

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

31  
2ej

ESCUELA DE QUIMICA  
INCORPORADA A LA U. N. A. M.

**ELABORACION DE UNA LECHE PARCIALMENTE  
DESLACTOSADA POR TRATAMIENTO ENZIMATICO,  
PARA REGIMENES ESPECIALES**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A:  
THELMA SANCHEZ RIOS

Director de Tesis: Dra. Araceli Sánchez de Corral

México, D. F.

1992



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

INDICE DE FIGURAS	i
INDICE DE CUADROS	i
I. INTRODUCCION	1
I.1 LA LECHE	2
I.2 LACTOSA	2
I.3 INTOLERANCIA A LA LACTOSA	5
I.4 $\beta$ -GALACTOSIDASA	8
I.5 ENZIMAS PROTEOLITICAS: HEMISFERICINA	10
I.6 COAGULACION DE LA LECHE: QUESO	10
II. OBJETIVOS	14
III. MATERIALES Y METODOS	15
III. MATERIALES	16
III.1 EQUIPO	16
III.2 MATERIA PRIMA	16
III.3 REACTIVOS	16
III.4 METODOS	18
III.4.1 DETERMINACION DE LACTOSA	18
III.4.2 UNIDADES DE COAGULACION	21
III.4.3 DETERMINACION DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA	26
III.4.4 CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS LIBRES SOLUBLES	28
III.4.5 DETERMINACION DE HUMEDAD	30
III.4.6 DETERMINACION DE CENIZAS	31
III.4.7 DETERMINACION DE PROTEINAS	32
III.4.8 DETERMINACION DE GRASA	33
IV. RESULTADOS	34
V. CONCLUSIONES	47
VI. BIBLIOGRAFIA	49
VII. ANEXOS	53

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. $\beta$ -GALACTOSIDASA	3
FIGURA 2. SINTESIS DE LACTOSA	4
FIGURA 3. PAISES INTOLERANTES A LA LACTOSA	7
FIGURA 4. HIDROLISIS DE LACTOSA	9
FIGURA 5. MECANISMO DE HIDROLISIS DE LACTOSA POR $\beta$ -GALACTOSIDASA	11
FIGURA 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL	17
FIGURA 7. CURVA TIPO DE LACTOSA	19
FIGURA 8. OBTENCION DE LECHE DESLACTOSADA	20
FIGURA 9. ACTIVIDAD COAGULANTE (CUAJO)	23
FIGURA 10. ACTIVIDAD COAGULANTE (HEMISFERICINA)	24
FIGURA 11. ELABORACION DE QUESO TIPO FRESCO A PARTIR DE LECHE DESLACTOSADA	25
FIGURA 12. CURVA TIPO DE TIROSINA (KUNITZ)	27
FIGURA 13. CURVA TIPO DE TIROSINA (JARRET)	29

## INDICE DE CUADROS

CUADRO I ACCION DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA M-2000 SOBRE LACTOSA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION	36
CUADRO II ACCION DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA M-2000 SOBRE LECHE EN FUNCION DE LA TEMPERATURA	37
CUADRO III HIDROLISIS DE LECHE (LECHE DESCREMADA)	38
CUADRO IV INACTIVACION ENZIMATICA (LECHE DESCREMADA)	39
CUADRO V INACTIVACION ENZIMATICA (LECHE FLUIDA)	40
CUADRO VI ACCION DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA M-5000 SOBRE LACTOSA EN FUNCION DELTIEMPO	42
CUADRO VII HIDROLISIS DE LECHE E INACTIVACION ENZIMATICA (LECHE ALPURA)	43
CUADRO VIII ANALISIS BROMATOLOGICO QUESO TIPO FRESCO	45
CUADRO IX ANALISIS DE QUESO: ACTIVIDAD PROTEOLITICA Y AMINOACIDOS LIBRES SOLUBLES	46

# I. INTRODUCCION

## **I.1.- LA LECHE**

La leche tradicionalmente ha sido el alimento más completo que en forma natural puede obtener el hombre.

Se define como una secreción láctea prácticamente libre de calostro segregado por las hembras de los mamíferos a través de las glándulas mamarias tras el nacimiento, cuya función natural es la de ser el alimento más importante en la dieta de los mamíferos jóvenes (lactantes y niños pequeños), cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituido por otros alimentos.

Es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor dulce y de pH cercano a la neutralidad. Es una mezcla de sustancias definidas: lactosa, glicéridos de ácidos grasos, caseína, albúmina y minerales, además de otras sustancias que están presentes en menor concentración.

La importancia de la leche se basa en su alto valor nutritivo, ya que sus componentes se encuentran en forma y proporción adecuada, de tal manera que la leche representa el alimento más balanceado, es la principal fuente de: proteínas, calcio, fósforo, riboflavina, vitamina A, D y agua. (1)

## **I.2.- LACTOSA**

La lactosa (4- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa), es el único azúcar libre que existe en la leche, es el componente más abundante, el más simple y el más constante en proporción. La leche humana contiene 65 g/l, o sea más de la mitad del extracto seco y la de vaca 48-50 g/l. (1, 13)

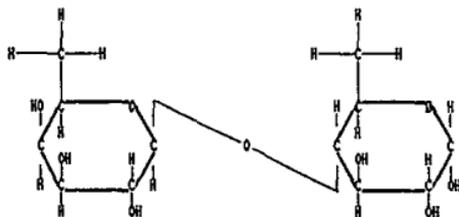
Este disacárido está compuesto por una molécula de  $\beta$ -galactosa y una molécula de  $\alpha$  o  $\beta$  glucosa unidos por un enlace glucosídico  $\beta$ -(1-4). (13) Figura 1.

La lactosa es sintetizada únicamente por las células de la glándula mamaria a través de la reacción de glucosa con el compuesto uridina difosfato galactosa.

Una de las proteínas que se encuentran en la leche, la  $\alpha$ -lacto-albúmina es la que se requiere para la síntesis de la lactosa. Esta proteína aparentemente no actúa en toda la reacción, pero se sabe que es específica en la acción de la enzima galactosil-transferasa modificando la enzima para que en presencia de  $\alpha$ -lacto-albúmina y glucosa se lleve a cabo la síntesis de lactosa. (17) Figura 2.

FIGURA 1

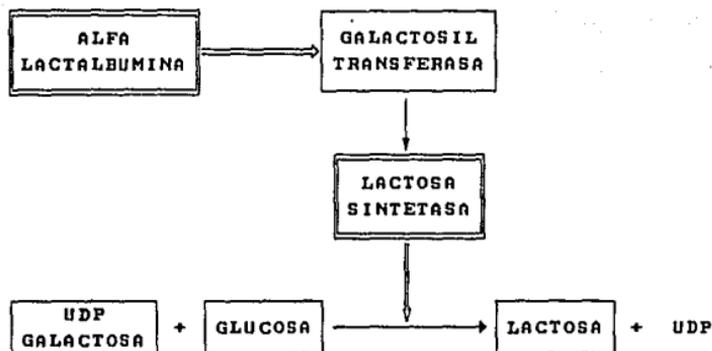
Beta-LACTOSA



\* Kretzmer, N. (1972) Scientific American 227 (4): 71-78.

FIGURA 2

## SINTESIS DE LACTOSA



\* Kretzmer, N. (1972) Scientific American 227 (4): 71-78.

### I.3.- INTOLERANCIA A LA LACTOSA

La leche no es fácilmente digerida por niños, adultos y algunos grupos étnicos que padecen de intolerancia a la lactosa, debido fundamentalmente a que carecen de las cantidades suficientes o presentan la ausencia de lactasa intestinal, originando con esto una digestión incompleta de lactosa cuando se consume leche o productos lácteos, lo que trae como consecuencia la aparición de síntomas y molestias gastrointestinales como son: diarrea, flatulencia, vómito y dolores abdominales. (8,28,36)

Intolerancia a la lactosa: síntomas que ocurren después de la ingestión de leche o de productos lácteos que contienen lactosa.(28, 36). Los tipos de deficiencia de  $\beta$ -galactosidasa son:

1) Ausencia congénita de lactasa en la mucosa intestinal: es un desorden extremadamente raro, el cual debe hacerse obvio durante las primeras semanas de vida. (29, 36)

2) Deficiencia primaria de lactasa (Hipoplactasia): consiste en que la actividad de la lactasa no está completamente ausente, pero tiene una actividad residual baja en la mucosa intestinal de niños y adultos. (29, 36)

La frecuencia de deficiencia primaria de lactasa en adultos es de un 50-79%. (29)

3) Mala absorción de lactosa: es la hidrólisis incompleta de la lactosa, resultado de la ausencia o deficiencia de  $\beta$ - galactosidasa. (13, 28, 36)

4) Deficiencia secundaria de lactasa: ocurre como consecuencia de muchas enfermedades, especialmente cuando hay un daño en la función fisiológica de la mucosa del intestino delgado. En esta última situación, la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa está deprimida, más que las otras actividades enzimáticas. (29, 36)

La mayoría de los mamíferos producen leche que contiene lactosa con excepción de los leones marinos (Pacific Basin pinnepeds, 16) por lo que los pequeños que están siendo amamantados presentan cantidades fisiológicamente adecuadas de  $\beta$ -galactosidasa en la mucosa intestinal, pero la concentración de esta enzima se reduce significativamente después del período de lactancia. (36)

Una gran proporción de la población mundial presenta hipolactasia con evidencia de mala absorción de lactosa e intolerancia a la misma. Los grupos culturales que tradicionalmente han sido ganaderos y por lo tanto generalmente consumidores de leche, presentan una incidencia baja de intolerancia a la lactosa. La población que compone el resto del mundo, por el contrario, presenta una alta incidencia de intolerancia a la lactosa. (36)

La mayoría de la población originaria del norte de Europa, que ha estado consumiendo leche durante varios miles de años, tiene una baja incidencia de intolerancia a la lactosa. Una situación similar ocurre en poblaciones que tradicionalmente son consumidoras de leche en Nigeria. Las poblaciones de África, sur de Europa, el Cercano Oriente, India y el Lejano Oriente, desarrollan intolerancia a la lactosa durante la niñez tardía y la vida adulta. (13, 17, 27, 36) Figura 3.

