



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD
UNIDAD IZTAPALAPA**

**SEPARACION DE LAS PROTEASAS CONTAMINANTES
DE UN PREPARADO COMERCIAL DE LACTASA Y SU
INFLUENCIA EN LA ELABORACION DEL YOGURT**



**COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

P R E S E N T A :

MARIA EUGENIA AGUILAR ALVAREZ

H. MIEMBROS DEL JURADO

DRA. AMELIA FARRES GONZALEZ S. (PRESIDENTE)

M.C. MARIANO GARCIA GARIBAY (SECRETARIO)

M.C. LORENA GOMEZ RUIZ (VOCAL)

DRA. ISABEL GUERRERO LEGARRETA (VOCAL)

MEXICO, D. F. JUNIO 1995

222268

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de los M. en C. *Mariano García Garibay, Lorena Gómez Ruiz* y la Dra. *Isabel Guerrero Legarreta*.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Armando Aguilar y Luz Amparo Alvarez:

Con profundo amor y respeto ya que con sus consejos, paciencia y amor, han forjado en mí el deseo siempre de caminar hacia adelante.

A mis queridos hermanos Dolores de Jesús, Amparo de los Angeles y Armando Antonio:

Porque constituyen una parte invaluable de mi vida.

A mi abuelita Carlota:

Con amor dedico el presente trabajo

A mis maestros Mariano García Garibay y Lorena Gómez Ruiz:

Mi sincero agradecimiento por su valioso e incondicional apoyo en la realización de este trabajo y lo más importante por distinguirme con su amistad.

A mi querida maestra y amiga Isabel Guerrero Legarreta:

Con gran respeto y admiración por toda esa vitalidad que me ha motivado para seguir adelante.

A la M.C. Obdulia González Robles

Por su apoyo incondicional durante la realización del análisis estadístico.

A los H. Miembros del Jurado:

Dra. Amelia Farrés González Saravia

M.C. Mariano García Garibay

M.C. Lorena Gómez Ruiz

Dra. Isabel Guerrero Legarreta

Mi agradecimiento por su comprensión y valiosas aportaciones

A mis queridas amigas Pati y Lulú:

Con mucho cariño dedico el presente trabajo.

A los Ingenieros: Mario Contreras Carranza, Guadalupe Rodríguez Valenzuela, Emilio Roacho Santillana, Alejandro Aguilar Esparza y Oscar Rivera Olivas

Mi agradecimiento por todo el apoyo y confianza brindada.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	2
2. OBJETIVOS	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 YOGURT	4
3.2 YOGURT CON BAJO CONTENIDO DE LACTOSA	5
3.3 MICROORGANISMOS INICIADORES DEL YOGURT	8
3.4 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS	9
3.4.1 Formación de los compuestos responsables del sabor y aroma	10
3.4.2 Vías metabólicas de la síntesis de acetaldehído	10
3.5 METABOLISMO PROTEICO	10
3.6 LACTASA	12
3.7 PRESENCIA DE CONTAMINANTES EN LAS PREPARACIONES COMERCIALES DE LACTASA DISPONIBLES EN EL MERCADO	15
3.8 EFECTO DE LA HIDROLISIS DE LA LACTOSA EN LA LECHE DESTINADA A LA ELABORACION DE YOGURT Y OTROS PRODUCTOS	16
4. MATERIALES Y METODOS	18
4.1 SEPARACION DE LAS PROTEASAS PRESENTES EN EL MAXILACT® LX-5000	18
4.2 INACTIVACION TERMICA DE LA LACTASA Y PROTEASAS PRESENTES EN EL MAXILACT® LX-5000	20
4.3 PERFIL DE TEMPERATURA DE LA LACTASA Y PROTEASAS DEL MAXILACT® LX-5000	20

	Pág.
4.4 OBTENCION DE LA ENZIMA β-GALACTOSIDASA PARCIALMENTE PURIFICADA	21
4.5 EFECTO DE LAS PROTEASAS CONTAMINANTES EN LA ELABORACION DEL YOGURT	21
4.6 METODOS ANALITICOS	23
4.7 ANALISIS ESTADISTICO	24
5. RESULTADOS Y DISCUSION	25
5.1 SEPARACION DE LAS PROTEASAS Y DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR	25
5.1.1 Filtración en gel	25
5.1.2 Cromatografía de intercambio iónico	25
5.1.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida	25
5.1.4 Determinación del peso molecular mediante espectrofotometria de masas por electro-aspersión (ESMS)	31
5.2 INACTIVACION TERMICA DE LA LACTASA Y PROTEASAS PRESENTES EN EL MAXILACT® LX-5000	37
5.3 PERFIL DE TEMPERATURA DE LA LACTASA Y PROTEASAS, Y ESTIMACION DE LA ENERGIA DE ACTIVACION	42
5.4 EFECTO DE LAS PROTEASAS CONTAMINANTES PRESENTES EN EL MAXILACT® LX-5000 EN LA ELABORACION DEL YOGURT EMPLEANDO LECHE LACTOSA HIDROLIZADA	48
5.5 EFECTO DEL GRADO DE HIDROLISIS DE LA LACTOSA DE LA LECHE EN LA ELABORACION DEL YOGURT	51
6. CONCLUSIONES	56
7. RECOMENDACIONES	58
8. BIBLIOGRAFIA	60

RELACION DE TABLAS

TABLA 1. Relación de algunos tipos de yogurt y productos similares en el medio Oriente y otras zonas.

TABLA 2. Posibles orígenes del acetaldehído producido por *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

TABLA 3. Lactasas comerciales de levadura.

TABLA 4. Pesos moleculares de los componentes del Maxilact® LX-5000 obtenidos mediante ESMS.

TABLA 5. Determinación del peso molecular de la β -galactosidasa parcialmente purificada por ESMS.

TABLA 6. Determinación del peso molecular de las proteasas parcialmente purificadas por ESMS.

TABLA 7. Curvas estimadas para la determinación del efecto de la temperatura en la velocidad de reacción de la lactasa.

TABLA 8. Curvas estimadas para la determinación del efecto de la temperatura en la velocidad de reacción de las proteasas.

TABLA 9. Energías de activación de reacción y de desnaturalización estimadas para la lactasa y proteasas presentes en el Maxilact® LX-5000.

TABLA 10. Valores promedio y desviaciones estándar calculados para cada una de las variables medidas en los yogures preparados bajo diferentes tratamientos.

TABLA 11. Modelos ajustados obtenidos para las variables acidez y pH de las cinéticas de fermentación bajo las diferentes condiciones de hidrólisis.

RELACION DE FIGURAS

FIGURA 1. Procedimiento para la elaboración del yogurt.

FIGURA 2. Separación de las proteasas contaminantes del Maxilac® LX-5000 y determinación del peso molecular por filtración en gel en Aca34.

FIGURA 3. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-SEPHAROSA CL6B del Maxilact® LX-5000.

FIGURA 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS.

FIGURA 5. Espectro de masa obtenido mediante ESMS del Maxilact® LX-5000.

FIGURA 6. Espectro de masa obtenido mediante ESMS de la β -galactosidasa parcialmente purificada.

FIGURA 7. Espectro de masa obtenido mediante ESMS de las proteasas parcialmente purificadas.

FIGURA 8. Efecto de la temperatura en la velocidad de desnaturalización de la lactasa.

FIGURA 9. Efecto de la temperatura en la velocidad de desnaturalización de las proteasas.

FIGURA 10. Perfil de temperatura de actividad de la lactasa a pH 6.6.

FIGURA 11. Perfil de temperatura de actividad de las proteasas contaminantes del Maxilac® LX-5000 a pH 7.0.

FIGURA 12. Grafica de Arrhenius para la lactasa y proteasas: Energía de activación de la reacción.

FIGURA 13. Gráfica de Arrhenius para la lactasa y proteasas: Energía de activación de desnaturalización.

FIGURA 14. Desarrollo de acidez y pH durante la fermentación de yogurt bajo diferentes condiciones de hidrólisis.

FIGURA 15. Desarrollo de acidez y pH durante la fermentación de yogurt considerando el 70% de hidrólisis.

RESUMEN

La aplicación de la lactasa en la industria de lácteos se ha intensificado en los últimos años. Existen diferentes fuentes de obtención a nivel comercial. Las lactasas de levaduras son las más utilizadas debido a su pH y temperatura de trabajo, estas enzimas son intracelulares y para su obtención requieren primeramente que la célula sea lisada. Su grado de pureza resulta ser muy importante para evitar la presencia de contaminantes cuyos efectos en el producto sean diversos; los contaminantes de importancia particular son las proteasas las cuales si son introducidas a la leche puede causar en casos extremos la coagulación de la misma y la generación de sabores amargos.

De los preparados comerciales disponibles en el mercado, el de mayor pureza, es el Maxilact® LX-5000. En el presente trabajo se le detectó actividad proteolítica contaminante de 0.28 UE/ml.

Se realizó la separación de las proteasas contaminantes del Maxilact® LX-5000, empleando las técnicas de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico. También se propuso como alternativa para la eliminación de la actividad proteolítica contaminante la muerte térmica de las enzimas.

Se determinó el peso molecular tanto de las proteasas contaminantes como de la lactasa, mediante filtración en gel, electroforesis-SDS y espectrofotometría de masas por electro aspersión.

El peso molecular para lactasa fue de 175000 Da y el de las proteasas de 59000 y 11000 Da, respectivamente. Se encontró que la lactasa es una enzima constituida por diferentes subunidades.

Se determinó la energía de activación y temperaturas de actividad óptima para lactasa y actividad proteolítica en el preparado comercial.

Se estudió el efecto del Maxilact® LX-5000 en la elaboración del yogurt, encontrándose, que los yogures con lactosa hidrolizada presentan menor velocidad de producción de ácido láctico que aquellos en donde no se hidroliza previamente la leche y además, que el porcentaje de hidrólisis y la presencia de los mosacáridos resultantes de la hidrólisis afectan el metabolismo de los microorganismos, dando como resultado yogures con una cantidad menor de ácido láctico.

