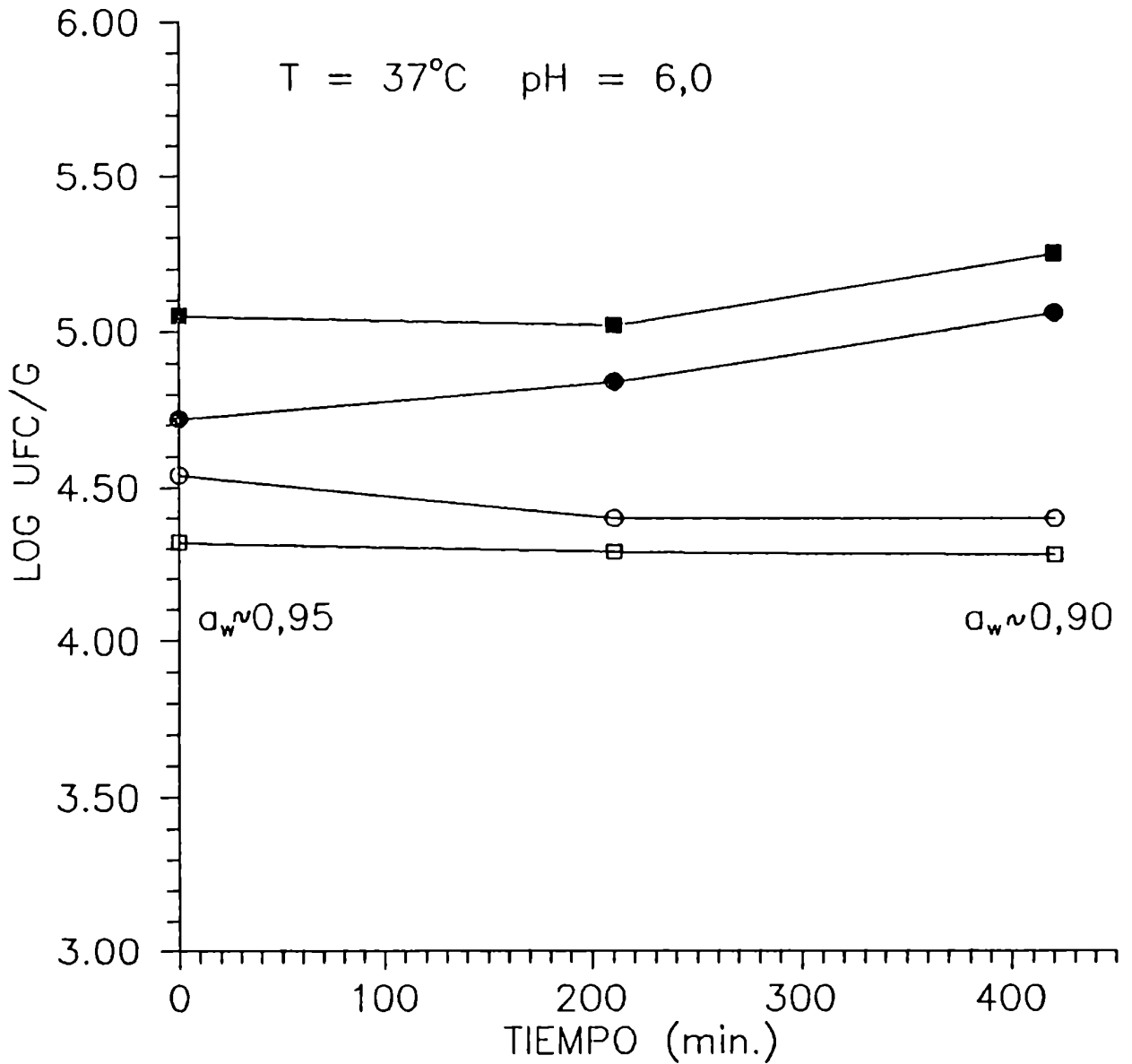


Figura 5.2:

Evolución del recuento total aeróbico y de *S. aureus*, en presencia de 0,2 % p/p de PCa, durante la hidrólisis de lactosa en SQC. □ Recuento total aeróbico, 0,2 % p/p de PCa; ■ Recuento total aeróbico, control; ○ *S. aureus*, 0,2 % p/p PCa; ● *S. aureus*, control.

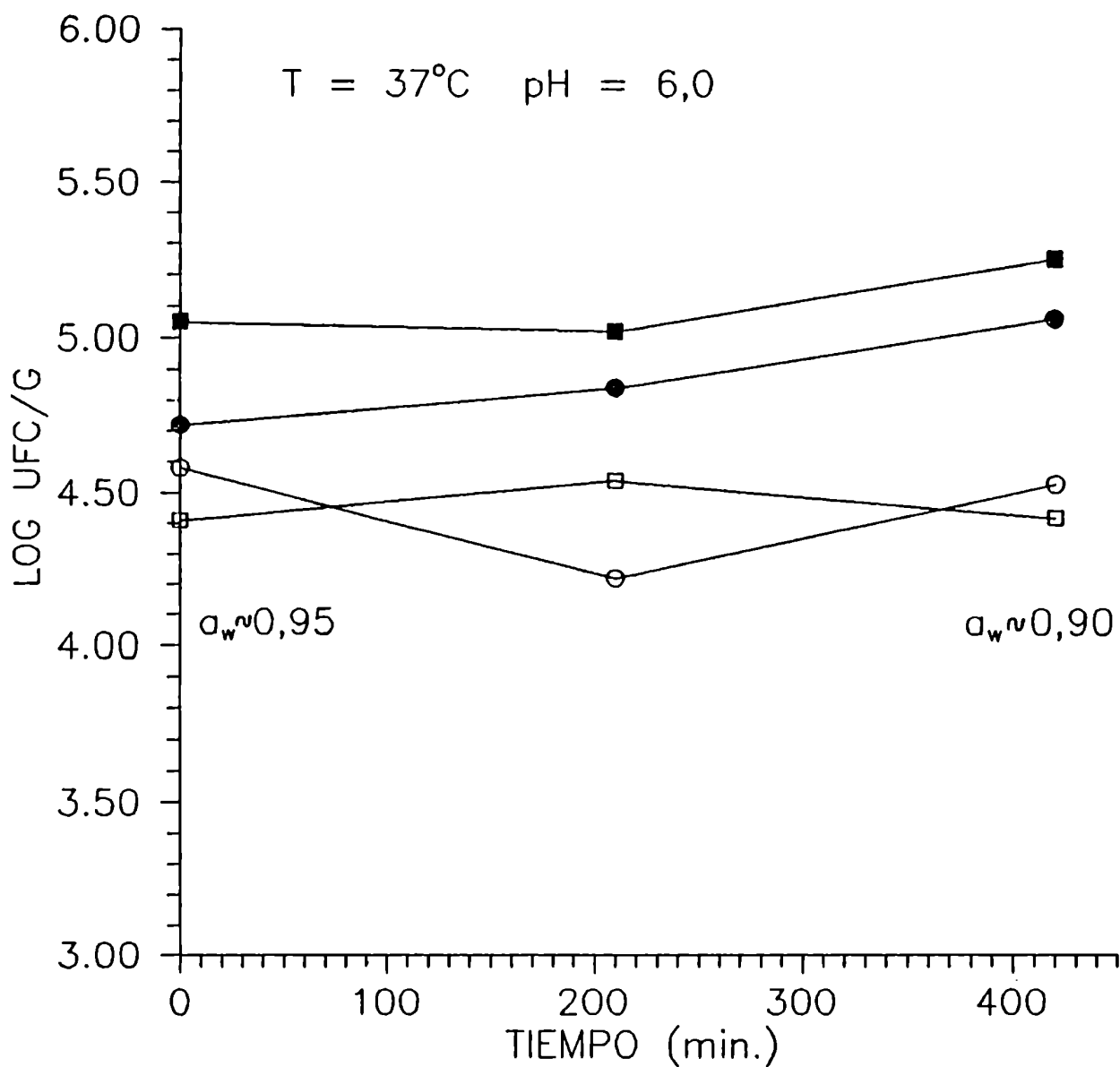


Figura 5.3:

Evolución del recuento total aeróbico y de *S. aureus*, en presencia de 0,1 % p/p SK + 0,1 % p/p de PCa, durante la hidrólisis de lactosa en SQC. □ Recuento total aeróbico, 0,1 % p/p SK + 0,1 % p/p de PCa; ■ Recuento total aeróbico, control; ○ *S. aureus*, 0,1 % p/p de SK + 0,1 % p/p PCa; ● *S. aureus*, control.

#### 5.4.2. Estabilidad microbiológica del suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado preservado durante el almacenamiento

Una vez comprobado que durante las 7 horas a 37°C que permanece el suero en el reactor no hay deterioro microbiológico bacteriano y que una contaminación accidental con *Staphylococcus aureus* no producirá problemas sanitarios en el mismo, se procedió a estudiar la estabilidad microbiológica del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado de  $a_w = 0,89-0,90$ , preservado por ajuste del pH a 5,5 ó 5,0 y agregado de 0,2 % p/p de sorbato de potasio, 0,2 % p/p de propionato de calcio ó 0,1 % p/p de sorbato de potasio + 0,1 % p/p de propionato de calcio, a lo largo de tres meses de almacenamiento. Los almacenamientos se realizaron a la temperatura óptima del microorganismo estudiado (37°C para bacterias y 25°C para levaduras y hongos).

##### 5.4.2.1. Bacterias aerobias totales y *Staphylococcus aureus*

Se estudió la evolución durante el almacenamiento de las bacterias aerobias totales propias del suero y de *S. aureus* inoculado en el suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado preservado. Se utilizó suero concentrado fresco con un recuento inicial de bacterias aerobias de  $10^3$  UFC/g. Se inoculó *S. aureus* (ATCC 6538 P y C-243) en una concentración del orden de  $10^4$  UFC/g y se realizaron los recuentos de bacterias aerobias totales y de *S. aureus* a lo largo del tiempo de almacenamiento. Se

trabajó con dos pH, 5,0 y 5,5 y tres combinaciones de conservador: 0,2 % p/p de sorbato de potasio, 0,2 % p/p de propionato de calcio y 0,1 % p/p de sorbato de potasio + 0,1 % p/p de propionato de calcio. En todas las muestras la actividad de agua fue de 0,89-0,90. Se utilizaron como controles suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH=6,0 y a pH=5,0 y suero de queso concentrado a pH=6,0, ambos sin conservador. En las Figuras 5.4 y 5.5 se encuentran los resultados obtenidos para los recuentos durante el almacenamiento para bacterias aerobias totales y *S. aureus* respectivamente, ambas en la misma muestra de suero.

Con respecto al crecimiento de *S. aureus* (Figura 5.4) en los controles, se puede observar que, mientras en el control de suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH=6,0 creció sin problemas, en el control de pH=5,0 esta bacteria tiene dificultades para crecer. En cambio las bacterias aerobias (Figura 5.5) presentes aumentaron a lo largo del tiempo en ambos controles. Esto indicaría que una pequeña variación en las condiciones del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado, en este caso pasar de pH 6,0 a pH 5,0, dificulta el crecimiento del *S. aureus* en el mismo, aunque no impide el crecimiento de las bacterias aerobias. Por lo tanto el suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado cuyo pH ha sido ajustado a 5,0 no sería el sustrato ideal para el desarrollo de *S. aureus*. Según los resultados obtenidos por Notermans y Heuvelman (1983) en caldo BHI de actividad de agua reducida por agregado de sacarosa, a  $a_w$  0,90 (la  $a_w$  del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado) y pH 5,5, el *S. aureus* es capaz de crecer a 30°C y 24°C pero no

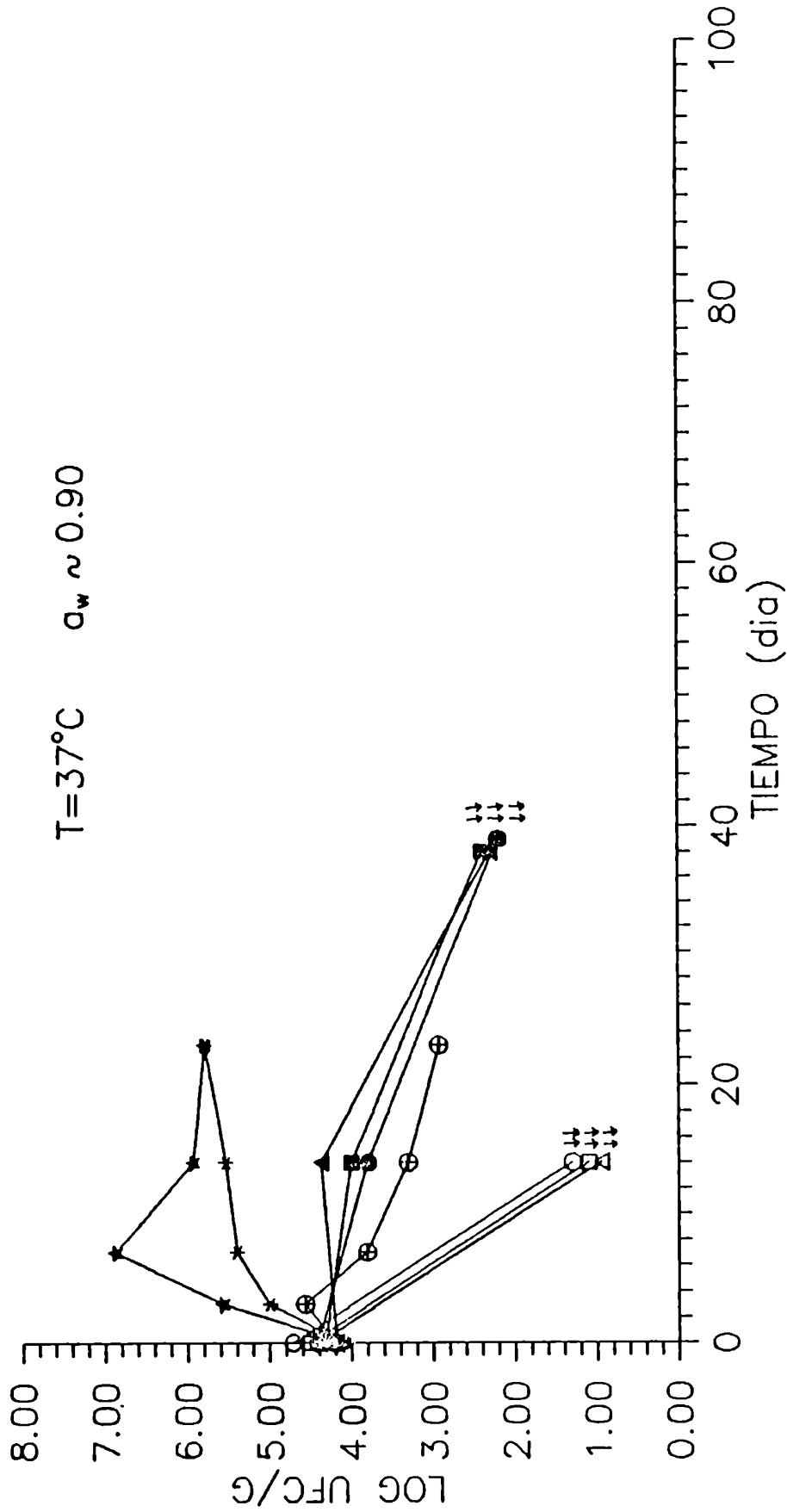


Figura 5.4:

Evolución del recuento de *S. aureus* en SQCH con 0,2 % p/p de conservador, almacenado a  $37^{\circ}\text{C}$ .  $\Delta$  0,2 % p/p SK, pH=5,0;  $\blacktriangle$  0,2 % p/p SK, pH=5,5;  $\square$  0,2 % p/p PCA, pH=5,0;  $\blacksquare$  0,2 % p/p PCA, pH=5,5;  $\circ$  0,1 % p/p SK + 0,1 % p/p PCA, pH=5,0;  $\bullet$  0,1 % p/p SK + 0,1 % p/p PCA, pH=5,5. Controles:  $\star$  SQCH, pH=5,0;  $\oplus$  SQCH, pH=5,0;  $\star$  SQCH, pH=6,0.  $\Downarrow$  recuento nulo ó menor a 30 UFC por Flaca.

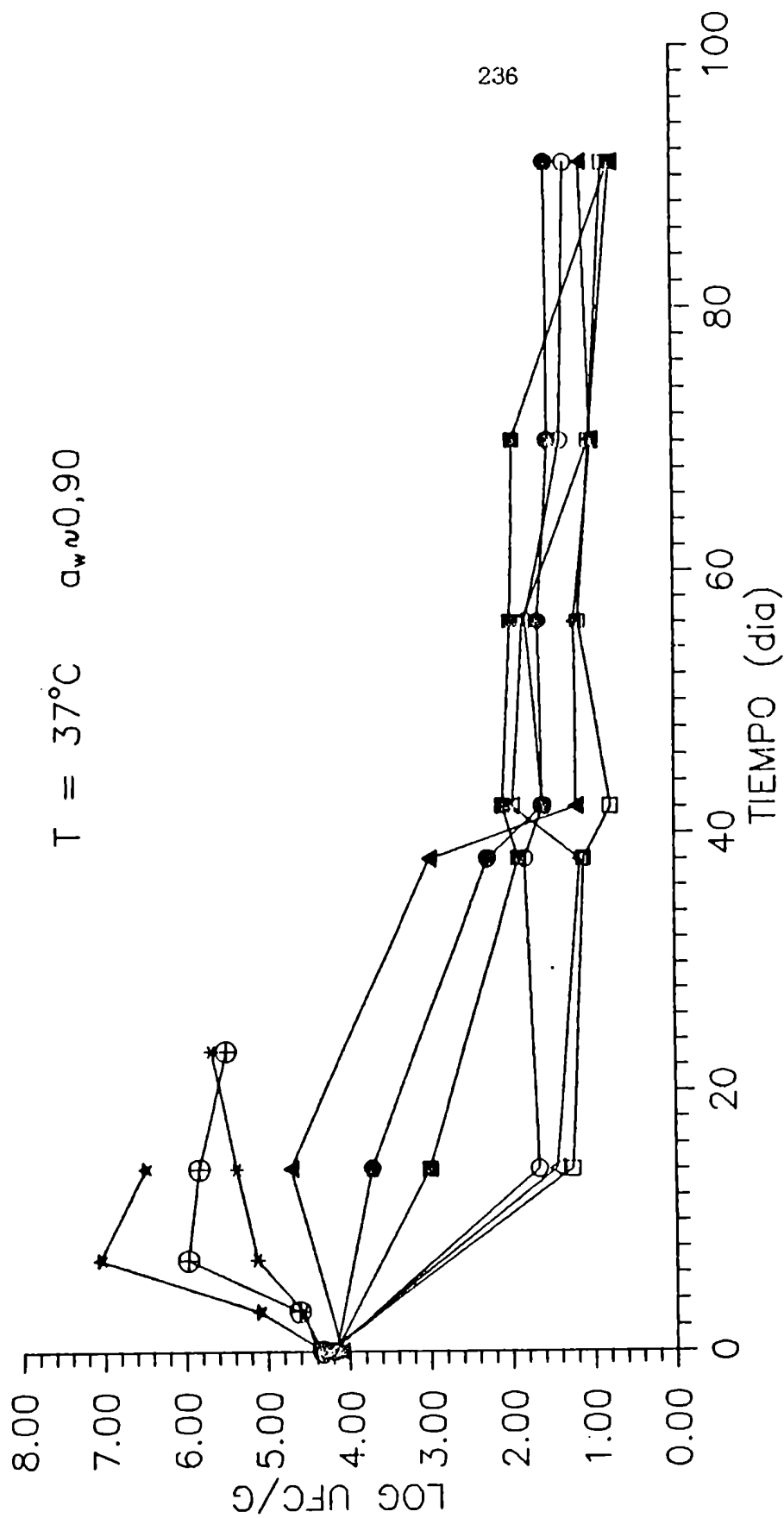


Figura 5.5:  
 Evolución del recuento de bacterias aerobias totales en SQCH con 0,2 % p/p de conservador (en presencia de *S. aureus*), almacenado a 37°C. Δ 0,2 % p/p SK, pH=5,0; ▲ 0,2 % p/p SK, pH=5,5; □ 0,2 % p/p propionato de calcio, pH=5,0; ● 0,2 % p/p PCa, pH=5,5; ○ 0,1 % p/p SK + 0,1 % p/p PCa, pH=5,0; ● 0,1 % p/p SK + 0,1 % p/p PCa, pH=5,5. Controles: ★ SQCH, pH=6,0; ⊕ SQCH, pH=5,0; ⊗ SQCH, pH=6,0.



a menor temperatura y a pH 4,9 sólo crece a 30°C. No observaron crecimiento cuando la  $a_w$  se ajustó con cloruro de sodio. Es decir que esta última condición inhibe el crecimiento de *S. aureus* en el caldo BHI. Para el caso del control de suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado en el que *S. aureus* no creció, la temperatura de incubación fue la óptima, 37°C, la  $a_w$  0,89-0,90 y el pH 5,0, condiciones un poco menos favorables que las empleadas por los autores Notermans y Heuvelman (1983); por lo tanto es explicable que no crezca.

En el caso de suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado preservado, es decir con el agregado de conservadores y ajuste de pH, los recuentos de bacterias aerobias totales y de *S. aureus*, disminuyeron rápidamente, llegándose a la pérdida casi total de viabilidad al cabo de 15-30 días. A pH=5,0 el descenso de los recuentos fue mucho más rápido que a pH=5,5, pero para ambos casos se llegó al mismo resultado final.

El efecto del pH debe explicarse, por un lado, por su efecto sobre la disociación de los conservadores. La efectividad de los conservadores utilizados es función del pH y ésta aumenta a medida que el pH se acerca al valor de su pKa ó es menor que el mismo (4,75 para sorbato de potasio y 4,90 para propionato de calcio (Parada y col., 1982; Corlett y Brown, 1980)). Por otro lado, se debe tener en cuenta el efecto 'per se' del ácido empleado para acidificar el medio. Para *S. aureus* C-243, una de las cepas empleadas en este trabajo, se ha reportado que a bajos niveles de  $a_w$  el ácido fosfórico es muy efectivo para inhibir el crecimiento. Para pH=5,6 y  $a_w$ =0,91 el tiempo de

generación cuando se acidifica con ácido fosfórico es de 9,05 horas mientras que si se acidifica con ácido cítrico, acético o clorhídrico los tiempos de generación son de 3,2-4,9 horas (Troller, 1985).

Dado que en las condiciones ensayadas anteriormente los recuentos disminuían muy rápidamente, se realizó una experiencia utilizando menor cantidad de conservador: 0,1 % p/p de sorbato de potasio ó 0,1 % p/p de propionato de calcio, ambos a pH=5,0. En la Figura 5.6 se encuentran los resultados obtenidos. Como puede observarse la población de *S. aureus* y de bacterias aerobias totales disminuyó de forma tal que a los 20-30 días los recuentos eran de alrededor de 10 UFC/g. Los resultados obtenidos indican que las menores concentraciones de conservador/es utilizadas también pueden reducir en forma rápidamente y con igual efectividad la población inicial de bacterias mesófilas y de *S. aureus*.

Para estudiar la estabilidad microbiológica del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado con una alta carga microbiana inicial, se utilizó suero deteriorado (dejado a temperatura ambiente durante 3 semanas) hasta llegar a un recuento de bacterias aerobias de  $3,5 \cdot 10^5$  UFC/g, Luego se ajustó el pH a 5,0 y se agregó el conservador (0,2 % p/p de sorbato de potasio, 0,2 % p/p de propionato de calcio ó 0,1 % p/p de sorbato de potasio + 0,1 % p/p de propionato de calcio). De esta manera pudo estudiarse el comportamiento de la flora aerobia propia del suero, con mayor concentración inicial y además sin que interfiriera en su evolución la presencia de *S. aureus*. Los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 5.7. Como se puede observar, los recuentos, tanto del control de suero de queso

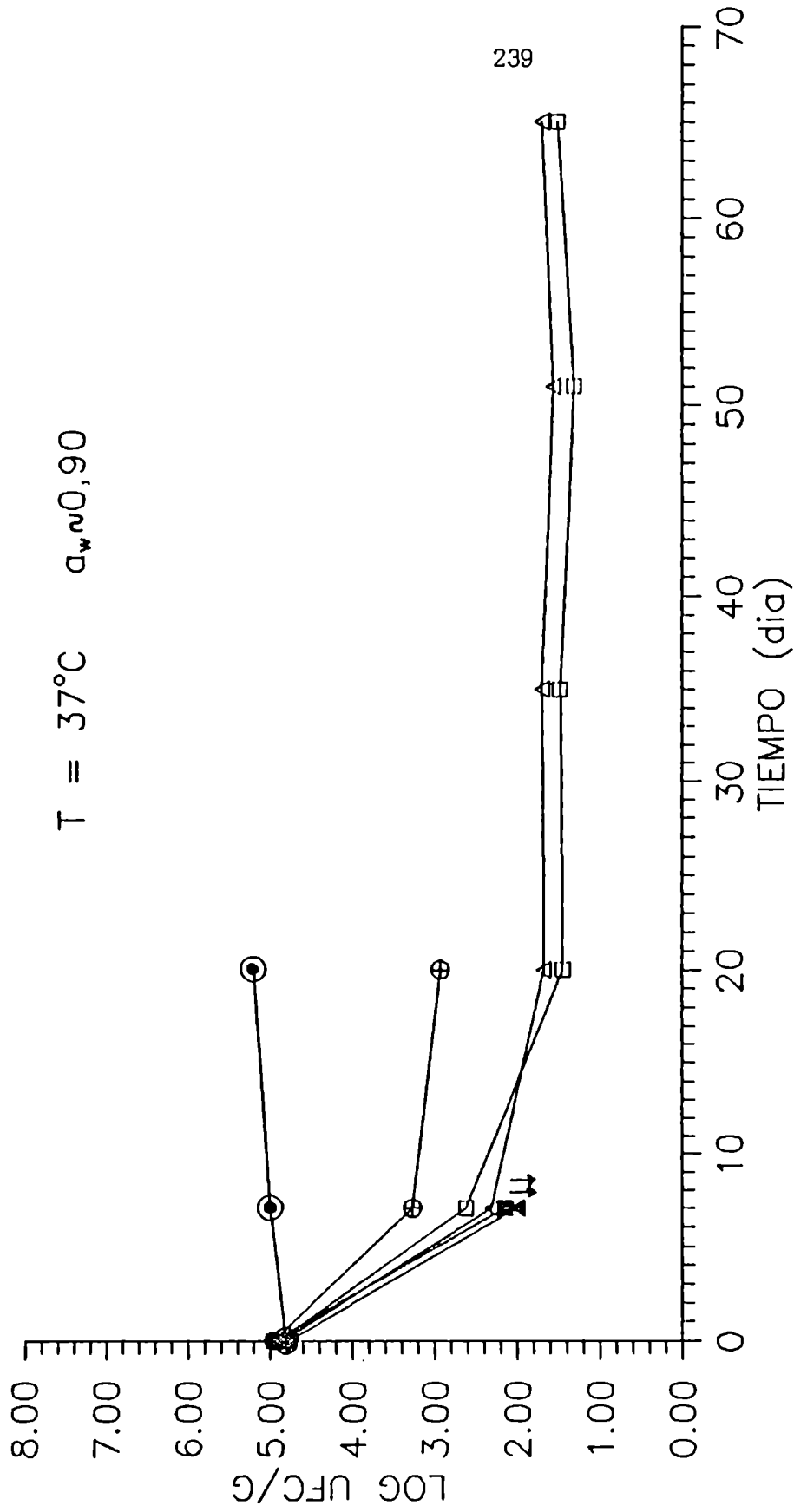


Figura 5.6:

Evolución de los recuentos de *S. aureus* y de bacterias aerobias (uno en presencia del otro) en SQCH a pH 5,0 con 0,1 % p/p de conservador y almacenado a 37°C. Bacterias aerobias:  $\Delta$  0,1 % p/p SK;  $\square$  0,1 % p/p PCa;  $\odot$  control SQCH, pH=5,0. *S. aureus*:  $\blacktriangle$  0,1 % p/p SK;  $\blacksquare$  0,1 % p/p PCa;  $\oplus$  control SQCH, pH=5,0.  $\Downarrow$  recuento nulo ó menor a 30 UFC por placa.

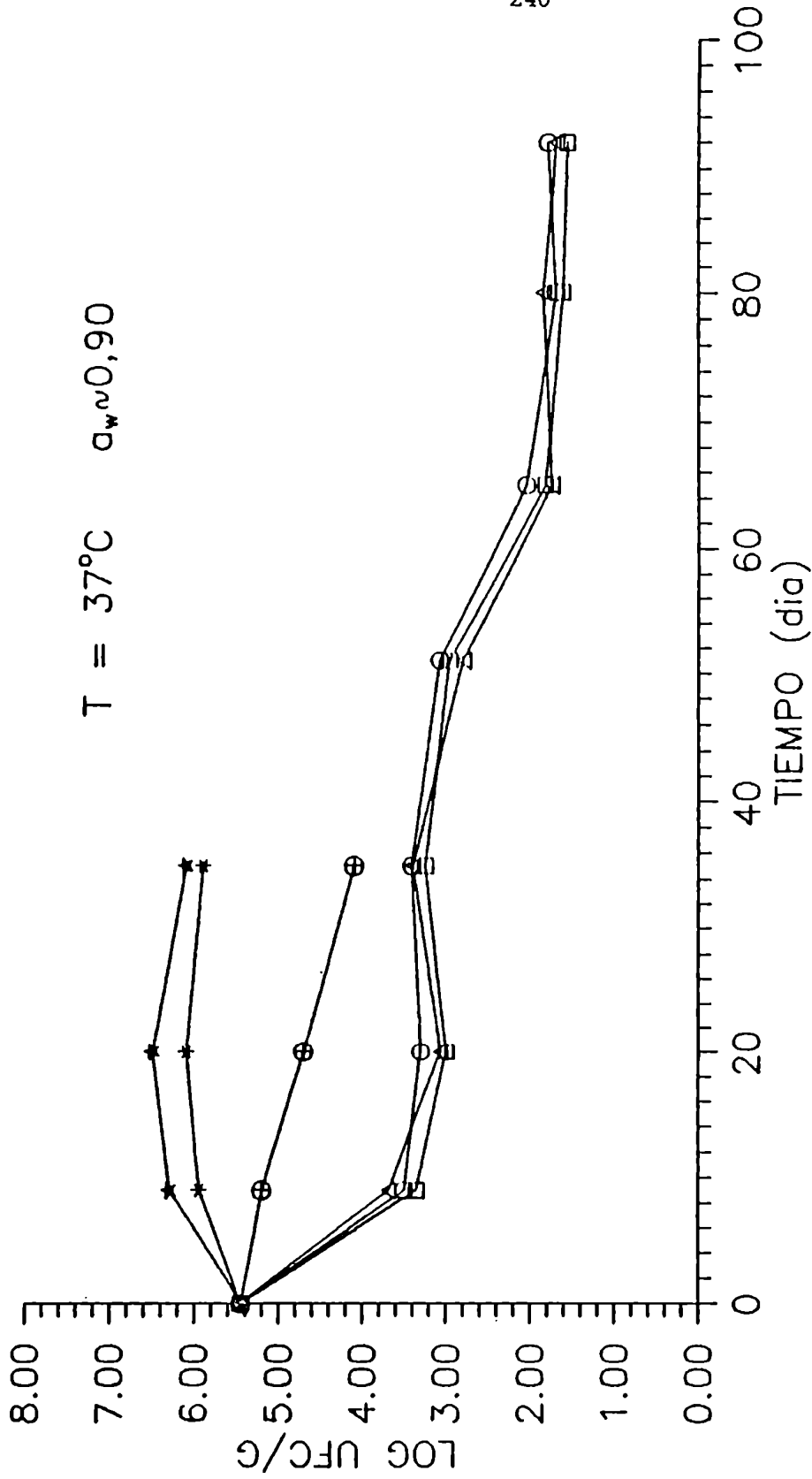


Figura 5.7:

Evolución de los recuentos totales de bacterias aerobias en SQCH con 0,2 % p/p de conservador, almacenado a  $37^{\circ}\text{C}$ .  $\Delta$  0,2 % p/p SK, pH=5,0;  $\square$  0,2 % p/p PCa, pH=5,0;  $\circ$  0,1 % p/p SK + 0,1 % p/p PCa, pH=5,0.    Controles:  $\oplus$  SQCH, pH=6,0;  $\star$  SQCH, pH=5,0;  $\star$  SQC, pH=6,0.

concentrado parcialmente hidrolizado a pH=5,0 como de las muestras preservadas, disminuyen a lo largo del tiempo. En los otros controles hubo crecimiento. Si se comparan los controles de suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH 5,0 de las figuras 5.5 y 5.7 se observa que para esta última los recuentos disminuyeron en función del tiempo, mientras que en la Figura 5.5 al principio hubo crecimiento. Esto puede explicarse en base a las diferencias que existían entre los dos sueros de queso concentrado empleados. Para la primera experiencia realizada se trataba de suero concentrado que había sido mantenido siempre bajo refrigeración. El suero de la segunda experiencia fue dejado a temperatura ambiente durante bastante tiempo a fin de aumentar los recuentos y no se sabía en qué fase de su crecimiento se encontraban las bacterias aerobias presentes en el mismo. Es posible que se encontraran en su fase estacionaria o declinante, lo cual explicaría el descenso de los recuentos. Estos resultados no deben considerarse para concluir que en el suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH=5,0 sin preservar no pueden crecer las bacterias aerobias.