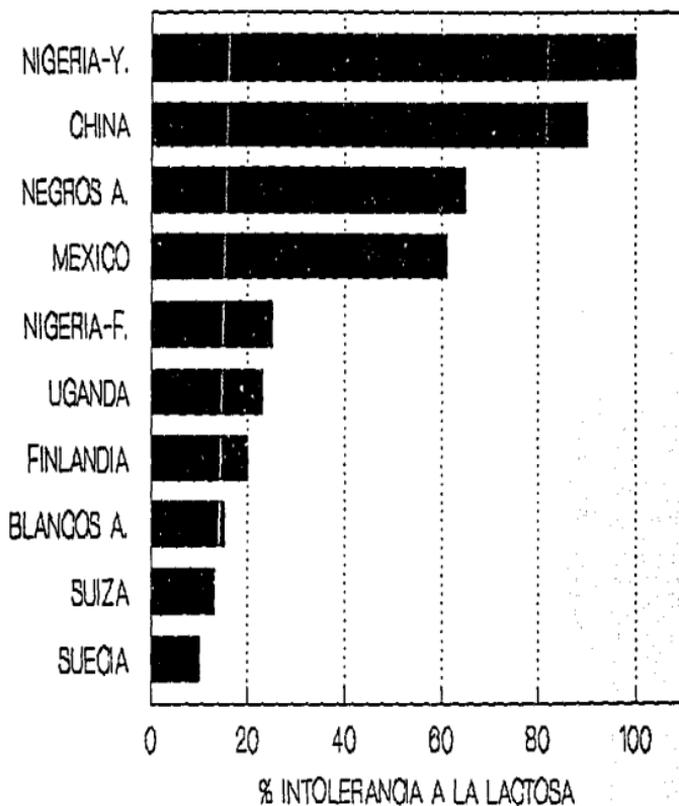
Se ha considerado la posibilidad de que la intolerancia a la lactosa pudiera inducirse mediante el daño producido a la mucosa intestinal en enfermedades gastrointestinales o mala nutrición. La deficiencia secundaria de lactasa es un fenómeno reconocido ampliamente en gastroenteritis aguda. En aquellas poblaciones en las cuales estos problemas son frecuentes, es posible que la explicación de la aparición temprana de la intolerancia a la lactosa pudiera ser la existencia de deficiencia secundaria de lactasa. (19)

Debido a que el periodo de la lactancia en los humanos no ha sido claramente definido, la aparición de mala absorción de lactosa puede ocurrir entre las edades de 3 y 7 años. (7, 37)

Aparentemente, aunque se tomara solamente pequeñas cantidades de leche (200 ml) durante un cierto periodo de tiempo, el sistema digestivo puede desarrollar la capacidad de producir  $\beta$ -galactosidasa intestinal necesaria para poder ingerir la leche en mayores cantidades (1 lt) sin efectos adversos. (38)

El porcentaje mínimo de hidrólisis para la producción de una leche baja en lactosa es de un 70-80% por lo que las personas que padecen de deficiencia de  $\beta$ -galactosidasa se benefician ya que reduce los síntomas de intolerancia a la leche. (12, 15)

FIGURA 3  
PAISES INTOLERANTES A LA LACTOSA



Y=YORUBA, F=FULANI, A=AMERICANO

\* Holsinger. V. (1981) Food Tech. 1:92

#### I.4.- $\beta$ -GALACTOSIDASA

La industria utiliza enzimas comerciales para la manufactura o el procesamiento de una gran número de alimentos y medicinas, las ventajas de su uso son las siguientes:

- a) son de origen natural y por lo tanto no son tóxicas.
  - b) son muy específicas en su modo de acción, por lo que efectúan reacciones que de otra manera serían difíciles.
  - c) funcionan en condiciones moderadas de temperatura y pH por lo que no requieren condiciones drásticas que pueden alterar la naturaleza del alimento o medicina.
  - d) actúan a bajas concentraciones.
- e) son fácilmente inactivadas después de haber alcanzado el cambio deseado. (4)

Las enzimas más comúnmente empleadas en la industria alimentaria pertenecen a las carbohidrasas; las principales son: amilasas, celulasas, disacarasas y pectinasas. (4)

La  $\beta$ -galactosidasa pertenece a las disacarasas.

La lactasa o  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -D-galactósido- galactohidrolasa, E.C.3.2.1.23), cataliza la hidrólisis del enlace  $\beta$ -D-galactósido y  $\alpha$ -L-arabinósido. Figura 4.

Algunas de las fuentes de  $\beta$ -galactosidasa son: (5,10,32)

- Vegetales (jitomate, semillas de alfalfa, papaya, cuaguayote "Pileus mexicanus" 32)
- Organos animales.
- Bacterias (E. coli y S. lactis)
- Levaduras (K. lactis y S. fragilis)
- Hongos (A. niger y A. oryzae)

Las propiedades de la enzima dependen de su fuente de origen.

El peso molecular más alto es el de la  $\beta$ -galactosidasa de E. coli que es de 520,000 a 850,000 daltones, mientras que para las enzimas de S. fragilis y A. oryzae sus pesos moleculares son de 200,000 a 90,000 daltones respectivamente. (25)

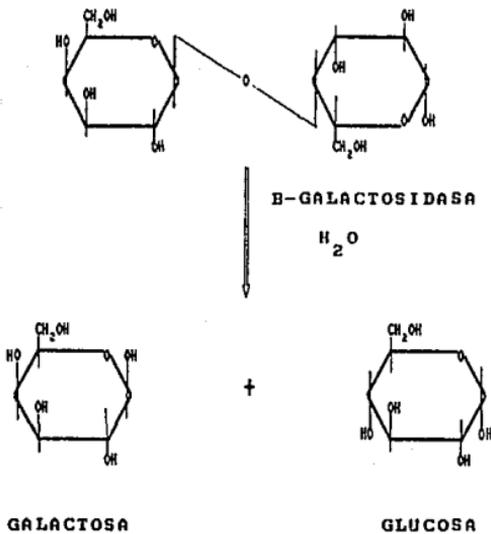
La temperatura y el pH óptimo difieren también de la fuente. Por ejemplo, la  $\beta$ -galactosidasa fungal tiene un pH óptimo en el límite ácido 2.5-4.5, mientras que las enzimas provenientes de bacterias y levaduras lo tienen en la región neutra 6.5-7.5 y 6.7 respectivamente, esta propiedad hace que se tengan condiciones diferentes para la aplicación de cada  $\beta$ -galactosidasa. (15, 25)

La inhibición por producto (especialmente inhibición por galactosa) es otra propiedad que depende también de la fuente de la  $\beta$ -galactosidasa.

FIGURA 4

# HIDROLISIS DE LACTOSA

LACTOSA



\* Shukla, T. (1975) Critical Rev. Food Tech. 5: 325.

El sitio activo de la molécula de  $\beta$ -galactosidasa se encuentra caracterizado por un grupo sulfhidrilo (-SH) que actúa como ácido para protonar el átomo de oxígeno glicosídico y el grupo imidazol de la histidina en la posición del C-1. En la remoción del grupo galactosil, el anión sulfhidrilo (S<sup>-</sup>) actúa generalmente como una base para extraer un protón del agua auxiliando en el ataque del OH en la posición del C-1. (33) Figura 5.

#### **1.5.- ENZIMAS PROTEOLITICAS: HEMISFERICINA**

Las proteasas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria en una gran diversidad de productos. Estas enzimas hidrolizan las proteínas en forma ordenada ya que la mayoría tiene cierta especificidad para un determinado enlace peptídico.(4)

La hemisfericina es una proteasa polimórfica que se obtiene del jugo del fruto de Bromelia hemisphaerica, planta perteneciente a la familia de las bromeliáceas vulgarmente conocida como: timbiriche, piñuela; crece en forma silvestre en las regiones subtropicales de México. (9)

Tiene formas moleculares múltiples con puntos isoeléctricos de pH 4-8.5. La actividad de esta enzima al igual que la mexicana y papaína depende de la presencia de un grupo sulfhidrilo libre. (9)