1. INTRODUCCION

El potencial de aplicación de la β -galactosidasa ha sido de gran interés en la industria láctea por los beneficios que de ella pueden obtenerse (Holsinger y Kligerman, 1991; García-Garibay, 1992). En los diferentes estudios realizados sobre productos lácteos con bajo contenido de lactosa se han empleado preparados enzimáticos comerciales obtenidos a partir de hongos y levaduras, en donde el grado de pureza es variable pudiendo influir en las características del producto final. Los autores no consideran en sus conclusiones la probable presencia de actividades contaminantes cuyos efectos pueden ser diversos.

En diferentes investigaciones se concluye que los efectos favorables de la hidrólisis de la lactosa presente en la leche previa a la elaboración de productos lácteos fermentados, son debidos a la estimulación de los microorganismos iniciadores por parte de la glucosa liberada durante la hidrólisis de la lactosa, y la disponibilidad de azúcares más fácilmente digeribles.

Reportes recientes sobre el metabolismo de las bacterias lácticas participantes en la fermentación del yogurt, coinciden en que existe mayor preferencia por la lactosa, y que los microorganismos carecen de un transporte específico para los monosacáridos liberados durante la hidrólisis de la lactosa en el medio, inclusive, que estos pueden tener un efecto inhibitorio en el transporte de la lactosa y en la síntesis de la β -galactosidasa intracelular (Zourari y col. 1992). Esto conduce a replantear la razón del efecto de la hidrólisis de la lactosa de la leche destinada a la elaboración de yogurt.

Si en la lactasa utilizada durante la hidrólisis están presentes contaminantes tales como proteasas, con actividad suficientemente alta, entonces éstas podrían estar iniciando la hidrólisis de la caseína de la leche y la consecuente liberación de aminoácidos, importantes en el desarrollo de los microorganismos iniciadores y con ello, una posible estimulación de los mismos reflejada en una mayor producción de ácido láctico, compuestos del sabor y la obtención de yogurt con características sensoriales aceptables. Por otra parte, si la lactasa comercial más pura disponible en el mercado (Maxilact® LX-5000) presenta actividad proteolítica contaminante el determinar si la actividad presente es suficientemente alta como para conducir a cambios en la producción y calidad del producto final, resulta ser importante.

Dado que la información referente a la β -galactosidasa producida por *K. lactis* es limitada, se plantea determinar algunas de sus características moleculares y su estabilidad térmica, esta última como una alternativa para eliminar selectivamente la actividad proteolítica contaminante.

2. OBJETIVOS

-Separar la lactasa y proteasas presentes en el preparado comercial Maxilact® LX-5000 y determinar su peso molecular.

-Establecer el perfil de temperatura de las actividades enzimáticas proteolítica y de lactasa y la inactivación térmica de ambas enzimas presentes en el Maxilact® LX-5000.

-Determinar el efecto del Maxilact® LX-5000 en el crecimiento de los microorganismos iniciadores y la producción de metabolitos relevantes durante la elaboración del yogurt y su repercusión en la calidad del producto final.

3. ANTECEDENTES

3.1 YOGURT

El yogurt es un producto lácteo fermentado obtenido a partir del crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* spp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en leche tibia, y se caracteriza por una textura suave y delicada con un característico sabor nogal (Kroger, 1976; Kosikowski, 1977; Tamime y Deeth, 1980; Garcia-Garibay 1986; Kroger, 1989; Tamime y Robinson, 1991). Es un alimento posiblemente originario de la región de los Balcanes y de los países del Oriente Medio. Desde tiempos muy remotos ha sido ampliamente consumido, y aunque la evolución del proceso de fermentación ha sido estrictamente intuitiva, su producción constituyó una alternativa en la conservación de la leche (Tamime y Robinson, 1991). A pesar de la proximidad entre Europa y Oriente Medio, la popularidad del yogurt no se extendió y la industria del yogurt no alcanzó un importante desarrollo hasta 1960, siendo consecuencia principalmente de la introducción del yogurt con sabor a frutas o azucarado. Desde entonces la popularidad del yogurt se ha extendido a otras partes del mundo y su consumo ha aumentado notablemente, el cual puede ser atribuido entre otros factores a la continua investigación y desarrollo tecnológicos realizados para lograr innovaciones en los productos a base de yogurt, lo que condujo a un importante aumento de su aceptabilidad.

En México el consumo de yogurt en 1980 fue de 15 mil toneladas, lo que representa el 8% del total de derivados lácteos producidos en nuestro país; en 1985 el consumo de este producto fue de 32 mil toneladas representando el 13% de los derivados lácteos producidos. Las proyecciones para 1986 y 1990 eran de 36 mil y de 49 mil toneladas (Garcia-Garibay, 1986) respectivamente, lo cual era indicativo de un mercado creciente, hoy en día el yogurt es aceptado ampliamente .

El vocablo yogurt se deriva del término turco "Jugurt", el cual ha presentado, a lo largo de los años numerosas variantes (Tabla 1).

Existen diferentes tipos de yogurt que varían en función de la composición química (contenido de grasa: total, medio y bajo), método de producción (yogurt rígido - tradicional-, batido y líquido), de acuerdo al sabor (natural, de frutas, aromatizados y con saborizantes artificiales), de acuerdo al proceso de post-incubación (pasteurización/UHT, concentrado, congelado, bajo contenido de lactosa, etc.) (Robinson y Tamime, 1975; Tamime y Deeth; 1980, Garcia-Garibay, 1986). En la Figura 1 se esquematizan las etapas del proceso para la elaboración de los diferentes tipos de yogurt.

3.2 YOGURT CON BAJO CONTENIDO DE LACTOSA

Este tipo de yogurt es elaborado utilizando leche previamente tratada con lactasa o bien por adición simultánea de la enzima y cultivos iniciadores.

Aun cuando el contenido de lactosa del yogurt puede variar con la concentración de sólidos no grasos, en la mayoría de yogures el contenido de sólidos de la leche es relativamente alto y cantidades considerables de lactosa permanecen en el producto después de la fermentación (Smith y Bradley, 1984).

La hidrólisis de la lactosa permite conferirle al yogurt un sabor más dulce, sin aumentar su contenido calórico, lo convierte en un producto de mayor digestibilidad y con características sensoriales aceptables por el consumidor, en virtud del mayor poder edulcorante de los monosacáridos resultantes de la hidrólisis (Engel, 1973).

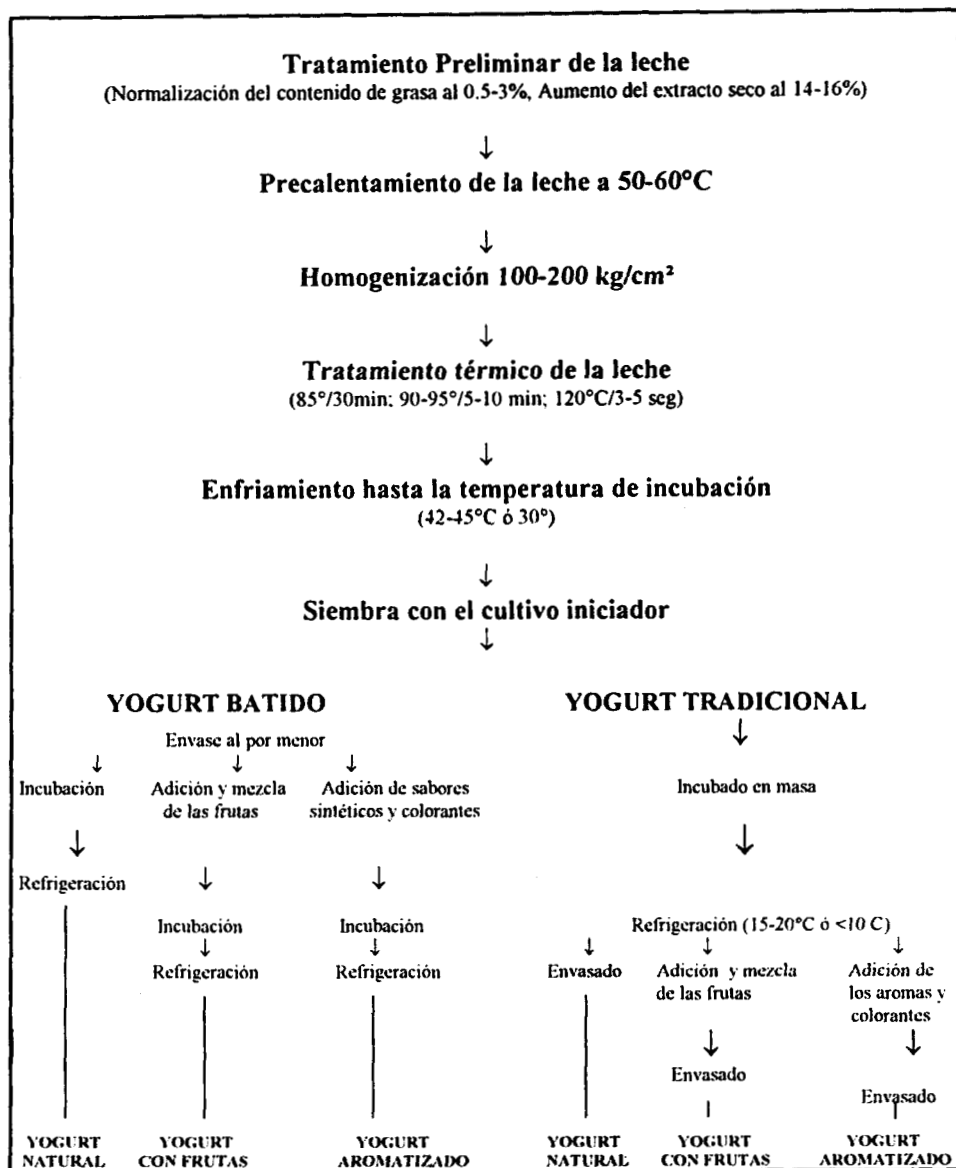
La adición de lactasa a la leche previa a la elaboración del yogurt puede incrementar su costo, no obstante ha sido demostrado que incrementa su poder edulcorante y la cantidad de azúcar y frutas puede ser reducidas, lo que contribuye a equilibrar costos (Gyuricksek y Thompson, 1976; O'Leary y Woychik, 1976b; Smith y Bradley, 1984).