#### 5.4.2.2. Levaduras y hongos

El límite de  $a_w$  para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* es 0,89 (Pitt y Hocking, 1985) en un medio de glucosa a pH 6,0. Debido a que esta  $a_w$  es muy cercana a la  $a_w$  del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado se procedió, en primera instancia, a determinar si esta levadura era capaz de crecer en el suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH=5,0 sin ningún

conservador. Se inoculó esta levadura en el suero correspondiente en cantidad tal que resultó un recuento de  $7,11 \cdot 10^4$  UFC/g y se incubó a  $25^\circ\text{C}$ . Luego de 14 días de incubación el recuento fue de  $8,12 \cdot 10^4$  UFC/g y a los 21 días de  $1,01 \cdot 10^6$  UFC/g. Estos resultados demuestran que, si bien no crece rápidamente en este sustrato, su crecimiento no es inhibido: puede desarrollarse en el mismo. Dado que esta levadura crece con dificultad en suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado, para realizar el estudio de almacenamiento correspondiente se preservó el suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado sólo con 0,1 % p/p de sorbato de potasio ó con 0,1 % p/p de propionato de calcio y se ajustó el pH a 5,0. Como controles se utilizaron suero de queso concentrado a pH=6,0 y suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH=5,0, ambos sin conservador. Se inoculó la levadura de forma de obtener un recuento inicial de  $10^5$  UFC/g y las muestras fueron incubadas a  $25^\circ\text{C}$ . Los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 5.8. Como puede observarse *S. cerevisiae* no puede crecer en el suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado preservado con 0,1 % p/p de cada uno de los conservantes utilizados. Al cabo de 30-40 días los recuentos disminuyeron en 3 y 2 ciclos logarítmicos en presencia de sorbato de potasio ó propionato de calcio respectivamente. Si bien los recuentos obtenidos con 0,1 % p/p de propionato de calcio son un orden mayor que con sorbato de potasio, son lo suficientemente bajos como para no producir deterioro. Por lo tanto se puede concluir que el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* es inhibido en suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado preservado con 0,1 % p/p de sorbato de potasio ó 0,1 % p/p de propionato de calcio durante los tres meses de almacenamiento.

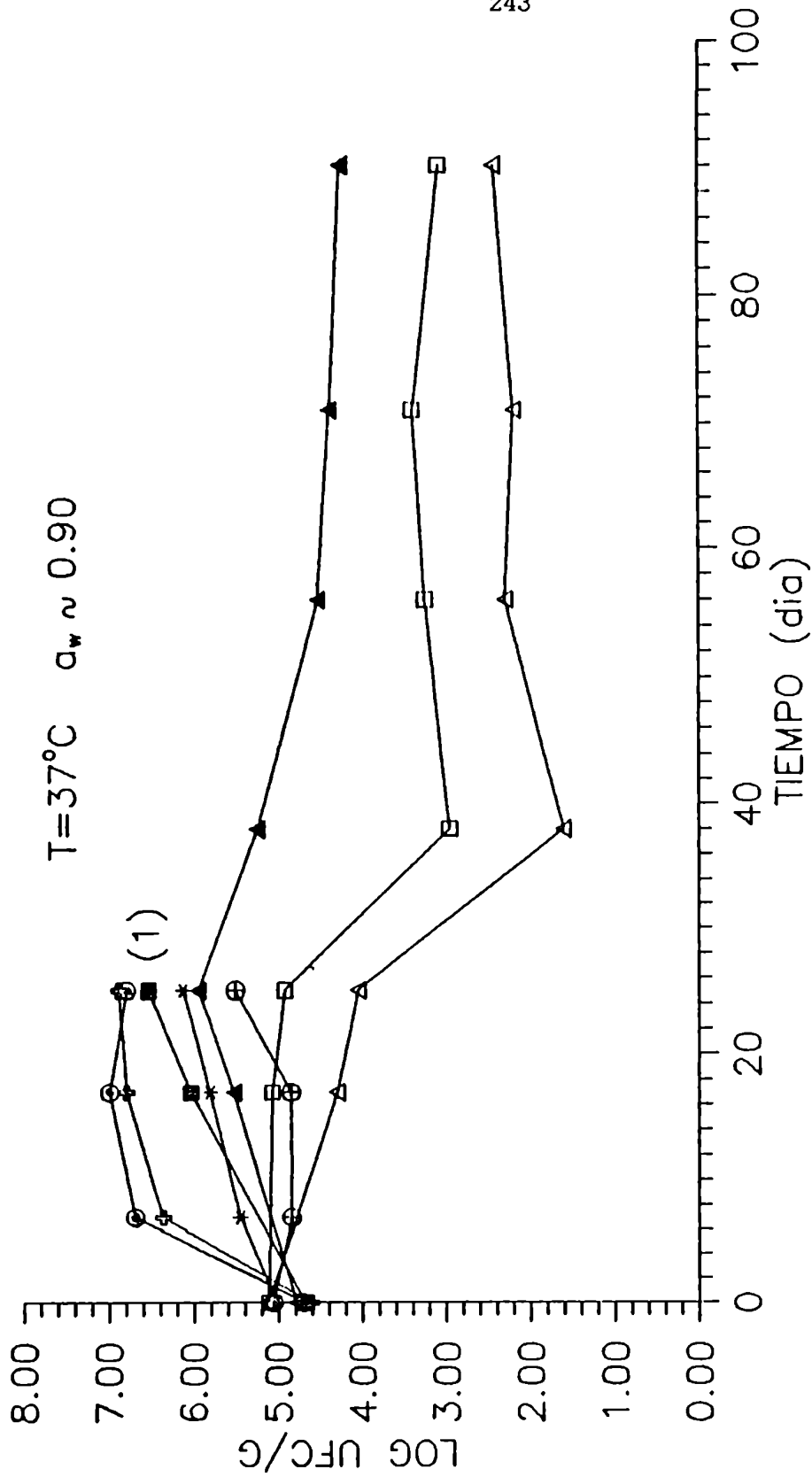


Figura 5.8:

Evolución de los recuentos de *S. cerevisiae* y de *S. rouxii* en SQCH con 0,1 % p/p de conservador y almacenado a 25°C. *S. cerevisiae*: ▲ 0,1 % p/p SK, pH=5,0; ⊖ 0,1 % p/p PCa, pH=5,0; ⊕ control SQCH, pH=5,0; \* control SQCH, pH=6,0. *S. rouxii*: ▲ 0,1 % p/p SK, pH=5,0; ■ 0,1 % p/p PCa, pH=5,0; ⊖ control SQCH, pH=5,0; ⊙ control SQCH, pH=6,0. (1) Rotura del frasco que contenía la muestra por excesiva producción de gas.

Respecto de la levadura *Saccharomyces rouxii*, en primer lugar se verificó la posibilidad de crecimiento de la misma en suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado preservado con 0,1 % p/p de sorbato de potasio ó 0,1 % p/p de propionato de calcio a pH=5,0. Los resultados obtenidos se encuentran también en la Figura 5.8. Se utilizó como control suero de queso concentrado a pH 6,0 y suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH 5,0, ambos sin conservador. Como puede observarse de la Figura 5.8, una concentración de 0,1 % p/p de propionato de calcio no es capaz de inhibir el crecimiento de *S. rouxii*, ya que su recuento aumentó hasta  $5,0 \cdot 10^6$  UFC/g, produciendo gas en cantidad suficiente como para romper el recipiente que contenía a la muestra. Con 0,1 % p/p de sorbato de potasio, si bien no se llegó a tal extremo, hubo producción de gas y los recuentos llegaron hasta valores cercanos a  $10^6$  UFC/g a los 17 días y luego descendieron lentamente. Este comportamiento indicó que estas condiciones no son adecuadas para controlar el crecimiento de *S. rouxii*.

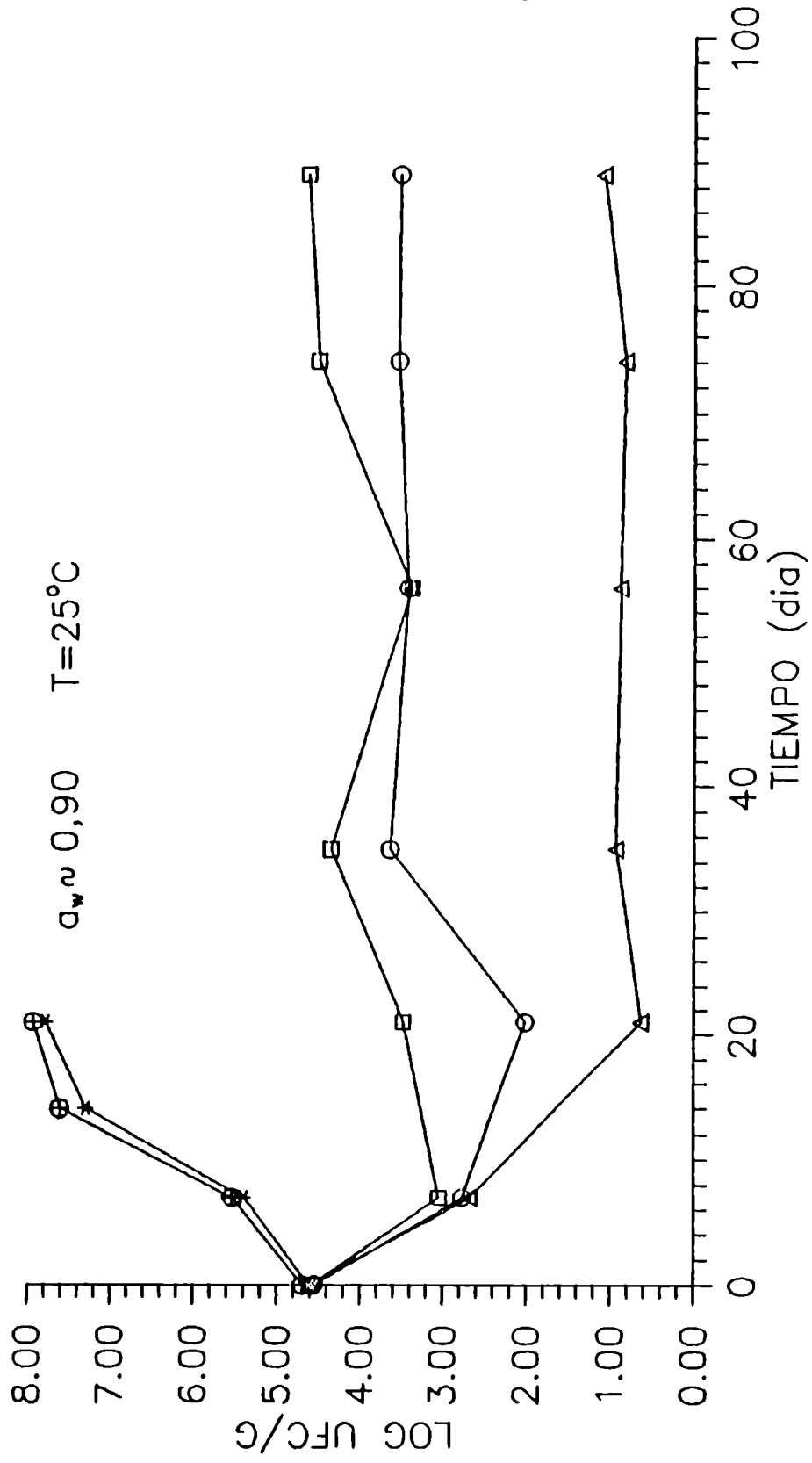
Se trabajó entonces aumentando la concentración total de conservador hasta 0,2 % p/p. Se utilizaron las siguientes concentraciones de conservador: 0,2 % p/p de sorbato de potasio, 0,2 % p/p de propionato de calcio ó 0,1 % p/p de sorbato de potasio + 0,1 % p/p de propionato de calcio. Los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 5.9. Con 0,2 % p/p de sorbato de potasio no sólo se consiguió un muy buen control del crecimiento de *S. rouxii*, sino que se eliminó casi toda la población a los 20 días de almacenamiento. Al utilizar 0,2 % p/p de propionato de calcio los recuentos obtenidos fueron aproximadamente tres



órdenes mayores que con sorbato de potasio y la concentración bacteriana se mantuvo levemente inferior al nivel inicial. Para el caso de la mezcla de sorbato y propionato los recuentos fueron intermedios entre los dos anteriores llegando a ser al final del almacenamiento un orden menor que el valor inicial. Evidentemente el sorbato de potasio, en una concentración de 0,2 % p/p, es el conservador más efectivo para impedir el deterioro del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado por acción de *S. rouxii*. Sin embargo cuando se utilizó la mezcla de sorbato de potasio+propionato de calcio ó solamente propionato de calcio, se logró controlar el crecimiento de esta levadura pues los recuentos obtenidos al final del almacenamiento no superaron los recuentos iniciales. Esto permite concluir que tanto 0,2 % p/p de cualquiera de los dos conservadores empleados como la mezcla de ambos son aptos para controlar el crecimiento de *S. rouxii* en suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH 5,0 a lo largo de un almacenamiento de tres meses.

En todos los estudios microbiológicos que se realizaron a continuación no se analizaron las condiciones de 0,1 % p/p de sorbato de potasio ó 0,1 % p/p de propionato de calcio, ya que demostraron no ser suficientes para controlar el crecimiento de *S. rouxii* en suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado.

Otra levadura estudiada fue *Saccharomyces bailii*. En la Figura 5.10 se muestran los resultados obtenidos con *S. bailii* inoculada en suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH 5,0 y preservado con 0,2 % p/p de sorbato de potasio, 0,2 % p/p de propionato de calcio y 0,1 % p/p de



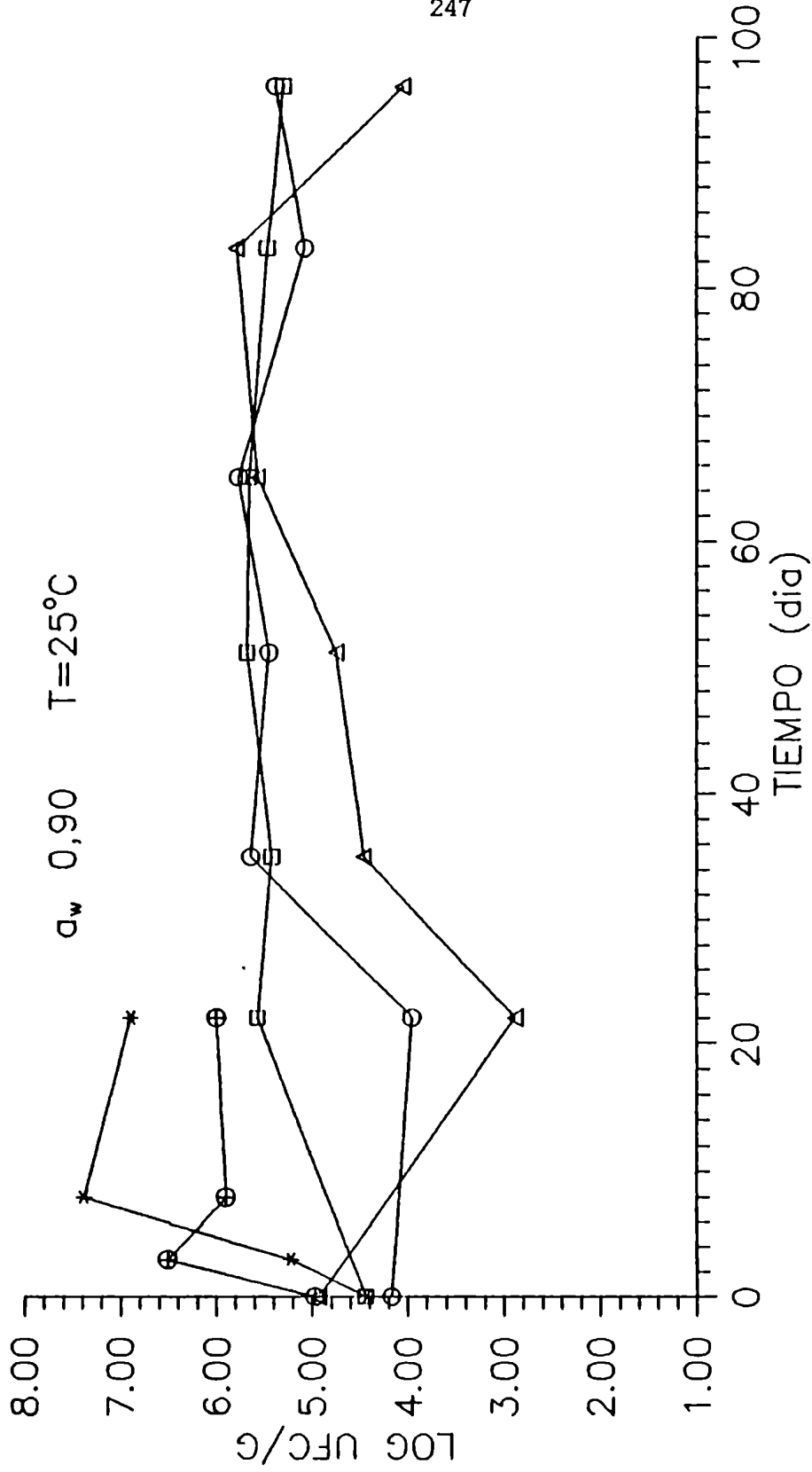


Figura 5.10:

Crecimiento de *S. baillii* en SQCH con 0,2 % p/p de conservador y almacenado a  $25^\circ\text{C}$ . 0,2 % p/p SK, pH=5,0; ○ 0,2 % PCa, pH=5,0; ⊕ 0,1 % p/p SK + 0,1 % p/p de PCa, pH=5,0; △ control SQCH, pH=5,0; \* control SQCH, pH=6,0.

sorbato de potasio + 0,1 % p/p de propionato de calcio y almacenado a 25°C. De todas las levaduras ensayadas, *S. bailii* demostró ser la más resistente a las condiciones del medio. Si bien no fue capaz de desarrollar en exceso (su concentración aumentó un orden o menos), su población se mantuvo aproximadamente constante a lo largo del almacenamiento para todas las condiciones ensayadas. Se debe tener en cuenta que *S. bailii* es resistente a determinadas concentraciones de sorbato de potasio, con lo cual la eficacia de este conservador es menor que para los otros microorganismos utilizados. Los resultados aquí obtenidos confirman la gran resistencia de esta levadura a los factores de estrés, lo cual hace peligrosa su presencia en cualquier alimento que se desee almacenar. Para suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado preservado, todas las condiciones en que se trabajó demostraron ser igualmente efectivas para impedir el crecimiento de *S. bailii*.

Los recuentos obtenidos con *Debaryomyces hansenii* durante el almacenamiento se encuentran en la Figura 5.11. Se trabajó con suero hidrolizado preservado en las mismas condiciones que para la levadura anterior. En estas condiciones, al cabo de una semana la población había descendido a menos de 10 UFC/g, lo cual demuestra que esta levadura no puede crecer en el suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado preservado.

Por último se analizó el crecimiento de varias especies de hongos. En la Tabla 5.2 se presentan los resultados obtenidos con los hongos inoculados en: Agar Papa-Glucosa (control); suero de queso concentrado (control); suero de queso concentrado parcialmente

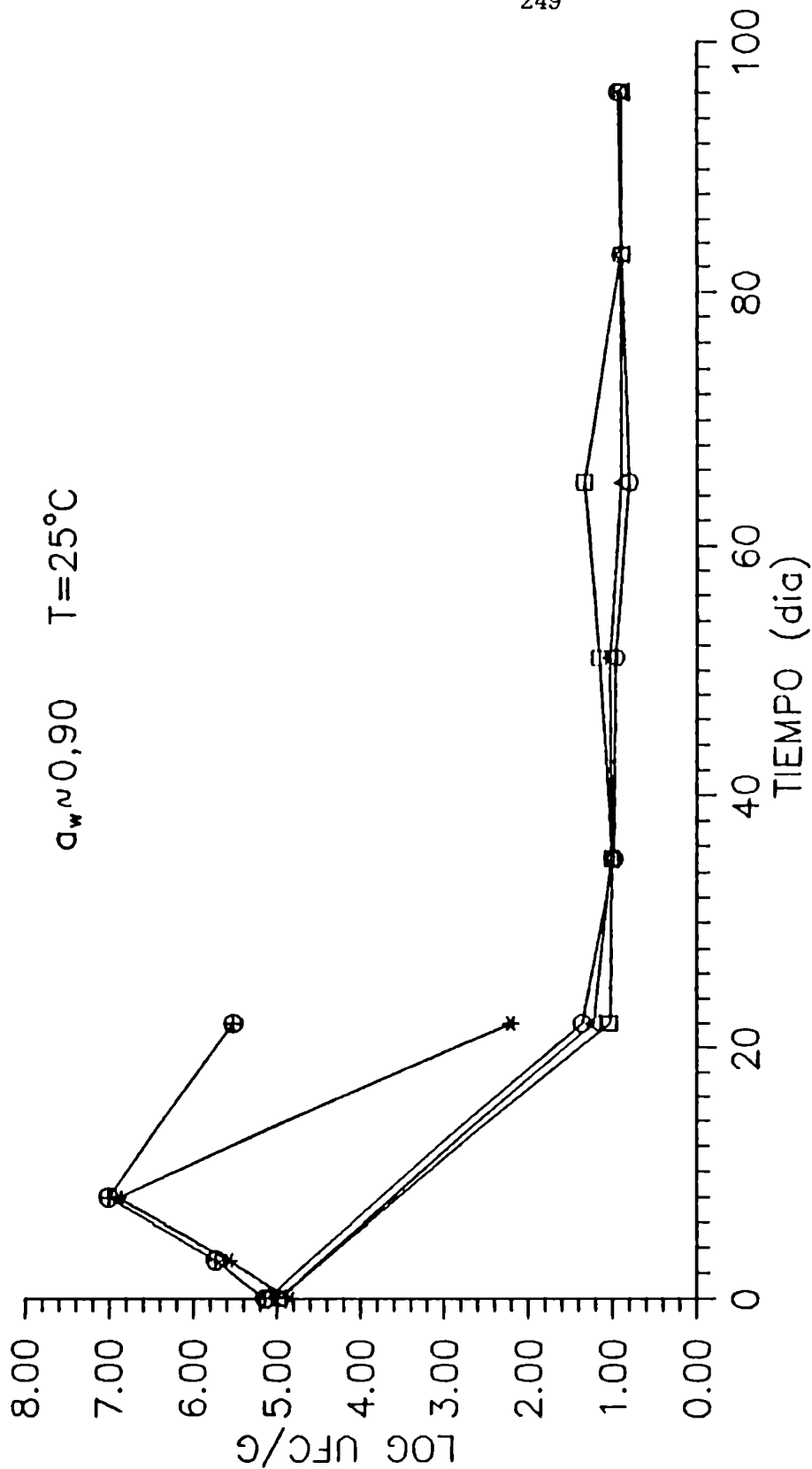


Figura 5.11:

Crecimiento de *D. hansenii* en SQCH con 0,2 % p/p de conservador y almacenado a 25°C. 0,2 % p/p SK, pH=5,0; □ 0,2 % PCa, pH=5,0; ○ 0,1 % p/p SK + 0,1 % p/p PCa, pH=5,0; ⊕ control SQCH, pH=5,0; \* control SQC, pH=6,0.

TABLA 5.2

Crecimiento de hongos en suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado, preservado con 0,2 % p/p de conservador, almacenado a 25°C.

HONGO	AGAR	SQC	SQCH	SQCHP	SQCHP	SQCHP
	PAPA	CONTROL	CONTROL	SK	PCa	SK+PCa
TIEMPO DE RECHAZO (días)						
<i>P. roquefortii</i>	2	7	16			
<i>P. funiculosum</i>	2	7	55			
<i>E. herbariorum</i>	3	3	45			
<i>E. amstelodami</i>	2	4	4			
<i>A. niger</i>	2	4	7			
<i>P. variotti</i>	2	16	16			
<i>W. sebi</i>	3	21	3			-

- Agar Papa: Agar Papa-Glucosa
- SQC control: suero de queso concentrado a pH=5,0 y  $a_w=0,94$  (sin conservador).
- SQCH control: suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH=5,0 y  $a_w=0,90$  (sin conservador).
- SQCHP SK: suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado preservado con 0,2 % p/p de sorbato de potasio, pH=5,0 y  $a_w=0,90$ .

(continuación de la Tabla 5.2)

- SQCHP PCA: suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado preservado con 0,2 % p/p de propionato de calcio, pH=5,0 y  $a_w=0,90$ .
  
- SQCHP PSK: suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado preservado con 0,1 % p/p de sorbato de potasio y 0,1 % p/p de propionato de calcio, pH=5,0 y  $a_w=0,90$ .

hidrolizado (control) y suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado preservado con 0,2 % p/p de sorbato de potasio, 0,2 % p/p de propionato de calcio ó 0,1 % p/p de sorbato de potasio + 0,1 % p/p de propionato de calcio, a pH 5,0. En la tabla 5.2 se detallan las condiciones empleadas para cada medio y el tiempo de rechazo. Se define como tiempo de rechazo el tiempo necesario para que se forme sobre la superficie del medio una colonia lo suficientemente grande como para ser visible a simple vista. Todos los hongos crecieron en los controles, sin embargo ninguno de ellos fue capaz de hacerlo en el suero preservado en el lapso de tres meses

#### 5.5. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos con los microorganismos estudiados, los que producirían mayores problemas, en caso de contaminarse el suero con ellos, son las levaduras *S. bailii* en primer lugar y *S. rouxii* en segundo lugar. Estos fueron los microorganismos cuyos recuentos se mantuvieron aproximadamente constantes durante el almacenamiento para las distintas condiciones ensayadas. Sin embargo, debido al calentamiento al que se somete al suero diluído para su concentración, las levaduras que pudieran estar inicialmente presentes mueren. Efectivamente, si se realiza un recuento de hongos y levaduras en el suero concentrado fresco (utilizando Agar Papa-Glucosa) se obtiene un recuento nulo. El mismo resultado fue encontrado por Kanterewicz y col. (1985b). Con respecto a la resistencia térmica de *S. bailii* y *S. rouxii*, se sabe que *S. rouxii* raramente sobrevive a un calentamiento a 62,5°C durante 10 minutos (Put y col.,



1976). Gibson (1976) estudió la influencia de la  $a_w$  sobre la resistencia al calentamiento de *S. rouxii* en soluciones que contenían glucosa y sacarosa. El valor del tiempo de reducción decimal (D) a 55°C a una  $a_w$  de 0,98 fue 0,1 minutos; a  $a_w=0,94$  de 0,6 minutos y a una  $a_w=0,90$  de 7 minutos. Durante la concentración del suero diluido la  $a_w$  varía de 0,99 a 0,94-0,95; el tratamiento térmico realizado durante la concentración del suero a 70°C sería suficiente para eliminar a esta levadura, en caso de hallarse presente en el suero de queso. Con respecto a *S. bailii*, Put y DeJong (1982) encontraron que las células vegetativas de esta levadura tienen una baja resistencia al calentamiento. El D a 60°C es 0,1-0,3 minutos, con lo cual serían eliminadas durante la etapa de concentración del suero. Sin embargo se debe tener especial cuidado en evitar contaminaciones durante la etapa de hidrólisis y de preservación del suero a fin de evitar problemas posteriores. En caso de producirse una contaminación accidental luego de preservado el suero, con las cantidades de conservador que se emplearon se asegura el control sobre el crecimiento de estos microorganismos.

En cuanto a la elección del conservador a utilizar, todas las combinaciones empleadas (concentración total de conservador = 0,2 % p/p) fueron efectivas para evitar la proliferación de los microorganismos inoculados. El sorbato de potasio fue el más eficaz para inhibir el crecimiento de todos los microorganismos ensayados, salvo para *S. bailii*, donde su eficacia es similar a la de las otras combinaciones. Con las otras dos condiciones de conservador empleadas se obtuvieron también resultados adecuados. El propionato de calcio presenta el problema que aumenta

levemente la viscosidad del suero de queso concentrado, dificultando la agitación y mezclado de la enzima al principio de la hidrólisis.

Puede concluirse que la estabilidad microbiológica del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado ( $a_w=0,90$ ) puede lograrse con un ajuste del pH a 5,0 y el agregado de 0,2 % p/p de sorbato de potasio; 0,2 % p/p de propionato de calcio ó 0,1 % p/p de sorbato de potasio + 0,1 % p/p de propionato de calcio. En estas condiciones el producto puede ser almacenado a 25-37 °C durante tres meses sin sufrir alteraciones microbiológicas.

## 6. REOLOGIA DEL SUERO DE QUESO CONCENTRADO Y DEL SUERO DE QUESO CONCENTRADO Y PARCIALMENTE HIDROLIZADO

### 6.1 Objetivos

Las propiedades de flujo del suero de queso concentrado y del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado difieren en forma considerable. Debido a la importancia de las mismas en el manejo industrial de los alimentos se estudió el comportamiento reológico de ambos sueros de queso concentrados (sin hidrolizar e hidrolizado), a fin de caracterizar sus comportamientos reológicos y poder cuantificar las diferencias existentes entre ambos.

### 6.2. Introducción

Una característica importante de los alimentos, asociada a su calidad y aceptación, son sus propiedades de flujo. Las propiedades de flujo de un alimento están directamente relacionadas con el procesamiento y la textura. Además frecuentemente están vinculadas a otras propiedades del mismo, a saber: densidad, estabilidad y contenido de sólidos (Shoemaker y col., 1987).

Existen varias razones para realizar mediciones reológicas sobre un alimento (Sherman, 1970):

- Controlar la calidad de materias primas ó ingredientes para la fabricación de un producto.
  
- Controlar la calidad de un proceso de fabricación y/o del

producto final.

- Estudiar la influencia de los ingredientes y de las condiciones de procesamiento sobre las propiedades reológicas de un determinado producto. Esto también puede dar información sobre la relación entre la estructura de un producto y sus características reológicas.
  
- Suplementar la información dada por un panel de expertos sobre la textura del producto.

El conocimiento de las propiedades reológicas de un alimento es esencial para el diseño adecuado de los equipos y para realizar las diferentes operaciones unitarias. Por ejemplo, para describir el flujo en caños, es necesario conocer la dependencia del esfuerzo de corte con el gradiente de velocidades dentro del caño, información que se obtiene de las curvas de flujo del alimento (Rao y Anantheswaran, 1982; Rao, 1986).

A pesar que la reología abarca el estudio de todos los aspectos del flujo y la deformación que resulta del mismo, la viscosidad es el principal parámetro que caracteriza las propiedades de flujo de los alimentos fluidos.

Se entiende por viscosidad a la resistencia interna al flujo que presenta un fluido, la cual determina que, al ser sometido a un esfuerzo, no fluya indefinidamente.

De acuerdo a su comportamiento de flujo, los materiales se clasifican en:

■ Newtonianos: los fluidos así llamados cumplen con la ley de Newton, la cual expresa la relación entre la viscosidad, el esfuerzo de corte y el gradiente de velocidad mediante la siguiente ecuación:

$$\tau = - \eta \frac{du}{dx} = - \eta D \quad (6.1)$$

donde:

esfuerzo de corte o fuerza por unidad de área (Pascal).

$\eta$ : coeficiente de viscosidad del fluido (Pascal.s).

$u$ : velocidad del fluido (m/s).