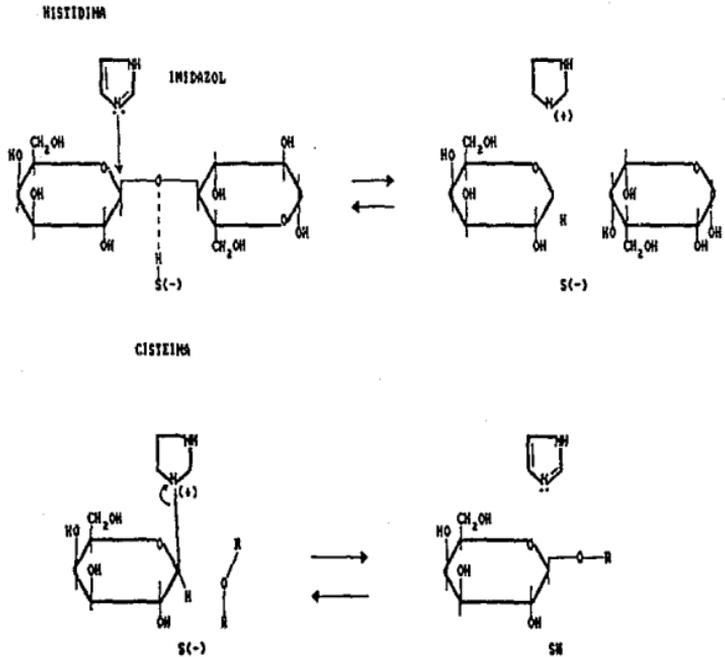
#### **1.6.- COAGULACION DE LA LECHE: QUESO**

Las enzimas proteolíticas de origen vegetal, tienen la propiedad de coagular la caseína de la leche característica que les permite ser utilizadas en la fabricación de quesos. (32, 35, 40)

A causa de la escasez de cuajo extraído del estómago de los terneros, se han reconocido diferentes productos de sustitución entre los que se encuentran: pepsina, cuajos vegetales y microbianos, pero debe indicarse que ninguna de estas enzimas, a parte de su poder coagulante tienen propiedades idénticas al cuajo: actividad proteolítica, sensibilidad al calcio, etc.(1,4)

FIGURA 5

MECANISMO DE HIDROLISIS DE  
LACTOSA POR B-GALACTOSIDASA



\* Shukla, T. (1975) Critical Rev. Food Tech. 5: 325.

Por mucho tiempo se ha dicho que las enzimas proteolíticas en general no eran capaces de producir queso con un buen rendimiento y sabor, ya que la proteólisis era la causante de esto, sin embargo Yeh (40) obtuvo un queso tipo fresco a partir de una enzima proteolítica, la chayaina (del látex de Cnidocolus chayamansa), para lo cual maneja concentraciones muy bajas de enzima para evitar esto y mantener las propiedades coagulantes de la misma.

La utilización de la hemisfericina en la elaboración de queso tipo fresco es con el objeto de complementar y no de sustituir al cuajo ya que este es insuficiente para la producción de quesos en el mundo. (18, 40)

Dado que aproximadamente el 70% de la población mundial (entre niños y adultos) presentan deficiencia de  $\beta$ -galactosidasa intestinal, es importante la producción de leche con bajo contenido de lactosa, ya que esta suministra más sustancias alimenticias (grasa, proteína, sales minerales, vitaminas) que cualquier otro alimento y la leche que se vende comercialmente "libre" de lactosa no contiene, debido a que es una mezcla de componentes (caseína, albumina, soya, maltodextrinas) que tratan de igualar a la leche. (13, 29)

## **II.- OBJETIVOS**

## **II OBJETIVOS**

- 1.- Obtener una leche parcialmente deslactosada por hidrólisis enzimática de la lactosa.
- 2.- Determinar la concentración de  $\beta$ -galactosidasa para producir entre un 70-80% de hidrólisis de la lactosa.
- 3.- Obtener a partir de la concentración de  $\beta$ -galactosidasa ya determinada, leche deslactosada utilizando diferentes leches (líquidas y en polvo).
- 4.- Preparar un queso tipo "fresco" a partir de la enzima proteínasa de origen vegetal hemisfericina, utilizando leche deslactosada.
- 5.- Comparar el queso "fresco" obtenido con leche deslactosada con un queso "fresco" comercial.

### **III. MATERIALES Y METODOS**

### III. MATERIALES

#### III.1.- Equipo:

- Balanza analítica (Sartorius 2442)
- Estufa para humedad (Precision GCA Corp.)
- Mufa (Lindberg 51848)
- Aparato Kjeldahl (Labconco 64366)
- Potenciómetro (Corning pH meter 125)
- Espectrofotómetro (Shimadzu Double Beam UV-210A)
- Colorímetro (Spectronic 20 Bausch and Lomb)
- Baño a temperatura controlada (Grant Instrument SE 15)
- Material de vidrio de laboratorio

#### III.2.- Materias primas:

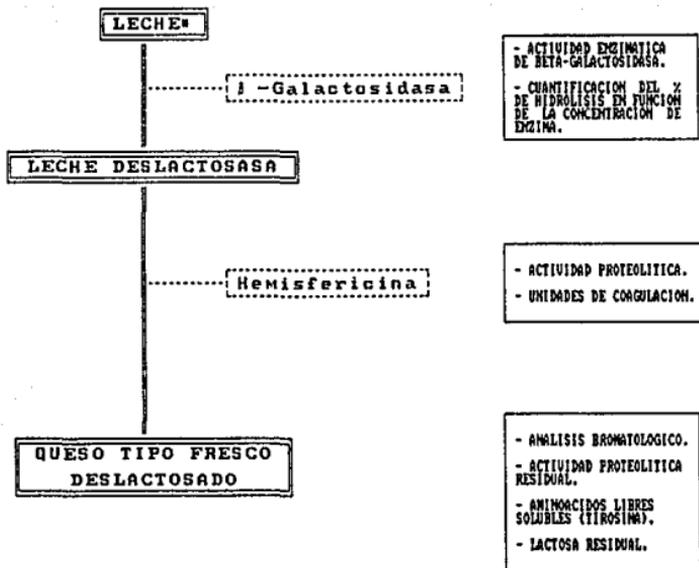
- Leches en polvo y fluidas, enteras y descremadas de (varias marcas).
- $\beta$ -galactosidasa Maxilact 2000 (sólida) y 5000 (líquida) (Quimiogan)
- Fruto timbiriche Bromelia hemisphaerica (CEPROBI-IPN)

#### III.3.- Reactivos:

- Metilamina (Sigma)
- TNBS.- 2,4,6 trinitrobencensulfónico (Sigma)
- PTA .- Acido fosfotungstico (Merck)
- ATC .- Acido tricloroacético (Merck)
- Caseína Hammersten (Merck)
- Reactivos de grado analítico.

FIGURA 6

## DESARROLLO EXPERIMENTAL



\* ANEXO Ia Y Ib

### **III.4.- METODOS**

#### **II.4.1.- DETERMINACION DE LACTOSA (METODO DE NICKERSON) (22)**

Es un método muy sensible para determinar el incremento de glucosa y galactosa y la disminución de lactosa después de la hidrólisis enzimática o ácida.

#### **CURVA TIPO DE LACTOSA.-**

A una serie de tubos se agregó la solución de lactosa (13150 ug/ml) en alícuotas que van de 0.01 a 0.1 ml y se llevaron a 5 ml con ácido benzoico a 1% y se leyó la absorbancia a 540 nm.

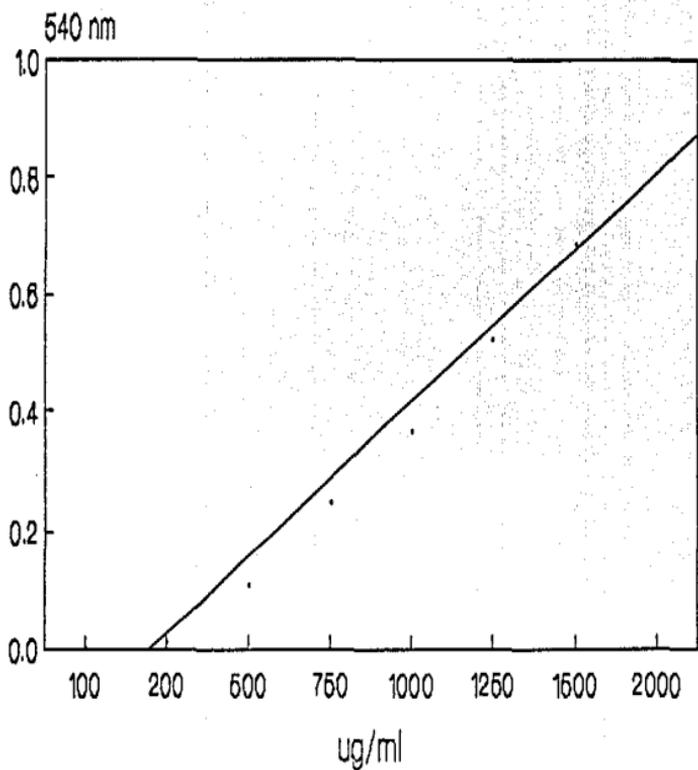
La curva tipo se muestra en la Figura 7.

#### **DESARROLLO EXPERIMENTAL.-**

- 1.- A 5 ml de leche adicionar 1 ml de acetato de zinc-ácido fosfotúngstico (ZAPT), después de 10 minutos filtrar.
- 2.- Al filtrado adicionarle 1 ml de NaOH 1 N y filtrar.
- 3.- A 5 ml del filtrado anterior adicionarle:  
5.0 ml de buffer Glicina-NaOH, pH 12.8  
0.5 ml de metilamina 5%.  
0.5 ml de sulfito de sodio 1 %  
y mezclar perfectamente.
- 2.- Calentar en un baño de agua a 65°C durante 25 minutos para que se lleve a cabo la reacción colorimétrica, inmediatamente enfriar en un baño de agua fría por 2 min.
- 3.- Leer absorbancia a 540 nm, ajustando el aparato con agua destilada. Las lecturas se interpolan en la curva tipo de lactosa.