TABLA 1

Relación de algunos tipos de yogurt y productos similares de Oriente Medio y otras zonas.

DENOMINACION TRADICIONAL	ORIGEN
Jugurt/Eyrab/Ayran	Turquía
Busa	Turquestán
Kissel Mleka	Balcanes
Urgotnic	Los Balcanes
Leban/Laban	Libano y algunos países Arabes
Zabady	Egipto y Sudán
Mast/Dough	Irán y Afganistán
Roba	Iraq
Dahi/Dadhi/Dahee	India
Mazun/Natziib/Matsun/Matsoni	Armenia
Katyk	Transcaucasia
Tiaourti	Grecia
Cieddy	Italia
Mezzoradu	Sicilia
Gioddu	Cerdeña
Tarho	Hungria
Fiili	Finlandia
Filmjolk/Fillbunke/Filbunk/Surmelk/ Taettemjolk/Tettemelk	Escandinavia
Iogurte	Brasil y Portugal
Skyr	Islandia
Gruzovina	Yugoslavia
Donskaya/Varenetes/Kurunga/Ryzhenka /Guslyanka	Rusia
Tarag	Mongolia
Shosim/Sho/Thara	Nepal
Yoghurt/Yogurt/Yogur/Yaort/Yourt/ Yaourti/Yahourth/Yaghourt	Resto del mundo (La "Y:"es sustituida por la "J"en algunos países).

Tamime y Deeth (1980).



Tamime y Robinson, 1991.

FIGURA 1. Procedimiento para la elaboración del yogurt.

3.3 MICROORGANISMOS INICIADORES DEL YOGURT

En la elaboración del yogurt, la leche sufre distintos cambios fisicoquímicos debido a las condiciones de procesamiento y por la actividad de las bacterias lácticas iniciadoras (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*). Las reacciones bioquímicas de estos microorganismos en la leche son fundamentales para conferir al yogurt sus características finales, ya que sus ciclos vitales se mantienen mediante un gran número de rutas metabólicas complejas (Tamime y Deeth, 1980; Marshall, 1987; Zourari y col., 1992).

El papel de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* en la manufactura del yogurt puede resumirse en tres aspectos principales:

- 1) La acidificación de la leche, mediante la producción de ácido láctico a partir de la lactosa, proporcionándole al yogurt su sabor ácido característico y desestabilizando las micelas de caseína al alcanzar un pH cercano a su punto isoelectrico y mediante el paso de calcio y fósforo del estado coloidal a una forma soluble.
- 2) La síntesis de compuestos que contribuyen al sabor y aroma, dentro de los cuales se encuentra principalmente el acetaldehído, acetona y diacetilo.
- 3) El desarrollo de la textura y viscosidad como consecuencia de la precipitación de proteínas.

S. thermophilus es una bacteria gram positiva esférica, se observa en pares o en cadenas; es homofermentativa y produce ácido L-(+)-láctico a partir de glucosa, fructosa, lactosa o sacarosa. Se caracteriza por su termorresistencia, presenta una temperatura óptima de 40 a 45°C, aun cuando puede crecer a temperaturas entre 50-52°C (García-Garibay, 1986; Zourari y col., 1992).

L. delbrueckii ssp. *bulgaricus* es un bacilo homofermentativo gram positivo, largo, no móvil; produce ácido D-(-)-láctico. Es capaz de fermentar fructosa, glucosa y lactosa, y algunas veces galactosa y manosa, pero no así maltosa y sacarosa. Puede crecer a temperaturas superiores a 45°C, pero tiene su óptimo entre 40 y 43°C; no es capaz de crecer a temperaturas menores de 15°C. Tiene la capacidad de crecer a pH inferiores a 5.0, y presenta metabolismo fermentativo aun en presencia de aire (García-Garibay, 1986; Zourari y col., 1992).

3.4 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

El catabolismo de la lactosa, en *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, se realiza en el interior de la célula, por lo que ambos microorganismos requieren de algún tipo de transporte para poder utilizarla y además la enzima capaz de hidrolizarla.

S. thermophilus posee un sistema de lactosa-permeasa, incluyendo una permeasa protón dependiente localizada en la membrana, en el que la galactosa parece estar involucrada directamente en el transporte de la lactosa. Una gran cantidad de galactosa en el medio inhibe el transporte de lactosa (Vedamuthu, 1978; Zourari y col., 1992).

Los estudios bioquímicos han demostrado que la galactosa tiene una considerable afinidad por la lactosa permeasa, en donde actúa como un inhibidor competitivo del transporte del disacárido. En vesículas de membrana de *E. coli* la permeasa *lacS* no solamente cataliza la fuerza motriz de los protones unida al sistema de transporte de la lactasa, sino que también intercambia β -galactósidos, lo que significa que la reacción de transporte procede como un antipuerto independiente de la fuerza motriz de protones.

La galactosa requiere una fuente exógena de energía e involucra la acción de una permeasa galactosa. En *S. thermophilus* no se ha detectado un sistema de transporte semejante al sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpirúvico (PEP-PTS) y además el transporte de la galactosa y glucosa es más lento que el de la lactosa en virtud de las limitaciones en el transporte de éstos monosacáridos (Zourari y col., 1992).

Tanto *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* como la mayoría de las cepas de *S. thermophilus* utilizan solamente la glucosa liberada por la β -galactosidasa intracelular y liberan la galactosa en el medio de crecimiento.

L. delbrueckii ssp. *bulgaricus* realiza el transporte de la lactosa y galactosa mediante un sistema de permeasas y el de la glucosa mediante un sistema de fosfotransferasas.

Recientemente se ha reportado (Zourari y col., 1992) que la galactosa intracelular es intercambiada con la lactosa, de manera semejante a la de *S. thermophilus* y que la presencia de glucosa en el medio reprime el transporte de lactosa y la síntesis de la β -galactosidasa.

En ambos microorganismos la glucosa liberada por la acción de la β -galactosidasa intracelular es metabolizada por la vía Embder Meyerhof Parnas. En el caso de la galactosa, es liberada al medio en la mayoría de cepas de *S. thermophilus*; en cepas con fenotipo Gal⁺ es utilizada por la vía Leloir. Hasta hoy, el uso de la galactosa por la vía de la tagatosa no ha sido reportado para *S. thermophilus* o *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Zourari y col., 1992).

3.4.1 Formación de los compuestos responsables del sabor y aroma

El sabor típico del yogurt es debido al ácido láctico y a varios compuestos carbonilos (acetaldehído, acetona y diacetilo), algunos compuestos volátiles y no volátiles, y diversos compuestos derivados de la degradación térmica de lípidos, lactosa y proteínas, durante el tratamiento térmico de la leche previo a la elaboración del yogurt (Tamime y Deeth, 1980). Aun cuando la importancia del acetaldehído, acetona y diacetilo en el sabor del yogurt es bien conocido, es difícil evaluar la contribución de otros compuestos volátiles, ya que la percepción sensorial varía considerablemente (Dumont y Adda, 1973).

3.4.2 Vías metabólicas de la síntesis del acetaldehído

La formación de acetaldehído y otros compuestos volátiles que contribuyen al aroma del yogurt por las bacterias lácticas tiene lugar durante la fermentación. Las concentraciones finales dependen de la presencia de enzimas específicas capaces de catalizar la formación de compuestos carbonilo a partir de diversos componentes de la leche. Los constituyentes importantes de la leche para la producción de acetaldehído en el yogurt son la lactosa (principalmente la glucosa liberada) y los aminoácidos treonina y metionina (Tamime y Robinson, 1991). La conversión de glucosa a acetaldehído es catalizada por la reacción de la aldehído deshidrogenasa tanto en *S. thermophilus* como en *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. En la Tabla 2 se resumen las posibles rutas metabólicas y reacciones iniciadas por *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* durante la formación del acetaldehído en el yogurt.

3.5 METABOLISMO PROTEICO

La actividad proteolítica de las bacterias lácticas del yogurt es baja (Dutta y col., 1971; citado en Tamime y Deeth, 1980; Zourari y col., 1992), no obstante, el grado de proteólisis es significativo durante la fermentación, lo que puede contribuir a los cambios en la estructura física del producto debido a la liberación de péptidos de diferentes tamaños y aminoácidos libres, y contribuye a la formación de compuestos del sabor y aroma (Tamime y Deeth, 1980).

S. thermophilus y *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producen proteasas y peptidasas, no obstante, existen diferencias importantes en cuanto a la actividad de éstas en ambos microorganismos. *S. thermophilus* presenta mayor actividad peptidasa pero actividad limitada de proteasas, mientras que *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* tiene la capacidad de hidrolizar caseína con mayor facilidad, lo que es indicativo de que posee una actividad proteolítica superior, importante para el desarrollo de *S. thermophilus* (Tamime y Deeth, 1980).

La actividad proteolítica de las bacterias lácticas está involucrada principalmente en la nutrición e interacción de las bacterias del yogurt, ya que éstas no pueden sintetizar aminoácidos esenciales. Ellas requieren de una fuente de nitrógeno exógena y por tanto utilizan los péptidos y proteínas del medio de crecimiento mediante la acción de un conjunto de enzimas (Zourari y col., 1992).

TABLA 2

Posibles orígenes del acetaldehído producido por *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

Constituyentes de la leche	Reacción que implica la formación de acetaldehído
Lactosa	Vía piruvato durante el ciclo glicolítico Vía acetil fosfato o piruvato Descarboxilación directa del piruvato
Aminoácido	Valina→acetaldehído + (posiblemente) alanina. Treonina→acetaldehído + glicina Escisión de la treonina en glicina y acetaldehído. Conversión de la metionina en treonina y de esta en acetaldehído +glicina
Acido nucleico	Timidina→ acetaldehído + gliceraldehído-3 fosfato

Tamime y Robinson, 1992.