$du/dx$ :  $D$ : gradiente de velocidad existente entre las dos superficies, equivalente a la velocidad de deformación ( $s^{-1}$ ).

En ellos la relación entre el esfuerzo de corte y la velocidad de deformación es constante y representa la viscosidad del fluido. Las soluciones verdaderas (sales y azúcares diluïdos en agua), las dispersiones diluïdas de macromoléculas, las emulsiones diluïdas y varios jarabes presentan este comportamiento (Muller, 1973; Scott Blair, 1969; Howard, 1991).

■ No-newtonianos: son los fluidos para los cuales la relación entre el esfuerzo de corte ( $\tau$ ) y la velocidad de deformación ( $D$ ) no es constante. En este caso, la relación entre  $\tau$  y  $D$  está dada por la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ), la cual es función de la velocidad de deformación. De acuerdo a Rha (1978), la viscosidad aparente se puede definir de dos formas diferentes: a) como la relación  $\tau/D$  en cada punto, lo cual es dimensionalmente correcto y b) como  $\partial\tau/\partial D$ , que da

más información acerca del comportamiento del flujo alrededor de la velocidad de deformación en estudio. Los flujos no-newtonianos pueden ser independientes ó dependientes del tiempo. En los sistemas independientes del tiempo, la viscosidad cambia cuando varía la velocidad de deformación, pero, a un dado valor de esta última, tiene un valor finito independiente del tiempo. En los sistemas dependientes del tiempo, la viscosidad varía con el tiempo cuando se aplica un gradiente de deformación constante.

Según la relación funcional existente entre  $\tau$  y  $D$  se pueden distinguir cuatro tipos de flúidos no-newtonianos (Rao, 1977):

■ Pseudoplásticos: en este tipo de flúidos la viscosidad aparente disminuye a medida que aumenta la velocidad de deformación. Este comportamiento es muy común en los alimentos e indica que existe en el mismo una continua disgregación y reacomodación de la estructura, lo que produce una disminución de la resistencia al flujo. Ejemplos de flúidos pseudoplásticos son las dispersiones y las emulsiones.

■ Dilatantes: en este caso se produce un fenómeno de espesamiento opuesto a la pseudoplasticidad. Al aumentar la velocidad de deformación aumenta la viscosidad aparente. Este tipo de comportamiento es menos frecuente en alimentos y es característico de flúidos con alta concentración de sólidos suspendidos. Por ejemplo, el almidón de maíz en agua, según su concentración, puede comportarse como dilatante.

■ Plásticos de Bingham: Este tipo de fluidos no fluye hasta que se excede cierto valor  $\tau_0$  del esfuerzo de corte, llamado "umbral de fluencia". Por encima de este valor fluyen siguiendo la ley de Newton, pero el coeficiente de proporcionalidad se denomina viscosidad plástica. Pocos alimentos exhiben este comportamiento.

■ Mixtos: Estos fluidos presentan un comportamiento dilatante o pseudoplástico pero sólo una vez que se superó el "umbral de fluencia". Alimentos que presentan este comportamiento son: mayonesas, salsas concentradas, etc..

La descripción del flujo de fluidos no-newtonianos independientes del tiempo se realiza utilizando diferentes modelos matemáticos. Algunos de los más empleados se detallan a continuación:

■ El modelo de la ley de la potencia ó de Ostwald-de-Waele ha sido utilizado ampliamente para describir el flujo de fluidos pseudoplásticos ó dilatantes en un amplio rango de gradientes de deformación. Se lo representa por la siguiente expresión (Rao, 1986):

$$\tau = K D^n \quad (6.2)$$

donde K: índice de consistencia.

n: índice de comportamiento de flujo.

$\tau_0$ : umbral de fluencia.

El índice de comportamiento de flujo es una medida del grado de desviación del comportamiento newtoniano; si n es igual a 1 el fluido es newtoniano y K coincide con el coeficiente de

viscosidad; si  $n$  es menor que 1 el fluido es pseudoplástico y si  $n$  es mayor que 1 se trata de un fluido dilatante.

■ El modelo de Herschel-Burkley (Sherman, 1970) es utilizado para caracterizar el flujo de plásticos de Bingham ó de fluidos de comportamiento mixto. Se lo representa por medio de la siguiente expresión (Rao, 1986)

$$\tau - \tau_0 = K D^n \quad (6.3)$$

donde  $\tau_0$  es el umbral de fluencia.

■ La ecuación de Casson es otro modelo a dos parámetros utilizado para describir el flujo de muchos alimentos, especialmente para calcular el esfuerzo de corte (Rao, 1986):

$$\tau^{1/2} = \tau_0^{1/2} + K^{1/2} D^{1/2} \quad (6.4)$$

La ordenada al origen elevada al cuadrado ha sido considerada por varios investigadores (Mizrahi y Berk, 1972; Vitali y Rao, 1984; Bianchi y col., 1985) como el umbral de fluencia. Para varios alimentos el umbral de fluencia calculado por la ecuación de Casson es mayor que el calculado por la ecuación de Herschel-Burkley ó el determinado experimentalmente.

■ El modelo de Bingham se describe por medio de la siguiente ecuación (Rao, 1986):

$$\tau = \tau_0 + K D \quad (6.5)$$



Este modelo supone que la muestra fluye con comportamiento newtoniano ( $n=1$ ), luego de superar el umbral de fluencia.

### Dependencia del flujo con respecto al tiempo

Los fluidos no-newtonianos dependientes del tiempo pueden ser tixotrópicos o reopécticos:

- Tixotrópicos: son aquellos fluidos que, para un valor constante del gradiente de deformación, presentan una disminución de  $\tau$  ó de la viscosidad aparente en función del tiempo. Cuando el cizallamiento desaparece estos fluidos recuperan total o parcialmente su viscosidad original, pero este proceso puede requerir un cierto tiempo. Los derivados de celulosa, la pulpa de tomate y las salsas de frutas son generalmente tixotrópicos. La tixotropía también es importante en el uso de ciertos productos, por ejemplo, la aplicación de coberturas de chocolate.

- Reopécticos: son materiales que para un valor constante de la velocidad de deformación muestran un incremento en  $\tau$  y  $\eta_{ap}$  en función del tiempo. En los alimentos es más frecuente un comportamiento tixotrópico que reopéctico.

Para caracterizar el comportamiento reológico de los fluidos dependientes del tiempo es necesario definir tres variables,  $\tau$ ,  $D$  y el tiempo. Para no utilizar gráficos tridimensionales, se caracterizan relacionando dos de las variables mientras la tercera se mantiene constante. Así se obtienen dos tipos de reogramas:

- Los que relacionan  $\tau$  con  $D$ , llamados curvas de flujo, que tienen forma lobular, típica de la histéresis.
- Los que relacionan  $\tau$  ó  $\eta_{sp}$  con el tiempo a velocidad de deformación constante.

Generalmente se acepta que la dependencia de las propiedades reológicas con el tiempo es una manifestación de los cambios estructurales que se producen debido al cizallamiento. Estos cambios estructurales pueden ser reversibles o irreversibles. La estructura del sistema que presenta tixotropía puede estar compuesta por moléculas de cadena larga, partículas fuertemente solvatadas, flóculos, agregados formados por varias moléculas e incluso pueden darse estructuras entrelazadas reticulares por unión de varios agregados (Sherman, 1970; Holdsworth, 1971 y 1973). Los componentes de la estructura interactúan entre sí por enlaces débiles de unión secundaria, principalmente fuerzas eléctricas. La aplicación de fuerzas externas distorsiona o rompe estas estructuras a lo largo del tiempo, oponiendo cada vez menos resistencia al flujo, hasta que finalmente puede llegar a alcanzarse un valor constante de  $\tau$  ó  $\eta_{sp}$ . Al cesar el cizallamiento las moléculas pueden volver a recuperar su estructura original luego de un cierto tiempo. Este es el caso de la tixotropía reversible.

En el campo de los alimentos la información sobre el fenómeno tixotrópico es bastante escasa. El primer trabajo aparecido se debe a Longree y col. (1966), que realizó un estudio empírico de las características de las curvas de histéresis registradas al analizar el comportamiento reológico de varias salsas (compuestas por leche, huevo y

almidones). Posteriormente, en 1970, Tung y col. aplicaron los modelos de Weltman (1943) y de Hahn y col. (1959) a claras de huevo con diferentes tratamientos (fresca, envejecida e irradiada). Higgs y Norrington (1971) evaluaron el comportamiento tixotrópico de leche condensada azucarada, mostaza y salsa de tomate tipo "Ketchup". En 1974, Tiu y Borger realizaron un estudio para evaluar cuantitativamente la tixotropía en muestras de mayonesa utilizando una versión simplificada de la teoría estructural desarrollada por Cheng y Evans (1965). Este mismo modelo fue empleado por Massaguer-Roig y col. (1984) para caracterizar el comportamiento tixotrópico de quesos crema. En 1978 los autores Costell y Durán utilizaron los modelos de Weltman (1943) y Hahn y col. (1959) para describir la tixotropía del puré de albaricoque, obteniéndose buenos resultados con ambos modelos. En 1988, Hough y col. utilizaron el modelo de Weltman (1943) para cuantificar la tixotropía del dulce de leche, obteniendo también con dicho modelo muy buena concordancia entre los datos experimentales y los predichos.

#### Evaluación cualitativa de la tixotropía

En 1943, Weltman describió las pruebas necesarias para detectar la presencia de tixotropía en un material. Actualmente se utilizan básicamente los mismos ensayos, siendo éstos: 1) representar gráficamente  $\tau$  en función de  $D$  y verificar la presencia de histéresis; 2) medir la disminución de  $\tau$  en función del tiempo de aplicación de un gradiente de velocidad constante y 3) medir  $\tau$  en función del tiempo de aplicación de una determinada velocidad de deformación en muestras sometidas a un período de reposo

luego de haber sido cizalladas previamente. Generalmente se supone que el área encerrada por la curva de  $\tau$  versus  $D$  debida a la histéresis está relacionada con el grado de destrucción de la estructura de la muestra. Este área dependerá de la velocidad a la que se rompan las uniones que conforman la estructura de la muestra y también de la velocidad a la que se reestablezcan. Ambas velocidades a su vez dependen de cómo se obtienen las curvas de flujo. Existe la posibilidad que un fluido newtoniano dé histéresis si hay aumento de la temperatura por fricción, o también si la experiencia se realiza en forma rápida y las fuerzas inerciales son grandes. Debido a esto se deben evaluar cuidadosamente las curvas de flujo y para confirmar la presencia de tixotropía de una muestra se deben cumplir las tres condiciones anteriormente descriptas.

#### Evaluación cuantitativa de la tixotropía

Las propiedades reológicas se han ido incorporando para caracterizar determinadas propiedades de los materiales. Por lo tanto es necesario cuantificar estas propiedades a fin de establecer relaciones entre los comportamientos de distintos productos ó entre el comportamiento reológico y características del producto (composición química, estructura, calidad, etc.).

Se ha estudiado la posibilidad de calcular, a partir de los reogramas tixotrópicos, parámetros que permitan valorar numéricamente este fenómeno. Según Oriol Pascual (1974), las técnicas utilizadas se pueden clasificar en dos grupos: 1) medidas basadas en el desmoronamiento tixotrópico, observable en el diagrama  $\tau$  versus  $D$  y 2)

medidas basadas en el equilibrio desmoronamiento-regeneración tixotrópica ( $\tau$  ó  $\eta_{ap}$  versus tiempo). Desde el punto de vista teórico el mejor método es el primero, pero a menudo en la práctica interesa más la cinética de regeneración tixotrópica.

El primer aporte al estudio de la caracterización reológica cuantitativa de los fluidos tixotrópicos es el modelo teórico desarrollado por Weltman (1943) para explicar el flujo de aceites minerales y suspensiones de pigmentos cuando se les aplicaba un cizallamiento. La expresión matemática inicial del modelo es:

$$B = \frac{\eta_1 - \eta_2}{\ln \left( \frac{t_1}{t_2} \right)} \quad (6.5)$$

donde  $B$  es el coeficiente de ruptura tixotrópica,  $\eta_1$  y  $\eta_2$  son las viscosidades aparentes a los tiempos  $t_1$  y  $t_2$  respectivamente. Esta ecuación representa el valor de la disminución de la viscosidad aparente del fluido durante un determinado período de cizallamiento a un gradiente de deformación constante. Este período de cizallamiento puede tener una amplitud variable entre el momento en que se inicia el cizallamiento ( $t_1=0$ ) y aquel en el que se llega a un valor de equilibrio ( $t=t_e$ ), donde la  $\eta_{ap}$  ya no varía. Para el período de cizallamiento comprendido entre  $t_1=0$ , al cual corresponde  $\eta=\eta_1$ , y un tiempo menor al necesario para alcanzar el equilibrio ( $t_2 < t_e$ ;  $\eta_2 < \eta_e$ ) la expresión matemática inicial se transforma en:

$$\eta = \eta_1 - B \ln t \quad (6.6)$$

La expresión del modelo de Weltman (1943) se puede escribir sustituyendo los valores de la viscosidad aparente por los valores correspondientes de  $\tau$  (Tung y col. (1970))

$$\tau = \tau_0 - B' \ln t \quad (6.7)$$

donde  $\tau_0$  es la presión tangencial necesaria para iniciar el cizallamiento,  $B'$  es el coeficiente de ruptura tixotrópica, indicativo de la velocidad a la que desaparece la tixotropía a un gradiente de deformación constante, y  $t$  es el tiempo de aplicación del cizallamiento.

Este modelo solamente vale para aquellos materiales en los que la regeneración estructural durante el cizallamiento es prácticamente nula y sólo se pone de manifiesto durante el reposo (Costell y Durán, 1978).

Sobre la base de la teoría general propuesta por Goodeve en 1939 (Cheng y Evans, 1965), que propone que el fenómeno tixotrópico para fluidos se puede explicar en función de un proceso de ruptura y reconstitución estructural simultánea por acción del cizallamiento, Hahn y col. (1959) desarrollaron su propia teoría. Consideraron que en los fluidos tixotrópicos existen dos tipos de moléculas: unas formadas por cadenas enlazadas que fluyen con características no-newtonianas y otras aisladas que lo hacen como fluidos newtonianos. Al ser sometido el material al cizallamiento se altera el equilibrio que existe entre ambos tipos de moléculas. Así se destruye la estructura tridimensional y hay una disminución de la viscosidad aparente del material. La expresión matemática del modelo es:

$$\log (\tau - \tau_e) = \rho - a t \quad (6.8)$$

y tiene en cuenta el valor de  $\tau$  cuando se alcanza el equilibrio ( $\tau_e$ ) luego de cizallar al sistema a una velocidad de deformación constante durante un tiempo  $t_e$ . La tixotropía se cuantifica por los valores numéricos del parámetro  $\rho$  (constante para cada material) que refleja el valor de la presión tangencial a la que se inicia el cizallamiento y el parámetro "a" que refleja la velocidad de ruptura estructural.

### 6.3. Materiales y métodos

#### 6.3.1. Materiales

Para las mediciones de viscosidad se empleó suero de queso concentrado (SQC) (51,90 % p/p de sólidos totales) y suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado (SQCH) obtenido por hidrólisis del anterior en las siguientes condiciones:  $T=37^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6,0$  y 0,1 % p/p de enzima; el grado de hidrólisis alcanzado fue 64,3 %, luego de 7 horas de hidrólisis.

#### 6.3.2. Preparación de las muestras

Para obtener mayor reproducibilidad en los resultados, previamente a su medición, las muestras fueron desgasificadas (Tiu y Borger, 1974). Dicha desgasificación fue realizada por aplicación de vacío a muestras de suero

refrigeradas (5°C) para evitar el deterioro microbiano y porque la menor viscosidad del suero de queso concentrado a baja temperatura facilita la expulsión del aire. Luego de la desgasificación se dejaban las muestras en reposo y refrigeradas durante al menos una semana con el objeto de permitir la regeneración de la estructura. Para estandarizar y eliminar la influencia de la historia previa de las muestras de suero utilizado, para cada medición se empleó una muestra nueva y se aplicó a todas el mismo tratamiento. Se trabajó con suero de queso concentrado y suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH 6,0 y 5,0, ajustados ambos con ácido fosfórico 85 % p/p. Se estudió la influencia de la temperatura trabajando a 25°C y 5°C.

### 6.3.3. Equipo y metodología de trabajo

Se termostató la muestra, previamente desgasificada, a la temperatura de trabajo durante 12 horas. Las mediciones de viscosidad se realizaron con un viscosímetro marca Haake RV 12 (Alemania) equipado con un programador Haake PG 142. La temperatura de las muestras dentro del rotor se mantenía constante con un baño termostático Haake (Alemania) cuya precisión era de  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . Como dispositivo sensor se emplearon cilindros concéntricos de acero inoxidable provistos por Haake (Alemania). Para las muestras más viscosas se utilizó el sensor MVI (cilindro interior (rotor): radio=20,04 mm; altura=60,00 mm; cilindro exterior (copa): radio=21,00 mm; volumen de muestra=40 cm<sup>3</sup>) y para las muestras de menor viscosidad se utilizó el sensor NV (cilindro interior (rotor): radio interno=17,85 mm; radio externo=20,10 mm; altura=60,00 mm; cilindro exterior (copa):



radio interno=17,50 mm; radio externo=20.15 mm; volumen de muestra=9 cm<sup>3</sup>). La muestra se introducía en el sensor procurando manipularla lo menos posible, y se dejaba en reposo durante 30 minutos para eliminar los efectos inmediatos debido a la degradación de la estructura (Costell y Durán, 1978), luego se comenzaba la medición.

La obtención de las curvas de flujo ( $\tau$  versus  $D$ ) de las muestras se realizó en forma automática utilizando el programador Haake PG 142. Para la determinación cuantitativa de las curvas de flujo las muestras eran cizalladas previamente hasta la eliminación de la tixotropía. Luego se midió el esfuerzo de corte en función de la velocidad del rotor, primero en el sentido de las velocidades de deformación ascendentes y luego en el orden decreciente. Las velocidades de rotación del rotor utilizadas estuvieron entre 0 y 64 revoluciones por minuto (rpm) y el tiempo empleado en efectuar cada barrido fue de 7 minutos.

Para la obtención de las curvas de variación de  $\eta_{ap}$  en función del tiempo, a velocidad de deformación constante, se trabajó a 64 rpm. Esta velocidad fue elegida como la más adecuada en base a ensayos preliminares. Cada muestra fue medida por duplicado. La medición continuó hasta llegar a un valor de  $\eta_{ap}$  aproximadamente constante. Dadas las complejas características estructurales del suero de queso concentrado, en el cual hay asociación entre proteínas, lactosa (soluble y cristalizada) e iones (especialmente calcio), en algunas muestras, en tiempos de hasta 5 horas de cizallamiento no se llegó a un valor de viscosidad aparente absolutamente constante. Por lo tanto se consideró

finalizada la medición cuando en cinco minutos la señal variaba menos que 0,5 unidades de la escala de la señal.

Las fórmulas para calcular la viscosidad (mPa.s), el esfuerzo de corte (Pa) y la velocidad de deformación (1/s) a partir de la señal obtenida fueron:

$$\tau = A \cdot S \qquad \eta = \frac{G \cdot S}{n} \qquad D = M \cdot n$$

donde S es la señal que se obtiene del equipo, n es la velocidad del rotor (1/min) y A, M y G los factores de cálculo de cada rotor, los cuales se detallan a continuación:

SENSOR	A (Pa/grado escala)	M (min/s)	G (mPa.s/grado escala.min)
MVI	3,22	2,34	1374
NV	1,78	5,41	329

#### 6.4. Resultados y discusión

##### 6.4.1. Reología del suero de queso concentrado sin hidrolizar

##### 6.4.1.1. Análisis de las curvas de flujo (esfuerzo de corte versus gradiente de deformación)

Para determinar las curvas de flujo ( $\tau$  versus D) de

suero de queso concentrado a 25°C se encontraron algunas dificultades. Cuando la muestra era cizallada a bajas velocidades del rotor, la primera porción de las curvas de flujo (tanto la correspondiente a la porción ascendente como a la descendente) presentaba muchas fluctuaciones en los primeros barridos. Asimismo, en algunas de las determinaciones realizadas, los valores de  $\tau$  obtenidos a bajas velocidades de rotación eran mucho mayores que los correspondientes a la máxima velocidad de rotación. Pese a que se variaron las condiciones de medición, no fue posible obtener una curva de flujo correcta para ninguno de los dos pH ensayados. Respecto de este comportamiento, observado a bajas velocidades del rotor, Harper y El Sahrigi (1965) hallaron el mismo fenómeno trabajando con concentrados de tomate. Las curvas de flujo de dicho material eran erráticas a bajos valores de  $D$  para las muestras más concentradas. Encontraron que este comportamiento dependía mucho de cuán rápido aumentaba la velocidad de rotación y también de la existencia de un umbral de fluencia. Los resultados obtenidos en puré de pera por Harper y Lebermann (1962) confirman que el comportamiento de la muestra a bajos valores de la velocidad de deformación se ve fuertemente influenciada por el umbral de fluencia, así como por la dependencia con el tiempo y los efectos de borde. Tampoco debe olvidarse que el suero de queso concentrado es un sistema heterogéneo y es posible que la presencia de los cristales de lactosa, sin bien menores que el espacio entre los cilindros, introduzca perturbaciones en el comportamiento del suero de queso concentrado.

Una vez cizallada la muestra durante cierto tiempo, es decir luego de la degradación de parte de la estructura

responsable de la tixotropía, el trazado de las curvas de flujo, a 25°C, se normalizaba y permitió la obtención de los datos necesarios para efectuar el estudio cuantitativo de las mismas. Cuando se trabajó a 5°C no se presentaron problemas para obtener las curvas de flujo.

En las Figuras 6.1 y 6.2 se muestran, a modo de ejemplo, las curvas de flujo obtenidas a 25°C y a 5°C, respectivamente, para suero de queso concentrado a pH 6,0. En la correspondiente a 25°C se pueden observar las fluctuaciones descritas en el párrafo anterior. Además, en ambas curvas, aunque con mayor claridad en la obtenida a 5°C, se puede apreciar la existencia del "loop" de histéresis, típico de una sustancia tixotrópica, y la disminución del área a medida que la muestra va siendo cizallada. La curvatura de la porción ascendente del ciclo es, en todos los casos, mayor que la de la descendente, característica ésta de los fluidos tixotrópicos (Weltman, 1943). Las curvas obtenidas a pH 5,0 fueron semejantes a las obtenidas a pH 6,0, para las dos temperaturas consideradas (no se muestran los datos).

En la Figura 6.3 se muestran las curvas de flujo obtenidas a 25°C y 5°C para suero de queso concentrado a pH 6,0 y 5,0, cuando ya no existía tixotropía. Para la obtención de los datos, la muestra era cizallada a velocidad constante hasta que se verificara la desaparición de la tixotropía y luego se realizaba la curva de flujo.

Al analizar el efecto de la temperatura, a pH constante, se encuentra que a mayor temperatura el esfuerzo de corte, y por lo tanto la viscosidad aparente (definida

como  $\eta_{ap} = \tau/D$ ), aumentan. Este comportamiento es anómalo ya que la ley de Arrhenius, que es obedecida por la mayoría de los alimentos (Rao, 1977), predice una disminución de la viscosidad al aumentar la temperatura. Con respecto al efecto del pH, para las dos temperaturas estudiadas, al disminuir el pH disminuye el valor del esfuerzo de corte para el mismo valor de D.

El análisis matemático de estas curvas se realizó utilizando los siguientes modelos: ley de la potencia, Herschel-Burkley, Casson y Bingham. El valor de los parámetros fue obtenido por regresión lineal (modelos de ley de potencia, Casson y Bingham) y por regresión no lineal (modelo de Herschel-Burkley) El ajuste entre los modelos y los datos experimentales se calculó por medio de la desviación media relativa (P) definida como (Rovedo y col., 1991):

$$P = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{(\tau_i - \tau_{pi})}{\tau_i} \quad (6.9)$$

donde  $\tau_i$  es el esfuerzo de corte medido,  $\tau_{pi}$  es el esfuerzo de corte predicho y N el número de observaciones. Valores de P menores o iguales al 5 % representan un buen ajuste entre los datos experimentales y el modelo aplicado (Rovedo y col., 1991). En la Tabla 6.1 y en la Figura 6.4 se encuentran los resultados obtenidos aplicando estos modelos.

Para suero de queso concentrado el modelo que, en promedio, ajusta mejor los datos experimentales obtenidos en las diferentes condiciones, es el de Herschel-Burkley

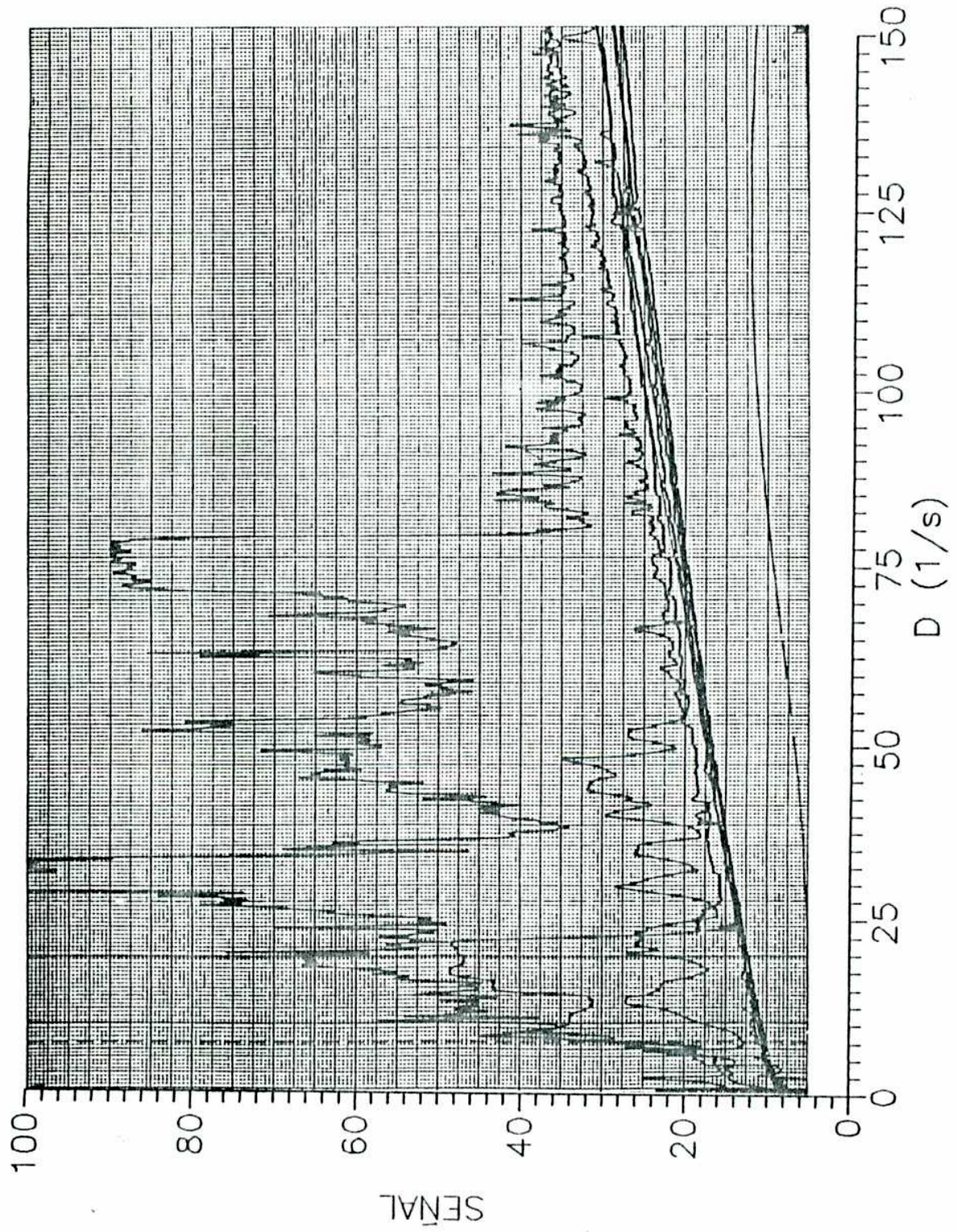


Figura 6.1:

Curva de flujo de suero de queso concentrado de pH=6,0 y a 25°C.

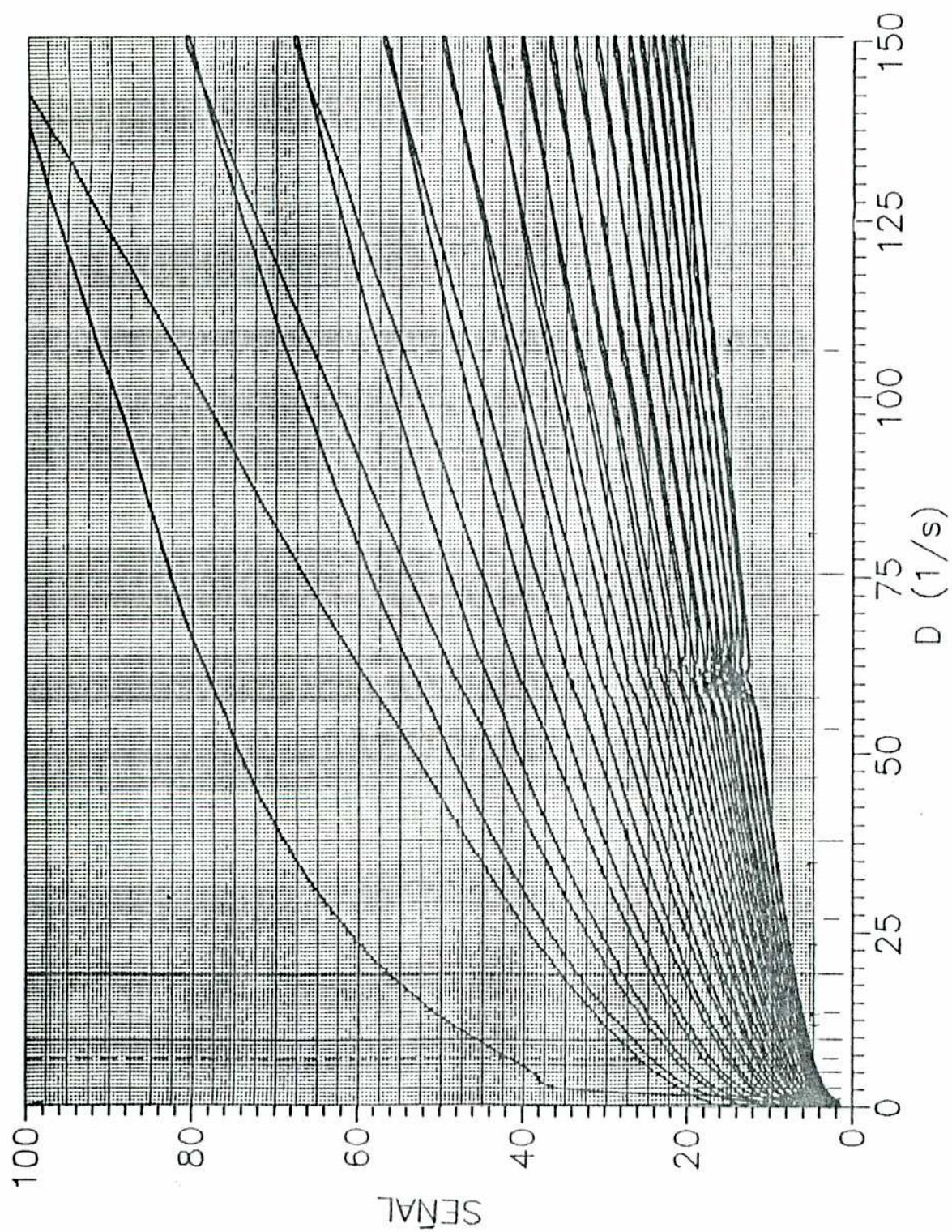


Figura 6.2:

Curva de flujo de suero de queso concentrado de pH=6,0 y a 5°C. La señal de este gráfico está aumentada tres veces con respecto a su valor verdadero.