FIGURA 7  
CURVA TIPO DE LACTOSA  
METODO DE NICKERSON

19

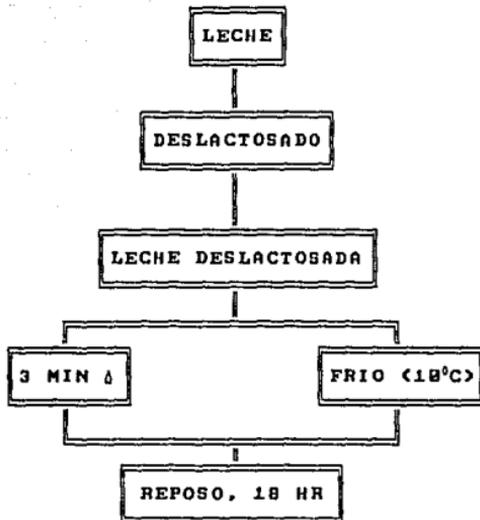


$$Y = 0.000528 x - 0.1486$$

$$r^2 = 0.9988$$

FIGURA 8

OBTENCION DE LECHE DESLACTOSADA.



[E] =  $\beta$ -Galactosidasa, K.lactis

### III.4.2.- UNIDADES DE COAGULACION (METODO DE BERRIDGE-FOLTMANN) (40)

La determinación de las unidades de coagulación se basa en medir el tiempo que tarda la enzima en empezar a coagular la leche (formación de una capa de grumos). Esta técnica es empleada a nivel industrial para medir la fuerza coagulante de las enzimas para la producción de quesos.

#### DESARROLLO EXPERIMENTAL.-

- 1.- Disolver 12 g de leche descremada en polvo en 100 ml de una solución de  $\text{CaCl}_2$  0.01M. El pH de esta solución está en el orden de 6.2-6.3.
- 2.- Se toman 9 ml del sustrato se le añade 1 ml de solución enzimática (diluida de modo que el tiempo de coagulación este entre 4 y 10 minutos). Los tubos de ensayo se mantienen oscilando o rotando sumergidos en un baño María a 30°C.
- 3.- Se toma el tiempo desde el momento de la adición de la enzima, hasta la aparición de pequeños grumos en la paredes del tubo de ensayo.
- 4.- Cada determinación se realiza por triplicado, tomándose como tiempo de coagulación el valor medio.

#### CALCULOS.-

$$a = \frac{K}{d (t_c - T)}$$

donde: a = actividad por gr o ml expresado en unidades Berridge

d = dilución utilizada para la enzima

t<sub>c</sub> = tiempo de coagulación en segundos

K y T = constantes de calibración del lote de leche a utilizar

#### - DETERMINACION DE LA CONSTANTE T:

Se prepara una solución madre de 1g de cuajo en polvo en 100 ml de agua destilada y apartir de ella se preparan diluciones de: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 ml a 50 ml con agua destilada (ó diluciones tales que cubran el límite entre 4 y 10 minutos de tiempo de coagulación).

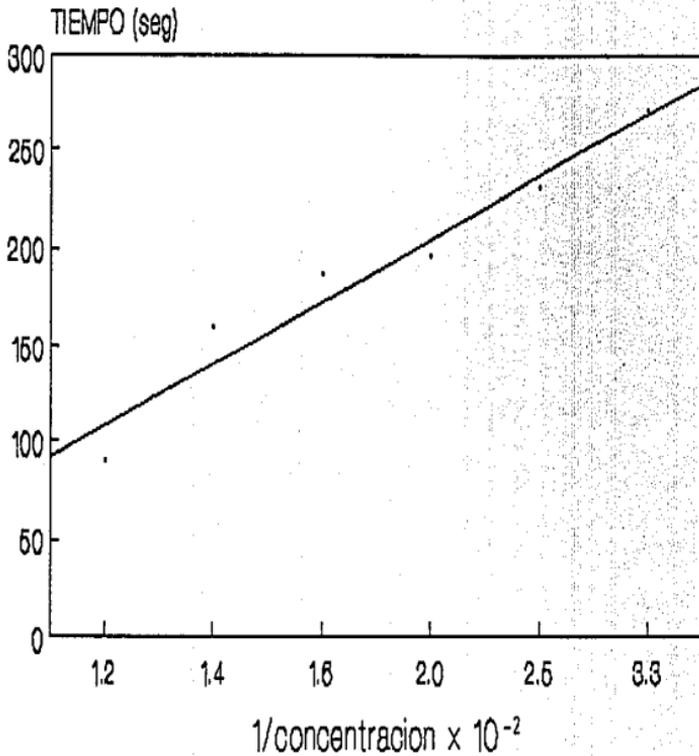
Se le determina el valor de  $t_c$  a cada dilución según el procedimiento descrito anteriormente para el sustrato que se desea calibrar (leche). Se traza la gráfica y se determina la regresión entre  $t_c$  y el inverso de la concentración de enzima ( $t_c$  como ordenada). Figuras 9 y 10.

El término independiente de la ecuación de regresión obtenido, será el valor de  $T$  para el sustrato que se calibra (usualmente oscila entre 0 y 30 seg.)

– DETERMINACION DE LA CONSTANTE K:

El valor de la constante  $K$ , en teoría y según la definición de la Unidad Berridge, es igual a  $(100-T)$ .

**FIGURA 9**  
**ACTIVIDAD COAGULANTE (CUAJO)**  
**METODO DE BERRIDGE-FOLTMANN**

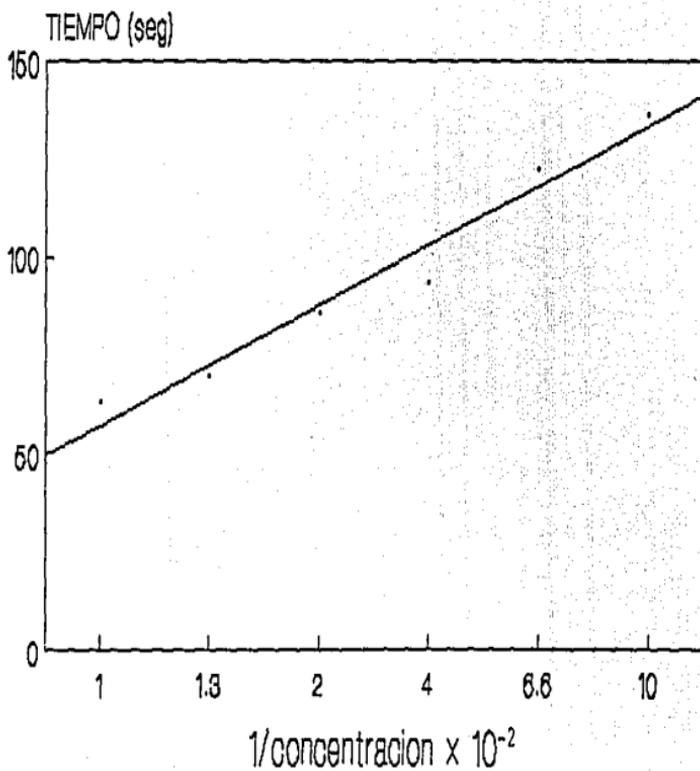


$$Y = 72x + 44.66 \quad r^2 = 0.9215$$

$$a = K/d(Tc-T)$$

$$K = (100-T)$$

FIGURA 10  
 ACTIVIDAD COAGULANTE (HEMISFERICINA)  
 METODO DE BERRIDGE-FOLTMANN



24

$$Y = 7.99 x + 62.03 \quad r^2 = 0.9738$$

$$a = K / (T_c - T)$$

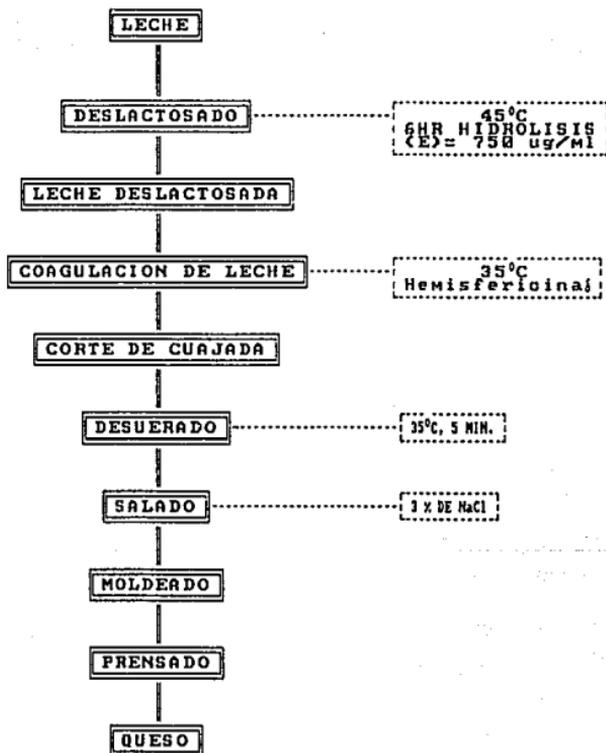
$$K = (100 - T)$$

FIGURA 11

# ELABORACION DE QUESO TIPO "FRESCO"

## A PARTIR DE LECHE DESLACTOSADA

(21)



(E) =  $\beta$ -Galactosidasa, *K.lactis* (solida)

δ = Jugo del fruto de Bromelia hemisphaerica

### **III.4.3.- DETERMINACION DE ACTIVIDAD PROTÉLITICA (METODO DE KUNITZ, MODIFICADO POR ORTEGA Y DEL CASTILLO) (18, 23)**

Está técnica consiste en dejar actuar una cantidad de enzima sobre caseína en regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.6.