3.6 LACTASA

La lactasa o β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) es una enzima que cataliza la hidrólisis de la lactosa dando como productos los monosacáridos D-glucosa y D-galactosa.

El uso de esta enzima ha abierto nuevas posibilidades en la industria láctea. Su potencial se ha establecido desde los años 50's (Reed y Pepler, 1973), no obstante fue hasta la década de los ochentas cuando su empleo se intensificó debido al desarrollo de los procesos comerciales y a sus diferentes aplicaciones (García-Garibay, 1992).

La lactasa se utiliza para producir leche libre de lactosa para personas con intolerancia a este disacárido (Houst, 1988); además, facilita la elaboración de productos lácteos edulcorados donde el disacárido constituye un problema en virtud que tiende a precipitarse debido a su baja solubilidad (García-Garibay, 1992). Así mismo, debido a que la lactosa hidrolizada tienen un mayor poder edulcorante, por los monosacáridos que la constituyen, su hidrólisis permite un ahorro en la cantidad de azúcar que deberá adicionarse a estos productos (Engel, 1973; Holsinger y Kligerman, 1991).

Otra aplicación de la lactasa es en el suero derivado de queserías, ya que es posible reducir su alto contenido de lactosa, la cual limita su utilización, permitiendo que el valor agregado de este subproducto se incremente. Esta enzima es utilizada también en la elaboración de algunos productos lácteos fermentados en los que se ha reportado una reducción considerable en el tiempo de fermentación y mayor producción de ácido láctico al utilizar leche con lactosa hidrolizada como materia prima (Thompson y Gyuricsek, 1974; Woodward y Kosikowski, 1975; O'Leary y Woychik, 1976a; Tamime, 1977; Marschke y Dulley, 1978; Weaver y Kroger, 1978; Dariani y col., 1982; Thakar y col. 1987).

La lactasa o β -galactosidasa ha sido aislada de diversas fuentes: bacterias, hongos, levaduras, plantas y animales. Para su utilización en la industria láctea, a nivel comercial, la enzima se extrae principalmente de hongos tales como *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, y levaduras como *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* y *Candida pseudotropicalis* (Vedamuthu, 1978; Nijpels, 1981; García-Garibay, 1992).

Las lactasas destinadas para la hidrólisis de la lactosa en la leche por las propiedades que presentan, principalmente su pH óptimo, son las de levaduras (Mahoney y col., 1975; Nijpels, 1981; Mahoney, 1985; Holsinger y Kligerman, 1991; García-Garibay, 1992). En la Tabla 3 se muestran las principales lactasas de levadura disponibles en el mercado mundial.

Las lactasas de levaduras son enzimas inducibles e intracelulares, en general son extraídas mediante la lisis de las células o bien mediante una ruptura parcial de la pared celular (permeabilización); en ambos casos es importante la purificación de la enzima de manera que no subsistan metabolitos contaminantes que afecten la calidad de los productos. Los contaminantes de importancia particular son las proteasas y la actividad de las enzimas de la glucólisis conocida como "actividad zimasa". En el primer caso, si son introducidas a la leche pueden dar origen a sabores amargos y en casos extremos a la coagulación del producto, y las zimastas podrían conducir a la fermentación de glucosa con la formación de alcohol (Marschke y Dulley, 1978; Mittal y col., 1991; García-Garibay, 1992).

La literatura científica sobre la aplicación y obtención de las lactasas es extensa, no obstante, se han realizado pocos estudios sobre los procesos de producción, purificación y caracterización de la enzima.

Existen algunos reportes referentes a la producción de lactasa a nivel laboratorio, en donde se establecen las condiciones de producción, más no de escalamiento, la selección de cepas hiperproductoras, las condiciones ambientales para la producción de la enzima (Mahoney y col., 1975), las condiciones de oxigenación (García-Garibay y col., 1987) y las características bioquímicas y funcionales de la enzima (Mahoney y Whitaker, 1977 y 1978; Dickson y col. 1979; Mahoney, 1980).

De las lactasas de levaduras del género *Kluyveromyces*, la de *Kluyveromyces fragilis* (en la actualidad *K. marxianus*) ha sido purificada y caracterizada (Uwajima y col. 1972; Mahoney y Whitaker, 1977 y 1978). El peso molecular encontrado para esta lactasa es de 201000 Da, con 9-10 subunidades presentes (Mahoney y Whitaker, 1978).

Dickson y col. (1979), realizaron estudios sobre la β -galactosidasa proveniente de *Kluyveromyces lactis*, ellos reportan un peso molecular de 135000 Da, sin la presencia aparente de subunidades.

Aun cuando pudiesen existir estudios más recientes y específicos sobre la estabilidad, propiedades bioquímicas y físicas de la enzima, la información está limitada posiblemente en virtud de que es una información confidencial por parte de las diferentes compañías que la producen (García-Garibay, 1992).

TABLA 3

Lactasas comerciales de levadura

NOMBRE COMERCIAL	COMPAÑIA	FUENTE DE OBTENCION	UNIDADES (Kat/ml)
Maxilact LX-5000	Gist-Brocades	<i>K. lactis</i>	5000
Maxilact L-2000	Gist-Brocades	<i>K. lactis</i>	2000
Kerulac	Gist-Brocades	<i>K. lactis</i>	---
Hydrolat	Sturge Enzymes	<i>K. fragilis</i>	5000
LP 7028	Rhom	<i>K. fragilis</i>	2000
Lactozym	Novo	<i>K. fragilis</i>	3000
Neutral Lactase	Pfizer	<i>C. pseudotropicalis</i>	2750
Takamine Lactase	Miles	<i>K. fragilis</i>	---
Lact-Aid	Lact-Aid	<i>K. lactis</i>	1000

Garcia-Garibay, 1992.

3.7 PRESENCIA DE CONTAMINANTES EN LAS PREPARACIONES COMERCIALES DE LACTASA DISPONIBLES EN EL MERCADO.

Las preparaciones comerciales de lactasa utilizadas en la industria láctea deben ser de alta pureza para evitar efectos adversos en el producto. En virtud de los diferentes procesos de obtención, se ha encontrado, aun en las preparaciones disponibles, de más alta pureza, la presencia de diferentes actividades enzimáticas, principalmente proteolítica (Mittal y col., 1991; Alatorre y col., 1993).

Marschke y col. (1980), ensayaron el nivel de actividad proteolítica contaminante en una preparación comercial de lactasa (Maxilact® 20000 y 40000), y concluyeron que el incremento de la proteólisis de queso cheddar elaborado con leche con lactosa hidrolizada era por las proteasas contaminantes en el extracto enzimático. Olano y col. (1983) ensayaron 19 actividades enzimáticas en Maxilact® 20000, encontrando que aun cuando la actividad lactásica fue la principal actividad en Maxilact, otras actividades fueron detectadas tales como α -galactosidasa, fosfatasa alcalina, fosfoamidasa, arilamidasa leucina, diferentes actividades lipolíticas y también actividad proteolítica considerablemente alta en las fracciones soluble e insoluble del Maxilact.

Broome y col. (1983), reportaron que yogures preparados con leche tratada a partir de diferentes preparaciones comerciales de lactasa fúngica y de levaduras, presentaron sabor amargo y desagradable, atribuyéndoselos a la posible presencia de proteasas contaminantes en las preparaciones empleadas, aun cuando no comprueban la presencia de éstas. De la misma manera Dariani y col. (1982), encontraron que leches con bajo contenido de lactosa tratadas con diferentes lactasas, presentaron coagulación y generación de sabores extraños, con excepción de Maxilact® LX-5000, que no ocasionó los mismos problemas.

Grieve y col. (1983), realizaron la caracterización parcial de las proteinasas producidas por *Kluyveromyces lactis* y las compararon con las presentes en el Maxilact® 40000. Reportan que en la preparación de Maxilact, las proteinasas detectadas eran similares a las presentes en un autolisado de *K. lactis*, conteniendo actividades de una endopeptidasa ácida, una serinendopeptidasa y una serinexopeptidasa, cuyo peso molecular fue de 58000, 48000 y 36000 Da respectivamente.

Alatorre y col. (1993), analizaron el preparado comercial de mayor pureza en el mercado, Maxilact® LX-5000, y detectaron actividad proteolítica elevada.

3.8 EFECTOS DE LA HIDROLISIS DE LA LACTOSA EN LA LECHE DESTINADA A LA ELABORACION DE YOGURT Y OTROS PRODUCTOS.

El empleo de la lactasa para disminuir el contenido de la lactosa presente en la leche, tuvo como principal razón facilitar el consumo de este valioso alimento a la población que presentaba intolerancia a este disacárido. Este hecho condujo a incrementar el interés por el uso de la enzima no solamente en la leche sino además en diferentes productos lácteos. Las investigaciones condujeron a observar que al hidrolizar la lactosa de la leche utilizada en la elaboración de algunos productos, presentaba efectos favorables y estimulaba la actividad de los microorganismos iniciadores participantes.

Engel (1973) reportó el uso de la lactasa para elaborar yogures más dulces sin incrementar su contenido calórico, mediante el aprovechamiento de la lactasa no utilizada por las bacterias lácticas durante la fermentación. El producto obtenido era de un sabor más suave y dulce, más agradable para los consumidores y rentable para el productor. Hilgendorf (1981) y Smith y Bradley (1984), determinaron los niveles óptimos de lactasa fúngica para elaborar yogurt bajo en calorías y de bajo contenido en lactosa, los productos mostraron un tiempo de coagulación ligeramente menor, dependiendo de la concentración adicionada del preparado comercial enzimático de lactasa adicionado, respecto al control.

Los pioneros en estudiar el efecto de la hidrólisis de la lactosa en el yogurt con la enzima β -galactosidasa fueron Guilliland y col. (1972). Observaron que la glucosa liberada durante la hidrólisis enzimática de la lactosa estimulaba la producción de ácido de los estreptococos lácticos. Sugirieron que los microorganismos no producían el máximo de ácido láctico debido a su incapacidad para metabolizar lactosa eficientemente cuando la leche no estaba hidrolizada. Además observaron que la glucosa se metabolizaba rápidamente y la galactosa se acumulaba en el medio. O'Leary y Woychik (1976a) encontraron resultados similares en cultivos mixtos de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* en leche tratada con lactasa.