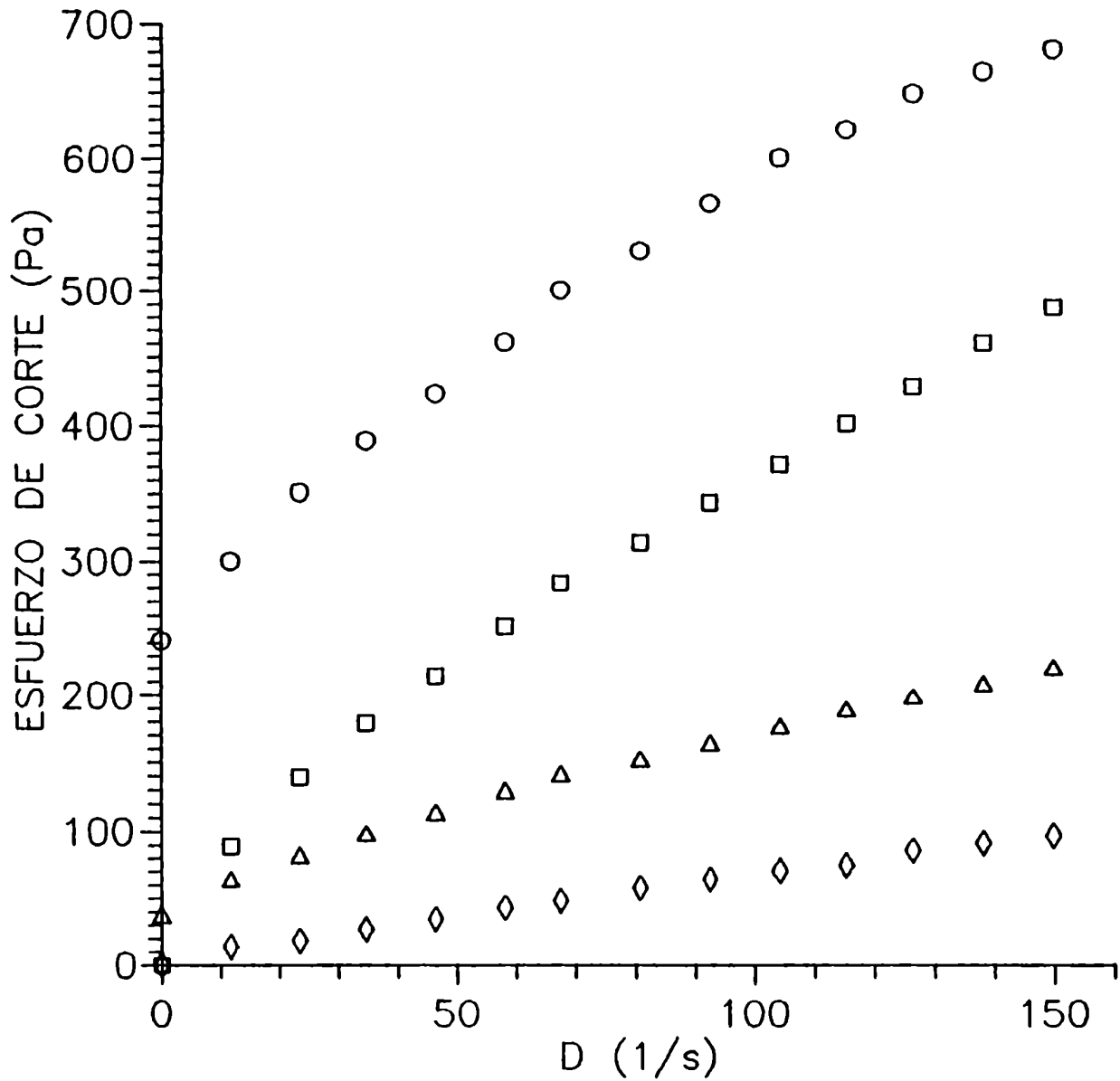


Figura 6.3:

Curvas de flujo de suero de queso concentrado de pH 6,0 y 5,0 obtenidas a  $25^{\circ}\text{C}$  y  $5^{\circ}\text{C}$ .  $\circ$  pH=6,0 y  $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $\square$  pH=5,0 y  $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $\triangle$  pH=6,0 y  $T=5^{\circ}\text{C}$ ,  $\diamond$  pH=5,0 y  $T=5^{\circ}\text{C}$ .



Tabla 6.1

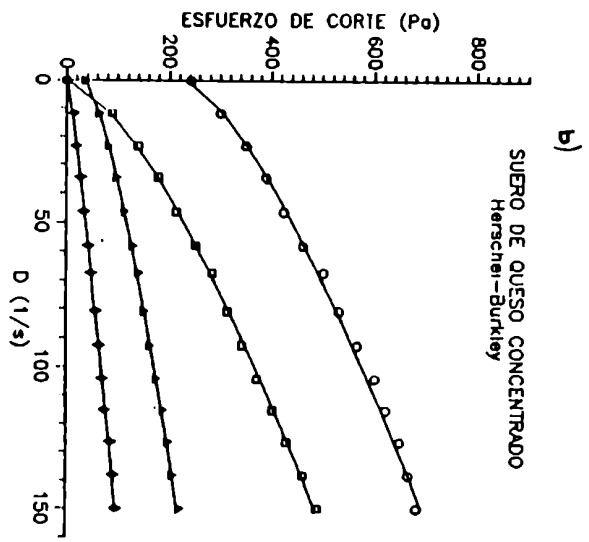
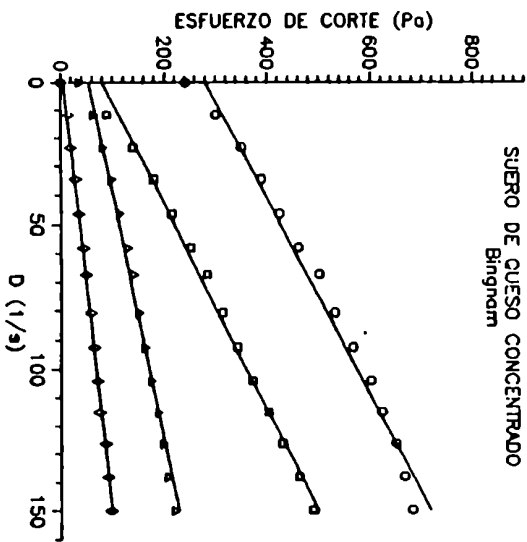
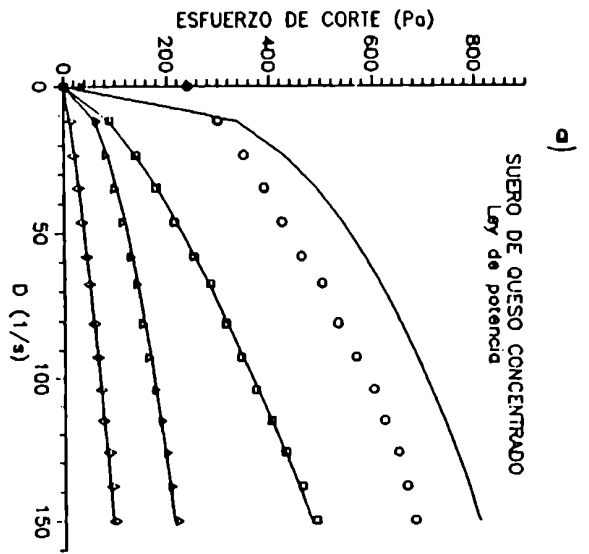
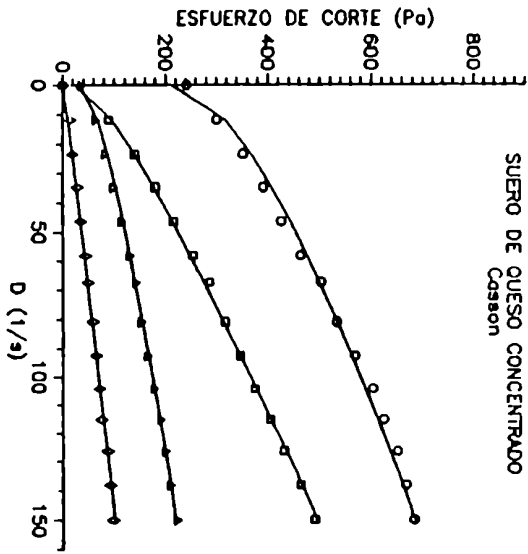
Curvas de flujo de suero de queso concentrado. Descripción matemática y ajuste de los diferentes modelos.

MODELO	T (°C)	pH	$\tau_0$ (Pa)	K (Pa. s <sup>n</sup> )	n	P
Ley de potencia	25	6	0	145,79	0,34	21,04
$\tau = K D^n$	25	5	0	16,99	0,67	1,07
	5	6	0	17,56	0,50	2,75
	5	5	0	1,61	0,81	4,65
Herschel-Burkley	25	6	235,32	11,81	0,73	1,38
$\tau - \tau_0 = K D^n$	25	5	2,63	15,23	0,69	1,10
	5	6	37,17	4,44	0,74	0,76
	5	5	0,85	1,17	0,88	3,15
Casson	25	6	212,57	0,89	0,5	2,33
$\tau^{1/2} = \tau_0^{1/2} +$	25	5	24,81	1,98	0,5	1,65
$+ K^{1/2} D^{1/2}$	5	6	32,81	0,55	0,5	1,83
	5	5	0,28	0,60	0,5	4,10
Bingham	25	6	280,51	2,92	1,0	2,62
$\tau = \tau_0 + K D$	25	5	79,41	2,80	1,0	4,03
	5	6	54,20	1,17	1,0	3,09
	5	5	4,56	0,63	1,0	3,43

**Figura 6.4:**

Predicción de las curvas de flujo de suero de queso concentrado utilizando los siguientes modelos: a) ley de la potencia; b) Herschel-Burkley; c) Casson y d) Bingham.

o pH=6,0 y T=25°C, □ pH=5,0 y T=25°C, △ pH=6,0 y T=5°C,  
◇ pH=5,0 y T=5°C, (—) predicción teórica.



(Figura 6.4 b) aunque con los modelos de Casson (Figura 6.4 c) y Bingham (Figura 6.4 d) también pueden predecirse las curvas de flujo. El modelo de Bingham se puede utilizar para predecir los datos experimentales pues la curvatura que presentan las curvas de flujo es pequeña. Esto permite un buen ajuste de dicho modelo. El modelo que peor ajusta, sobre todo para suero a 25°C y pH 6,0, es la ley de la potencia debido a que no contempla la existencia de un umbral de fluencia, que para este caso tiene un valor relativamente alto.

Según se observa en la Table 6.1 el índice de flujo, calculado por el modelo de Herschel-Burkley y ley de potencia, es menor que uno para todos los casos, lo cual indica que el suero de queso concentrado es pseudoplástico. Sin embargo al disminuir el pH y la temperatura su comportamiento se aproxima al de los fluidos newtonianos ( $n \rightarrow 1$ ).

El umbral de fluencia para suero de queso concentrado es máximo para suero a 25°C y pH 6,0 y casi cero para suero a 5°C y pH 5,0. El valor de  $\tau_0$  depende del modelo empleado para calcularlo, y a su vez este valor puede ser diferente del encontrado experimentalmente (Pauletti y col., 1988).

Con respecto al índice de consistencia predicho se ve que disminuye con la temperatura y el pH. Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado experimentalmente.

#### 6.4.1.2. Análisis de las curvas de viscosidad aparente en función de tiempo

Para obtener las curvas de viscosidad aparente en función del tiempo de suero de queso concentrado fue necesario trabajar a velocidades de rotación del rotor mayores o iguales que 64 rpm. Si la velocidad de rotación era menor, cuando se trabajaba a 25°C, las curvas presentaban grandes variaciones de los valores obtenidos punto a punto. Por lo tanto, para que el trazado de las curvas no tuviera irregularidades se trabajó a 64 rpm. A 5°C, si bien no se presentaba este problema, se trabajó a la misma velocidad de rotación para poder comparar las curvas obtenidas con las correspondientes a 25°C. Todas las curvas de  $\eta_{ap}$  versus tiempo fueron realizadas con el sensor MVI.

En la Figura 6.5 se representa la variación del viscosidad aparente en función del tiempo de cizallamiento a un gradiente de deformación constante para suero de queso concentrado a pH=6,0 y T=25°C. Para la interpretación de todas las figuras en las que se representa  $\eta_{ap}$  en función del tiempo se debe tener en cuenta que para la abcisa (eje del tiempo) 1,5 cm corresponden a 1 minuto y que cada porción de la curva (de izquierda a derecha del gráfico) dura 9 minutos. Es decir que a la curva superior le corresponde una escala de la abcisa de 0 a 9 minutos; a la curva inmediatamente por debajo de ésta la escala de la abcisa va de 9 a 18 minutos y así sucesivamente. Como puede observarse, en los primeros 10-15 minutos hay una disminución muy acentuada del valor de  $\eta_{ap}$ ; de allí en más sigue disminuyendo pero más lentamente. Este comportamiento es típico de los fluidos tixotrópicos. Sin embargo no se llega a un valor de equilibrio (donde  $\tau$  o la viscosidad permanezcan constantes en el tiempo), pues luego de 5 horas

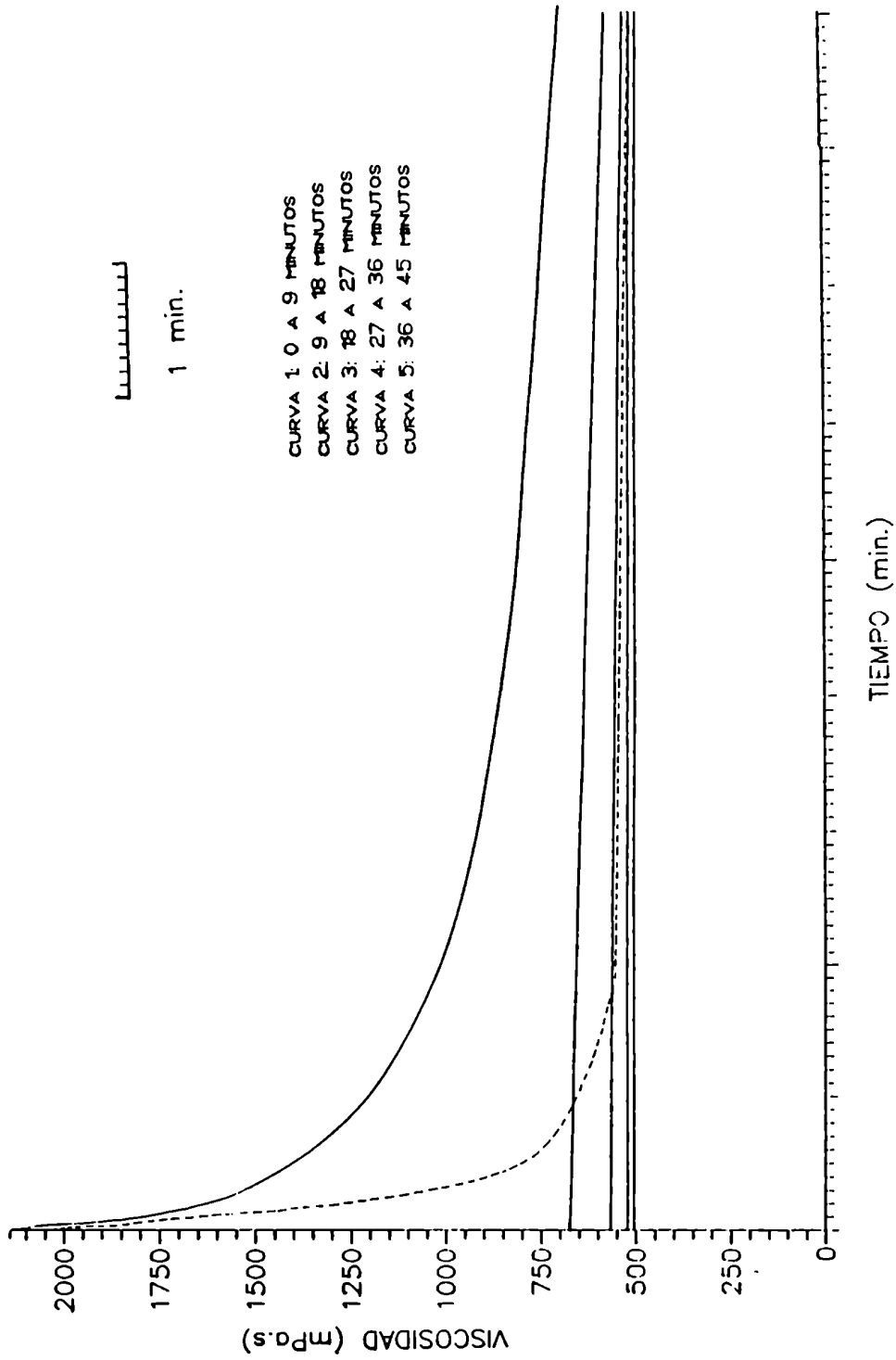


Figura 6.5:  
Viscosidad aparente en función del tiempo de cizallamiento, a gradiente de deformación constante, de suero de queso concentrado de pH=6,0 y a 25°C (—). Recuperación de la estructura (---). Curva 1 es la curva superior, las demás se numeran en orden decreciente hacia abajo.

de cizallar a velocidad de rotación constante el valor de la señal sigue variando. Estas variaciones son muy pequeñas y a los fines prácticos puede considerarse que se llegó a un valor constante.

Se estudió también la recuperación de la estructura degradada por el cizallamiento. Luego de cizallar la muestra durante 3 horas a la máxima velocidad (512 rpm), se apagaba el equipo y se dejaba la muestra en reposo durante 24 horas. Al cabo de ese tiempo se encendía el equipo determinándose nuevamente la curva de  $\eta_{sp}$  versus tiempo. Los resultados obtenidos se muestran en la misma Figura 6.5 (línea punteada). Si bien el valor inicial de la viscosidad de la muestra cizallada coincide con el de la muestra fresca, en 24 horas la recuperación de la estructura no fue total ó pueden haber ocurrido cambios irreversibles en parte de la misma, pues el valor de la viscosidad aparente disminuye más rápido que en la muestra sin cizallar.

En la Figura 6.6 se representa la variación de la viscosidad en función de tiempo para suero de queso concentrado a pH=5,0 y T=25°C. La viscosidad y el grado de tixotropía de este sistema es menor que a pH 6,0 y la degradación de la estructura hasta un valor aproximadamente estable ocurre en un tiempo menor que para pH 6,0. También se estudió, con el mismo método empleado en el caso anterior, la capacidad de recuperación de la estructura del suero de queso concentrado a pH 5,0. Los resultados se presentan con la línea punteada de la Figura 6.6. Se puede observar que no hubo casi recuperación de la estructura al cabo de 24 horas.

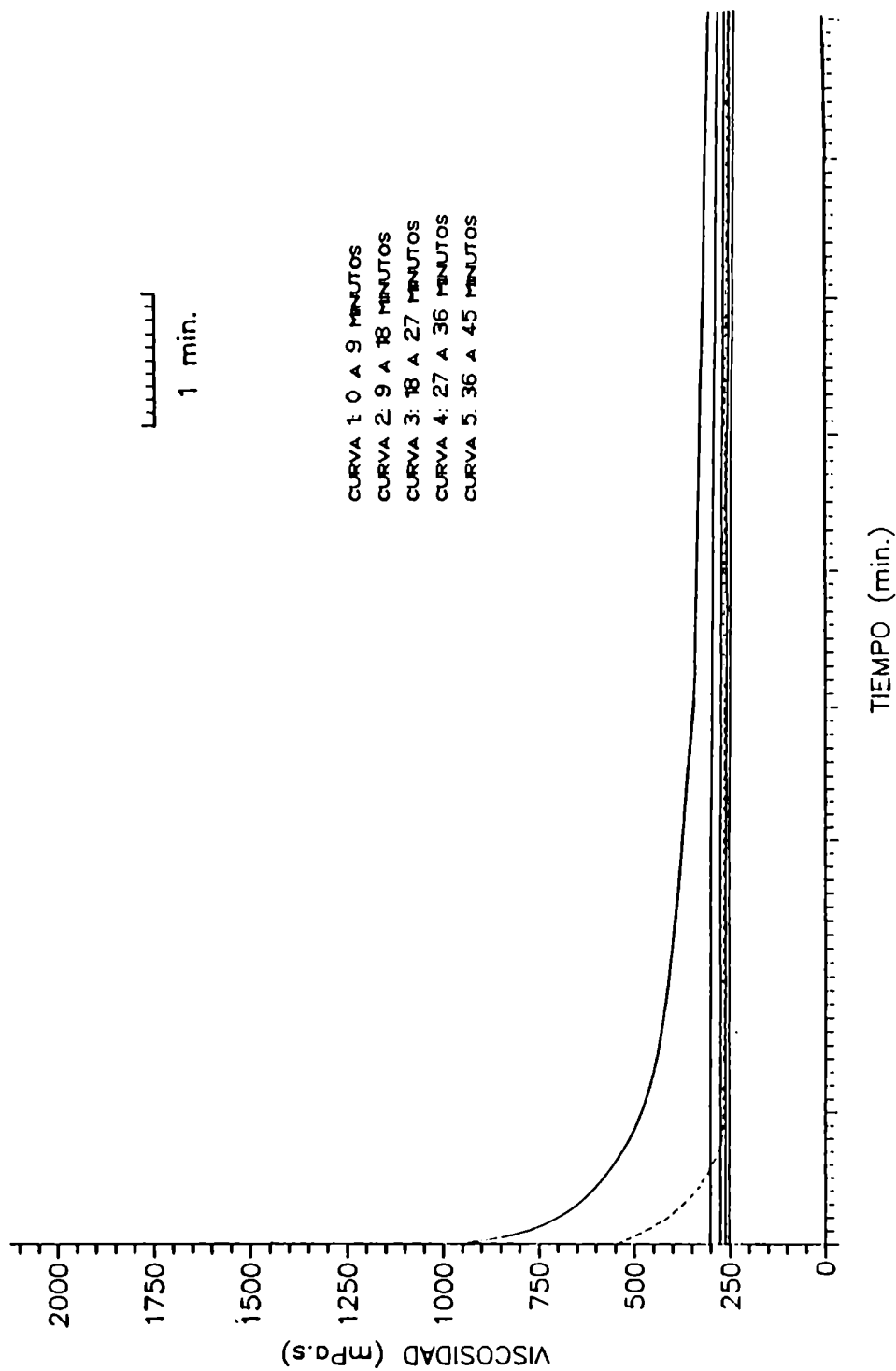


Figura 6.6:

Viscosidad aparente en función del tiempo de cizallamiento, a gradiente de deformación constante, de suero de queso concentrado de pH=5,0 y a 25°C (—). Recuperación de la estructura (---). Curva 1 es la curva superior, las demás se numeran en orden decreciente hacia abajo.



Se analizó la influencia de la temperatura en la viscosidad del suero de queso concentrado a pH 6,0 y a pH 5,0, para lo cual se trabajó a también a 5°C. En la Figura 6.7 se muestran los resultados para el suero de queso concentrado de pH 6,0. Si bien la viscosidad del suero de queso concentrado a pH 6,0 es menor a 5°C que a 25°C, la velocidad de degradación de la estructura es más lenta a menor temperatura. Un comportamiento similar muestra el suero de queso concentrado a pH 5,0 (Figura 6.8). El efecto de la temperatura sobre la viscosidad del suero de queso es opuesto al que presentan la mayoría de los fluidos, en los cuales la viscosidad aumenta al disminuir la temperatura según lo predice la ley de Arrhenius.

Se intentó también medir la viscosidad del suero de queso concentrado a 35°C pero éste aumentaba su consistencia al punto de comportarse como un gel a dicha temperatura, y la muestra patinaba sobre las paredes del sensor, imposibilitando la obtención de resultados correctos. Si bien no se pudo explicar porqué la viscosidad aumentaba con la temperatura, se piensa que este fenómeno puede estar relacionado con la gelificación reversible de las proteínas del suero a menores temperaturas que las usuales.

Para realizar el análisis cuantitativo de las curvas de  $\eta_{sp}$  versus tiempo de suero de queso concentrado se utilizó el modelo de Weltman (1943) (ecuación 6.6). No se consideraron para el tratamiento matemático los tres primeros puntos de cada curva, ya que se desviaban mucho respecto de los otros valores, probablemente debido a la presencia de un umbral de fluencia en las muestras (Harper y

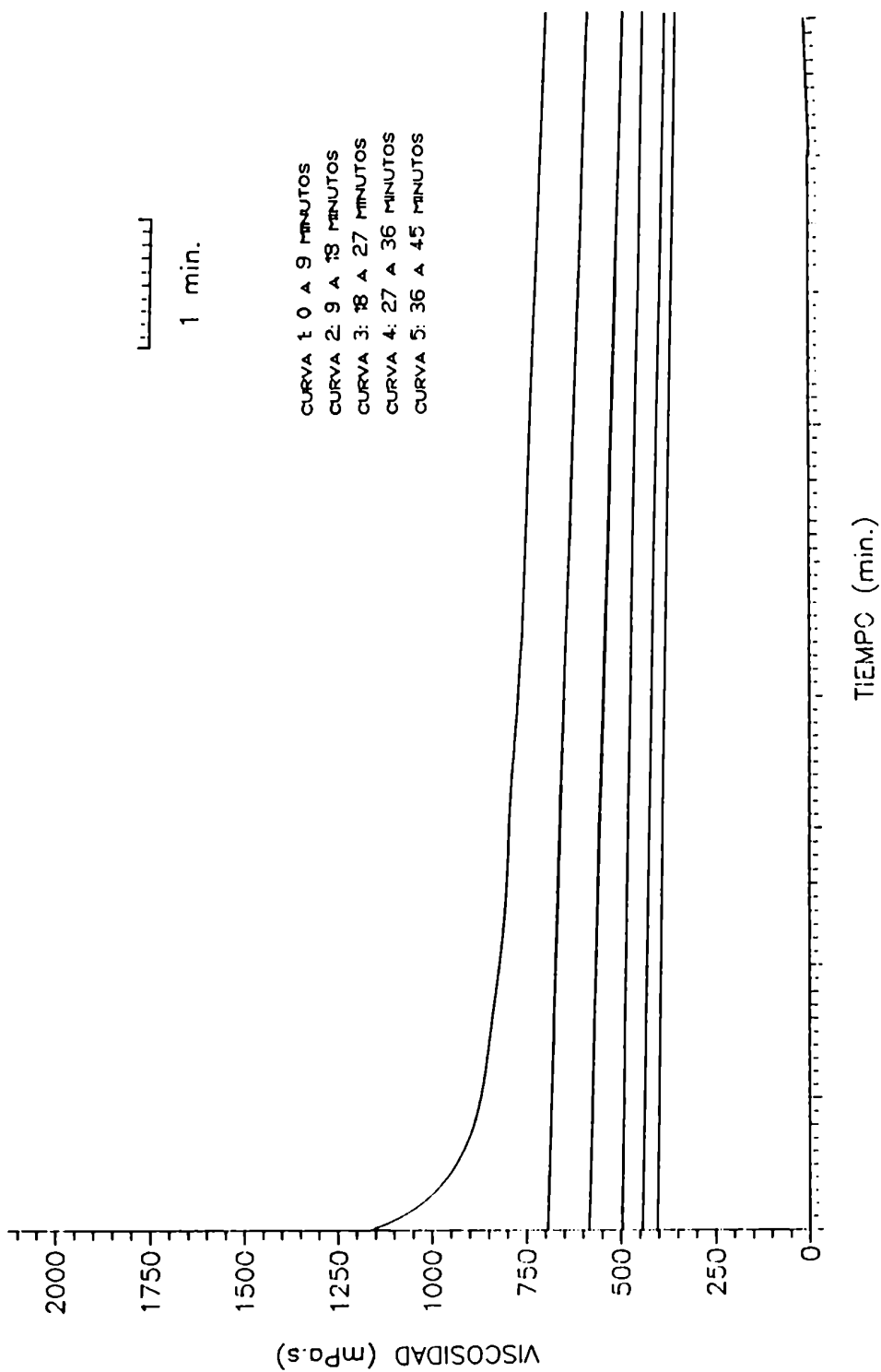
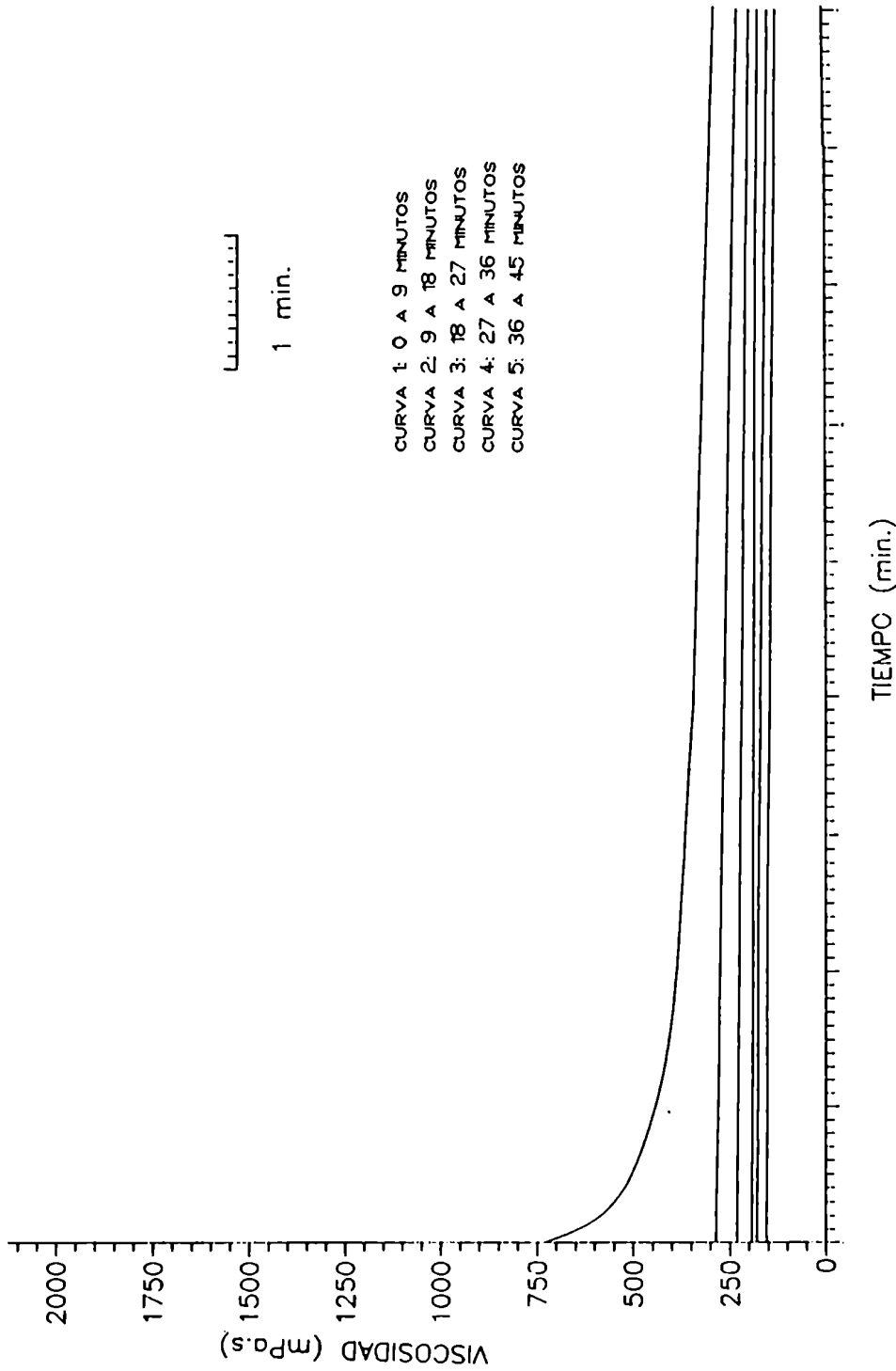


Figura 6.7:

Viscosidad aparente en función del tiempo de cizallamiento, a gradiente de deformación constante, de suero de queso concentrado de pH=6,0 y a 5°C. Curva 1 es la curva superior, las demás se numeran en orden decreciente hacia abajo.



**Figura 6.8:**  
 Viscosidad aparente en función del tiempo de cizallamiento, a gradiente de deformación constante, de suero de queso concentrado de pH=5,0 y a 5°C. Curva 1 es la curva superior, las demás se numeran en orden decreciente hacia abajo.

El Sahrighi, 1965). Los parámetros  $\eta_1$  y  $B$ , que caracterizan a la ecuación propuesta por Weltman (1943), los coeficientes de correlación ( $r_0$ ) obtenidos y el valor de  $P$  (definido por la ecuación 6.9) se encuentran en la Tabla 6.2 y en la Figura 6.9, se presentan los valores experimentales de viscosidad aparente en función del tiempo y su predicción teórica para suero de queso concentrado a 25°C y 5°C. De las figuras y de los valores de  $P$  calculados se puede concluir que este modelo es adecuado para representar matemáticamente el descenso de la viscosidad aparente a lo largo del tiempo de cizallamiento en suero de queso concentrado de pH 5,0 a 25°C y a 5°C, no siendo tan bueno el ajuste para suero de queso concentrado a pH 6,0 a 25°C y 5°C.