#### **CURVA TIPO DE TIROSINA.-**

A una serie de tubos se agregó la solución de tirosina (500  $\mu$ moles/litro) en alícuotas que van de 0 a 3 ml y se llevaron a 3 ml con una mezcla de regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.6 y ácido tricloroacético (ATC) al 5% en proporción 2:3 y se leyó la absorbancia a 280 nm.

La curva tipo se muestra en la Figura 12.

#### **DESARROLLO EXPERIMENTAL.-**

1.0 g de caseína en regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.6 se desnaturalizó en un baño con agua en ebullición durante 20 min. A continuación se enfrió y aforó a 190 ml con el regulador antes mencionado quedando al 1%

En un baño a 35°C, se colocan tubos de ensayo conteniendo 1.9 ml de solución de caseína al 1% y 0.1 ml de solución enzimática y se deja actuar el tiempo establecido (entre 10 y 60 minutos).

Para suspender la hidrólisis se agregan 3 ml de ácido tricloroacético al 5% (ATC).

El tubo testigo se precipita primero con ATC y luego se le añade la solución enzimática.

Los tubos se filtran o centrifugan a 2000 rpm durante 20 minutos, en el sobrenadante se encuentran aminoácidos libres y péptidos producto de la hidrólisis enzimática.

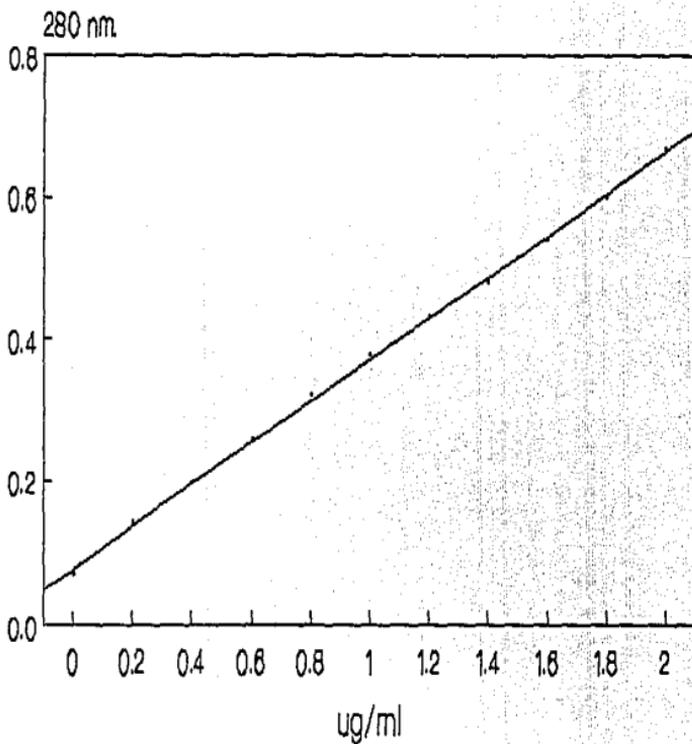
Los tubos se leyeron a 280 nm, ajustando el aparato con una solución de 2.0 ml de regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.6 y 3.0 ml de ATC al 5%.

#### **CALCULOS.-**

La actividad proteolítica se expresó en unidades de tirosina: microgramos ( $\mu$ g) de tirosina liberados por hora, por ml de extracto. Haciendo uso de la curva tipo y con la diferencia de absorbancias entre el problema y el testigo se obtuvieron los  $\mu$ g de tirosina liberados.

La tirosina se utiliza como tipo para determinar las unidades a nivel internacional.

FIGURA 12  
CURVA TIPO DE TIROSINA  
METODO DE KUNITZ



$$Y = 0.0709 x + 0.2928$$
$$r^2 = 0.9996$$

### III.4.4.- CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS LIBRES SOLUBLES (METODO DE JARRET) (14)

Este método se basa en la estimación de aminoácidos libres en queso mediante la extracción con ácido fosfotúngstico (PTA)/ácido sulfúrico y se determinan con ácido 2,4,6 trinitrobencensulfónico.

#### **CURVA TIPO DE TIROSINA.-**

10 ml de la solución de tirosina de concentración conocida se homogeneizaron con 50 ml de citrato de sodio (2%), de ahí se tomó una alícuota de 5 ml y se le añadió 3.5 ml de ácido sulfúrico 3.95 M y 1.5 ml de ácido fosfotúngstico 33.3%. A continuación se filtró y se tomó una alícuota de 3 ml la cual se neutralizó con NaOH 0.6 M hasta un volumen de 20 ml.

Se tomó nuevamente otra alícuota de 0.2 ml (por triplicado) y se aforó a un volumen de 1 ml con agua destilada, posteriormente se añadió 1 ml de bicarbonato de sodio al 4%, pH 8.5 y 1 ml de 2,4,6 trinitrobencensulfónico al 0.1%, esta reacción se dejó que evolucione a una temperatura de 37°C durante 2 horas.

Al finalizar este lapso se añadió 1.5 ml de HCl 0.33 M, y se procedió a leer a 340 nm.

La curva tipo se muestra en la Figura 13.

#### **DESARROLLO EXPERIMENTAL.-**

Se tomó una muestra de 10 g de queso y se homogeneizaron con 50 ml de citrato de sodio al 2%, se filtra y se desecha la grasa.

Se toman 5 ml del filtrado, a continuación se le adicionó 3.5 ml de ácido sulfúrico 3.95 M y 1.5 ml de ácido fosfotúngstico al 33.3%, se deja reposar a 10°C toda la noche para precipitar la proteína.

Al final de este período se filtró y del sobrenadante se tomó una alícuota de 3 ml los cuales se neutralizaron con NaOH 0.6 M hasta un volumen de 20 ml, seguidamente se tomó 0.2 ml y se aforó a 1 ml con agua destilada, seguidamente se le añadió 1 ml de bicarbonato de sodio al 4%, pH 8.5 y 1 ml de 2,4,6 trinitrobencensulfónico 0.1%.

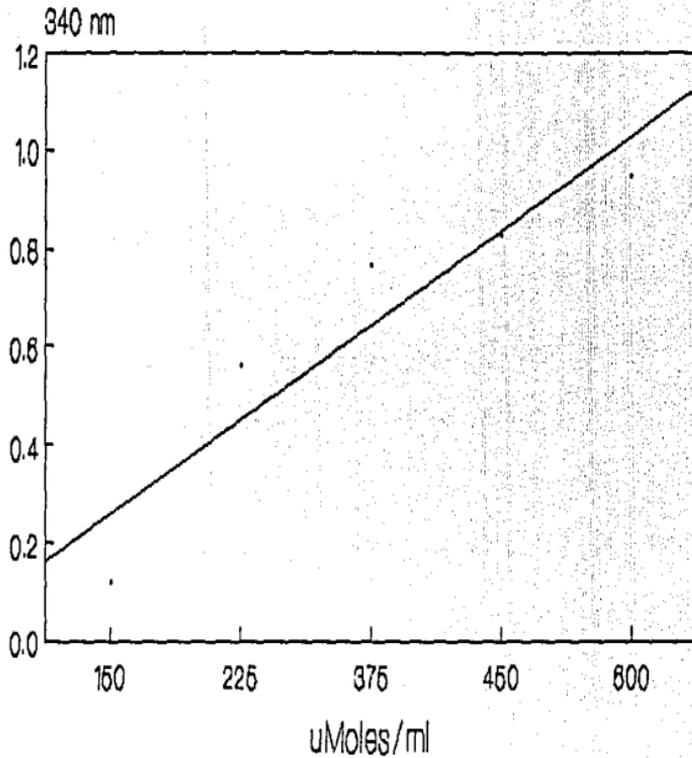
Se dejó reaccionar durante 2 hr. a una temperatura de 37°C.

Al finalizar este lapso de tiempo se adicionó 1.5 ml de HCl 0.33M y se procedió a leer a 340 nm.

Las lecturas se interpolan en la curva tipo de tirosina.

FIGURA 13  
CURVA TIPO DE TIROSINA  
METODO DE JARRET

29



$$Y = 0.0451x + 0.00166$$
$$r^2 = 0.9144$$

### **III.4.5.- DETERMINACION DE HUMEDAD (METODO DE LA TERMOBALANZA)** **(2)**

La humedad es tomada como la pérdida de peso al secado, usando un instrumento de humedad, el cual emplea una balanza de torsión sensible para pesar la muestra y una lámpara infrarroja para secar.

#### **DESARROLLO EXPERIMENTAL.-**

- 1.- Soltar el sujetador del plato para muestra, revisándolo para asegurarse de que el plato corre libremente sobre su soporte finamente punteado y que este limpio y seco.
- 2.- Ajustar al 0 y 100%.
- 3.- Determinar 5 g de la muestra pesada en la misma balanza y distribuirla cuidadosamente en el platillo.
- 4.- Con la fuente de potencia debidamente ajustada, bajar la tapa de la balanza. La muestra comenzará a perder humedad y la manecilla se moverá hacia arriba. Después de pasado un tiempo de 10 a 20 min. deberá tomarse la lectura, y si ésta permanece estable durante 2 min. se registrará como porcentaje total de humedad.

### III.4.6.- DETERMINACION DE CENIZAS (METODO DEL A.O.A.C.) (2)

Las temperaturas (550°C) destruyen la materia orgánica para dejar únicamente las sales minerales contenidas en el alimento.