Thompson y Gyuricksec (1974) y Gyuricksec y Thompson (1976), desarrollaron un proceso para la elaboración de yogurt rígido de bajo contenido en lactosa. El procedimiento propuesto involucraba el pretratamiento de la leche con una lactasa proveniente de *Kluyveromyces lactis*, considerando 90-95% de hidrólisis de la lactosa total presente en la leche. Reportaron de igual manera que el tiempo requerido para desarrollar la acidez final era menor y que el producto era más dulce que el control, favoreciendo así la aceptación por parte de los consumidores. Estudios similares realizaron O'Leary y Woychick (1976b), encontrando el mismo efecto, no obstante, concluyen que ni la relación simbiótica de los

microorganismos iniciadores ni la formación de los compuestos responsables del sabor eran afectados por la hidrólisis de la lactosa.

Tamime (1977 y 1978) realizó el estudio del comportamiento de tres tipos de cultivos iniciadores (normal, viscoso y filante) para la elaboración del yogurt utilizando leche hidrolizada con lactasa al 50 y 100%. En todos los casos la producción de ácido láctico fue mayor en la leche hidrolizada al 50% respecto al control. La excepción fue el yogurt preparado con leche hidrolizada al 100% e inoculado con bacterias filantes, ya que presentó una velocidad menor de desarrollo de ácido láctico comparado con el control.

Uno de los trabajos más interesantes del efecto de la hidrólisis de la lactasa en el desarrollo de lactobacilos y estreptococos es el realizado por Hemme y col. (1979). Mediante su estudio lograron establecer la diferencia que puede existir entre cepas de la misma especie en cuanto a su capacidad para metabolizar glucosa, galactosa y lactosa. Concluyen que la estimulación en el crecimiento de los microorganismos descrita por Guillard y col. (1972), y sostenida por otros autores, no era debida a la facilidad de asimilar glucosa, sino a la presencia de proteasas contaminantes en el preparado comercial.

Por otra parte estudios similares se realizaron en quesos. Reportaron un incremento en la velocidad de producción de ácido y maduración del queso reflejado en una mayor proteólisis (Thompson y Brower, 1974; Thompson y Gyuricsek, 1974; Woodward y Kosikowski, 1975; Marschke y Dulley, 1978; Weaver y Kroger, 1978; Labuschagne y Nieuwoudt, 1978; Gooda y col., 1980, 1982, 1983; Rhida y col., 1983, 1984; Thakar y col., 1987 y 1992). A pesar de lo anterior Cardwell y Prombutara (1976), reportaron efectos no favorables en la maduración y características sensoriales de quesos cuando se utilizaba leche hidrolizada con lactasa, en donde el producto obtenido presentaba la formación de sabores extraños, color blanquecino y cuerpo arenoso.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 SEPARACION DE LAS PROTEASAS PRESENTES EN EL MAXILACT® LX-5000

4.1.1 Enzima

Se usó un preparado comercial de lactasa: Maxilact® LX-5000 (Gist Brocades, Holanda).

4.1.2 Determinación de actividades enzimáticas

Actividad de lactasa

Se determinó midiendo espectrofotométricamente (Espectrofotómetro, Shimadzu UV-160 con control de temperatura, Japón) la hidrólisis de o-nitrofenil- β -galactopiranosido (ONPG) (Miller, 1972) en reacción continua efectuada en la celda, bajo temperatura controlada a 37°C, siguiendo un registro de la absorbancia a 410 nm a pH 6.6, empleando una solución amortiguadora de fosfatos 100mM.

Una unidad de lactasa se define como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar una μ mol de ONPG por minuto a 37°C.

Actividad proteolítica

Se utilizó la técnica modificada de Hull (1947), empleando caseína soluble (Hammarsten, Merck) como sustrato en regulador TRIS, pH 7.0. La proteólisis se determinó mediante el aumento de péptidos solubles en ácido tricloroacético (Baker) al 5%, cuantificados espectrofotométricamente a 280 nm empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

Una unidad de proteasa se define como la cantidad de enzima requerida para liberar una μ mol de de tirosina por minuto a 35°C.

4.1.3 Separación de las proteasas y determinación del peso molecular por filtración en gel

Se empleó una resina Ultrogel AcA34 (LKB), la cual fue dispersada en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7.0, y se empacó en una columna (2.5x90cm). La columna fue equilibrada con la misma solución amortiguadora y el flujo se mantuvo a 7 ml/h, empleando una bomba peristáltica (PI Pharmacia). Se calibró la columna con proteínas de peso molecular conocido (MW-GF-

1000;Sigma). El peso molecular aparente de las proteasas y lactasa fue determinado a partir de la curva de calibración, relacionando el volumen de elución y el volumen vacío (V_e/V_o) contra el logaritmo del peso molecular de las proteínas conocidas (Andrews, 1964). Para la elución de la muestra, se adicionó a la columna un volumen de 7.5 ml de extracto comercial diluido con solución reguladora hasta alcanzar una concentración de proteína entre 70-80 mg/ml, determinado por el método de Lowry y col. (1951). La muestra se filtró antes de pasarla a través de la columna, empleando una membrana de 0.45 μ m en un filtro Millipore. Se colectaron fracciones de 3.5ml cada una y se les determinó la actividad proteolítica y de lactasa. Para cada fracción se registró la absorbancia a 280 nm.

4.1.4 Cromatografía de intercambio iónico

Se dispersó una resina de DEAE-Sepharosa CL6B (Sigma) en solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM pH 7.0 y se empacó en una columna (1.5x20cm) calibrada con la misma solución amortiguadora. Se adicionó a la columna 3 ml de extracto comercial de lactasa previamente filtrado a través de una membrana de 0.45 μ m en un filtro Millipore. El material no absorbido en la columna fue lavado con la misma solución amortiguadora de calibración. La proteína absorbida fue removida de la columna mediante un gradiente lineal de NaCl (0-0.5N). Se colectaron fracciones de 3.5 ml y se determinó en cada una de ellas la actividad de lactasa y proteolítica.

4.1.5 Electroforesis

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Se empleó una cámara de electroforesis Mini Protean II, Biorad. Para el corrimiento electroforético las muestras fueron tratadas adicionándoles volumen a volumen una solución de SDS al 4%, mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol al 0.002%. La mezcla obtenida se incubó a 100°C durante 2 min antes de su aplicación. Se usaron geles verticales con 11% de poliacrilamida y un voltaje constante de 200V. La fijación de proteínas se realizó sumergiendo el gel en una solución al 50% de ácido acético y metanol, durante 30 min. Para la tinción se empleó una solución de azul de Coomassie al 0.25%, durante 30 min y después se destiñó empleando una solución al 50% de metanol y ácido acético. Para la determinación del peso molecular se utilizaron proteínas de peso molecular conocido entre 10,000 y 70,000 Da (MW-SDS-70;Sigma).

4.1.6 Espectrofotometría de masa por electro-aspersión (ESMS)

El extracto crudo de Maxilact® LX-5000 fue dializado en agua desionizada durante 24h a 4°C, posteriormente la muestra fue liofilizada.

El Maxilact (1 mg) previamente liofilizado fue dispersado en agua desionizada (0.5ml) y después diluido con un volumen igual de acetonitrilo y ácido fórmico (Ponce y col. 1993). Todas las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro de masas VG Quattro, ajustado a una interfase de electroaspersión (VG Biotech. Altrinchman, G.B.). El solvente acarreador consistió de volúmenes iguales de acetonitrilo y ácido fórmico, el cual se bombeó mediante una válvula Rheodyne a la fuente a 5 µm/min. La entrada del capilar fue mantenida a 4KV con un electrodo contador a 1KV y la fuente a 70°C. Las muestras fueron introducidas en la corriente de solvente vía una válvula Rheodyne. La escala de masa fue calibrada regularmente (cada 3h; aproximadamente cada seis muestras) usando mioglobina de corazón de caballo (Sigma).

De manera semejante se realizó el tratamiento de las muestras de β-galactosidasa y de proteasas parcialmente purificadas obtenidas por cromatografía de intercambio iónico para su análisis por ESMS.

4.2 INACTIVACION TERMICA DE LA LACTASA Y PROTEASAS PRESENTES EN EL MAXILACT® LX-5000

Para evaluar la inactivación térmica de la lactasa y proteasas presentes en el Maxilact® LX-5000, las cinéticas de inactivación (desnaturalización) se realizaron por triplicado utilizando las temperaturas de 20 a 90°C con incrementos de 5 °C. Para cada temperatura se utilizaron 4 g de extracto crudo de Maxilact® LX-5000, distribuidos en 4 tubos de ensaye, previamente incubados a la temperatura de operación. Se tomaron muestras de 1 g a diferentes intervalos de tiempo (1,2,3 y 4 min) y se guardaron en refrigeración durante 6-8h aproximadamente para la determinación de las actividades proteolítica y de lactasa.

4.3 PERFIL DE TEMPERATURA DE LA LACTASA Y PROTEASAS DEL MAXILACT® LX-5000

4.3.1 Lactasa

Para determinar el perfil de temperatura de la lactasa, se trabajó en reacción continua, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 con control de

temperatura. La actividad enzimática se midió en un intervalo de temperatura de 5 a 65°C con incrementos de 5°C y 75°C.

4.3.2 Proteasas

Se realizó la determinación de actividad proteolítica mediante reacción continua, tomando datos de actividad proteolítica cada hora durante 3 h, considerando las mismas temperaturas de reacción utilizadas en la determinación de lactasa.

4.4 OBTENCION DE LA ENZIMA β -GALACTOSIDASA PARCIALMENTE PURIFICADA

La lactasa obtenida después de la filtración en gel (punto 4.1.3), fue dializada en solución amortiguadora de fosfatos 10mM, pH 7.0, durante 24 h a 4°C y concentrada por ultracentrifugación (Ultracentrifuga HETO VR-1). Posteriormente se sometió a cromatografía de intercambio iónico, bajo las mismas condiciones mencionadas en el punto 4.1.4. La β -galactosidasa obtenida, se dializó en agua desionizada durante 24 h a 4°C y liofilizó (Liofilizador, HETO VR-1).