De los resultados de la Tabla 6.2 se observa que el valor de  $B$ , que indica cuán rápido desaparece la tixotropía a una velocidad de deformación constante, es máximo para suero de queso concentrado de pH 6,0 a 25°C. Al disminuir la temperatura ó el pH el valor de  $B$  disminuye notablemente. La temperatura tiene un efecto más pronunciado a pH 6,0 que a pH 5,0, siendo en este último caso muy pequeña la diferencia entre los valores obtenidos a ambas temperatura ensayadas.

Con respecto al valor de  $\eta_1$ , que representa el valor de la viscosidad de la muestra a tiempo cero y se puede relacionar con el umbral de fluencia, sigue las mismas tendencias que  $B$ , siendo máximo para suero de queso concentrado a pH 6,0 y 25°C.

Se intentó ajustar los datos experimentales con el

TABLA 6.2

Parámetros del modelo de Weltman (ecuación 6.6) obtenidos para suero de queso concentrado a pH 6,0 y a pH 5,0 y a temperaturas de 25°C y 5°C.

MUESTRA	$\eta_1$ (mPa.s)	B (mPa.s)	$r_0$	P
SQC, pH=6,0, T=25°C	1273 $\bar{+}$ 28	255 $\bar{+}$ 7	0,990	4,06
SQC, pH=5,0, T=25°C	538 $\bar{+}$ 15	110 $\bar{+}$ 6	0,980	4,47
SQC, pH=6,0, T=5°C	896 $\bar{+}$ 16	117 $\bar{+}$ 6	0,977	7,56
SQC, pH=5,0, T=5°C	496 $\bar{+}$ 14	85 $\bar{+}$ 5	0,996	2,92

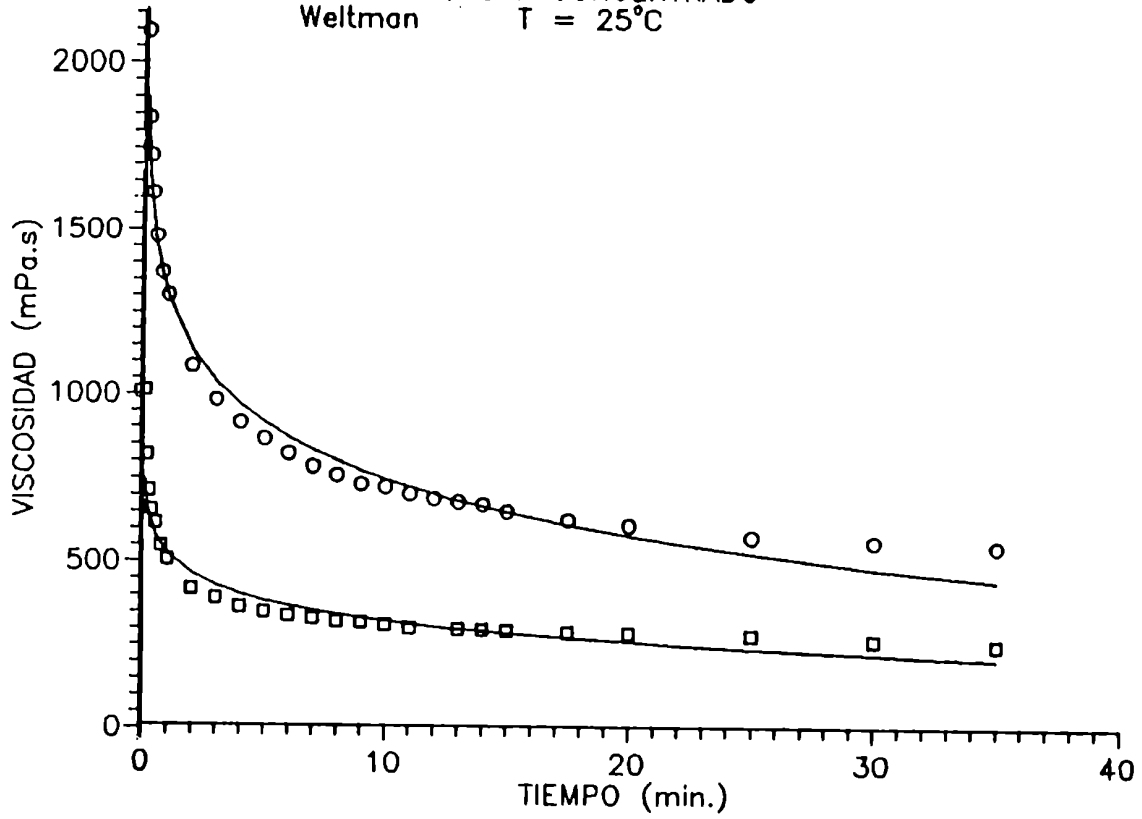
Figura 6.9:

Predicción de la viscosidad aparente en función del tiempo de suero de queso concentrado utilizando el modelo de Weltman (ecuación 6.6): a) 25°C: o pH=6,0; □ pH=5,0 y b) 5°C: pH=6,0; pH=5,0; (—) predicción teórica.

a)

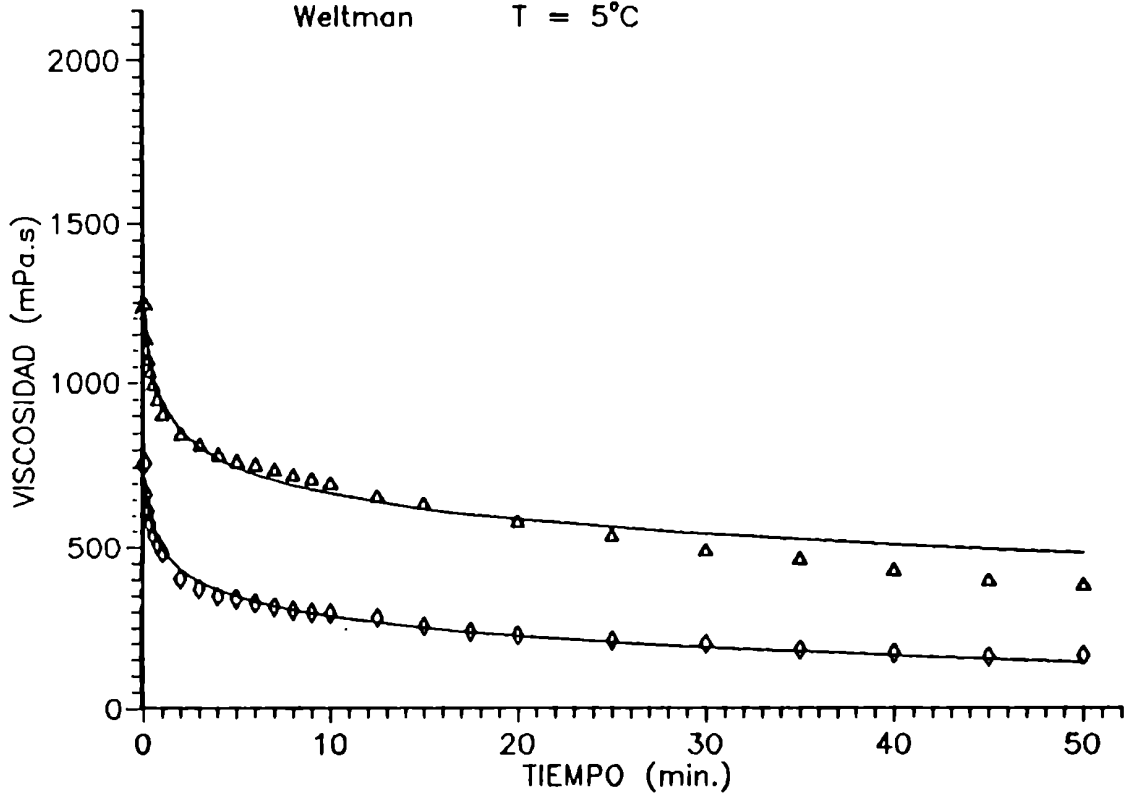
293

SUERO DE QUESO CONCENTRADO  
Weltman T = 25°C



b)

SUERO DE QUESO CONCENTRADO  
Weltman T = 5°C



modelo propuesto por Hahn y col. (1959). Para todos los casos se obtuvieron bajos coeficientes de correlación. Posiblemente el ajuste de este modelo no sea bueno porque se necesita conocer el valor de  $\tau_0$  (valor de  $\tau$  al que se llega luego de degradar toda la estructura tixotrópica). Pese a que las muestras fueron cizalladas por tiempos prolongados, es posible que no se haya alcanzado el valor de  $\tau_0$ . Asimismo, se debe considerar que el modelo de Hahn y col. (1959) se basa en un equilibrio entre la ruptura y la reconstitución de la estructura, hipótesis que posiblemente no se cumpla en el suero de queso concentrado. Según se determinó experimentalmente en suero de queso concentrado de pH 6,0 a 25°C y 5°C, al cabo de 24 horas la recuperación de la estructura es parcial.

#### 6.4.2. Reología del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado

##### 6.4.2.1. Análisis de las curvas de flujo (esfuerzo de corte en función del gradiente de deformación)

Las curvas de flujo obtenidas para suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado fueron del mismo tipo que las obtenidas para suero de queso concentrado y se presentaron los mismos problemas. A 25°C las curvas presentaban fluctuaciones en las primeras vueltas y luego el trazo se normalizaba. A 5°C las curvas no presentaron anomalías (no se muestran las figuras). Para suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado, debido a su



menor viscosidad se trabajó con el sensor NV.

En la Figura 6.10 se muestran las curvas de flujo obtenidas para suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a los dos pH y a las dos temperaturas una vez que la estructura responsable de la tixotropía ha sido degradada. Al igual que para suero de queso concentrado la muestra fue cizallada a velocidad de rotación constante hasta la eliminación de la tixotropía y luego se determinó la curva de flujo.

Al analizar el efecto de la temperatura, a pH constante, se ve que para pH 6,0 el esfuerzo de corte, y por lo tanto la viscosidad aparente, aumentan al aumentar la temperatura. Es decir que nuevamente no se cumple la ley de Arrhenius. Sin embargo para suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH 5,0 a menor temperatura la viscosidad es mayor, es decir que en este caso particular se obedece la ley de Arrhenius. Con respecto al efecto del pH, trabajando a temperatura constante, a 25°C al disminuir el pH disminuye el esfuerzo de corte. A 5°C el pH casi no influye en los resultados obtenidos.

El análisis matemático de las curvas de flujo se realizó utilizando los mismos modelos que para suero de queso concentrado y los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 6.3 y en la Figura 6.11.

El análisis de las curvas de flujo para suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado indica que, al igual que el suero de queso concentrado, las mismas pueden ser descriptas por los modelos de Casson, Bingham y

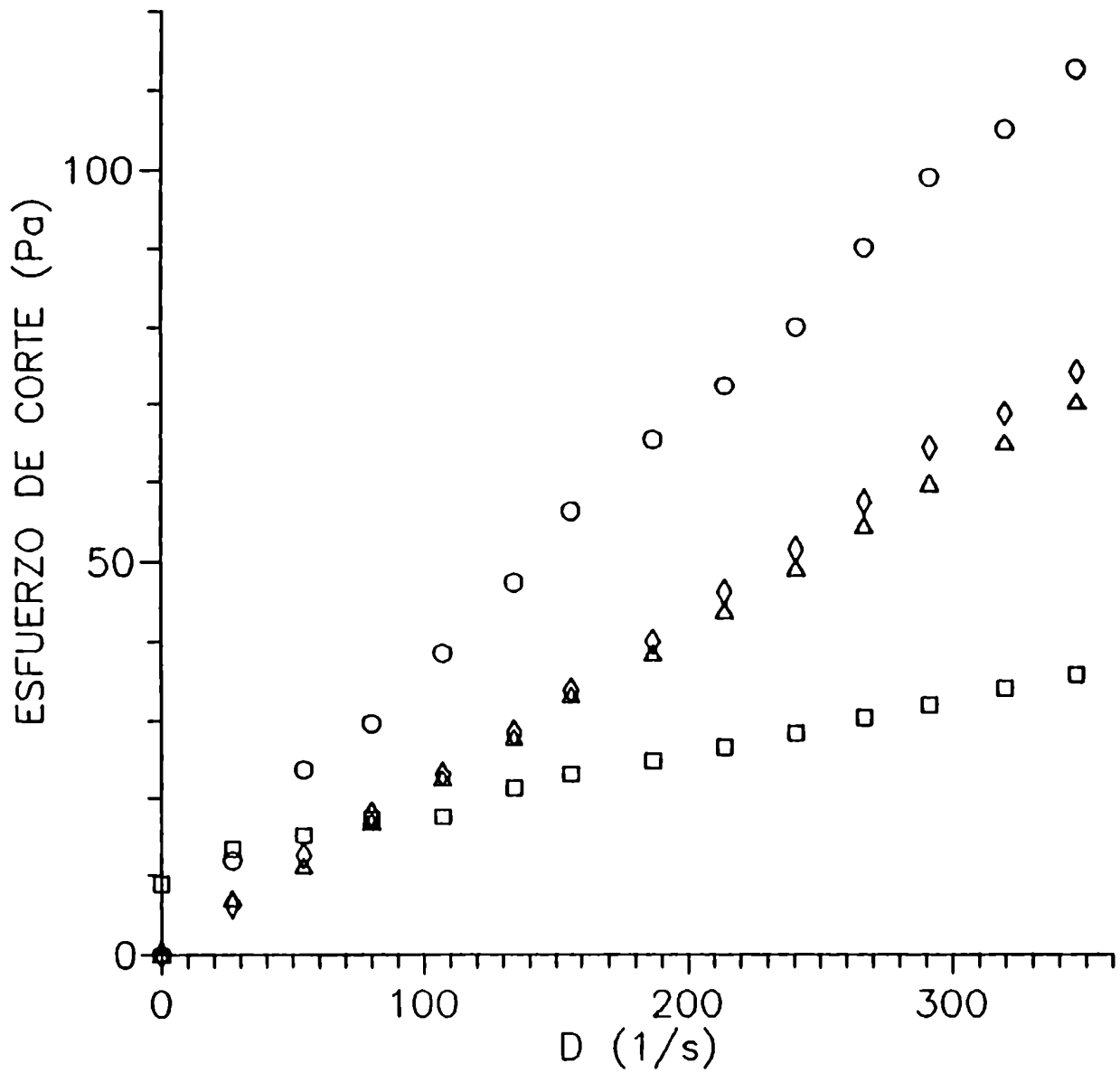


Figura 6.10:

Curvas de flujo de suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH 6,0 y 5,0 obtenidas a  $25^{\circ}\text{C}$  y  $5^{\circ}\text{C}$ .  $\circ$  pH=6,0 y  $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $\square$  pH=5,0 y  $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $\triangle$  pH=6,0 y  $T=5^{\circ}\text{C}$ ,  $\diamond$  pH=5,0 y  $T=5^{\circ}\text{C}$ .

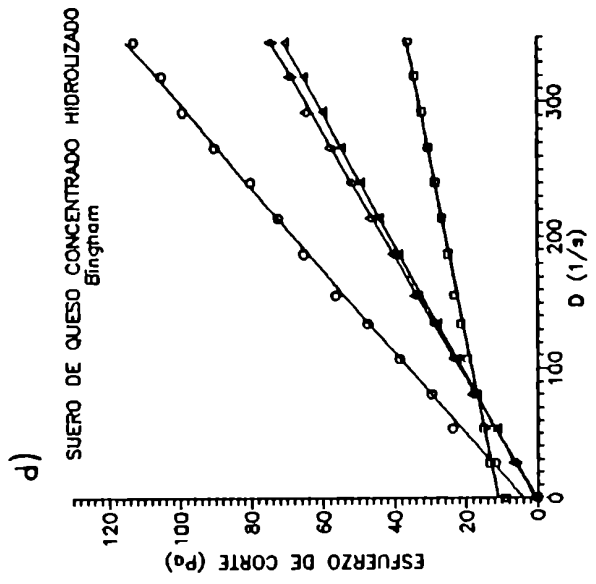
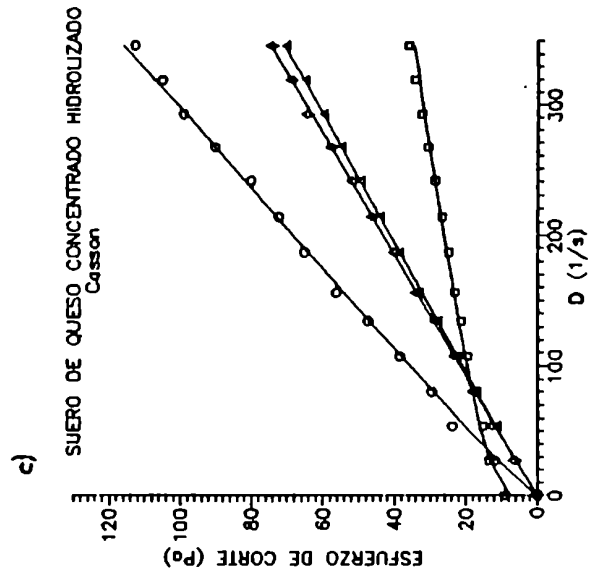
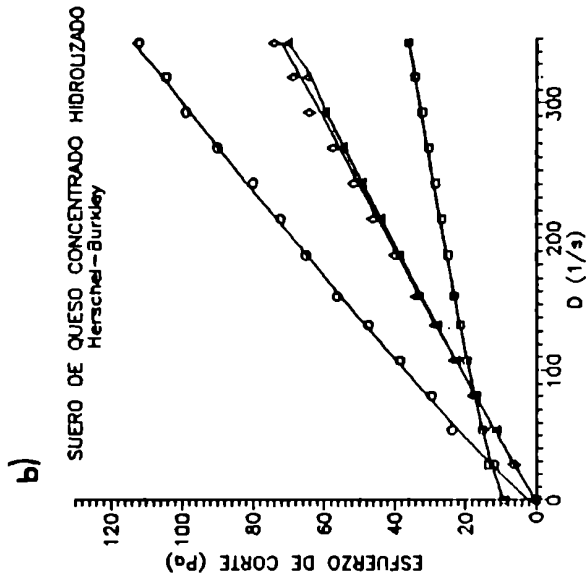
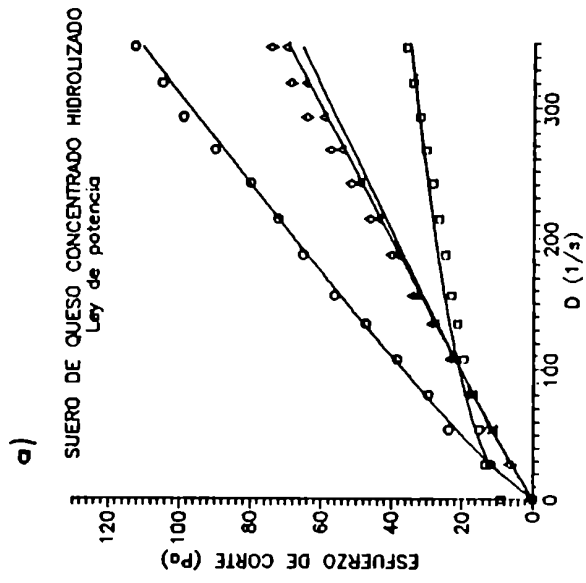
Tabla 6.3

Curvas de flujo de suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado. Descripción matemática y ajuste de los diferentes modelos.

MODELO	T (°C)	pH	$\tau_0$ (Pa)	K (Pa. s <sup>n</sup> )	n	P
Ley de potencia	25	6	0	0,65	0,88	2,42
$\tau = K D^n$	25	5	0	3,21	0,41	6,55
	5	6	0	0,29	0,93	5,49
	5	5	0	0,24	0,97	5,27
Herschel-Burkley	25	6	2,28	0,46	0,94	2,02
$\tau - \tau_0 = K D^n$	25	5	9,34	0,22	0,82	1,34
	5	6	0,27	0,24	0,97	1,80
	5	5	0,29	0,22	0,99	1,12
Casson	25	6	0,16	0,31	0,5	3,16
$\tau^{1/2} = \tau_0^{1/2} +$ $+ K^{1/2} D^{1/2}$	25	5	7,72	0,03	0,5	2,68
	5	6	0,02	0,20	0,5	1,96
	5	5	0,001	0,21	0,5	1,31
Bingham	25	6	3,91	0,32	1,0	2,46
$\tau = \tau_0 + K D$	25	5	10,98	0,07	1,0	1,61
	5	6	0,88	0,20	1,0	1,74
	5	5	0,30	0,21	1,0	1,21

Figura 6.11:

Predicción de las curvas de flujo de suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado utilizando los siguientes modelos: a) ley de la potencia; b) Herschel-Burkley; c) Casson y d) Bingham.  $\circ$  pH=6,0 y  $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $\square$  pH=5,0 y  $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $\Delta$  pH=6,0 y  $T=5^{\circ}\text{C}$ ,  $\diamond$  pH=5,0 y  $T=5^{\circ}\text{C}$ , (—) predicción teórica.



Herschel-Burkley. Las desviaciones del modelo de la ley de la potencia son apreciables para todas las condiciones, salvo para  $\text{pH}=6,0$  y  $25^{\circ}\text{C}$ , por lo tanto se descarta para predecir las curvas de flujo de suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado. Los valores de las constante predichas por el modelo de Herschel-Burkley y el de Bingham son semejantes ya que el índice de fluencia, predicho por el primer modelo, es muy cercano a 1.

Los valores del índice de flujo encontrados para suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado son mayores que para suero de queso concentrado y cercanos a 1, lo cual indica un acercamiento al comportamiento newtoniano al desaparecer los cristales de lactosa como consecuencia de la hidrólisis.

El umbral de fluencia calculado es menor que para suero de queso concentrado, siendo muy pequeño y cercano a cero para suero hidrolizado a  $\text{pH } 5,0$ .

Los valores del índice de consistencia son para todos los casos considerados menores que los de suero de queso concentrado.

#### 6.4.2.1. Análisis de las curvas de viscosidad aparente versus tiempo

Para realizar la determinación de las curvas de  $\eta_{ap}$  versus tiempo para suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado se utilizó la misma velocidad de rotación que para suero de queso concentrado (64 rpm), a fin de poder

comparar mejor los resultados obtenidos en cada caso:

En la Figura 6.12 se observa el comportamiento de suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH 6,0 y 25°C. Cuando se trabaja a pH 5,0 y 25°C (Figura 6.13) no se nota gran diferencia respecto de los resultados obtenidos a pH 6,0. Es decir que a 25°C el pH no influye demasiado en la viscosidad del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado. Además en todo punto la viscosidad es menor que para el suero de queso concentrado.

En cuanto a la regeneración de la estructura, experiencia realizada de igual forma que para suero de queso concentrado, luego de las 24 horas de reposo, no se recuperó totalmente ó parte de la estructura se degradó en forma irreversible pues los valores de viscosidad alcanzados son menores que los de la muestra sin cizallar (Figuras 6.12 y 6.13, línea punteada).

Al trabajar a 5°C, el descenso de viscosidad que se produce es muy pequeño respecto de los valores a 25°C, pudiendo concluirse que la viscosidad del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado se ve poco afectada por la temperatura (Figuras 6.14 y 6.15).

Como la mayor diferencia que existe entre el suero de queso concentrado y el suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado, desde el punto de vista de su estructura, es la ausencia de cristales de lactosa en el segundo, podría suponerse que los cristales de dicho azúcar influyen sobre el comportamiento reológico del suero de queso.

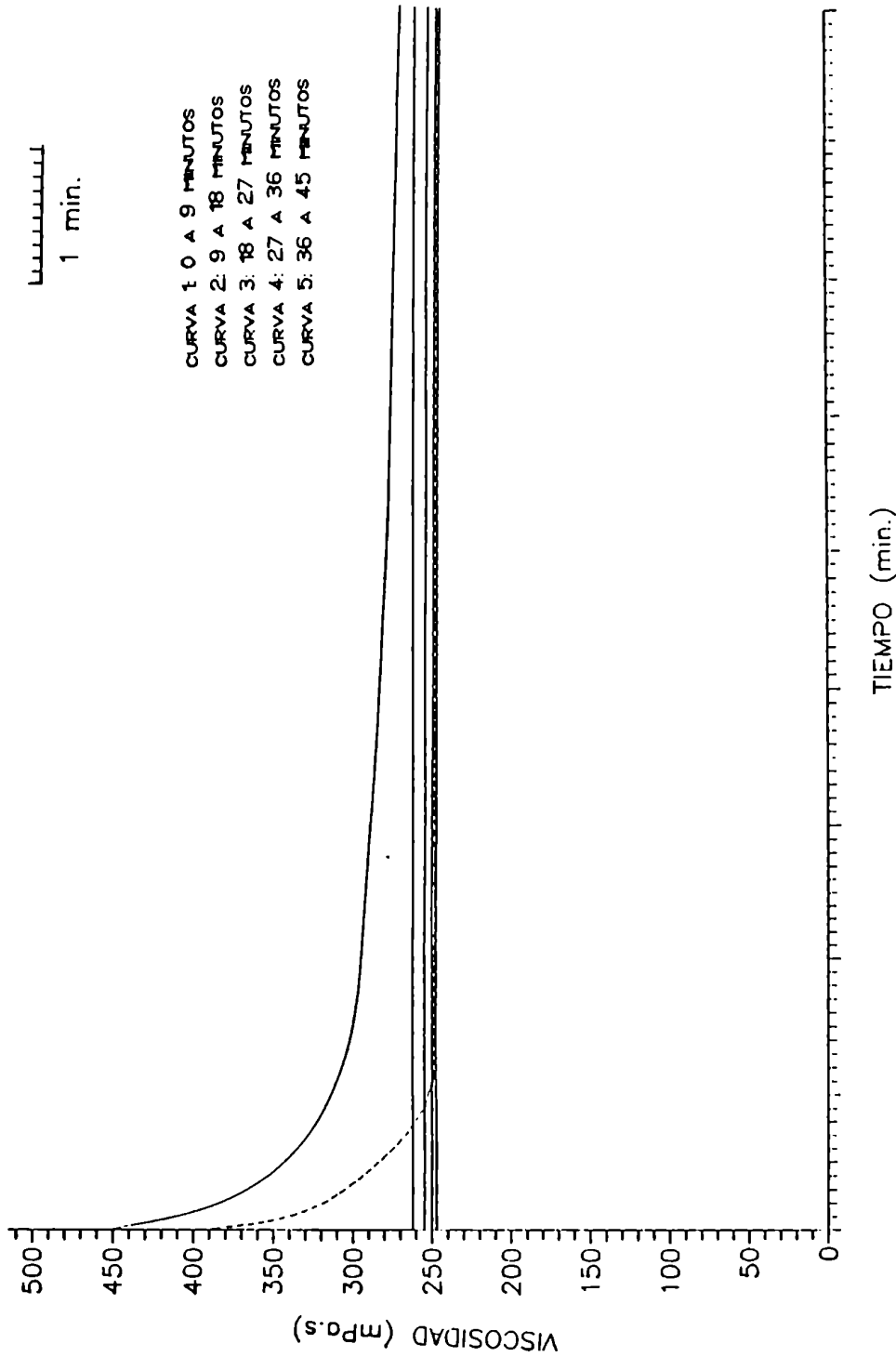


Figura 6.12:

Viscosidad aparente en función del tiempo de cizallamiento, a gradiente de deformación constante, de suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH=6,0 y a 25°C (---). Recuperación de la estructura (- - -). Curva 1 es la curva superior, las demás se numeran en orden decreciente hacia abajo.



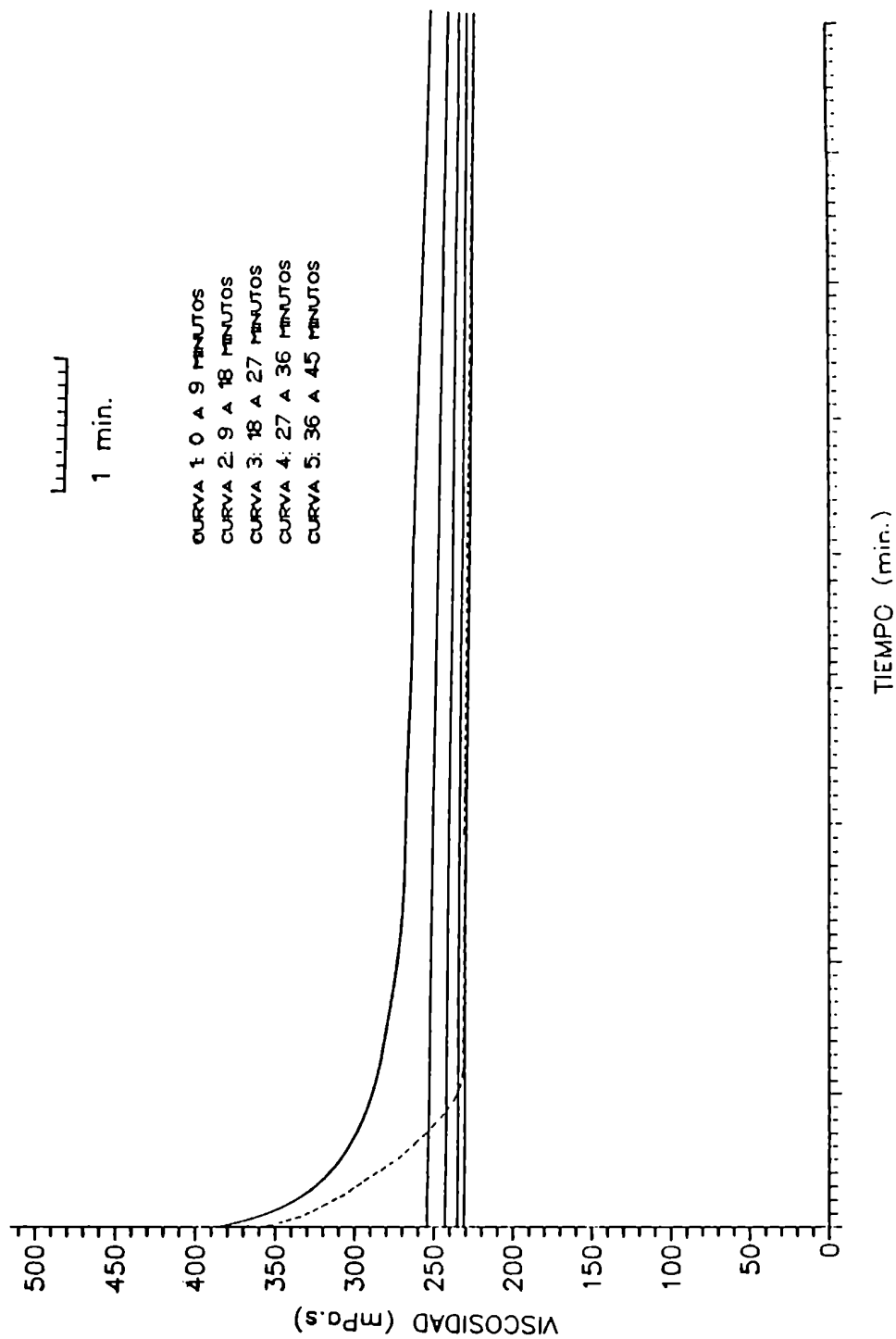
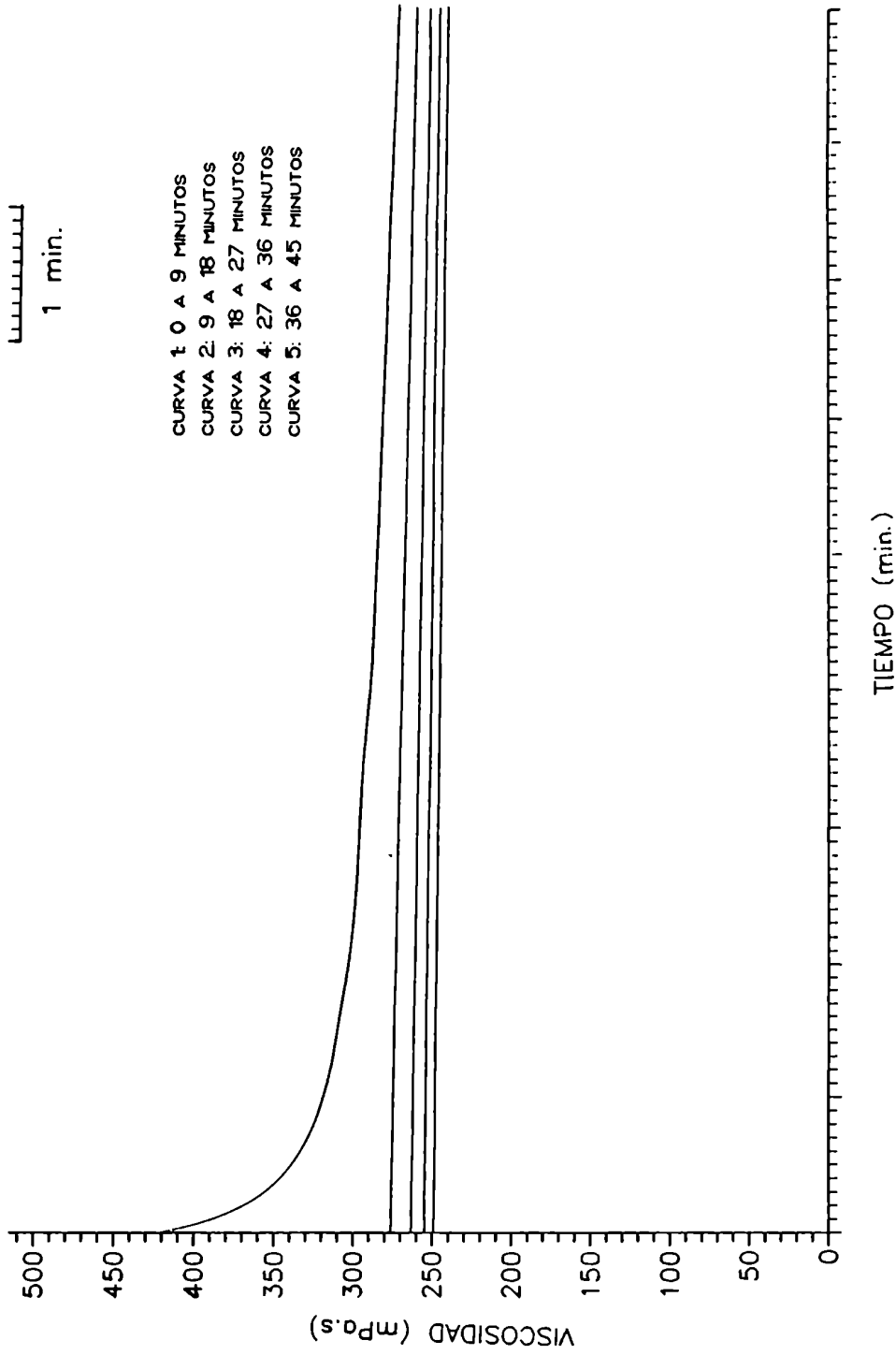


Figura 6.13:

Viscosidad aparente en función del tiempo de cizallamiento, a gradiente de deformación constante, de suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH=5,0 y a 25°C (—). Recuperación de la estructura (---). Curva 1 es la curva superior, las demás se numeran en orden decreciente hacia abajo.