#### DESARROLLO EXPERIMENTAL.-

- 1.- Poner a peso constante el crisol, colocándolo en la mufla a 550°C durante media hora.
- 2.- Secar el crisol y dejarlo enfriar en un desecador.
- 3.- Pesar el crisol vacío en una balanza analítica, agregar aproximadamente 1 g de muestra y volver a pesar.
- 4.- Incinerar la muestra con un mechero, evitando que se incendie.
- 5.- Una vez que la muestra esté totalmente incinerada (cuando deje de salir el humo), pasar el crisol a la mufla y dejar durante una hora y media a 550°C.
- 6.- Transcurrido este tiempo, sacar el crisol con las pinzas, dejar enfriar dentro del desecador y pesar.

#### CALCULOS.-

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(\text{Peso crisol cenizas} - \text{Peso crisol vacío})}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

### III.4.7.- DETERMINACION DE PROTEINAS (METODO DE KJELDAHL) (2)

La materia orgánica es digerida para pasar el nitrógeno a un compuesto inestable el cual en medio alcalino se descompone liberando amoniaco que es recibido en solución de ácido bórico y titulado en ácido clorhídrico.

#### DESARROLLO EXPERIMENTAL.-

- 1.- Pesar de 0.5 a 1 g de muestra seca y llevarlo a un matraz Kjeldahl de 800 ml previamente limpio y seco.
- 2.- Agregar 5.24 g de mezcla de sulfato de sodio-óxido mercuríco en una relación de 15-0.7 g respectivamente.
- 3.- Agregar perlas de vidrio y 12.5 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- 4.- Llevar a ebullición, primeramente a calor lento y después de 30 min. a calor alto.
- 5.- Una vez adoptado un color amarillo transparente apagar el aparato y dejar enfriar.
- 6.- Una vez frío, agregar 300 ml de agua destilada; agregar granalla de zinc y 85 ml de NaOH al 40%, sulfato de sodio al 4%, mezclada en una relación de 60-25 ml respectivamente.
- 7.- Recibir el destilado en 200 ml de ácido bórico al 4% y adicionar 4 gotas del indicador Wasselow, terminando la destilación hasta obtener un volumen de 400 ml.
- 8.- Titular con HCl 0.1 N.

#### CALCULOS:

$$\% \text{ Nitrogeno} = \frac{(0.014) (N \text{ HCl}) (\text{ml HCl gastados})}{\text{peso de la muestra (g)}} \times 100$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.38$$

donde: 0.014 = meq. de nitrógeno

6.38 = factor para productos lácteos

### **III.4.8.- DETERMINACION DE GRASA EN QUESO (METODO DE GERBER)** **(24)**

Se basa en la digestión parcial de los compuestos de la leche, excepto la grasa en ácido sulfúrico. Emplea alcohol isoamílico para ayudar a romper la emulsión de la leche y evitar que se quema la capa de grasa. El alcohol reacciona con el ácido sulfúrico formando un éster que es completamente soluble en el ácido.

#### **DESARROLLO EXPERIMENTAL.-**

- 1.- Pesar directamente en el tubo fijado en el tapón del butirómetro 3 g  $\pm 0.001$  g de muestra.
- 2.- Meter el tapón con la muestra de queso dentro del butirómetro.
- 3.- Por la abertura superior, agregar al butirómetro 15 ml de ácido sulfúrico (densidad 1.530) de tal manera que recubra a todo el queso.
- 4.- Tapar la abertura y ponerlo en baño María a 65°C por 30 min. agitándolo cuidadosamente 2 o 3 veces durante ese lapso para disolver todas las partículas de queso.
- 5.- Agregar 1 ml de alcohol isoamílico y agitar.
- 6.- Terminar de llenar el butirómetro con ácido sulfúrico hasta que el volumen llegue a aproximadamente tres cuartas partes de la columna graduada.
- 7.- Tapar la abertura superior y volver a meterlo a baño María por 5 min.
- 8.- Mezclarlo antes de centrifugar a 1200 r.p.m durante 5 min.
- 9.- Volver a meter el butirómetro al baño María y dejarlo allí por 10 min.
- 10.- Hacer la lectura llevando la base de la columna de grasa exactamente al cero, por medio de presión con el tapón.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSION**

Los resultados obtenidos de la hidrólisis de lactosa se describen a continuación:

En el cuadro I se presenta la actividad enzimática de  $\beta$ -galactosidasa Maxilat 2000 en función de la concentración y se observa un incremento al aumento de este, esto se llevó a cabo para corroborar cual era la actividad que traía el primer lote de enzima (sólido).

En función de esto se decidió trabajar con la actividad de 750 ug/ml de  $\beta$ -galactosidasa, 6 hr de hidrólisis en regulador de fosfatos pH 7.0 0.05 M a diferentes temperaturas las cuales se muestran en el cuadro II.

Como se ve la temperatura de 45°C fué la que mejores resultados dió con leche Sveltes, el porciento de hidrólisis osciló entre 70-80% valor más que suficiente para que sea consumida por un intolerante congénito o de deficiencia primaria de acuerdo con los resultados obtenidos por Holsinger (12) y Kosikowski (15), los cuales trabajando con intolerantes a la lactosa observaron que con el porciento de hidrólisis antes mencionado las personas que padecen intolerancia no tuvieron trastornos digestivos.

Sin embargo en los resultados anteriores se trabajó en presencia de un regulador de fosfatos, pero esto no es lo que sucede en la forma práctica por lo que en el cuadro III se presentan los valores obtenidos de 3 leches en polvo las cuales se encontraban en agua ajustada a pH 7.0. Comparando con la actividad realizada en presencia de regulador se nota que no hay variación en usar una u otra solución.

Tratando de hacerlo a nivel industrial se decidió disolver la leche en polvo en agua potable. En los cuadros IV y V se presentan los resultados de la hidrólisis de lactosa a 45°C, no habiendo ninguna diferencia con respecto a las soluciones anteriormente utilizadas.

Habiéndose encontrado las condiciones óptimas de hidrólisis de lactosa (entre 70-80%) se presentó una incógnita: ¿como detener la reacción?, para este fin se utilizaron 2 formas de inactivación enzimática:

- 1.- Calentamiento a ebullición por 3 minutos.
- 2.- Refrigeración a 10°C

Al término de las 6 hr de hidrólisis se inactivaron por los 2 métodos y se dejaron en reposo durante 18 hr.

Los resultados de estas inactivaciones se muestran en el cuadro IV y V en donde se observa que para este lote de enzima es suficiente con que se meta la leche en refrigeración.

Creemos que 18 hr fué un tiempo determinado pero puede ser menor, incluso inmediatamente después de la reacción de hidrólisis se puede bajar la temperatura de 45°C a 10°C.

CUADRO I

ACCION DE LA B-GALACTOSIDASA M-2000  
 SOBRE LACTOSA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION

CONCENTRACION (ug/ml)	$\frac{\text{ug LACTOSA}}{\text{mg ENZIMA}} = \text{U.L.}$	% hidrolisis
250	3284	38.0
500	5153	56.0
750	7690	80.0
1000	6417	70.0

Temperatura = 35°C

(S) = Lactosa 0.06 M

Regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.0

E =  $\beta$ -Galactosidasa, *K. lactis* (solida)

U.L. = mg lactosa consumida/mg enzima en un tiempo

Volumen muestra = 50 ml

CUADRO II

ACCION DE LA B-GALACTOSIDASA M-2000  
SOBRE LECHE\* EN FUNCION DE LA TEMPERATURA

(E) = 750 ug/ml, regulador de fosfatos pH 7.8

TEMP. (°C)	TIEMPO DE REACCION	ug lactosa	% hidrolisis
35	1 HR	4424	46.5
	3 HR	6265	66.0
	6 HR	6691	70.4
40	1 HR	4223	44.4
	3 HR	5422	57.0
	6 HR	6032	63.5
45	1 HR	3442	37.6
	3 HR	5065	55.3
	6 HR	6589	72.0

(E) = B-Galactosidasa, K.lactis (solido)

\* = leche descremada en polvo (Sveltes)

Volumen de muestra = 50 ml

CUADRO III

HIDROLISIS DE LECHE

45°C, (E) = 750 ug/ml.

TIEMPO DE REACCION	REGULADOR DE FOSFATOS pH 7.0					
	LECHE SVELTES <sup>*</sup>		LECHE NUTRICAL <sup>*</sup>		LECHE NUEVA ZELANDA <sup>*</sup>	
	ug lactosa	% hidrolisis	ug lactosa	% hidrolisis	ug lactosa	% hidrolisis
1 HR	3442	38.0	2693	31.0	3020	34.3
3 HR	5061	55.3	4051	46.1	4242	48.2
6 HR	6589	72.0	6312	72.0	6226	71.0

TIEMPO DE REACCION	AGUA pH 7.0					
	LECHE SVELTES <sup>*</sup>		LECHE NUTRICAL <sup>*</sup>		LECHE NUEVA ZELANDA <sup>*</sup>	
	ug lactosa	% hidrolisis	ug lactosa	% hidrolisis	ug lactosa	% hidrolisis
1 HR	2245	28.0	1706	24.1	3180	37.3
3 HR	3745	48.0	3232	46.0	5211	61.2
6 HR	5862	73.1	5230	74.0	6919	81.2

(E) =  $\beta$ -Galactosidasa, *K.lactis* (solido)

\* = leche descremada en polvo

Volumen de muestra = 50 ml

CUADRO IV

INACTIVACION ENZIMATICA

45 C, (E) = 750 ug/ml, 6 HR HIDROLISIS

LECHE	TIEMPO DE REPOSO <sup>+</sup>			
	18 HR 3 MIN Δ		18 HR EN FRIO (10°C)	
	ug lactosa	% hidrolisis	ug lactosa	% hidrolisis
SUELTES*	4679	50.4	4679	50.4
NUTRICAL*	5655	80.0	5727	81.0
NUEVA* ZELANDA	6293	74.0	6375	75.0

(E) = β-Galactosidasa, K.lactis (solida)

+ = despues de la hidrolisis.