La muestra liofilizada obtenida, se sometió nuevamente a cromatografía de intercambio iónico, para asegurar un mayor grado de pureza. De igual manera la enzima fue dializada y liofilizada.

Las proteasas parcialmente purificadas se obtuvieron de manera similar al procedimiento mencionado con anterioridad.

4.5 EFECTO DE LAS PROTEASAS CONTAMINANTES EN LA ELABORACION DEL YOGURT

4.5.1 Microorganismos

Las cepas usadas fueron *Streptococcus thermophilus* ST233 de la colección del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F., y *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* NCFB 1489 de la National Collection of Food Bacteria, Reading, Inglaterra.

4.5.2 Mantenimiento de iniciadores

Los microorganismos iniciadores se mantuvieron en 10% (p/v) de leche descremada bacteriológica (Difco, Detroit, MI4832, USA), esterilizada a 121°C durante 15 min.

4.5.3 Preparación del inóculo

El inóculo fue preparado adicionando 5% (v/v) de los cultivos reserva en leche descremada (Nestlé, México) la cual fue reconstituida al 10% (p/v) y esterilizada a 121°C/15 min. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 16-18 h.

4.5.4 Enzimas

Las enzimas utilizadas fueron Maxilact® LX-5000 (Gist-Brocades, Holanda) y β -galactosidasa parcialmente purificada (libre de proteasas), obtenida por cromatografía de intercambio iónico (punto 4.4).

4.5.5 Condiciones de hidrólisis de la leche

4.5.5.1 Efecto de las proteasas contaminantes presentes en el Maxilact® LX-5000 durante la elaboración del yogurt versus β -galactosidasa

Se prepararon por triplicado tres lotes de leche descremada (Nestlé) reconstituida al 11%, se trataron térmicamente a 85°C durante 20 min y se enfriaron a 30°C.

1) Se adicionó 0.05% de Maxilact® LX-5000, en condiciones asépticas, previamente filtrado en membranas estériles de 0.22 μ m (Millipore), se incubó con agitación a 30°C (temperatura óptima determinada de acuerdo al punto 4.3.1) durante 8h para asegurar el 100% de hidrólisis de la lactosa presente en la leche.

2) Bajo las mismas condiciones que el anterior, se adicionó β -galactosidasa purificada, asegurándose que las unidades enzimáticas fuesen equivalentes. Las condiciones fueron las mismas para obtener el 100% de hidrólisis.

3) Se mantuvo bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura pero sin la adición de ninguna enzima.

4.5.5.2 Efecto del grado de hidrólisis de la lactosa presente en la leche en el metabolismo de las bacterias iniciadoras durante la fermentación del yogurt.

Se utilizó leche reconstituida al 11% (p/v) y tratada térmicamente, como se describió en el punto anterior.

Se prepararon por triplicado tres lotes de leche:

1) Control, leche sin hidrolizar.

2) Leche hidrolizada al 100% , con Maxilact® LX-5000.

3) Leche en el que simultáneamente se adicionó el inóculo y la enzima Maxilact® LX-5000 al 0.05% y se mantuvo a la temperatura de incubación de la fermentación mencionadas con anterioridad.

4.5.6 Condiciones de fermentación

Se inocularon tanto la leche previamente hidrolizada (con ambas enzimas) como a la leche sin hidrolizar (control) con 5% (v/v) de los microorganismos iniciadores. La fermentación se realizó a 43°C durante 6h, los yogures resultantes fueron almacenados una noche a 4°C, para la realización de los análisis correspondientes. La fermentación se llevó a cabo por triplicado, en frascos herméticamente cerrados, conteniendo 250 ml de leche.

4.6 METODOS ANALITICOS

4.6.1 Determinación de lactosa/galactosa

La cuantificación de azúcares, durante la hidrólisis de la leche, se realizó mediante el método de Lactosa/D-Galactosa (Boehringer-Mannheim, No. Cat. 176303) que consiste en la cuantificación estequiométrica de la galactosa liberada por la hidrólisis de la lactosa en presencia de la enzima β -galactosidasa y la subsecuente reacción de óxido reducción entre la D-galactosa y nicotinamida-adenín-dinucleótido catalizada por la enzima β -galactosa-deshidrogenasa. El incremento de NADH es medido por su absorbancia a 365 nm.

4.6.2 Acidez total

Fue determinada mediante titulación con NaOH 0.1N de 10g de yogurt diluido con 50 ml de agua destilada, empleando fenoftaleína como indicador. La acidez fue expresada como % de ácido láctico presente en la disolución.

4.6.3 Determinación de pH

El pH se midió directamente en la muestra con un potenciómetro (Conductronic pH20, México).

4.6.4 Viscosidad aparente

Se midió empleando un viscosímetro Brookfield RVTDV-II+ , en 300 g de muestra de yogurt rígido. Las lecturas fueron tomadas a 15°C, después de 5 min, usando el vástago 4 y una velocidad de 10 RPM en muestras refrigeradas una noche después de la fermentación. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

4.6.5 Cuantificación de acetaldehído

El acetaldehído presente en los diferentes yogures se cuantificó mediante el método de Boehringer-Mannheim (Cat. No. 668613), basado en la reacción estequiométrica entre el acetaldehído y nicotinamida-adenín-dinucleótido, en presencia de la enzima aldehído deshidrogenasa. El aldehído es oxidado a ácido acético y el NADH obtenido es determinado midiendo a una absorbancia de 365 nm.

Preparación de la muestra para la cuantificación de acetaldehído

A 40g de yogurt se adicionaron 4ml de solución de ácido cítrico al 20%(p/v), se agitó ligeramente y transfirió a un matraz volumétrico de 50 ml. Se aforó con agua destilada, mezcló perfectamente y centrifugó. En el sobrenadante se realizaron los ensayos.

4.6.6 Cuenta total y diferencial de microorganismos

El desarrollo microbiano se midió mediante cuenta en placa de la dilución apropiada, preparada con una solución de peptona (Bioxon) al 0.1% en agar YLA descrito por Matalon y Sandine (1986).

4.7 ANALISIS ESTADISTICO

El análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples se realizaron por medio del paquete computacional SAS, adaptado a una red (servidor) (SAS Institute, 1992).

A lo largo de la presente investigación se realizaron diseños experimentales de bloques completamente al azar (Steel y Torrie, 1988).

Así mismo se realizaron ajuste de modelos mediante regresión simple y curvilínea, comparación de curvas y pruebas de paralelismo (Martínez-Garza y Castillo-Morales, 1987).

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 SEPARACION DE LAS PROTEASAS Y DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR.

Para realizar la separación de proteasas contaminantes del preparado comercial Maxilact® LX-5000, se utilizaron las técnicas de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico, para lograr una mejor separación de la lactasa y proteasas contaminantes. En la determinación del peso molecular se emplearon las técnicas de filtración en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS y la de espectrofotometría de masas por electro-aspersión, este último como un método alternativo, nuevo, rápido y de mayor sensibilidad que electroforesis.

5.1.1 Filtración en gel

En la Figura 2 se muestra el perfil de elución obtenido de la filtración en gel del extracto crudo de Maxilact® LX-5000, así como los pesos moleculares aparentes calculados a partir de la curva de calibración estimada. Los pesos moleculares encontrados son de 59000 y 11000 Da para las proteasas y de 175000 Da para la lactasa.

5.1.2 Cromatografía de intercambio iónico

El perfil de elución obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico se presenta en la Figura 3. Se encontró que la lactasa eluye a una concentración de NaCl de $0.19 \text{ N} \pm 0.03$. Los picos de actividad proteolítica eluyeron a 0.31 y 0.33 N de NaCl.

5.1.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Se realizó la electroforesis de las fracciones de máxima actividad tanto para lactasa como para las proteasas obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico (Fig. 3). Del patrón electroforético (Fig. 4) se calculó el peso molecular de las bandas a partir de la curva de calibración estimada con marcadores conocidos. Para las proteasas se encontró la presencia de una banda de mayor intensidad con un peso promedio de 51560 Da y también bandas menores con un peso molecular de 44700, 34200, 22000 y 19500 Da en los picos A y B, (Fig. 3); en el caso del pico A, se encontró una banda adicional cuyo peso molecular es de 15000 Da. Lo anterior puede sugerir que las bandas menores pueden ser impurezas derivadas de la separación cromatográfica o bien posibles proteasas que estuviesen eluyendo a la misma fuerza iónica.

Grieve y col. (1983) reportaron la presencia de tres proteasas en un lote de Maxilact® 40000 cuyos pesos moleculares fueron de 58000 (endopeptidasa), 48000 (serinendopeptidasa) y 36000 Da (serinexopeptidasa). Mediante filtración en gel se encontró la presencia de una proteasa con un peso molecular de 59000 Da, el cual es muy semejante al peso molecular reportado para la endopeptidasa, sin embargo, en el electroforegrama se encontraron bandas cuyos pesos moleculares oscilaban entre 51560, 44700 y 34200 Da las cuales podrían corresponder a las tres proteasas reportadas por los autores antes mencionados, considerando que la variación del peso molecular es debido al método empleado para la determinación. Es posible que por la naturaleza de las proteasas y bajo las condiciones de la cromatografía de intercambio iónico, las proteasas eluyeran con una fuerza iónica muy parecida, no existiendo la separación total entre éstas, de ahí que encontramos en la fracción de máxima actividad para las proteasas diferentes bandas con pesos moleculares muy semejantes a las proteasas reportadas por Grieve y col. (1983). De acuerdo con la intensidad de las bandas en el electroforegrama (Fig. 4) la proteína cuyo peso molecular es de 51560 Da puede ser la proteasa que se encuentra en mayor concentración en esa fuerza iónica.