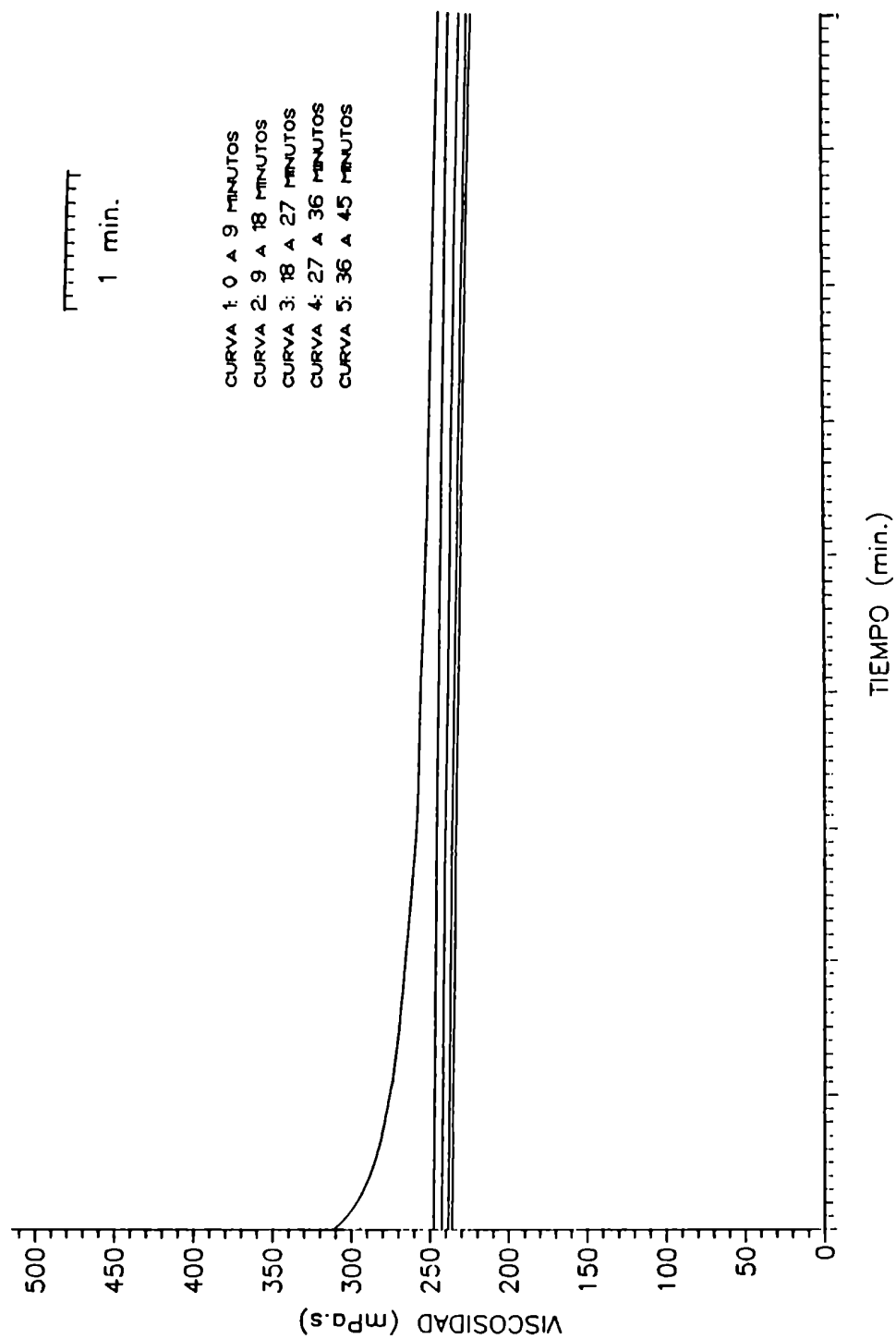


Figura 6.15:

Viscosidad aparente en función del tiempo de cizallamiento, a gradiente de deformación constante, de suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH=5,0 y a 5°C. Curva 1 es la curva superior, las demás se numeran en orden decreciente hacia abajo.

Al igual que para el suero de queso concentrado, las curvas de viscosidad versus tiempo fueron correlacionadas con el modelo de Weltman (1943) (ecuación 6.6). Los resultados obtenidos para las constantes  $\eta_1$  y  $B$  se encuentran en la Tabla 6.4 y en la Figura 6.16 se muestra el ajuste del modelo a los datos experimentales. De las figuras se puede observar que el ajuste del modelo a los datos experimentales es bueno, pudiendo ser utilizado para la predicción de los datos.

Si se comparan los valores obtenidos, en la Table 6.4, para suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado en diferentes condiciones de trabajo, no existe mucha diferencia entre ellos, salvo para el caso de pH 5,0 y 5°C, donde los valores son levemente menores. Es decir que tanto la temperatura como el pH tienen poca influencia sobre la viscosidad del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado. Los valores de  $\eta_1$  y  $B$  para este suero, son sensiblemente menores que para suero de queso concentrado. En la Tabla 6.4 también se presenta la bondad del ajuste entre el modelo y los datos experimentales expresado por medio del parámetro P.

También se intentó reproducir los datos experimentales por medio del modelo de Hahn y col. (1959). Al igual que para el suero de queso concentrado los coeficientes de correlación obtenidos no fueron adecuados, por lo que se descarta el uso de este modelo para describir el comportamiento tixotrópico del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado.

TABLA 6.4

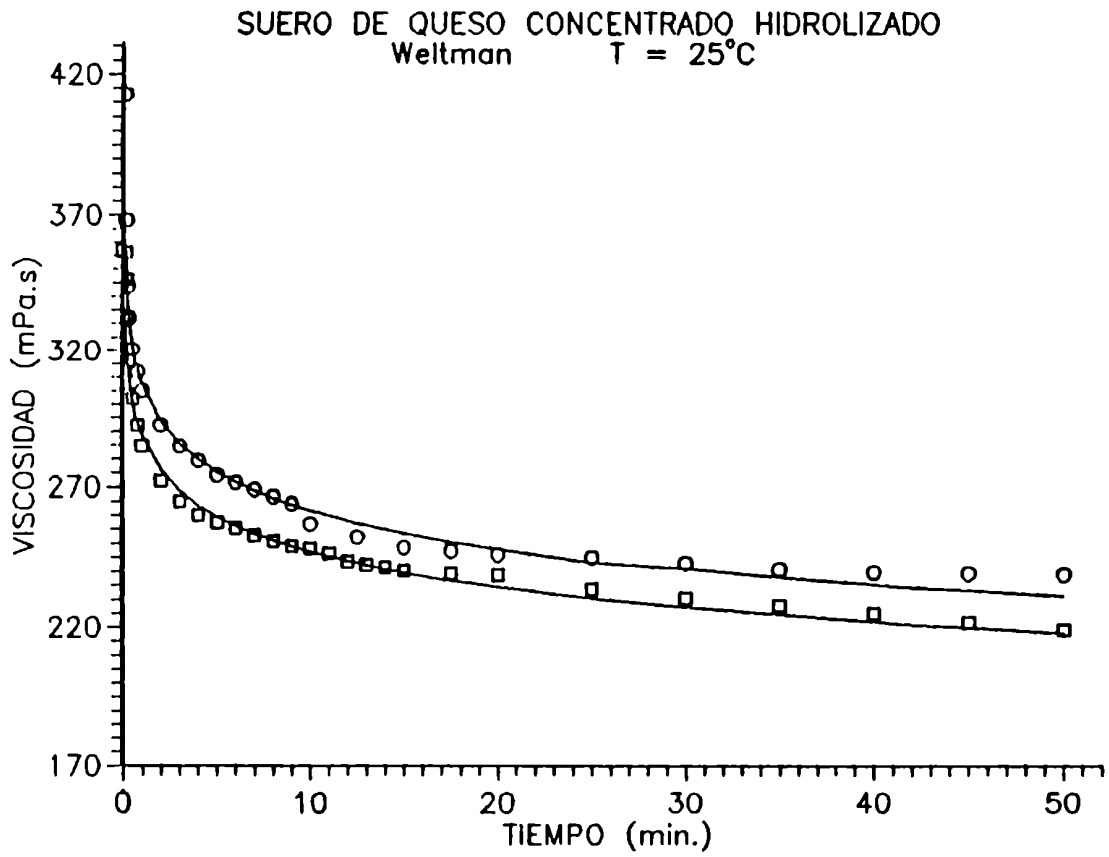
Parámetros del modelo de Weltman (1943) (ecuación 6.6) obtenidos para suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado a pH 6,0 y a pH 5,0 y a temperaturas de 25°C y 5°C.

MUESTRA	$\eta_1$ (mPa.s)	B (mPa.s)	$r_0$	P
SQCH, pH=6,0, T=25°C	314 $\bar{+}$ 4	25 $\bar{+}$ 2	0,990	1,72
SQCH, pH=5,0, T=25°C	297 $\bar{+}$ 5	22 $\bar{+}$ 1	0,971	1,48
SQCH, pH=6,0, T=5°C	319 $\bar{+}$ 4	21 $\bar{+}$ 1	0,997	0,80
SQCH, pH=5,0, T=5°C	267 $\bar{+}$ 3	11 $\bar{+}$ 0,5	0,997	0,36

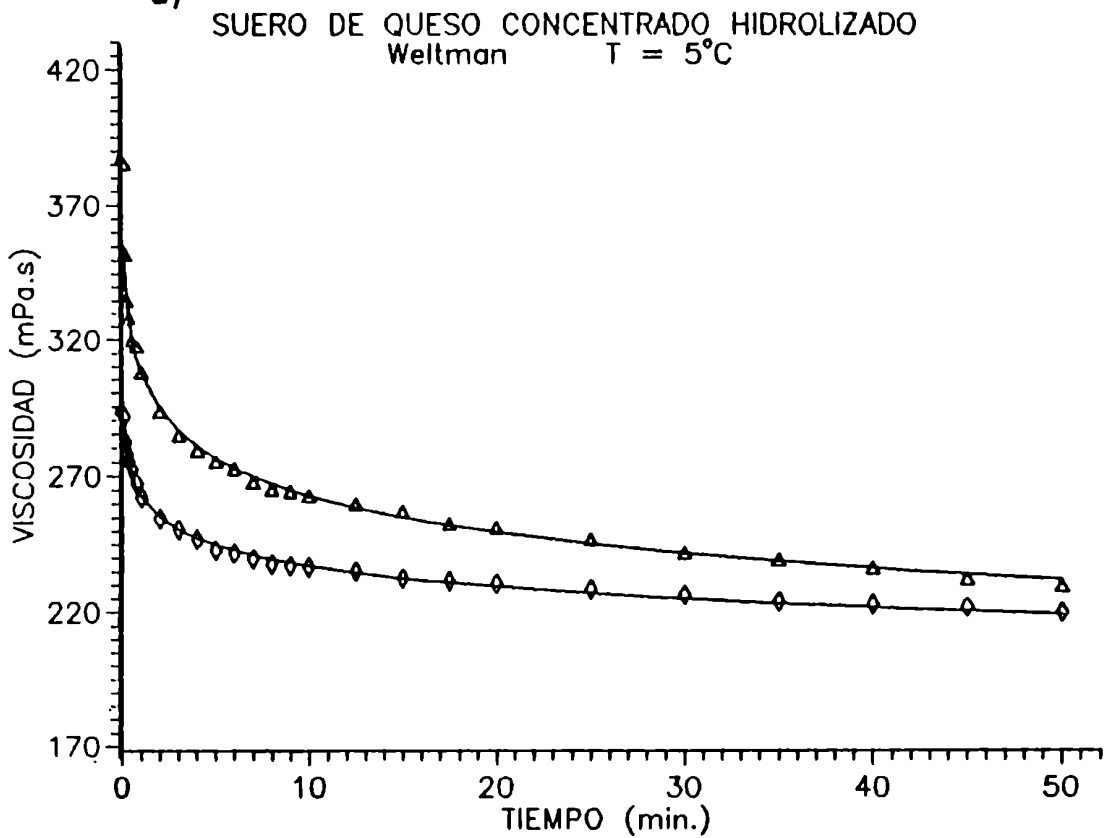
Figura 6.18:

Predicción de la viscosidad aparente en función del tiempo utilizando el modelo de Weltmann (ecuación 8.8) de suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado: a) 25°C, o pH=6,0; □ pH=5,0 y b) 5°C. Δ pH=6,0, ◇ pH=5,0, (—) predicción teórica.

a)



b)



### 6.5. Conclusiones

Uno de los principales problemas que presenta el suero de queso concentrado para su aprovechamiento es, además de su alta concentración de lactosa, su elevada viscosidad, lo que impide un fácil manejo del mismo. Sin embargo, al eliminar los cristales de lactosa por medio de la hidrólisis, la viscosidad desciende obteniéndose así un producto casi líquido. Otra de las ventajas que presenta el suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado relacionado con su comportamiento reológico, es que se caracteriza por ser poco tixotrópico y poco afectado por el pH y la temperatura. Además al tener menos carácter pseudoplástico se podría aproximar su comportamiento al de un fluido newtoniano, simplificándose el tratamiento matemático para el cálculo de requerimientos de bombeo, circulación en caños, etc.

El aumento de la viscosidad que presenta el suero de queso concentrado al aumentar la temperatura, es opuesto al comportamiento de la mayoría de los fluidos. En efecto la mayoría de los alimentos cumplen con la ecuación de Arrhenius (Rao, 1977; Scott Blair, 1969), que predice una disminución de la viscosidad al aumentar la temperatura (Saravacos, 1970; Harper y El Sahrighui, 1965; Rao, 1977).

Con el objeto de obtener alguna explicación respecto de este comportamiento del suero de queso se realizaron dos pruebas cualitativas:



■ Se calentó suero de queso concentrado a una temperatura mayor que 60°C y se vió que la viscosidad descendía y el suero se tornaba líquido (se disuelven los cristales de lactosa).

■ Se agregó 0,1 a 0,5 % p/p de cloruro de calcio, lo que produjo un aumento gradual de la viscosidad con la concentración de la sal. Con 0,5 % p/p de cloruro de calcio se transformó en una pasta muy consistente. Para analizar lo que ocurre al disminuir la concentración de calcio iónico en el suero de queso concentrado se agregó ácido etilendiaminotetraacético (E.D.T.A.), complejante del ión calcio, en concentraciones de 0,5; 1,0 y 2,0 % p/p. Con 0,5 % p/p de E.D.T.A. la viscosidad de suero de queso concentrado disminuyó con respecto a suero de queso concentrado sin complejante. Con 1 y 2 % p/p de E.D.T.A. el descenso de la viscosidad fue mucho más pronunciado y se produjo una separación de fases. Los cristales de lactosa, que normalmente están en suspensión, precipitaron al cabo de 30 minutos cuando se agregó 1,0 % p/p de E.D.T.A. e inmediatamente cuando la concentración fue de 2,0 % p/p. El precipitado consistió principalmente en cristales de lactosa, quedando un líquido sobrenadante. Estos hechos permiten inferir la importancia del calcio en la estructura y propiedades del suero de queso concentrado. Los autores Kuhn y Foegeding (1991) encontraron que en suspensiones de preparados comerciales de concentrados de proteínas de suero (10 % p/p de sólidos) el agregado de E.D.T.A. dificulta la gelación de dichas suspensiones. Estos autores asignan al calcio una función importante en los mecanismos de gelación de la proteínas del suero.

La "solidificación" del suero de queso concentrado al ser colocado a 35°C se podría explicar suponiendo un principio de gelificación de las proteínas del suero a una temperatura menor que las reportadas en la bibliografía (70-90 °C trabajando con soluciones acuosas de concentrados de proteínas de suero en una concentración de 7,5-10 % p/p (Kohnhorst y Mangino, 1985; Melachouris, 1984; Harwalkar y Kalab, 1985)), facilitado por la presencia de calcio y por la alta concentración de lactosa. Schmidt y col. (1986) encontraron que la concentración de lactosa influía en la viscosidad del suero de queso concentrado, siendo ésta mayor a mayor contenido de lactosa. El calcio iónico interactúa con las proteínas del suero, aumentando las interacciones entre ellas y facilitando la formación de redes proteicas, lo cual favorece la gelificación (Schmidt y col, 1978; Kohnhorst y Mangino, 1985; Mangino, 1984). En el suero de queso concentrado coexisten proteínas con cristales de lactosa y altas concentraciones de calcio. La asociación de estos factores podría ser responsable de los aumentos de la viscosidad al aumentar la temperatura. El agregado de un complejante de calcio como el E.D.T.A., impediría la intervención del calcio en la estabilización de las redes proteicas, con lo cual se produciría un descenso brusco de la viscosidad y la consiguiente precipitación de los cristales de lactosa. Las altas temperaturas (mayores a 60°C) producen un descenso de la viscosidad. Esto puede ser debido en parte a la acción del calor sobre las proteínas del suero y por otro lado a la solubilización de los cristales de lactosa.

La disminución del esfuerzo de corte ó de la viscosidad aparente al disminuir el pH, se puede explicar

considerando el efecto del pH sobre las proteínas. Reiner (1949) encontró que la menor viscosidad de una proteína corresponde a su pH isoeléctrico, aumentando a medida que el pH aumenta o disminuye. El pH isoeléctrico de las proteínas del suero es 4,2-5,1 (Morr, 1985); por lo tanto la viscosidad del suero a pH 5,0 debe ser menor que a pH 6,0, ya que este último pH está más alejado de punto isoeléctrico.

Todas estas conclusiones son en realidad presunciones sobre lo que ocurre, ya que la mayoría de los estudios sobre el comportamiento de las proteínas del suero se han realizado trabajando con proteínas puras en sistemas modelo. Seguramente existen relaciones más complejas entre los diferentes componentes del suero de queso concentrado que no pueden ser dilucidadas con las sencillas experiencias realizadas.

## 7. Usos potenciales y breve estimación del costo de producción del suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado

### 7.1. Usos potenciales del suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado

El suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado posee propiedades que lo hacen apto para ser incorporado a ciertos alimentos a fin de otorgarle determinadas características. Puede ser utilizado como fuente de azúcares y, en determinados productos, como fuente de proteína. A continuación se proponen usos para el mismo:

■ Panificación: Puede ser incorporado a la masa para hacer pan reemplazando a la leche y a la sacarosa. La lactosa hidrolizada tiene una buena fermentabilidad y propiedades de pardeamiento no enzimático. Las levaduras fermentan la glucosa, con el consiguiente aumento en el volumen de dióxido de carbono producido, y la galactosa contribuye a un mejor color de la corteza.

■ Helados: Al incorporarse el suero concentrado e hidrolizado a una formulación para helados se puede reemplazar parte de la leche y de la sacarosa. Se obtendrían ventajas como por ejemplo una textura más suave ya que no hay cristalización de lactosa (Rexroat y Bradley, 1986; Harju y Kreula, 1978).

■ Dulce de leche: Puede reemplazar parte de la leche y el

azúcar. Se obtiene un mejor color (Spurgeon y col. 1974).

■ **Productos varios:** Se puede incorporar en cualquier formulación como endulzante ó fuente de proteína.

■ **Alimentación animal:** Podría utilizarse ventajosamente en la alimentación de cerdos ya que al tener bajos porcentajes de lactosa éstos pueden consumir más cantidad.

Se debe tener en cuenta el aumento en el valor nutricional de los productos a los que se agregue el suero de queso debido a la incorporación de proteínas de alto valor biológico.

#### 7.2. Análisis comparativo y breve estimación del costo de producción del suero de queso concentrado parcialmente hidrolizado y preservado

La hidrólisis de la lactosa y preservación del suero de queso concentrado por métodos combinados se propone como alternativa al secado en spray del mismo para obtener suero en polvo. Por lo tanto es interesante hacer una breve comparación de los costos de ambos procesos.

En base a los datos proporcionados por Sancor Cooperativas Unidas Ltda. el costo de producción del queso en polvo está compuesto por los siguientes ítems (los costos de cada etapa están dados en dólares (u\$s a julio de 1990) por kilogramo de suero en polvo):

1) Pasteurización del suero diluido (7 % p/p de sólidos

totales) y evaporación en un evaporador al vacío hasta llegar a un 50 % p/p de sólidos totales

0,13 a 0,15

2) Secado del suero de queso concentrado (50 % p/p de sólidos) es un secadero tipo spray

0,10 a 0,12

3) Resto, de los gastos de elaboración. Este ítem comprende el costo de materia prima, envase, almacenamiento, amortización, etc.

0,15 a 0,17

4) Costo total de elaboración de un kilogramo de suero de queso en polvo

0,38 a 0,44

5) Costo de los gastos administrativos, comerciales, fletes, etc.

0,12 a 0,14

6) Costo total estimado para la elaboración de un kilogramo de suero de queso en polvo

0,50 a 0,58

Para la estimación del costo de producción del suero

de queso concentrado y parcialmente hidrolizado se tomaron en cuenta los datos proporcionados por Sancor Cooperativas Unidas Ltda. Para realizar los cálculos para el suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado se consideró que 2 kilogramos de suero de queso concentrado equivalen, en contenido de sólidos, a 1 kilogramo de suero en polvo y se reemplazó el costo de secado en spray por el agregado de la enzima y aditivos. El costo de cada etapa está dado en dólares (u\$s) por kilogramo de suero concentrado.

1) Pasteurización del suero diluido (7 % p/p de sólidos) y evaporación en un evaporador al vacío hasta llegar a un 50 % p/p de sólidos totales

0,065 a 0,075

2) Costo de los aditivos agregados para la hidrólisis y preservación del suero de queso concentrado (50 % p/p de sólidos) (enzima, conservadores, ácido fosfórico)

0,13

3) Resto de los gastos de elaboración. Este ítem comprende los costos de materia prima, envase, almacenamiento, amortización, etc.

0,075 a 0,086

4) Costo total de elaboración de un kilogramo de suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado estable microbiológicamente a temperatura ambiente

0,27 a 0,29

Debe tenerse en cuenta que sólo se comparan los costos operativos y de materia prima, no los de capital. Los costos de los equipos de secado en spray son mayores que los necesarios para realizar la hidrólisis. Con respecto al envase el suero secado en spray posee mayores exigencias que el suero hidrolizado. Pero el transporte del suero hidrolizado es más caro que el de suero en polvo (considerando el transporte de 1 kilogramo de sólidos)

Al comparar el costo del secado en spray con el de hidrólisis y preservación del suero de queso concentrado se debe tener en cuenta que el suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado y preservado posee propiedades funcionales superiores a las del suero en polvo. El suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado tiene menor concentración de lactosa y por lo tanto no presenta problemas de textura ni produce problemas digestivos y es fácilmente bombeable.

Es conveniente aclarar que no se pretendió hacer un estudio de costos de obtención del suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado, sinó simplemente tener idea de su factibilidad económica.



## 8. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método simple de obtención de suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado estable microbiológicamente a temperatura ambiente durante tres meses. Las ventajas de este proceso son su factibilidad de implementación y la obtención de un producto de características mejoradas respecto del suero de queso concentrado. Efectivamente, el suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado es más dulce, menos viscoso, tiene menor actividad de agua (lo que facilita su preservación) y al no poseer cristales de lactosa su textura es suave y cremosa.

En base a los resultados obtenidos se propone como método de preservación del suero de queso el detallado en la Figura 8.1. El suero de queso obtenido luego de aplicar el proceso descrito posee las siguientes características: pH=5,0, % hidrólisis = 63-68 %, 0,2 % p/p de conservador,  $a_w=0,89-0,90$ , 50 % p/p sólidos totales, 8-10 % p/p lactosa, no posee cristales de lactosa, es amarillo, de baja viscosidad, de textura suave y estable microbiológicamente a temperatura ambiente durante 3 meses.

A continuación se resumen los principales estudios y hallazgos realizados:

■ Se estudió el efecto de diversos factores (velocidad de agitación, concentración de enzima, temperatura, pH, presencia de conservadores, presencia de inhibidores de la enzima, concentración de sólidos del suero, concentración de lactosa) en la cinética de hidrólisis enzimática de lactosa.

Figura 8.1

Método propuesto para el procesamiento y preservación del suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado.

SUERO DE QUESO CONCENTRADO

- 50 % p/p sólidos totales
- pH = 6,2-6,3
- $a_w = 0,94-0,95$
- 34-35 % p/p lactosa
- Alta concentración de lactosa
- Problemas de textura
- Baja digestibilidad
- Alta viscosidad
- No es estable microbiológicamente a temperatura ambiente

\* Agregado de conservador

0,2 % p/p de sorbato de potasio ó

0,2 % p/p de propionato de calcio ó

0,1 % p/p de sorbato de potasio + 0,1 %  
p/p de propionato de calcio

\* Ajuste del pH a 6,0 con ácido fosfórico  
(85 % p/p)

\* Termostatización

\* Agregado de la lactasa Maxilact LX 5000  
(Gist Brocades nv, Holanda). Concentración:  
0,1 % p/p

(continuación de la Tabla 8.1)

↓ \* Hidrólisis de la lactosa en un reactor batch  
termostatzado. Condiciones de hidrólisis:  
T = 37 °C, pH = 6,0, tiempo de hidrólisis=  
7 horas

SUERO DE QUESO CONCENTRADO  
PARCIALMENTE HIDROLIZADO

- 50 % p/p sólidos totales
- pH = 6,0
- $a_w = 0,89-0,90$
- 8-10 % p/p lactosa

- Textura suave y cremosa
- Mayor digestibilidad
- Menor viscosidad
- Mayor dulzura

SUERO DE QUESO CONCENTRADO Y PARCIALMENTE HIDROLIZADO

↓ \* Ajuste del pH a 5,0 con  
ácido fosfórico (85 % p/p)

SUERO DE QUESO CONCENTRADO PARCIALMENTE HIDROLIZADO ESTABLE  
MICROBIOLOGICAMENTE A TEMPERATURA AMBIENTE  
DURANTE TRES MESES

La importancia de este estudio reside en que en bibliografía no se encuentran trabajos realizados en medios tan concentrados. Los resultados obtenidos permiten cuantificar el fenómeno de la hidrólisis en función de los parámetros de operación. Esto es particularmente útil a fin de realizar predicciones para el diseño de un proceso. Un resultado particularmente interesante es que en este sistema (suero de queso concentrado) la temperatura óptima de trabajo de la enzima, para ciertas partidas de suero, está por encima de la normalmente utilizada en leche o suero de queso diluido. Esto permitiría trabajar a mayores temperaturas con el consiguiente ahorro de tiempo. Sin embargo es necesario profundizar más sobre este tema.

■ Se modeló el fenómeno de hidrólisis enzimática de lactosa a través de ecuaciones de bibliografía y de una ecuación que contempla las condiciones en que ocurre la hidrólisis de lactosa en el suero de queso concentrado. Los resultados experimentales se pueden representar por medio de un modelo tipo Michaelis Menten con inhibición competitiva por galactosa y por medio de un modelo tipo Michaelis Menten con inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por glucosa.

■ Se estudió el efecto del grado de hidrólisis en la  $a_w$  del producto resultante. Debido a la hidrólisis de lactosa la  $a_w$  del suero de queso concentrado disminuye de 0,95-0,94 a 0,90-0,89 y es posible correlacionar matemáticamente el porcentaje de hidrólisis alcanzado con la  $a_w$ .

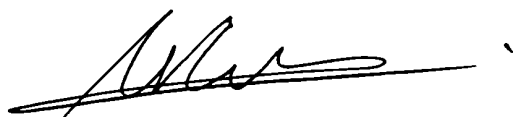
■ Se determinó el efecto del agregado de solutos en la resistencia térmica de la lactasa en sistemas modelo. Se

encontró que el agregado de sacarosa ó glicerol estabilizan a la enzima respecto de un control sin soluto. Los resultados permitieron aclarar el efecto observado de la mayor resistencia térmica de la enzima en suero de queso concentrado respecto de suero de queso diluido.

■ Se determinó el efecto de diferentes factores:  $a_w$ , pH y agentes antimicrobianos, en la inhibición del crecimiento de bacterias hongos y levaduras capaces de crecer en suero de queso concentrado. Los resultados permitieron plantear las combinaciones de factores más efectivas para lograr la supresión del crecimiento de microorganismos patógenos o deteriorativos durante el almacenamiento de suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado a 25-37°C.

■ Se caracterizó el comportamiento reológico de suero de queso concentrado y suero de queso concentrado y parcialmente hidrolizado. La hidrólisis produce un descenso notable de la viscosidad y tixotropía del suero de queso concentrado. Es también remarcable el efecto de la temperatura sobre la viscosidad del suero de queso concentrado, ya que la viscosidad es menor a menor temperatura, a la inversa que para la mayoría de los alimentos.

Los resultados expuestos en este trabajo son de utilidad a fin de mejorar y optimizar el aprovechamiento del suero de queso mediante un método simple que puede ser utilizado por cualquier fabricante de quesos, ya que no requiere de equipamiento costoso.

  
M. Cecilia Ferrás

  
Dra. STELLA M. ALZAMORA

9. APENDICE 1Método de Marquardt

El método utilizado para la regresión no lineal de ecuaciones con dos parámetros a determinar fue desarrollado por Marquardt (1963) e implementado por IBM SHARE LIBRARY. N° 309401, (1966). El mismo permite obtener una estimación de los parámetros  $\beta_i$  ( $i=1,2,\dots,p$ ) de una regresión no lineal (ecuación A1) a partir de la minimización de la suma de los cuadrados de los residuos (SC).