\* = leche en polvo descremada.

Volumen de muestra = 200 ml

CUADRO U

INACTIVACION ENZIMATICA

45°C, (E) = 750 ug/ml, 6 HR HIDROLISIS.

LECHE	TIEMPO DE REPOSO <sup>+</sup>			
	18 HR 3 MIN Δ		18 HR EN FRIO (10°C)	
	ug lactosa	% hidrolisis	ug lactosa	% hidrolisis
ALPURA <sup>†</sup> 2000	6672	73.9	6610	73.2
BOREAL <sup>‡</sup>	5729	63.3	6424	63.2
LALA <sup>§</sup>	6038	77.0	6180	78.0
ALPURA <sup>†</sup>	6238	85.3	6340	86.7
CAMPINA <sup>†</sup>	7308	72.0	7448	77.2
UNION <sup>†</sup>	7178	79.5	7109	78.7
MILECHE <sup>†</sup>	4967	66.0	4679	67.0

(E) = β-Galactosidasa, K.lactis (solida)

+ = despues de la hidrolisis.

\* = leche UHT

§ = leche pasteurizada

# = leche concentrada

Volumen de muestra = 200 ml

El tiempo de 18 hr se eligió para ver si continuaba la hidrólisis a 10°C, al término de este se volvió a determinar la lactosa residual dando el mismo porcentaje de hidrólisis que se obtuvo al finalizar la reacción por lo que si se desea el tiempo de reposo a 10°C puede ser disminuído a criterio.

Tanto en los cuadros IV y V se observa que los porcentos de hidrólisis no son los mismos ni semejantes entre los diferentes tipos y marcas de leche, lo cual nos indica que para cada marca de leche se tienen que especificar las condiciones de hidrólisis ya que el origen de las leches es diferente, pues existen leches tanto nacionales como de importación y aún entre las mismas leches nacionales las condiciones de hidrólisis tienen que ser modificadas en cuanto a tiempo de reacción.

Las condiciones utilizadas anteriormente son para un lote específico de enzima (sólido). México es un importador de enzimas en general por lo que no se cuenta con un lote estándar de enzima, debido a esto se depende de lo que en ese momento esté disponible en las compañías que las distribuyen.

Para poner en claro esto en el cuadro VI se presenta la actividad de  $\beta$ -galactosidasa Maxilat 5000 la cual viene en estado líquido. En este cuadro se muestra la actividad a 35°C, 100 ug/ml obteniéndose con esta concentración de enzima a 10 minutos el porcentaje deseado de hidrólisis (70-80%).

En el cuadro VII se muestra la hidrólisis de leche Alpura a 35°C, 100 ug/ml y se puede observar que 10 minutos es un tiempo suficiente para obtener el porcentaje de hidrólisis de deseado.

Con los resultados anteriores, la cantidad de enzima utilizada (100 ug/ml) se redujo 6.5 veces que con el primer lote (750 ug/ml), esto es un ahorro en cuanto al costo de la enzima, pero dado que México no tiene disponible ésta se tendrá que utilizar la enzima que en esos momentos se venda y tendremos que recurrir a estandarizar la enzima como se indica en los cuadros VI y VII.

CUADRO VI

ACCION DE LA B-GALACTOSIDASA M-5000  
 SOBRE LACTOSA EN FUNCION DEL TIEMPO

TIEMPO DE REACCION	$\frac{\text{ug LACTOSA}}{\text{mg ENZIMA}} = \text{U.L.}$	% hidrolisis
10 MIN	8686	78.2
30 MIN	9068	73.3
1 HR	9652	78.0

Temperatura = 35°C

(S) = Lactosa 0.06 M

Regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.0

E =  $\beta$ -Galactosidasa, K. lactis (liquida)

U.L. = mg lactosa consumida/mg enzima en un tiempo

(E) = 100 ug/ml

Volumen de muestra = 50 ml

CUADRO VII

HIDROLISIS DE LECHE \* E  
INACTIUACION ENZIMATICA

35°C, (E) = 100 ug/ml

TIEMPO DE REACCION	ug lactosa	% hidrolisis
10 MIN	9054	80.0
30 MIN	9255	81.5
1 HR	9774	86.0

TIEMPO DE REACCION	TIEMPO DE REPOSO <sup>+</sup>			
	10 HR 3 MIN Δ		10 HR EN FRIO (10°C)	
	ug lactosa	% hidrolisis	ug lactosa	% hidrolisis
10 MIN	9580	84.3	9719	85.0
30 MIN	9947	87.0	10034	88.3
1 HR	10150	89.4	10227	90.0

(E) = β-Galactosidasa, *K.lactis* (liquida) M-5000

\* = Leche pasteurizada (Alpura).

+ = despues de la hidrolisis.

Volumen de muestra = 200 ml

Tratando de buscar otro uso más de la leche deslactosada se realizó la obtención de un queso tipo "fresco" utilizando como enzima coagulante la hemisfericina, la cual proviene del jugo del fruto de Bromelia hemisphaerica, con esta enzima se trata de complementar al cuajo, el cual no es suficiente para la producción de quesos. La concentración de hemisfericina fué de 75 ug/ml, ya que es la concentración a la cual se tiene menor actividad proteolítica y las mayores unidades de coagulación.

En el cuadro VIII se presenta el análisis bromatológico del queso tipo "fresco" obtenido con hemisfericina comparado con un queso obtenido con cuajo comercial, utilizado como testigo y un queso comercial tipo Panela.

El queso tipo "fresco" presentó una vida de anaquel de aproximadamente 15 días. Este tipo de queso tiene un elevado contenido acuoso, por lo que no se conserva durante mucho tiempo (aproximadamente entre 10-15 días a 10°C).

La vida de anaquel se siguió mediante el análisis de actividad proteolítica y aminoácidos libres solubles los cuales se muestran en el cuadro IX, se observa que estos van aumentando conforme pasa el tiempo, lo cual es un indicio de la actividad proteolítica residual para el caso de la hemisfericina, no así en el caso del cuajo cuya actividad proteolítica es muy baja, de ahí los valores de cero.

Con respecto a las características de textura adecuada y sabor excelente del queso elaborado con hemisfericina, estas se mantuvieron sin diferencia con respecto al queso hecho con cuajo durante los primeros días de almacenamiento en refrigeración, posteriormente (21 días) aparecieron sabores amargos y la textura se volvió más blanda. Según Green (11) indica que la aparición de estos sabores se deben a la presencia de determinados péptidos y aminoácidos libres, resultado de la acción proteolítica residual que generalmente poseen los sustitutos de cuajo.

Las pruebas de tipo sensorial y de textura fueron empíricas, por lo que para poder realizar una evaluación de este tipo se tendrían que preparar lotes grandes de queso para llevarla a cabo.

CUADRO VIII

ANALISIS BROMATOLOGICO  
 QUESO TIPO "FRESCO"

DETERMINACION	QUESOS A PARTIR DE LECHE DESLACTOSADA		
	CUAJO TESTIGO	HEMISTERICINA	PANELA COMERCIAL
HUMEDAD (%)	55.7	56.0	58.0
CENIZAS (%)	4.0	4.6	3.8
PROTEINA (%)	16.3	16.9	20.0
GRASA (%)	24.0	22.5	20.0
LACTOSA (%)	0.74	0.76	24.8
Rendimiento (%)	16.8	16.0	-

\* promedio de 3 repeticiones.

CUADRO IX

ANALISIS DE QUESO TIPO "FRESCO"

ACTIVIDAD PROTEOLITICA

Cas 1%, 35°C, regulador de fosfatos pH 7.0

ALMACENAMIENTO	ug Tir mg/min	
	CUAJO	HEMISFERICINA
1a. SEMANA	0	6811
2a. SEMANA	0	7296
3a. SEMANA	0	7339

AMINOACIDOS LIBRES SOLUBLES

ALMACENAMIENTO	ug Tir mg/min	
	CUAJO	HEMISFERICINA
1a. SEMANA	0	171
2a. SEMANA	0	406
3a. SEMANA	0	414

## **V. CONCLUSIONES**

1.- Las condiciones que se encontraron para alcanzar de un 70-80% de hidrólisis de lactosa en el primer lote de enzima son: temperatura de 45°C, 6hr de hidrólisis, 750 ug/ml de  $\beta$ -galactosidasa de Kluyveromices lactis Maxilat 2000 (sólida).

2.- Las condiciones para el segundo lote de enzima son: temperatura de 35°C, 10 minutos de hidrólisis, 100 ug/ml de  $\beta$ -galactosidasa de Kluyveromices lactis Maxilat 5000 (líquida).

3.- En el proceso de deslactosado en leche se utilizaron 2 procesos para detener la hidrólisis: enfriamiento (10°C) y calentamiento a ebullición por 3 minutos. Ambos métodos fueron eficientes para obtener de un 70-80% de hidrólisis de lactosa.