Muchos autores en la literatura han reportado un amplio intervalo de pesos moleculares para proteasas, los cuales varían entre 41000 (Meusdsdoerffer y col. 1980), a 60000 Da (Hata y col. 1967) para endopeptidasas y de 32000 (Lenney y Dalbec, 1969) a 82000 Da (Saheki y Holzer, 1974) para serin endopeptidasas, esta variación depende del método utilizado en la determinación.

En el caso de la lactasa (Fig. 4), se encontró en la fracción de máxima actividad, dos bandas de mayor intensidad cuyo peso molecular es de 46000 y 43600 Da y seis bandas menores, las cuales presentaron un peso molecular entre 78000 y 20000 Da. No es posible determinar si las bandas menores encontradas son impurezas debido al proceso de purificación resultado de la proteólisis o subunidades de la enzima. Esto no permite determinar con precisión el peso molecular de la lactasa mediante electroforesis ni el número de subunidades que la componen. No obstante lo anterior es indicativo de que la lactasa es una enzima constituida por diferentes subunidades.

Mahoney y col. (1978) reportaron un peso molecular para la lactasa de *K. fragilis* de 201000 Da, determinado mediante filtración en gel. Estos autores encontraron mediante microscopía electrónica, que la enzima estaba constituida de 9 ó 10 subunidades, al llevar a cabo separaciones electroforéticas en SDS-PAGE, encontraron dos bandas mayores correspondiendo a pesos moleculares de 90000 y 120000 Da. Otras siete bandas menores con pesos moleculares entre 33000 y 71000 fueron consideradas impurezas. Dickson y col. (1979), reportaron para la lactasa de *K. lactis*, un peso molecular aparente de 135000 Da obtenido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, concluyendo que la enzima contenía un solo tipo de subunidad cuyo peso molecular era de 135000 Da, y que en caso de contener dos o más tipos de subunidades éstas presentaban movilidad electroforética semejante. El peso molecular obtenido para la lactasa en la presente investigación es semejante al reportado por Mahoney y col. (1978) y Dickson y col. (1979), las variaciones encontradas pueden ser debidas a la fuente de obtención de la enzima y a las condiciones de trabajo de las técnicas utilizadas para la determinación.

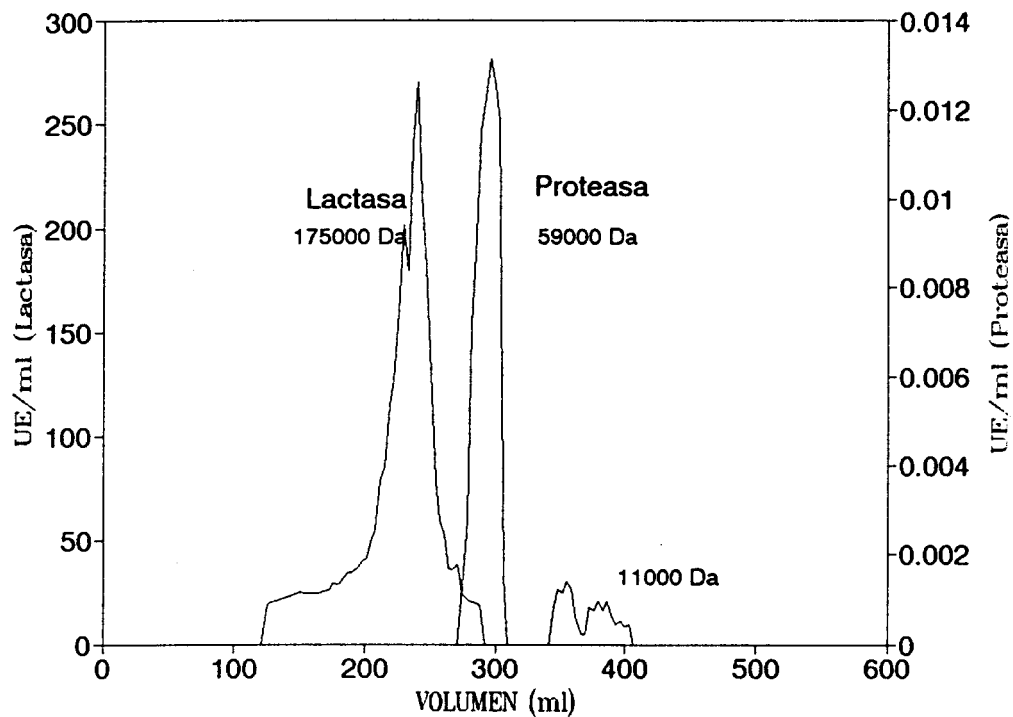


FIGURA 2. Separación de las proteasas contaminantes del Maxilac® LX-5000 y determinación del peso molecular por filtración en gel en AcA34.

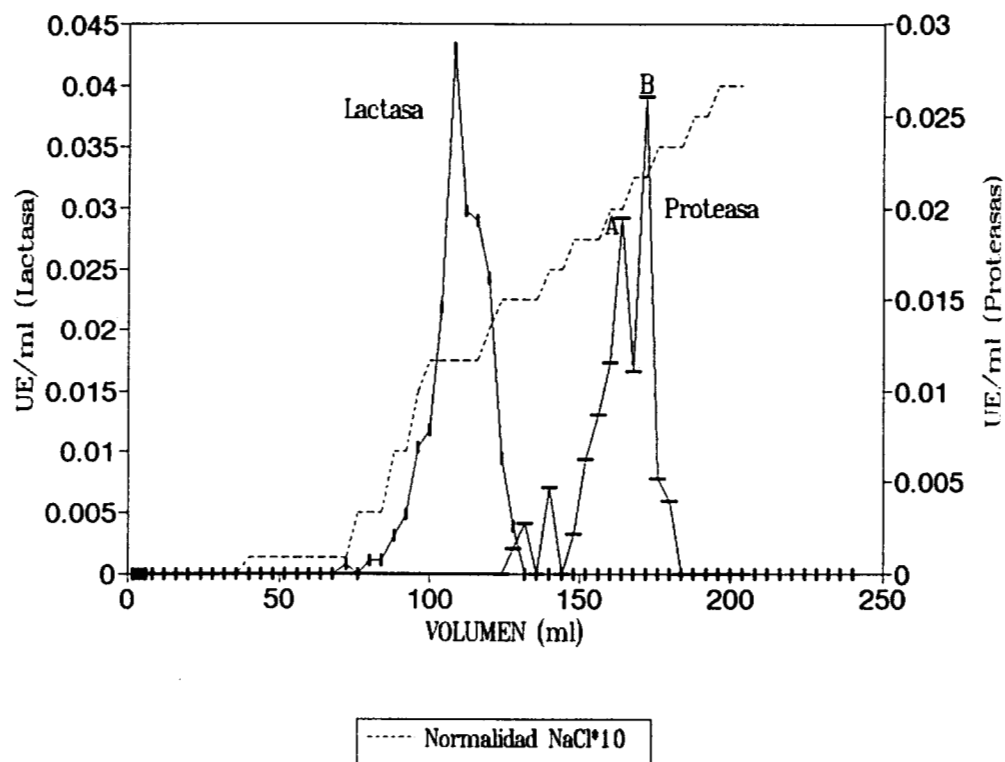


FIGURA 3. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-SEPHAROSA CL6B del Maxilact® LX-5000.

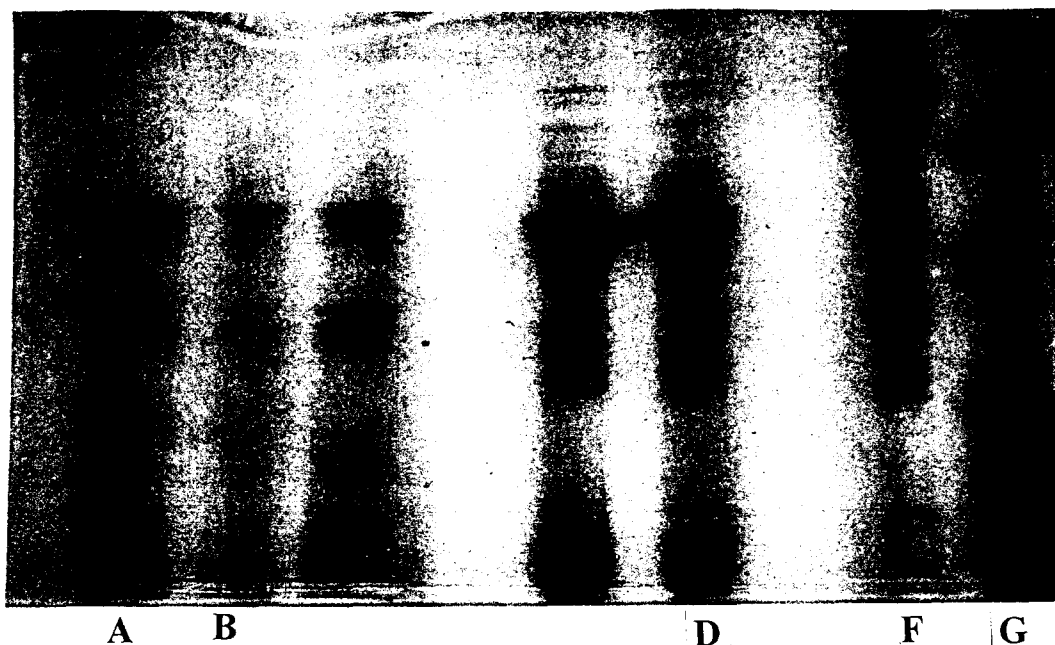


FIGURA 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. A) Fracción A de máxima actividad proteolítica; B) Fracción B de máxima actividad proteolítica; D) Fracción de máxima actividad de lactasa; F) Maxilact® LX-5000; G) Proteínas de peso molecular conocido 1) seroalbúmina bovina 66000 Da, 2) albúmina de huevo 45000 Da, 3) gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa 36000 Da, 4) Anhidrasa carbónica 29000 Da, 5) Tripsinógeno 6) Inhibidor de tripsina 20100 Da, 7) alfa-lactoalbúmina 14 200 Da.