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_q; \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p) + \text{error} \quad (\text{A1})$$

$$SC = \sum_{i=1}^N [y_i - f_i(x, \beta)]^2 \quad (\text{A2})$$

siendo  $f_i(x, \beta)$  la función usada para predecir los valores de  $y$  ( $f_i(x, \beta) = \hat{y}$ ).

El programa realiza una secuencia iterativa de cálculos que finaliza cuando la SC es menor que una cota previamente establecida. Los usuarios deben proveer los datos, el modelo matemático y los valores iniciales de los parámetros. El programa tabula los datos experimentales  $(x, y)$ , los valores predichos de  $y$  ( $\hat{y}$ ), las diferencias  $(y - \hat{y})$  y calcula los siguientes valores:

$$B = (B_1, B_2, \dots, B_p) \quad \text{Vector de parámetros estimados} \quad (\text{A3})$$

$$DE\% = 100 \left[ \frac{SC}{N - P} \right] \quad \text{Desviación standard porcentual del ajuste} \quad (A4)$$

$$PTP^{-1} = \begin{bmatrix} c_{11} & \dots & c_{1p} \\ \vdots & & \vdots \\ c_{p1} & \dots & c_{pp} \end{bmatrix} = \frac{1}{DE^2} \quad \text{Matriz de varianza-covarianza} \quad (A5)$$

$$MR = \begin{bmatrix} r_{11} & \dots & r_{1p} \\ \vdots & & \vdots \\ r_{p1} & \dots & r_{pp} \end{bmatrix} \quad \text{Matriz de correlación entre los parámetros} \quad (A6)$$

$$SE (\beta_j)^2 = DE^2 c_{jj} \quad \text{Varianza del parámetro} \quad (A7)$$

En base a la ecuación (A7) es posible calcular el intervalo de confianza individual para cada parámetro de la siguiente manera:

$$\left[ B_j \pm t_{(N-1, 1-\alpha/2)} SE (B_j) \right] \quad (A8)$$

donde  $\alpha$  es el parámetro estadístico que indica el nivel de confianza.

## 10. APENDICE 2

### Método de regresión no lineal para el modelo de tres parámetros

El método utilizado para la regresión no lineal de las ecuaciones a tres parámetros forma parte de las rutinas de cálculo computacional del Biomedical Computer Programs P-Series (1979). Estas fueron diseñadas por L. Engelman, J.W. Frane y R.I. Jennrich y editadas por W.J. Dixon y M.B. Brown, University of California Press (Los Angeles). Dentro de estas rutinas se utilizó el programa PAR (Derivative-Free Nonlinear Regression), que estima los parámetros de una ecuación no lineal sin necesitar que se le especifiquen las derivadas de la función.

El PAR estima los parámetros de la función no lineal por cuadrados mínimos utilizando un algoritmo de pseudo-Gauss-Newton. El programa requiere los valores iniciales de los parámetros, y se puede acotar el valor de los mismos dentro de un rango especificado. El programa calcula los siguientes ítems:

- El valor de los parámetros.
- La suma de los cuadrados de los residuos.
- La matriz asintótica de correlación de los parámetros.
- El error cuadrático medio estimado.
- La desviación standard de cada parámetro.



1 TABLAS DE DATOS PARA LA HIDROLISIS DE LACTOSA EN SUERO DE QUESO

A continuación se detallan los datos obtenidos para las experiencias de hidrólisis de lactosa en suero de queso. Los tiempos de hidrólisis se expresan en minutos. Para todos los casos, salvo que se indique lo contrario, la concentración de sólidos del suero de queso concentrado utilizado fue 49,5-52,0 % p/p.

a) Influencia de la velocidad de agitación.  
 Temperatura = 37 °C, pH = 6,0, concentración de enzima = 0,1 % p/p.

7 rps		20 rps	
tiempo	% hidrólisis	tiempo	% hidrólisis
0	0	0	0
16,92	10,6	17,87	13,2
31,54	12,7	32,10	16,2
46,20	19,8	46,82	18,3
61,44	22,8	64,93	26,8
92,10	27,3	91,43	29,7
121,35	35,3	121,46	33,9
184,13	42,3	181,03	42,2
245,20	52,7	242,18	51,5
301,10	55,1	345,20	55,6
362,31	57,0	401,53	58,3
421,50	62,5		

## b) Influencia de la concentración de enzima

Temperatura = 37°C, pH = 6,0.

0,05 % p/p lactasa		0,1 % p/p lactasa	
tiempo	% hidrólisis	tiempo	% hidrólisis
0	0	0	0
16,33	5,2	16,57	9,2
30,15	12,6	32,31	15,5
47,56	17,3	46,18	20,0
59,03	20,7	61,52	22,2
92,21	23,1	91,40	28,4
119,89	26,8	121,48	35,1
181,01	34,7	181,61	42,4
242,52	35,9	241,84	49,4
300,99	43,3	301,30	54,6
360,38	44,4	362,40	59,0
421,03	45,7	421,50	63,7

0,2 % p/p lactasa		0,3 % p/p lactasa	
tiempo	% hidrólisis	tiempo	% hidrólisis
0	0	0	0
16,20	12,9	11,30	16,6
45,61	27,0	20,84	24,7
77,73	39,4	30,69	32,1
121,12	52,1	41,17	43,4
171,12	65,1	53,23	50,9
240,91	76,0	61,15	60,4
		80,58	68,5
		101,48	77,1
		122,66	82,1
		156,06	87,0

0,4 % p/p lactasa		0,5 % p/p lactasa	
tiempo	% hidrólisis	tiempo	% hidrólisis
0	0	0	0
10,98	23,4	13,99	31,9
20,73	34,7	20,97	33,3
32,34	47,2	31,39	40,4
40,57	55,0	44,53	55,0
50,66	60,7	53,05	63,5
62,47	69,3	65,03	72,3
82,78	80,5	81,88	83,7
102,63	83,1	101,97	85,3
124,16	88,0		

c) Influencia de la temperatura y del contenido de sólidos  
pH = 6,0, concentración de enzima = 0,1 % p/p.

i) Suero de queso concentrado de 49,5-52,0 % p/p de sólidos.

T = 25°C		T = 37°C	
tiempo	% hidrólisis	tiempo	% hidrólisis
0	0	0	0
16,75	5,0	16,57	9,2
31,50	9,3	32,31	15,6
46,82	11,6	46,18	20,0
61,61	15,7	61,52	22,3
91,88	20,8	91,40	28,4
121,73	27,1	121,48	35,1
183,40	35,3	181,61	42,4
243,11	41,9	241,84	49,4
301,15	44,0	301,30	54,6
361,44	48,6	362,40	59,0
421,83	52,4	421,50	63,7

T = 43°C		T = 47°C	
tiempo	% hidrólisis	tiempo	% hidrólisis
0	0	0	0
16,97	15,4	16,43	11,7
31,88	17,8	31,05	22,5
47,64	25,8	46,74	26,4
62,13	28,0	61,61	32,6
81,24	36,6	91,61	39,5
121,75	43,0	122,13	47,0
181,75	53,7	181,28	56,0
240,89	58,9	243,11	62,7
301,68	66,2	302,32	67,8
361,88	69,0	362,26	72,0
421,68	72,8	421,83	75,1

T = 50°C		T = 53°C	
tiempo	% hidrólisis	tiempo	% hidrólisis
0	0	0	0
19,01	13,9	17,08	7,7
31,65	14,2	30,90	11,1
46,33	17,7	46,26	23,2
61,51	25,6	62,02	21,0
92,66	29,2	91,37	22,6
123,39	31,1	121,38	23,8
181,73	29,3	181,26	24,6
241,33	31,4	242,13	22,6
301,27	31,9	301,46	23,8
361,80	31,8	361,49	24,8
424,68	34,6	421,17	23,9

T = 58°C

tiempo	% hidrólisis
0	0
15,34	1,4
31,56	0,9
46,78	0,6
62,18	0
91,02	1,0
121,94	0
180,90	1,1
241,73	0
302,12	0
361,29	0
421,88	1,7

ii) Suero de queso concentrado de 48,0; 51,9 y 57,0 % p/p de sólidos

1) Temperatura = 37 °C

48,0 % p/p sólidos		51,9 % p/p de sólidos	
tiempo	% hidrólisis	tiempo	% hidrólisis
0	0	0	0
16,21	9,3	16,57	9,2
31,95	17,5	32,31	15,6
62,27	19,7	46,18	20,0
120,61	37,2	61,52	22,3
181,68	46,7	91,40	28,4
242,10	54,1	121,48	35,1
301,18	61,8	181,61	42,4
360,90	64,5	241,84	49,4
422,33	68,3	301,30	54,6
		362,40	59,0

421,50

63,7

57,0 % p/p sólidos

tiempo	% hidrólisis
0	0
18,67	4,3
32,17	9,2
46,62	9,9
61,60	9,7
93,58	14,8
122,20	16,9
182,38	23,8
241,48	29,7
305,43	32,0
361,63	37,5
421,32	40,6

## 2) Temperatura = 47°C

48,0 % p/p sólidos

tiempo	% hidrólisis
0	0
32,04	25,1
62,50	33,1
121,95	50,6
181,03	61,6
241,84	69,3
300,75	77,0
363,67	82,9
420,10	83,9

51,9 % p/p sólidos

tiempo	% hidrólisis
0	0
16,43	11,7
31,05	22,5
46,74	26,4
61,61	32,6
91,61	39,5
122,13	47,0
181,28	56,0
243,11	62,7
302,32	67,8
362,26	72,0

421,83                      75,1

57,0 % p/p sólidos

57,0 % p/p sólidos

(0,3 % p/p EDTA)

tiempo	% hidrólisis
0	0
16,48	8,4
31,45	8,9
47,18	12,1
62,00	15,3
91,48	18,6
121,25	21,5
183,23	28,5
243,15	29,4
302,37	31,6
362,50	32,5
424,15	34,8

tiempo	% hidrólisis
0	0
18,40	8,2
35,63	13,5
61,22	18,0
92,43	24,0
120,79	30,1
181,99	37,2
241,38	46,0
301,55	49,9
362,18	56,4
421,43	60,7

iii) Suero de queso diluído, 7 % p/p sólidos  
pH = 6,0, 0,02 % p/p enzima

T = 37°C

T = 43°C

tiempo	% hidrólisis
0	0
9,23	8,9
11,08	15,8
56,29	27,5
122,18	39,2
182,56	45,5
236,74	50,5
360,52	57,2
419,89	61,3

tiempo	% hidrólisis
0	0
10,96	7,1
31,55	16,3
61,48	15,8
123,88	16,4
241,77	16,5
419,91	15,9

T = 47°C

tiempo	% hidrólisis
0	0
11,75	3,4
31,25	3,9
60,14	4,4
123,48	3,8
240,55	4,1
421,46	4,3

d) Influencia del pH.

Temperatura = 37°C, concentración de enzima = 0,1 % p/p.

pH = 5,0		pH = 5,5	
tiempo	% hidrólisis	tiempo	% hidrólisis
0	0	0	0
30,83	5,5	18,67	6,8
61,08	5,8	30,63	10,1
121,25	5,2	45,50	12,8
241,78	4,3	62,22	10,5
301,52	4,7	92,15	10,2
371,96	5,7	122,05	11,5
422,25	5,5	180,97	12,5
		240,71	11,7
		304,45	11,5
		360,64	11,4
		423,07	11,2



pH = 6,0		pH = 6,5	
tiempo	% hidrólisis	tiempo	% hidrólisis
0	0	0	0
16,57	9,8	16,45	18,0
32,31	15,5	31,30	29,2
46,19	20,4	46,44	30,4
61,52	22,3	61,61	30,8
91,40	28,4	91,88	35,9
121,48	34,6	121,30	42,3
181,61	42,4	180,77	50,8
241,58	49,1	244,86	54,5
301,22	54,6	302,53	55,4
362,34	58,9	361,47	51,8
421,27	63,4	421,34	53,9

pH = 7,0	
tiempo	% hidrólisis
0	0
17,48	13,3
30,98	16,2
46,41	16,6
61,48	18,5
90,05	21,9
120,32	25,3
182,89	29,3
242,03	31,1
301,60	31,9
361,56	33,5
422,51	33,9

e) Presencia de glucosa o galactosa.

Temperatura = 37°C, pH = 6,0, concentración de enzima = 0,1 p/p.

5 % p/p glucosa		5 % p/p galactosa	
tiempo	% hidrólisis	tiempo	% hidrólisis
0	0	0	0
6,35	7,6	16,67	2,5
10,97	8,8	30,92	3,9
15,65	9,3	46,67	3,7
30,63	12,6	61,96	6,4
46,22	15,6	91,20	7,0
60,84	19,6	122,17	9,1
121,13	25,7	181,87	8,9
181,15	29,6	245,13	13,5
240,53	38,5	303,43	21,8
361,08	39,5	361,27	23,7
422,47	48,6	422,47	28,1

f) Influencia de los conservadores agregados.

Temperatura = 37°C, pH = 6,0, concentración de enzima = 0,1 % p/p.

0,2 % p/p de sorbato de potasio		0,2 % p/p de propionato de calcio	
tiempo	% hidrólisis	tiempo	% hidrólisis
0	0	0	0
16,87	13,8	16,63	13,3
30,08	18,1	30,28	17,9
46,50	20,6	45,80	19,8
61,23	24,3	60,87	24,5
91,86	28,6	91,53	30,6

120,86	35,0	121,27	34,2
181,11	43,3	181,43	42,3
242,18	49,7	241,75	50,1
302,22	54,8	302,08	55,3
361,88	56,6	361,43	59,1
433,04	62,3	421,71	63,1

0,1 % p/p de sorbato de potasio +  
0,1 % p/p de propionato de calcio

tiempo      % hidrólisis

0	0
15,78	10,6
31,22	17,4
46,58	21,6
61,25	23,6
91,53	28,5
120,65	34,9
181,42	42,1
246,00	50,1
300,08	53,7
360,76	58,9
421,35	64,0

g) Variación de la concentración de lactosa soluble en función de avance de la reacción de hidrólisis.

Temperatura = 37°C, pH = 6,0, concentración de enzima = 0,1 % p/p

Suero concentrado completo		Sobrenadante (sin cristales)	
tiempo	% lactosa	tiempo	% lactosa
0	35,0	0	-
30,00	31,6	30,00	16,1

59,90	27,2	59,90	16,8
120,90	24,2	120,90	15,7
179,27	20,5	179,27	14,2
241,38	18,9	241,38	11,2
300,80	15,1	300,80	11,6
361,20	12,2	361,20	10,5
423,85	9,4	423,85	10,2
481,22	7,2	481,22	7,9

## h) Influencia del contenido de cristales

Temperatura = 37°C, pH = 6,0, concentración de enzima = 0,1 % p/p.

13,4 % p/p lactosa		17,1 % p/p lactosa	
tiempo	% hidrólisis	tiempo	% hidrólisis
0	0	0	0
6,22	4,3	7,50	8,3
16,56	21,7	17,82	11,1
30,67	26,4	32,17	18,9
47,73	36,9	52,23	27,7
60,00	43,4	62,83	36,0
90,37	54,0	92,93	48,6
121,77	62,3	122,93	55,7

24,1 % p/p lactosa		29,0 % p/p lactosa	
tiempo	% hidrólisis	tiempo	% hidrólisis
0	0	0	0
6,50	7,4	7,93	2,9
16,00	8,2	17,73	9,3
30,65	14,8	31,74	16,4
47,75	19,5	45,90	18,3
61,00	26,1	62,22	23,2

91,80  
127,48

81,8  
96,8

93,84  
128,74

93,8  
98,8

35,8 p/p lactosa  
tiempo % hidrólisis

,50  
15,66  
29,90  
45,36  
60,77  
90,08  
120,66

,8  
14,5  
18,4  
25,8  
30,8  
35,8

Bibliografía

Agbebavi, J.T., Rouleau, D. y Myer, R.C. (1987). The effects of whey cations on the kinetic parameters of a model for the enzymic hydrolysis of lactose. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 37:153.

Alais, C. "Ciencia de la leche". Compañía Editorial Continental S.A.. Barcelona, España.

Alaviuhkola, T. y Harju, M. (1985). Utilization of whey protein concentrate and hydrolyzed whey by growing pigs. *Acta Agric. Scand.*, 35:213.

Alzamora, S.M., Gercenson, L.N., Cerruti, P. y Rojas, A.M. 1989. Shelf stable pineapple for long term non-refrigerated storage. *Lebensm-Wiss u Technol.*, 22:233.

A.O.A.C. (1980). "Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists", editado por W. Horwitz, 13<sup>o</sup> edición.

Argos, P., Rossmann, M.G., Grau, J.M., Zuber, H., Frank, G. y Tratschin, J.D. (1979). Thermal stability and protein structure. *Biochemistry*, 18:5698.

Asp, N.G., Burvall, A., Dahlqvist, A. Hallgreen, P. y Lundblal, A. (1980). Oligasaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase. Part II: oligosaccharides structures. *Food Chemistry*, 5:147.

Atkins, G.L. y Nimmo, I.A. (1973). The reliability of

Michaelis constants and maximum velocities estimated by using the integrated Michaelis-Menten equation. *Biochem. J.*, 135:779.

Ayerst, G. (1966). The influence of physical factors on deterioration by moulds. *Soc. Chem. Ind. Monogr.*, 23:14

Ayerst, G. (1969). The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *J. Stored Prod. Res.*, 5:127.

Back, J.F., Oakenfull, D. y Smith, M.B. (1979). Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry*, 18:5191.

Baer, R.J. and Loewenstein, M. (1979). Activity of a  $\beta$ -D-galactosidase from *Saccharomyces lactis* at temperatures below 0°C. *J. Dairy Sci.*, 62:1041.

Baird Parker, A.C. (1969). The use of Baird-Parker medium for the isolation and enumeration of *Staphylococcus aureus*. En "Isolation methods for microbiologists" editado por D.A. Shapton y G.W. Gould. Academic Press, New York.

Baird Parker, A.C. y Freame, B. (1967). Combined effect of water activity, pH and temperature on the growth of *Clostridium botulinum* from spore and cell inocula. *J. Appl. Bacteriol.*, 30:420.

Baird-Parker, A.C. (1980). Acidos orgánicos. En "Ecología microbiana de los alimentos", volumen I. International Commission on Microbiological Specifications for Foods.

Editorial Acribia, España.

Baldock, J.D., Frank, P.R., Graham, P.P. y Ivey, F.J. (1979). Potassium sorbate as a fungistatic agent in country ham processing. *J. Food Prot.* 42:780.

Ball, C.D., Hardt, C.R. y Dudders, W.J. (1943). Influence of sugars on the formation of sulphhydryl groups in heat denaturation and heat coagulation of egg albumina. *J. Biol. Chem.*, 151:163.

Barnett, J.A., Payne, R.W. y Yarrow, D. (1983). "Yeasts, characteristics and identification". Cambridge. Cambridge University Press.

Benedict, S.R. (1946). The analysis of the whole blood. *J. Biol. Chem.* 150:141.

Benmergui, E.A., Ferro Fontán, C y Chirife, J. (1979). The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. I.  $a_w$  prediction in aqueous single electrolyte solutions. *J. Food Technology*, 14:625.

Bergmeyer, H.U. (1983). "Methods of enzymatic analysis". Volumen I: Fundamentals. Tercera Edición, Verlag Chemie.

Bernal, V. y Jelen, P. (1984). The effect of calcium binding on thermal denaturation of bovine  $\alpha$ -lactalbumine. *J. Dairy Sci.*, 67:2452.

Bernal, V. y Jelen, P. (1985). Thermal stability of whey



proteins, a calorimetric study. *J. Dairy Sci.*, 68:2847.

Beuchat, L. (1981). Combined effect of solutes and food preservatives on rates of inactivation and colony forming by heated spores and vegetative cells of molds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41:472.

Bianchi, M.A., Pilosof, A.M.R. y Bartholomai, G. (1985). Rheological behavior of comminuted meat proteins containing soy protein isolates. *J. Texture Studies*, 16:193.

Boeker, E.A. (1982). Initial rates. A new plot. *Biochem. J.*, 203:117.

Boeker, E.A. (1987). Analytical methods for fitting integrated rate equations. A discontinuos assay. *Biochem. J.*, 245:67.

Boer, R y Robbertsen, T. (1981). A purified hydrolyzed lactose syrup made from ultrafiltrate permeate. *Netherland Milk Dairy J.*, 35:95.

Briggs G.E. y Haldane, J.B.S. (1925). Kinetics of enzyme action. *J. Biol. Chem.*, 106:67.

Brimelow, J.C.B. (1985). A pragmatic approach of the developments of new intermediate moisture foods. In "Properties of water in foods, in relation to quality and stability" editado por D. Simatos y J.L. Multon, Martinus Nijhoff Publishers.

Brockman, M.C. (1970). Development of intermediate moisture

foods for military use. Food Technol., 24:896.

Bromley, L.A. (1973). Thermodynamic properties of strong electrolytes in aqueous solutions. A.I.C.H.E. J., 19:313.

Brown, A.J. (1902). Trans. Chem. Soc., 81:373.

Brown, A.D. (1974). Microbial water relation: features of the intracellular composition of sugar tolerant yeasts. J. Bacteriol., 118:769.

Brown, A.D. (1976). Microbial water stress. Bact. Rev., 40:803.

Buera, M.P. (1983). Cinética de las reacciones de pardeamiento no enzimático entre azúcares y glicina en soluciones de alta actividad de agua. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.

Buera, M.P., Chirife, J. y Resnik, S.L. (1990). Non-enzymatic non-oxidative browning in hydrolyzed shelf-stable concentrated cheese whey and in related model systems. J. Food Sci., 55:697.

Burvall, A., Asp, N.G. y Dahlgvist, A. (1979). Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactosa with *Saccharomyces lactis* lactase. Part I: Quantitative aspects. Food Chem., 4:248.

Burvall, A., Asp, N.G., Dahlgvist, A. y Oste, R. (1977). Nutritional value of lactosa hydrolyzed milk: protein quality after some industrial processes. J. Dairy Research, 44:549.

Canela, E.I. y Franco, R. (1986). Enzyme kinetics from progress curves. *Biochem. J.*, 233:599.

Cerruti, P., Resnick, S.L., Seldes, A. y Ferro Fontán, C. (1985). Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity: glucose loss, 5-hydroxymethyl-furfural accumulation and fluorescence development due to non-enzymatic browning. *J. Food Sci.*, 50:627.

Colquhoun, D. (1968). Rate of equilibration in a competitive system and the autoinhibitory equation of enzyme kinetics. *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, 170:135.

Corlett, D.A. y Brown, M.H. (1980). PH y acidez. En "Ecología microbiana de los alimentos", Volumen I. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Editorial Acribia, España.

Cornish-Bowden, A. (1975). The use of the direct linear plot for determining initial velocities. *Biochem. J.*, 149:305.

Corry, J.E.L. (1987). Relationship of water activity to fungal growth. In "Food beverage and micology" editado por L.R. Beuchat. Van Nostrand Reinhold, New York.

Corry, J.E.L. (1973). The water relations and heat resistance of microorganisms. *Prog. Ind. Microbiol.*, 12:73.

Corry J.E.L. (1975). The effect of water activity on the heat resistance of bacteria. In "Water relations in foods"

editado por R.B. Duckworth. Academic Press, London.

Costell Durán, E. y Durán, L. (1978). Evaluación y cuantificación de la tixotropía del albaricoque. Rev. Agroquím. y Tecnol. Alim., 18:470.

Coughlin, J.R. y Nickerson, T.A. (1975). Acid catalyzed hydrolysis of lactose in whey and aqueous solutions. J. Dairy Sci., 58:169.

Cox, T.T. y Boeker, E.A. (1987). Analysis of enzyme kinetics by using integrated rate equations. Biochem. J., 245:59.

Chen, S.L., Frank, J.F. y Loewenstein, M. (1981). Estimation of lactose hydrolysis by freezing point measurement in milk and whey substrates treated with lactases from various microorganisms. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64:1414.

Chen, H.C. y Zall, R.R. (1983). Continuous lactose hydrolysis in fixed bed and expanded bed reactors containing catalytic resins. J. Food Sci., 48:1744.

Cheng Chen, K., Houngh, J.Y. y Ling, A.C. (1985). Product inhibition of the enzymatic hydrolysis of lactose. Enzyme Microb. Technol., 7:510.

Cheng, D.C.H. y Evans, F. (1965). Phenomenological characterization of the rheological behaviour of inelastic reversible thixotropic and antithixotropic fluids. Brit. J. Appl. Phys., 16:1599.

Chirife, J. y Ferro Fontán, C. (1980). The prediction of

water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. V. Experimental investigation of the  $a_w$  lowering behavior of sodium lactate and some related compounds. J. Food Sci., 45:802.

Chirife, J., Ferro Fontán, C. y Benmergui, E.A. (1980). The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. IV.  $a_w$  prediction in aqueous non-electrolyte solutions. J. Food Technol., 15:59.

Chirife, J. y Ferro Fontán, C. (1982). The water activity of fresh foods. J. Food Sci., 47:661.

Chirife, J., Favetto, G. y Ferro Fontán, C. (1982). Water activity of fructose solutions in the intermediate moisture range. Lebensm-Wiss u Technol., 15:159.

Chiu, C.P. y Kosikowski, F.V. (1985). Hydrolyzed lactose syrups from concentrated sweet whey permeates. J. Dairy Sci. 68:16.

Christian, J.H.B. y Stewart, B.J. (1973). Survival of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella newport* in dried foods, as influenced by water activity and oxygen. En "The microbial safety of foods" editado por B.C. Hobbs y J.H.B. Christian. Academic Press, New York.

Christian, J.H.B. (1987). Actividad de agua reducida. En "Ecología microbiana de los alimentos", volumen I. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Editorial Acribia, España.

Dahlquist, A., Asp, N.G., Burvall, A. y Rausing, H. (1977). Hydrolysis of lactose in milk and whey with minute amounts of lactase. *J. Dairy Research*, 44:511.

Darvey, I.G. y Williams, J.F. (1964). Integrated steady-state rate equations for enzyme catalyzed reactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 85:1.

Declaire, M., van Huyhn, N. y Motte, J.C. (1985). Hydrolysis of lactose solutions and whey by whole cells of *Kluyveromyces fragilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21:103.

Delaney, R.A.M., Donnelly, J.K. y O'Sullivan, A.C. (1972). Manufacture of undenatured whey protein concentrates by ultrafiltration and spray drying. 1. Low Protein powders. *Ir. J. Agric. Res.*, 11:181.

Demaimay, M., Le Henaff, Y. y Printemps, P. (1978). Hydrolysis of lactose on catalytic resin. *Process Biochemistry*, 13:3.

Demaimay, M., Combeaud, D., Goukassow, A. y Baron, C. (1980). Etude comparée de l'hydrolyse du lactose à l'aide des résines échangeuses d'ions par voies enzymatique et catalytique. *Le lait*, LX:619.

Deuel, H.F., Alfin-Slater, R., Weil, C.S. y Smyth, H.F. (1954). Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. I. Harmlessness of sorbic acid as a dietary component. *Food Research*, 19:1.

de Wit J.N. y Klarenbeek, G. (1981). A differential scanning calorimetric study of the thermal behaviour of bovine  $\beta$ -lactoglobuline at temperatures up to 160°C. J. Dairy Res., 48:293.

de Wit, J.N. y Klarenbeek, G. (1984). Effect of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. J. Dairy Sci., 67:2701.

Di Paolo, G. y Belleau, B. (1977). Polyol-water interactions. Apparent molal heat capacities and volumes of aqueous polyols solutions. Can. J. Chem., 55:3825.

Dicker, R. (1982). Whey hydrolysis, a 'sweet' breakthrough. Dairy Industries International, 47:19.

Dixon, M. y Webb, E.C. (1964). "The Enzymes". Academic Press, New York.

Doyle, M.P. y Marth, E.H. (1975b). Thermal inactivation of conidia from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. II. Effect of moist heat, age of conidia and substrate. J. Milk Food technol., 38:678.

Doyle, M.P. y Marth, E.H. (1975a). Thermal inactivation of conidia from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. I. Effects of pH and buffers, glucose, sucrose and sodium chloride. J. Milk Food technol., 38:750.

Duggleby, R.G. (1985). Estimation of the initial velocity of enzyme-catalyzed reactions by non-linear regression analysis of progress curves. Biochem. J., 228:55.

- Duggleby, R.G. (1986). Progress curve analysis in enzyme kinetics. Numerical solution of integrated rate equations. *Biochem. J.*, 235:613.
- Duggleby, R.G. y Morrison, J.F. (1977). The analysis of progress curves for enzyme catalyzed reactions by non-linear regression. *Biochim. Biophys. Acta.*, 481:297.
- Durán, L. y Costell, E. (1982). Rheology of apricot puree: Characterization of flow. *J. Texture Studies*, 13:43.
- Eadie, G.S. y Hoftee, S.B. (1942). *J. Biol. Chem.*, 146:85.
- Elliot, R.P., Clark, D.S., Lewis, K.H., Lundbeck, H., Olson, J.C. y Simonsen, b. (1984). "Técnicas de análisis microbiológico", Vol. I, Parte II. Editorial Acribia, España.
- Elfagm, A.A., Wheelock, J.V. (1978). Interaction of bovine  $\alpha$ -lactalbumine and  $\beta$ -lactalbumine during heating. *J. Dairy Sci.*, 61:28
- Eyring, H. (1935a). *J. Chem. Phys.* 3:107
- Eyring, H. (1935b). *Chem. Rev.* 17:65
- Fain, A.R., Loewenstein, M., Speck, S.J., Barnhart, H.M. y Frank, J.F. (1980). Cottage cheese whey derivatives as ingredients of cottage cheese creaming mixtures. *J. Dairy Sci.*, 63:905.



Fearon, W.R. (1942). Detection of lactose and maltose by means of metylamine. *Analyst*, 67:130.

Feitosa Teles, F.F., Young, C.K. y Stull, J.W. (1978). A method for rapid determination of lactose. *J. Dairy Sci.*, 61:506.

Ferro Fontán, C., Benmergui, E.A. y Chirife, J. (1980). The prediction of water activity of aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. III.  $a_w$  prediction in multicomponents strong electrolyte aqueous solutions. *J. Food Technol.*, 15:14.

Ferro Fontán, C.; Chirife, J. y Benmergui, E.A. (1979). The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. I.  $a_w$  prediction in single aqueous electrolyte solutions. *J. Food Technol.*, 14:625.

Fisher, R.B. y Nimmo, I.A. (1972). *J. Exp. Physiol.*, 57:162.

Finocchiaro, T., Richarson, T. y Olson, N.F. (1980). Lactase immobilized on alumina. *J. Dairy Sci.*, 63:215.

Flaschel, E., Raetz, E. y Renken, A. (1982). The kinetics of lactose hydrolysis for the  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Bioeng.*, 24:2499.

Fox, M. y Loncin, M. (1982). Investigation into the microbiological stability of water rich foods processed by a combination of methods. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 15:321.

Fox, M., Loncin, M. y Weiss, M. (1985). Investigations into the influence of water activity, pH and heat treatment on the breakdown of thiamine in foods. *J. Food Qual.*, 5:161.

Franks, F. (1983). "Water". Primera edición, The Royal Society of London, Londres.

Friend, B.A. y Shahani, K.M. (1982). Characterization and evaluation of *Aspergillus oryzae* lactase coupled to a regenerable support. *Biotechnol. Bioeng.*, 24:329.

Gekas, V. y López-Leiva, M. (1985). Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochemistry*, 20:2.

Giacin, J.R., Jakubowski, J.G., Leeder, S.G., Gilbert, S.G. y Kleyn, D.H. (1974). Characterization of lactase immobilized on collagen: conversion of whey lactose by soluble and immobilized lactase. *J. Food Sci.*, 39:751.

Gibson, B. (1976). The effect of high sugar concentrations on the heat resistance of vegetative microorganisms. *J. Appl. Bacteriol.*, 52:235.

Giec, A. y Kosikowski, F.V. (1983). Low temperature lactose hydrolysis of concentrated whey permeates. *J. Dairy Sci.*, 66-396.

Giles, C.H. y McKay, R.B. (1962). Studies in hydrogen bond formation. XI. Reactions between a variety of carbohydrates and proteins in aqueous solutions. *J. Biol. Chem.*, 237:3388.

González, H.H.L. (1984). Estudio de la influencia de la temperatura y la actividad de agua en el crecimiento de hongos aislados de maíz. M.S. Tesis. Universidad de Mar del Plata.