4.- Las condiciones de hidrólisis entre 70-80% no se cumplen para todas las marcas de leche ya que cada tipo tiene diferente origen por lo que si las condiciones no se ajustan a una determinada leche, se tendrán que buscar éstas.

5.- Para la elaboración del queso tipo fresco se utilizó la enzima proteinasa de origen vegetal "hemisfericina", en una concentración de 75 ug/ml, la cual es la concentración con la menor actividad proteolítica.

6.- Las características de textura y sabor del queso tipo fresco no se alteraron durante los primeros 15 días de almacenamiento, después de este tiempo (21 días) se detectó la presencia de aminoácidos libres, así como sabor amargo y reblandecimiento.

7.- A partir de leche deslactosada y la enzima proteolítica hemisfericina se puede elaborar queso tipo fresco.

8.- El porciento de hidrólisis obtenido fue de 70-80% ya que esto es más que suficiente para que la leche pueda ser ingerida por un intolerante a la lactosa sin que tenga consecuencias.

NO SE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## **VI. BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Alais, Charles (1986). Ciencia de la leche, Principios de técnica lechera. Editorial C.E.C.S.A. México.
- 2.- A.O.A.C (1975). Official Methods of Analysis. Editorial Association of Analytical Chemists. Washington D.C., U.S.A.
- 3.- Ayres, Gilbert (1970). Análisis químico cuantitativo. Editorial Haría. México.
- 4.- Badui, Salvador (1986). Química de los Alimentos. Editorial Alhambra. México.
- 5.- Bernal, V. and Pavel J. (1985). Lactose hydrolysis by Kluyveromices lactis  $\beta$ -galactosidase in skim milk, whey, permeate and model systems. J. Inst. Can. Sci. Tech. Aliment. 18: 97-99.
- 6.- Birch, G.C. (1981). Enzyme and Food Processing. Editorial Applied Ciencia Publishers L.T.D. London.
- 7.- Brown, K.; Khatun, M.; Parry, L.; Ahmed, G. (1980) Nutritional consequences of low dose milk supplements consumed by lactose-malabsorbing children. American J. of Clinical Nutrition 33: 1054-1063.
- 8.- Espinoza, M.T.; Rosado, J.; Gálvez, M.A. (1986). Factores que afectan la hidrólisis de lactosa, Estudio in vivo e in vitro. Tecnol. Alim. 21: 3-11.
- 9.- Garduño, R.; Soriano, M.; Chávez, E.; Cruz, M.T.; Del Castillo, L.M.; Castañeda, M. (1974). Proteinases de plantas mexicanas II. Puntos isoelectrónicos y caracterización de formas moleculares múltiples en enzimas de bromeliáceas. Rev. Latinoamericana Quím. 5: 243-248.
- 10.- Gekas, V. and Lopez-Leiva, M. (1985). Hydrolysis of lactose: a literature review. Process Biochemistry 20: 2-12.
- 11.- Green, M.L. (1977). Review of the progress of dairy science milk coagulant. J. of Dairy Sci. 44: 159-188.
- 12.- Holsinger, V.N. and Kingerman, A.E. (1991). Applications of lactase in Dairy Foods and other foods containing lactose. Food Technology January: 92.
- 13.- Houts, Sandra. (1988). Lactose intolerance. Food Technology March: 110-113.
- 14.- Jarret, N.D. (1982). A simple method for estimating free aminoacids in Cheddar cheese. The Australian J. of Dairy Technology June: 55-58.

- 15.- Kosikowski, Frank (1988) Dairy foods research papers. J Dairy Sci. 71: 557-573.
- 16.- Kretchmer, N. and Sunshine, P. (1967). Intestinal Disaccharidase deficiency in the sea lion. Gastroenterology 53: 123-129.
- 17.- Kretchmer, N. (1972). Lactose and lactase. Scientific American 227 (4): 71-78.
- 18.- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor II, General properties. J. Gen. Physiol. 30: 291.
- 19.- Lisker, R. (1981). Deficiencia de lactasa: frecuencia, modo de herencia e implicaciones prácticas. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Junio Vol. XXXI # 2: 223-234.
- 20.- Lira, Yolanda. Aplicación de la hemisfericina como enzima coagulante en la elaboración de queso. Tesis Licenciatura E.N.C.B.-I.P.N.
- 21.- Meyer, Marco (1987). Manuales para industria agropecuaria, Elaboración de productos lácteos. Ed. Trillas Vol 32. México.
- 22.- Nickerson, T.A. (1975). Colorimetric estimation of lactose and its hydrolytic products. J. Dairy Sci. 59: 386-389.
- 23.- Ortega, D.M.L. and Del Castillo, L.M. (1966). Actividad en la mexicaína en presencia de altas concentraciones de urea. Ciencia Vol. 24: 247. México.
- 24.- Ramos Cordova, Mario (1976). Manual de métodos de análisis de leche y lactcinios. México.
- 25.- Reed, G. (1975). Lactase. In "enzymes in food processing". Ed Academic Press, Inc. New York.
- 26.- Richmond, M.L. and Gray, J.L. (1981).  $\beta$ -Galactosidase: Review of recent research related to technology application, nutritional concerns and immobilization. J. Dairy Sci. 64: 1759.
- 27.- Rosado, Jorge (1985). Análisis de hidrógeno espirado como índice de absorción de carbohidratos. Rev. Invest. Clín. (Méx.) 37: 261-270.
- 28.- Rosado, J.; Lindsay, H.A. and Solomons, N. (1987) Milk consumption symptom response and lactose digestion in milk intolerance. Am. J. Clin. Nutr. 45: 1457-1460.

- 29.- Rosado, J; Morales, M. and Pasquetti, A. (1989). Lactose digestion and clinical tolerance to milk, lactose prehydrolysed milk and enzyme-added milk: A study in undernourished continuously enteral-fed patients. *J. of Parenteral and enteral nutrition* 13: 157-160.
- 30.- Rosado, J.; Solomons, N. and Lisker, R. (1984). Enzyme replacement therapy for primary adult lactase deficiency. *Gastroenterology* 87: 1072-1082.
- 31.- Rosado, J.; Solomons, N. and Pineda, O. (1985). Hidrólisis in vivo de lactosa por  $\beta$ -galactosidasa de origen microbiano: Cinética de Actividad. *Tecnol. Alim.* 20: 5-10.
- 32.- Santiago López, Irma (1989). Distribución de la  $\beta$ -galactosidasa y de la lisozima durante el desarrollo de los frutos de papaya (*Carica papaya*) y de cuagayote (*Pileus mexicanus*). Tesis Licenciatura. E.N.C.B.-I.P.N.
- 33.- Shukla, P.T. (1975).  $\beta$ -Galactosidase technology a solution to the lactose problems. *Critical reviews in Food Technology* 5: 325.
- 34.- Vara, V.R. and Briones, H.R. (1988). Queso fresco elaborado con jugo del fruto de *Bromelia hemiphaerica*. VII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica T:093: 126.
- 35.- Whitaker, J.R. (1959). Properties of the milk clotting activity of ficin. *Food Tech.* 13:
- 36.- Woodruff, Calvin (1978). Conocimientos actuales en nutrición. Instituto de Nutrición de Centro America y Panama (INCAP), Guatemala. Cap. 47: 480-489.
- 37.- Woteki, C.; Weser, E.; Young, E. (1976). Lactose malabsorption in Mexican-American children. *American J. of Clinical Nutrition* 29: 19-24.
- 38.- Woteki, C.; Weser, E.; Young, E. (1977). Lactose malabsorption in Mexican-American adults. *American J. of Clinical Nutrition* 30: 470-475.
- 39.- Woychik, J.H. and Holsinger, V.H. (1977). Use of lactase in the manufacture of dairy products. *Enzymes in food beverage.* Processing American Chemical Society: 67-79.
- 40.- Yeh Ceballos, Martha (1991). Caracterización y aplicación de la enzima proteolítica del látex de la chaya (*Cnidioscolus chayamansa*). Tesis Maestría E.N.C.B.-I.P.N.

## **VII. ANEXOS**

## ANEXO Ia

## ANALISIS DE COMPOSICION DE LECHE

DETERMINACION	LECHES		
	SUELTE <sup>†</sup>	NUTRICAL <sup>†</sup>	NUEVA <sup>†</sup> ZELANDA
HUMEDAD	4.0	4.4	5.0
CENIZAS	7.8	7.5	7.8
PROTEINA	35.3	34.0	34.5
GRASA	1.0	0.2	0.1
LACTOSA	51.7	53.9	53.1

† = Leche descremada en polvo

## ANEXO 1b

## ANALISIS DE COMPOSICION DE LECHE

DETERMINACION	LECHES						
	ALPURA <sup>#</sup> 2888	UNION <sup>#</sup>	ALPURA <sup>\$</sup>	BOREAL <sup>\$</sup>	LALA <sup>\$</sup>	CAMPINA <sup>#</sup>	MILKCHE <sup>#</sup>
HUMEDAD	98.8	89.1	87.3	86.8	88.8	90.5	89.8
CENIZAS	0.4	0.6	0.6	0.5	0.5	1.2	1.3
PROTEINA	2.2	2.7	2.4	2.5	2.5	2.1	2.0
GRASA	2.8	2.8	3.3	3.3	3.3	0.0	3.0
LACTOSA	4.5	4.5	4.2	5.1	4.0	5.1	3.7
SOLIDOS TOTALES	9.9	10.6	10.5	11.4	10.3	8.4	10.0

\* = Leche UHT

\$ = Leche pasteurizada

# = Leche concentrada