Gould, W.G., Brown, M.H. y Fletcher, B.C. (1983). Mechanisms of action of food preservation procedures. En "Food microbiology. Advances and prospectus". editado por T.A. Roberts y F.A Skinner. Academic Press, New York.

Gould, W.G. (1985). Present state of knowledge of  $a_w$  effects on microorganisms. En "Properties of water in foods in relation to quality and stability", editado por D. Simatos y J.L Multon. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Gould, G.W., Brown, M.H. y Fletcher, B.C. (1983) Mechanisms of action of food preservation procedures. En "Food microbiology. Advances and prospectus", editado por T.A. Roberts y F.A. Skinner. Academic Press, New York.

Gratzer, W.B. y Bevan, G.H. (1969). Effect of sugars on non-ionic detergent behavior in water. J. Phys. Chem., 73:2270.

Greenberg, N.A., Wilder, T. y Mahoney, R.R. (1985). Studies on the thermostability of lactase (*Streptococcus thermophilus*) in milk and sweet whey. J. Dairy Res., 52:439.

Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. J. of Research, National Bureau Standards (US), Series A, 81:89.

Griffith, M.W. y Miur, D.D. (1980). Hydrolysis of lactose by a thermostable  $\beta$ -galactosidase. *J. Sci. Food Agric.*, 31:397.

Griffith, L., Sigvaldson, E. y Sporns, P.(1989). Determination of lactose and lactose hydrolysis in milk using cerium(IV). *J. Food Sci.*, 54:419.

Gutfreund, O. (1968). "Introducción al estudio de las Enzimas". Editorial Acribia, España.

Guy, E.J. y Bingham, E.W. (1978). Properties of  $\beta$ -galactosidase of *Saccharomyces lactis* in milk and milk products. *J. Dairy Sci.*, 61:147.

Guy, E.J. y Edmonson, L.F. (1978). Preparation and properties of syrups made by hydrolysis of lactose. *J. Dairy Sci.*, 61:542.

Hahn, S.J., Ree, T. y Eyring, H. (1959). Flow mechanism of thixotropic substances. *Ind. Eng. Chem.*, 51:856.

Hahn-Hagerdal, B. (1985). Water activity: a possible external regulator in biotechnical processes. *Enzyme Microb. Technol.*, 8:322.

Halwachs, W. (1978). Km and Vm from only one experiment. *Biotechnol. Bioeng.*, 20:281.

Hanes, C.S. (1932). *Biochem. J.*, 26:1406.

Harju, M. y Kreula, M. (1978). Lactose hydrolysates. N. J. F. Symposium on carbohydrate sweeteners. Espoo, Finland.

Harju, M. y Heikonen, M. (1982). Hydrolysis of whey with immobilized lactase. Experiences in practice. XXI International Dairy Congress. Vol. I, book 2, pag. 493.

Harju, M., Heikonen, M. P. Linko y Kreula, M. (1978). Optimization of an immobilized  $\beta$ -galactosidase system. En "Food process engineering" editado por P. Linko y J. Larinkari. Applied Science Publishers, London.

Harper, J.C. y Lebermann, K.W. (1962). Rheological behaviour of pear purees. First Int. Congress of Food Sci. and Technol. London.

Harper, J.C. y El Sahrigui, A. (1965). Viscometric behavior of tomato concentrates. J. Food Sci., 30:470.

Harwalkar, V.R. y Modler, H.W. (1981). Whey protein concentrate by heating under acidic conditions. 2. Physico-chemical evaluation of proteins. Milchwissenschaft, 40:593.

Harwalkar, V.R. y Kalab, M. (1985). Thermal denaturation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin in solution. Electron microscopic study. Milchwissenschaft, 40:65.

Harwalkar, V.R. (1980). Measurement of thermal denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin at pH 2.5. J. Dairy Sci., 63:1043.

Higgs, S.J. y Norrington, R.J. (1971). Rheological properties of selected foodstuffs. Process Biochem., 6:52.

Hillier, R.M., Lyster, R.L.J. y Cheeseman, G.C. (1979). Thermal denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in cheese whey: effect of total solids concentration and pH. *J. Dairy Res.*, 46:103.

Holdsworth, S.D. (1971). Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behaviour of fluid food products. *J. Texture Stud.*, 2:393.

Holdsworth, S.D. (1973). Consistency and texture of food products. *Food manufacture*, 48:25.

Horner, K.J. y Anagnostopoulos, G.D. (1973). Combined effect of water activity, pH and temperature on the growth and spoilage potential of fungi. *J. Appl. Bacteriol.*, 36:427.

Horowitz, M.G., Davidson, H.M., Howard, F.D. and Reithel, F.J. (1959). Determination of lactose in biological materials. *Anal. Chem.*, 23:375.

Hough, G., Moro, O., Segura, J. y Calvo, N. (1988). Flow properties of dulce de leche, a typical argentine dairy product. *J. Dairy Sci.*, 71:1783.

Hourigan, J.A. (1977). Kinetic studies of the enzymic hydrolysis of lactose. *Diss. Abstr. International B. Part I*, 37:6053B.

Hourigan, J.A. y Mittal, S.B. (1984). Milk intolerance due to lactose and the role of lactose-hydrolyzed milk products in combatting the consequences. *Indian J. Dairy Sci.*, 37:303.

Howard, D.H. 1991. A look at viscometry. Food Technol., 22:34.

Hsu, T. y Tsao, G.T. (1979). Convenient method for studying enzyme kinetics. Biotechnol. Bioeng., 21:2235.

Hultin, H.O. (1983). Current and potential uses of immobilized enzymes. Food Technol., Octubre:66.

Hustad, G.O., Richardson, T. y Olson, N.F. (1973a). Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on an insoluble carrier with a poliisocianate polymer. I. Preparation and properties. J. Dairy Sci., 56:1111.

Hustad, G.O., Richardson, T. y Olson, N.F. (1973b). Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on an insoluble carrier with a poliisocianate polymer. II. Kinetics and stability. J. Dairy Sci., 56:1118.

Jackson, E.H. y Jelen, P. (1989). Batch hydrolysis of lactose in concentrated whey systems. J. Food Sci., 54:1086.

Jelen, P. y Coulter, S.T. (1973). Effects of supersaturation and temperature on the growth of lactose crystals. J. Food Sci., 38:1182.

Jelen, P. y Buchheim, W. (1984). Stability of whey protein upon heating under acidic conditions. Milchwissenschaft, 39:215.

Jeon, I.J. y Mantha, V.R. (1985). HPLC analysis of

oligosaccharides formed during  $\beta$ -galactosidase action on lactose. J. Dairy Sci., 68:581.

Jones, C.K.S. y White, E.T. (1985). Enzymatic hydrolysis of lactose in a hollow fiber reactor. Annals New York Acad. Sci., 1:119.

Juven, B.J., Kanner, J. y Weisslowicz, H.(1978). Influence of orange juice composition on the thermal resistance of spoilage yeasts. J. Fd. Sci., 43:1074.

Kanterewicz, R.J. (1985a). Preservación de suero de queso por métodos combinados. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.

Kanterewicz, R.J., Chirife, J. y Lagarde, E.A. (1985b). Preservation of concentrated cheese whey by combined factors. J. Food Sci., 50:1629.

Kaplow, M. (1970). Commercial development of intermediate moisture foods. Food Technol. 24:889.

Karel, M. (1976). Technology and applications of new intermediate moisture foods. En "Intermediate moisture foods" editado por R. Davies y col.. Applied Science Publishers Ltd., Londres.

Karel, M., Fennema, O. y Lund, D.B. (1977). "Principles of food preservation".

Kitic, D., Favetto, G.J., Chirife, J. y Resnik, S.L. (1986). Measurement of water activity in the intermediate moisture



range with the Novasina Thermoconstanter Humidity Meter. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 19:297.

Kleyn, D.H. (1985). Determination of lactose by an enzymatic method. *J. Dairy Sci.*, 68:2791.

Klibanov, A.M. (1979). Enzyme stabilization by immobilization. *Anal. Biochem.*, 93:1.

Kohlwey, D.E. y Cheryan, M. (1981). Performance of a  $\beta$ -D-galactosidase hollow fiber reactor. *Enzyme Microb. Technol.*, 3:64.

Kohnhorst, A.L. y Mangino, M.E. (1985). Prediction of the strength of whey protein gels based on composition. *J. Food Sci.*, 50:1403.

Kosikowski, F.V. y Wierzbicki, L.E. (1972). Lactose hydrolysis of raw and pasteurized milk by *Saccharomyces lactis* lactase. *J. Dairy Sci.*, 56:146.

Kosikowski, F.V. (1988). Review: Enzyme behaviour and utilization. *J. Dairy Sci.*, 71:88.

Koujima, I., Hayashi, H., Tomochika, K., Aklase, A. y Kanemosa, Y. (1978). Adoptional change in proline and water content of *Staphylococcus aureus* after alteration of environmental salt concentration. *Appl. Environ. Microb.*, 35:467.

Kuby, S.A. y Lardy, H.A. (1953). Purification and kinetics of  $\beta$ -D-galactosidase from *Escherichia coli*, strain K-12. *J.*

Am. Chem. Soc., 75:890.

Kuhn, P.R. y Foegeding, A. (1991). Factors influencing whey protein gel rheology: dialysis and calcium chelation. J. Food Sci., 56:789.

Labuza, T.P. (1975). Oxidative changes in food at low and intermediate moisture levels. In "Water relations in foods" editado por R.B. Duckworth. Academic Press, London.

Labuza, T.P., Tannenbaum, S.R. y Karel, M. (1970). Water content and stability of low moisture and intermediate moisture foods. Food Technol., 24:543.

Laidler, K.J. y Bunting, P.S. (1973). "The chemical kinetics of enzyme action". Segunda edición, Clarendon Press, Oxford.

Laidler, K.J. (1954). "Introduction to the chemistry of enzymes". Mc Graw Hill Book Company, Inc., New York.

Lakshmi, T.S. y Nandi, P.K. (1976). Effects of sugars solutions on the activity coefficients of aromatic amino acids and their N-acetyl ethyl esters. J. Phys. Chem., 80:249.

Leistner, L. (1985). Hurdle technology applied to meat products of the shelf stable product and intermediate moisture food types. En "Properties of water in foods in relation to quality and stability", editado por D. Simatos y J.L. Multon. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Leistner, L. y Rodel, W. (1975). The significance of water

activity for microorganisms in meat, en "Water relations in foods" editado por R.B. Duckworth. Academic press, New York.

Leistner, L., Rodel, W. y Krisplen, K. (1981). Microbiology of meat and meat products at high and intermediate moisture ranges. En "Water activity: influence in food quality", editado por L.B. Rockland y G.F. Stewart. Academic Press, New York.

Le Rudulier, D., Strom, A.R., Dandekar, A.M., Smith, L.T. y Valentine, R.C. (1984). Molecular biology of osmoregulation. Science, 226:1064.

Lewis, G.N. y Randall, M. (1961). "Thermodynamics". McGraw-Hill, Londres.

Li-chan, E. (1983). Heat-induced changes in the proteins of whey protein concentrates. J. Food Sci., 48:47.

Lin, A.Y. y Nickerson, T.A. (1977). Acid lactose hydrolysis in whey versus aqueous solutions. J. Dairy Sci., 60:34.

Lineweaver, H. y Burk, D. (1934). Determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc., 56:658.

Longree, K., Beaver, S., Buck, P. y Norway, J.E. (1966). Viscous behaviour of custard systems. J. Agric. Food Chem., 14:653.

Lotter, L.P. y Leistner, L. (1978). Minimal water activity for enterotoxin A production and growth of *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol., 36:377.

Lyster, R.L.J. (1970). The denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in heated milk. *J. Dairy Res.*, 37:233.

Ma, H., Monsan, R. y Rouleau, D. (1983). Hydrolyse enzymatique du lactose dans un réacteur type réservoir agité. *Canadian J. Chem. Eng.*, 61:73.

Mahoney, R.R. y Wilder, T. (1989). Stabilization of lactase (*Escherichia coli*) by milk components and related products. *J. Food Sci.*, 54:899.

Mahoney, R.R. y Wilder, T. (1987). Enhanced thermostability of lactase (*Escherichia coli*) in milk. *J. Food Sci.*, 52:1730.

Mahoney, R.R. y Adamchuk, C. (1980). Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Sci.*, 45:962.

Mangino, M.E. (1984). Physicochemical aspects of whey protein functionality. *J. Dairy Sci.*, 67:2711.

Marquardt, D.W. (1963). An algorithm for least square estimation of non-linear parameters. *J. of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, 2: 431.

Massaguer-Roig, S., Rizvi, S.S.H. y Kosikowski, F.V. (1984). Characterization of thixotropic behaviour of soft cheeses. *J. Food Sci.*, 49:668.

Matyska, L. y Kovar, J. (1985). Comparison of several

non-linear regression methods for fitting the Michaelis-Menten equation. *Biochem. J.*, 231:171.

Mauri, L.M. (1988). Efecto del soluto usado para ajustar la actividad de agua en la cinética de degradación térmica de tiamina en sistemas modelo. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.

Mavropoulou, I.P. y Kosikowski, F.V. (1973). Composition, solubility and stability of whey powders. *J. Dairy Sci.*, 56:1128.

Melachouris, N. (1984). Critical aspects in development of whey protein concentrates. *J. Dairy Sci.*, 67:2693.

Melnick, D., Luckmann, F. y Gooding, C.M. (1954). Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. IV. Metabolic degradation of sorbic acid in cheese by molds and the mechanism of mold inhibition. *Food Res.*, 19:44.

Merkler, D.J., Farrington, K. y Wedler, F.C. (1981). Protein thermostability. *Int. J. Peptide and Prot. Res.*, 18:430.

Michaelis, I. y Menten, M.L. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem. Z.*, 49:333.

Milisvec, P.B. y Tuite, J. (1970). Temperature and relative humidity requirements of species of penicillium isolated from yellow dent corn kernels. *Mycologia*, 62:75.

Miller, J.J. y Brand, J.C. (1980). Enzymatic lactose hydrolysis. *Food Technol. (Australia)*, 32:144.

Miracco, J.L., Alzamora, S.M., Chirife, J. y Ferro Fontán, C. (1981). On the water activity of lactose solutions. *J. Food Sci.*, 46:1612.

Mizrahi, S. y Berk, Z. (1972). Flow behavior of concentrated orange juice: mathematical treatment. *J. Texture Studies*, 3:69.

Modler, H.W. y Emmons, D.B. (1977). Properties of whey protein concentrates prepared by heating under acidic conditions. *J. Dairy Sci.*, 60:177.

Morr, C.V. (1985). Composition, physicochemical and functional properties of reference whey protein concentrates. *J. Food Sci.*, 50:1406.

Morrison, R.T. y Boyd, R.N. (1976). *Química Orgánica*. Fondo Educativo Interamericano, México.

Mozaffar, Z., Nakanishi, K. y Matsuno, R. (1985). Formation of oligosaccharides during hydrolysis of lactose in milk using  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. *J. Food Sci.*, 50:1602.

Muller, H.G. (1973). "Introducción a la reología de los alimentos". Editorial Acribia, España.

Multon, J.L y Guilbot, A. (1974). Water activity in relation to the thermal inactivation of enzyme proteins. In "Water relations in foods". Editado por R.B. Duckworth. Academic Press, London.

Muriell, W.G. y Scott, W.J. (1966). The heat resistance of bacterial spores at various water activities. J. Gen. Microbiol., 43:411.

Mustranta, A., Linko, M., Harju, M. y Heikonen, M. (1979). Production and use of lactase. Kemia-Kemi, 6:306.

Nakai, S. y Li-Chan, E. (1985). Structure modification and functionality of whey proteins: quantitative structure-activity relationship approach. J. Dairy Sci., 68:2763.

Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somoyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153:375.

Nickerson, T.A. y Moore, E.E. (1974).  $\alpha$ -lactose and crystallization rates. J. Dairy Sci., 57:160.

Nickerson, T.A. (1974). Potential for hydrolyzed lactose. Proceeding of "Whey products conference", Chicago, Illinois.

Nickerson, T.A., Vujicic, I.F. y Lin, A.Y. (1976). Colorimetric estimation of lactose and its hydrolytic products. J. Dairy Sci., 59:386.

Nijpels, H.H. (1976a). Maxilact in the dairy industry. Nordeuropaeisk mejeri-tidsskrift, 8:274.

Nijpels, H.H. (1976b). Maxilact in the dairy industry. Nordeuropaeisk mejeri-tidsskrift, 10:356.

Nijpels, H.H. (1976c). Maxilact in the dairy industry. *Nordeuropaeisk mejeri-tidsskrift*, 11-12:382.

Norman, B.E., Severinsen, S.G., Nielsen, T. y Wagner, J. (1978). Enzymatic treatment of whey permeate with recovery of enzyme by ultrafiltration. *North European Dairy J.*, 5-6:2.

Novo Enzyme Division (1979). Applications of yeast lactases. File number A 5489.

Norrish, R.S. (1966). An equation for the activity coefficient and relative humidities of water in confectionary syrup. *J. Food Technol.*, 1:25.

Notermans, S. y Heuvelman, C.J. (1983). Combined effect of water activity, pH and suboptimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.*, 48:1832.

Oakenfull, D.G. y Fenwick D.E. (1979). Effect of polyols and sugars on the structure of water. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I.*, 75:636.

Ohye, D.F. y Christian, J.B.H. (1966). Combined effects of temperature, pH an dwater activity on growth and toxin production by *Clostridium botulinum* types A, B and E. *Proc. 5th Int. Symp. Food Microbiol., Mosc#*.

Okos, M.R., Grulke, E.A. y Syverson, A. (1978). Hydrolysis of lactose in acid whey using  $\beta$ -galactosidase adsorbed to a



phenol-formaldehyde resin. J. Food Sci., 43:566.

Oriol Pascual, J. (1974). Caracterización de fenómenos tixotrópicos. Afinidad, 31:19.

Parada, J.L., Chirife, J. y Magrini, R.C. (1982). Effect of BHA, BHT and potassium sorbate on growth of *Staphylococcus aureus* in a model system and in processed cheese. J. Food Prot., 45:1108.

Park, H.S. y Marth, E.H. (1972). Inactivation of *Salmonella typhimurium* by sorbic acid. J. Milk Food Technol., 35:532.

Park, Y.K., De Santi, M.S.S. y Pastore, G.M. (1979). Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. J. Food Sci., 44:100.

Pastore, M., Morisi, F. y Viglia, A. (1974). Reduction of lactose in milk by entrapped  $\beta$ -galactosidase. II. Conditions for an industrial continuous process. J. Dairy Sci., 57:269.

Perutz, M.F. (1978). Electrostatic effects in proteins. Science, 201:1187.

Perutz, M.F. y Raidt, H. (1975). Stereochemical basis of heat stability in bacterial ferredoxins and in haemoglobin. Nature, 255:256.

Peter, J., Prenosil, J.E. y Bourne, J.R. (1981). Comparison of various methods for kinetic constants calculations for  $\beta$ -galactosidase in soluble and immobilized states. J. Chem. Technol. Biotechnol., 31:705.

Petriella, C., Resnik, S.L., Lozano, R.D. y Chirife, J. (1985). Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity: color changes due to nonenzymatic browning. *J. Food Sci.*, 50:622.

Philo, R.D. y Selwyn, M.J. (1973). Use of progress curves to investigate product inhibition in enzyme-catalyzed reactions. *Biochem. J.*, 135:525.

Pitt, J.J. (1974). Resistance of some food spoilage yeasts to preservatives. *Food Technol. (Australia)*, 26:238.

Pitt, J.J. y Christian, J.B.H. (1968). Water relations of xerophilic fungi isolated from prunes. *Appl. Microbiol.*, 16:1853.

Pitt, J.J. y Hocking, A.D. (1977). Influence of solute and hydrogen ion concentration on the water relations of some xerophilic fungi. *J. Gen. Microbiol.*, 101:35.

Pitt, J.J. (1975). Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. En "Water relations in foods", editado por R.B. Duckworth. Academic Press, London.

Pitt, J.J. y Hocking, A.D. (1985). "Fungi and food spoilage". Academic Press, New York.

Pitzer, K.S. y Mayorga, G. (1973). Thermodynamics of electrolytes. II. Activity and osmotic coefficients for strong electrolytes with one or both ions univalent. *J. Phys. Chem.*, 77:2300.

Pitzer, K.S. (1973). Thermodynamics of electrolytes. I. Theoretical basis and general equations. J. Phys. Chem., 77:268.

Plainer, H., Sprossler, B.G. y Uhlig, H. (1982). L'hydrolyse du lactose par des enzymes immobiliseés. En "Utilisation des enzymes en technologie alimentaire, Symposium Internationale" editado por P. Dupuy. Versailles

Pomeranz, Y., Johnson J.A. y Shellenberg, J.A. (1962). Properties of hydrolyzed lactose. J. Food Sci., 27:350.

Potter, N.N. (1970). Intermediate moisture foods: principles and technology. Food Product Dev., 4:38.

Pryce-Jones, J. (1953). The rheology of honey. En "Foodstuffs: their plasticity, fluidity and consistency" editado por G.W. Scott Blair. North Holland, Amsterdam.

Put, H.M.C., de Jong, J., Sand, F. y van Grinsven, A.M. (1976). Heat resistance studies on yeast spp causing spoilage in soft drinks. J. Appl. Bacteriol., 40:135.

Put, H.M.C. y de Jong, J. (1982). The heat resistance of ascospores of four *Saccharomyces* spp isolated from spoiled heat processed soft drinks and fruit products. J. Appl. Bacteriol., 52:235.

Rao, M.A. y Anantheswaran, R.C. (1982). Rheology of fluids in food processing. Food Technol., Febrero:116.

Rao, M.A. (1977). Rheology of liquid foods, a review. J. Texture Stud., 8:135.

Rao, M.A. y Rizvi, S.S.H. 1986. Engineering properties of food. En "Rheological properties of fluid foods", editado por M.A. Rao. Marcel Dekker, Inc., N.Y..

Reiner, M. (1949). "Deformation and flow". Lewis, London.

Resnik, S.L., Favetto, G, Chirife, J. y Ferro Fontán, C. (1984). A world survey of water activity values of certain saturated solutions at 25°C. J. Food Sci., 49:510.

Rha, C.H. (1978) Rheology of fluid foods. Food Technol., 32:77.

Richmond, M.L., Gray, J.I. y Stine, C.M. (1981).  $\beta$ -galactosidase: a review of recent research related to technological application, nutritional concern and immobilization. J Dairy Sci., 64:1759.

Robach, M.C. (1980). Use of preservatives to control microorganisms in foods. Food Technol., Octubre:81.

Robach, M.C. y Stateler, C.L. (1980). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by potassium sorbate with sodium chloride, tertiary butylhydroquinone, butylated hydroxianisole or etilendiamine tetraacetic acid. J. Food Prot., 43:208.

Roberts, A.R. y Pettinari, J.D. (1957). Conversion of lactose to oligosaccharides. Agric. Food Chem., 5:130.

Roberts, D.V. (1977). "Enzyme kinetics". Cambridge University Press, Cambridge.

Robinson, R.A. y Stokes, R.H. (1965). "Electrolyte solutions", segunda edición. Butterworths Publications Limited, Londres.

Rockland, L.B. y Nishi, S.K.. (1980). Influence of water activity on food product quality and stability. Food Technol., abril:42.

Roger, L., Thapon, J.L., Maubois, J.L. y Brule, G. (1976). Hydrolyse du lactose contenu dans l'ultrafiltrat de lait ou lactosérum en réacteur enzymatique a membrane. Le Lait, 551:56.

Ross, K.D. (1975). Estimation of water activity in intermediate moisture foods. Food Technol., 29:26.

Rovedo, C.O., Viollaz, P.E. y Suarez, C. (1991). The effect of pH and temperature on the rheological behaviour of dulce de leche, a typical dairy argentine product. J. Dairy Sci., 74:1497.

Sajur, S. (1985). Preconservación de duraznos por métodos combinados. Tesis M.S.. Universidad Nacional de Mar del Plata.

Saravacos, G.D. (1970). Effect of temperature on viscosity of fruit juices and purees. J. Food Sci., 35:122.

Scatchard, G., Hamer, W.J. y Wood, S.E. (1938). Isotonic solutions. 1. The chemical potential of water in aqueous solutions of sodium chloride, potassium chloride, sulphuric acid, sucrose, urea and glycerol, at 25°C. J. Am. Soc., 60:3061.

Schmidt, H.S.; Packard, V.S. y Morris, H.A. (1984). Effect of processing on whey protein functionality. J. Dairy Sci., 67:2723.

Schmidt, R.H., Smith, D.E., Packard, V.S. y Morris, H.A. (1986). Composition and selected functional properties of whey protein concentrates and lactose-hydrolyzed whey protein concentrates. J. Food Protection, 49:192.

Scott Blair, G.W. (1969). "Elementary rheology". Academic Press, New York.

Scott, W.J. (1953). Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30°C. Aust. J. Biol. Sci., 6:549.

Scott, W.J. (1957). Water relations and food spoilage microorganisms. Adv. Food Res., 7:83.

Scott, T.C., Hill, C.G. y Amundson, C.H. (1984). Elucidation of the activity decay characteristics of immobilized  $\beta$ -galactosidase utilizing an integral reactor scheme. Biotechnol. Bioenerg. Symp., 14:321.

Segel, I.H. (1975). "Enzyme Kinetics". Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems". Wiley Interscience. New York.

Shah, N.O. y Nickerson, T.A. (1978). Funtional properties of hydrolyzed lactose: solubility, viscosity and humectant properties. J. Food Sci., 43:1081.

Shah, N.O. y Nickerson, T.A. (1978). Funtional properties of hydrolyzed lactose: crystallization. J. Food Sci., 43:1085.

Sherman, P. (1970). "Industrial rheology". Academic Press, New York.

Shoemaker, C.F., Lewis, J.I. y Tamura, M. (1987). Instrumentation for rheological measurements of foods. Food Technol., 42:80.

Shukla, T.P. (1975).  $\beta$ -galactosidase technology: a solution to the lactose problem. CRC Crit. Rev. Food Technol., 5:325.

Singleton, R. y Amelunxen, R.E. (1973). Proteins from thermophilic microorganisms. Bacteriol. Rev., 37:320

Sofos, J.M. y Busta, F.F. (1981). Antimicrobial activity of sorbate. J. Food Prot., 44:614.

Sofos, J.N. (1989). "Sorbate and food preservatives". CRC Press Inc., Florida.

Sperber, W.H. (1983). Influence of water activity on foodborne bacteria. A review. J. Food Protection, 46:142.

Spreer, E. (1973). "Lactologia Industrial". Editorial Acribia.

Sprossler, B. y Plainer, H. (1983). Immobilized lactase for processing whey. *Food Technol.*, octubre:93.

Tannenbaum, S.R. (1982). Modificaciones químicas y bioquímicas de los alimentos y su influencia sobre la calidad. En "Introducción a la ciencia de los alimentos" editado por O.R. Fennema. Editorial Reverté, Argentina.

Tatini, S.R. (1973). Influence of food environment on growth of *S. aureus* and production of various toxins. *J. Milk Food Technol.*, 36:559.

Tauber, H. y Kleiner, I.S. (1932). A method for the determination of monosaccharides in the presence of disaccharides and its application to blood analysis. *J. Biol. Chem.*, 99:249.

Tilbury, R. H. (1980). Xerotolerant yeasts. In "Biology and activities of yeasts", editado por F.A Skinner, S.M. Passmore y R.P. Davenport. Academic Press, New York.

Tiu, C. y Boger, D.V. (1974). Complete rheological characterization of time dependent food products. *J. Texture Studies*, 5:329.

Toba, T., Tomita, Y., Itoh, T. y Adachi, S. (1981).  $\beta$ -galactosidase of lactic acid bacteria: characterization by oligosaccharides formed during hydrolysis of lactose. *J. Dairy Sci.*, 64:185.

Tompkin, R.B., Christiansen, L.N., Shaparis, A.B. y Bohn, H.



(1974). Effect of potassium sorbate on *Salmonellae*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Clostridium botulinum* in cooked, uncured sausage. Applied Microbiol., 28:262.

Toren, E.C. (1967). Determination of glucose. J. Chem Educ., 44:172.

Torun, B., Solomons, N.W. y Viteri, F.E. (1979). Lactose malabsorption and lactose intolerance implications for general milk consumption. Arch Latinoamerican Nutrition, 29:445.

Troller, J.A. (1985). Effects of  $a_w$  and pH on growth and survival of *Staphylococcus aureus*. En "Properties of water in foods in relation to quality and stability", editado por D. Simatos y J.L. Multon. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Troller, J.A. y Christian, J.H.B. (1978). "Water activity and food". Academic Press, New York.

Troller, J.A. (1980). Influence of water activity on microorganisms in foods. Food Technol., 34:76.

Troller, J.A. (1979). Food spoilage by microorganisms tolerating low water activity environments. Food Technology, Octubre:72.

Tung, M.A., Richards, J.F., Morrison, B.F. y Watson, E.L. (1970). Rheology of fresh, aged and  $\gamma$ -irradiated egg white. J. Food Technol., 35:872.

Vaamonde, G, Chirife, J. y Scorza, O.C. (1982). An examination of the minimal water activity for *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P growth in laboratory media adjusted with less conventional solutes. *J. Food Sci.*, 47:1259.

van Griethuysen, E., Flaschel, E. y Renken, A. (1985). The influence of the ion content of whey on the pH activity profile of the  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 35B:129.

van Griethuysen, E., Flaschel, E. y Renken, A. (1988). Process development for the hydrolysis of lactose in whey by immobilized lactase of *Aspergillus oryzae*. *Process Biochem.*, Abril:55.

Vitali, A.A. y Rao, M.A. (1984). Flow properties of low pulp concentrated orange juice. Effect of temperature and concentration. *J. Food Sci.*, 49:882.

von Schelhorn, M. (1950). Untersuchungen über den Verderb wasser warmer Lebensmittel durch osmophile Mikroorganismen. I. Verderb von Lebensmittel durch osmophile Hefen. *Lebensm.-Unters Forsch.*, 21:117.

Vujicic, I.F., Lin, A.Y. y Nickerson, T.A. (1977). Changes during acid hydrolysis of lactose. *J. Dairy Sci.*, 60:29.

Wallenfels, K. y Weil, R. (1972).  $\beta$ -galactosidase. In "The enzymes", Volumen VII, editado por P.D. Boyer. Academic Press, New York.

- Wasserman, B.P. (1984). Thermostable enzyme production. *Food Technol.*, Febrero:78.
- Weetall, H.H., Havewala, W.H., Pitcher, W.H., Detar, C.C., Vann, W.P. y Yaverbaum, S. (1974). The preparation of immobilized lactase and its use in the enzymatic hydrolysis of acid whey. *Biotechnol. Bioeng.*, 16:195.
- Weltman, R.N. (1943). Breakdown of thixotropic structure as a function of time. *J. Appl. Phys.*, 14:343.
- Whalen, C.A., Gilmore, T.M., Spurgeon, K.R. y Parsons, J.G. (1988). Yoghurt manufacture from whey caseinate blends and hydrolyzed lactose. *J. Dairy Sci.*, 71:299.
- Wierzbicki, L.E. y Kosikowski, F.V. (1972). Kinetics of lactose hydrolysis in acid whey by  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. *J. Dairy Sci.*, 55:1396.
- Wierzwicki, L.E. y Kosikowski, F.V. (1972). Food syrups from acid whey treated with  $\beta$ -galactosidase of *Aspergillus niger*. *J. Dairy Sci.*, 56:1182.
- Wilkinson, G.N. (1961). Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.*, 80:324.
- Wodzinsky, R.J. y Frazier, W.C. (1960). Moisture requirements of bacteria. Influence of temperature and pH on requirements of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 79:572.
- Wolf, A.V. (1966). "Aqueous solutions and body fluids".

Harper, New York.

Woolf, B. (1932). "In allgemaine chemie der enzyme", editado por J.B.S. Haldane y K. Stern. Steinkopf, Leipzig.

Wong, J.T.F. (1975). "Kinetics of enzyme mechanisms". Academic Press, New York.

Yang, R.Y.K., White, E.T. y Jones, C.K.S. (1984). The performance of a radial flow/back flush hollow fiber enzymatic reactor. Chemeca 84, The twelfth Australian Chemical Engeneering Conference, Melbourne, 26-29 August, 1984.

Zadow, J.G. (1986). Lactose hydrolized dairy products. Food Technol. (Australia), 38:460.