5.1.4 Determinación del peso molecular mediante espectrofotometría de masas por electro-aspersión (ESMS) de los componentes del Maxilact® LX-5000, y de las enzimas β -galactosidasa y proteasas parcialmente purificadas

Se realizó el análisis del preparado comercial Maxilact® LX-5000 y de la β -galactosidasa y proteasas parcialmente purificadas, por ESMS. Se obtuvieron los espectros de masas correspondientes (Figs. 5, 6 y 7) de donde se determinaron los pesos moleculares de los componentes encontrados (Tablas 4, 5, y 6). En general los datos fueron difíciles de analizar, principalmente para el Maxilact debido a las impurezas presentes en el extracto, lo que se reflejó en variaciones muy grandes entre las diferentes repeticiones. Para todos los casos los pesos moleculares obtenidos fueron similares a los determinados por filtración en gel y electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

En el preparado comercial se encontraron aproximadamente 8 componentes (Tabla 4) los cuales pueden corresponder a subunidades de la lactasa, diferentes proteínas o péptidos presentes en el extracto.

TABLA 4

Pesos moleculares de los componentes del Maxilact® LX-5000, obtenidos mediante ESMS.

COMPONENTE	PESO MOLECULAR (Da)
1	74748.93
2	60526.70
3	35640.69
4	31423.34
5	24827.72
6	23363.69
7	22884.23
8	20600.89

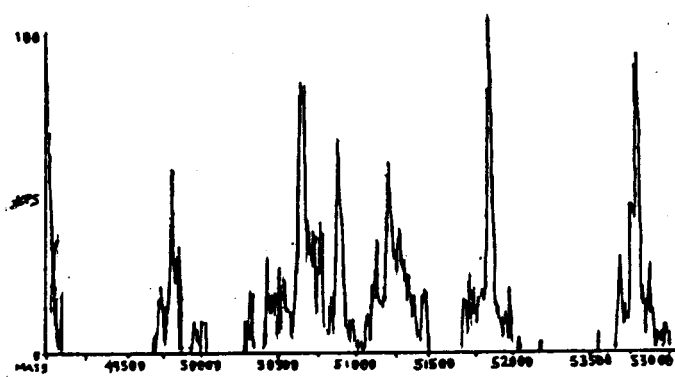
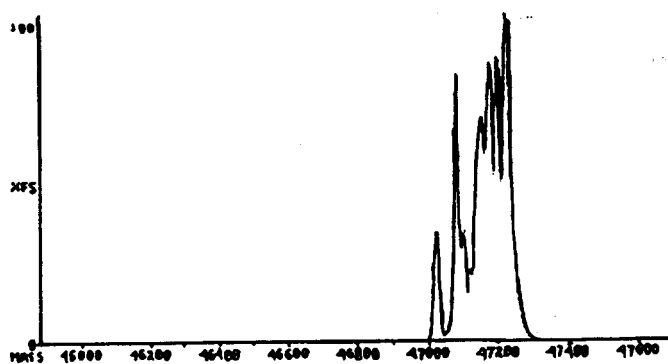


FIGURA 6. Espectro de masa obtenido mediante ESMS de la β -galactosidasa parcialmente purificada.

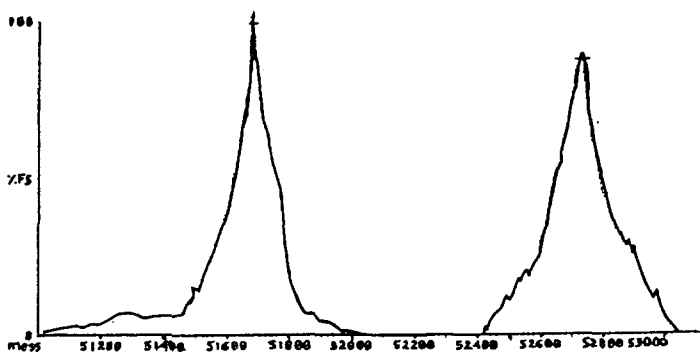
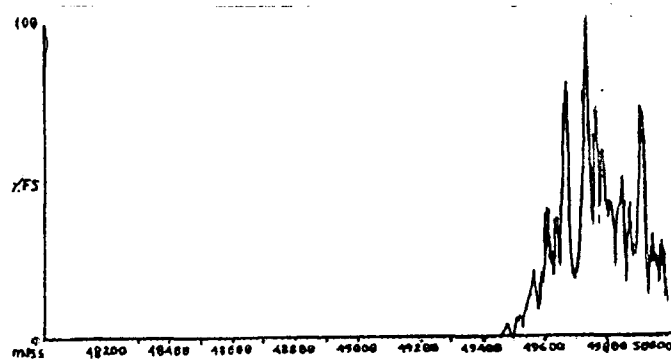
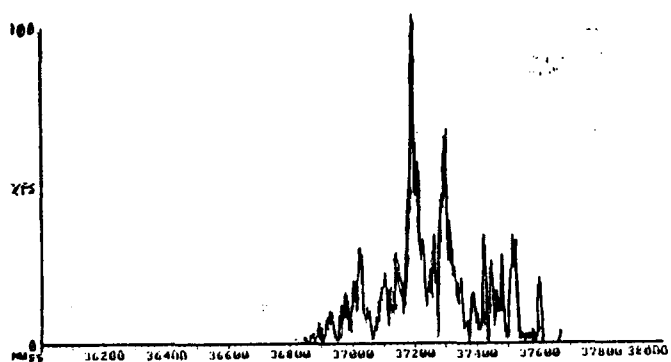


FIGURA 7. Espectro de masa obtenido mediante ESMS de las proteasas parcialmente purificadas.

De los pesos moleculares obtenidos para la β -galactosidasa (Tabla 5) se puede observar que esta enzima está aparentemente constituida por diferentes subunidades cuyos peso moleculares son variables, no obstante en virtud de estar parcialmente purificada fué difícil diferenciar y conocer el número de subunidades que la constituyen. Por otra parte dado que el análisis por ESMS permite detectar cambios pos transduccionales de grupos tales como número de puentes disulfuro, acetilación y fosforilación, entre otros (Geisow y Green, 1990), el análisis de los resultados sugiere que la lactasa posiblemente es una enzima glicosilada y fosforilada aun cuando lo anterior no se confirmó en virtud de que los análisis para confirmar esta hipótesis requieren que la enzima tuviera un grado de pureza mayor.

TABLA 5

Determinación del peso molecular de la β -galactosidasa parcialmente purificada por ESMS.

COMPONENTE	PESO MOLECULAR (Da)
1	73704.13*
2	66371.14*
3	50929.61
4	47379.09
5	44619.16
6	39627.42
7	32515.66
8	31408.37
9	22161.05*
10	20189.37*

*Componentes menores

Respecto a las proteasas se encontró en la muestra analizada, cinco componentes (Tabla 6). Tres de ellos con peso molecular de 51683, 49735 y 37791, consistentes a lo encontrado con anterioridad por electroforesis, aun cuando en este caso no se localizó la presencia de ninguna proteína de menor peso molecular.

TABLA 6

Determinación del peso molecular de las proteasas parcialmente purificadas por ESMS.

COMPONENTE	PESO MOLECULAR (Da)
1	37200.77
2	49735.80
3	51683.00
4	52731.50
5	53731.26

5.2 INACTIVACION TERMICA DE LA LACTASA Y PROTEASAS PRESENTES EN EL MAXILACT® LX-5000.

Se determinó el efecto de la temperatura en la estabilidad de las enzimas presentes en el preparado comercial como una alternativa para eliminar o minimizar selectivamente la actividad proteolítica presente, considerando que la cinética de desnaturalización sigue un proceso de primer orden (Whitaker, 1994). En las Figuras 8 y 9, se muestran las gráficas de las curvas estimadas para la lactasa y proteasas respectivamente a partir de los datos obtenidos.

La lactasa en el extracto enzimático es completamente estable respecto al tiempo en el intervalo comprendido entre 30 y 60°C, reflejado estadísticamente en un nivel de explicabilidad (ajuste) muy bajo ($r^2=0.0023$ a 0.1221) y la pendiente de las curvas cercana a 0 (Fig. 8 y Tabla 7). Arriba de esas temperaturas la actividad enzimática de la lactasa disminuye considerablemente respecto al tiempo (pendiente de las curvas diferentes de cero), lo cual se indica con un mayor nivel de explicabilidad ($r^2\geq 0.0778$). A 90°C la enzima presenta una fuerte disminución en su actividad no obstante la actividad remanente es considerablemente alta, aproximadamente el 30% en un tiempo de incubación de 2 y 3 minutos.

El intervalo en el cual la temperatura no afecta a las proteasas respecto al tiempo es el comprendido entre 30 y 35°C, esto puede observarse en la Figura 9, ya que las pendientes de la curvas son cercanas a 0 y un $r^2=0.01230$ y 0.3544 (Fig. 9 y Tabla 8). Arriba de esas temperaturas la velocidad de desnaturalización respecto al tiempo se incrementa considerablemente, existiendo una pérdida considerable de actividad a partir de 60°C.

Los resultados anteriores coinciden con lo reportado por Hemme y col. (1979), ellos reportan que una solución al 1% de Maxilact pierde 66% de su actividad proteolítica contaminante después de 1h a 40°C y, a la vez la lactasa pierde 25% de su actividad. Además que una solución de lactasa al 0.1% pierde el 100% de su actividad después de 15 min a 54°C. Contrariamente a lo anterior Marschke y col. (1983), no encontraron cambio en la actividad proteolítica, cuando el extracto de Maxilact fué calentado durante 10 minutos a 50°C a pH 5.0, y bajo las mismas condiciones la β -galactosidasa perdió completamente su actividad en el extracto. Lo anterior pudiera ser consecuencia del efecto del pH al que se sometió la muestra, ya que la lactasa proveniente de *K. lactis* tiene una actividad máxima a un pH entre 6.5 y 7.0 y una temperatura entre 30 y 40° (Nijpels, 1988), presentando pérdidas considerables de actividad a pH menores de 6.0, lo que conjuntamente con una variación de temperatura puede hacer que su estabilidad térmica disminuya respecto a las proteasas presentes.

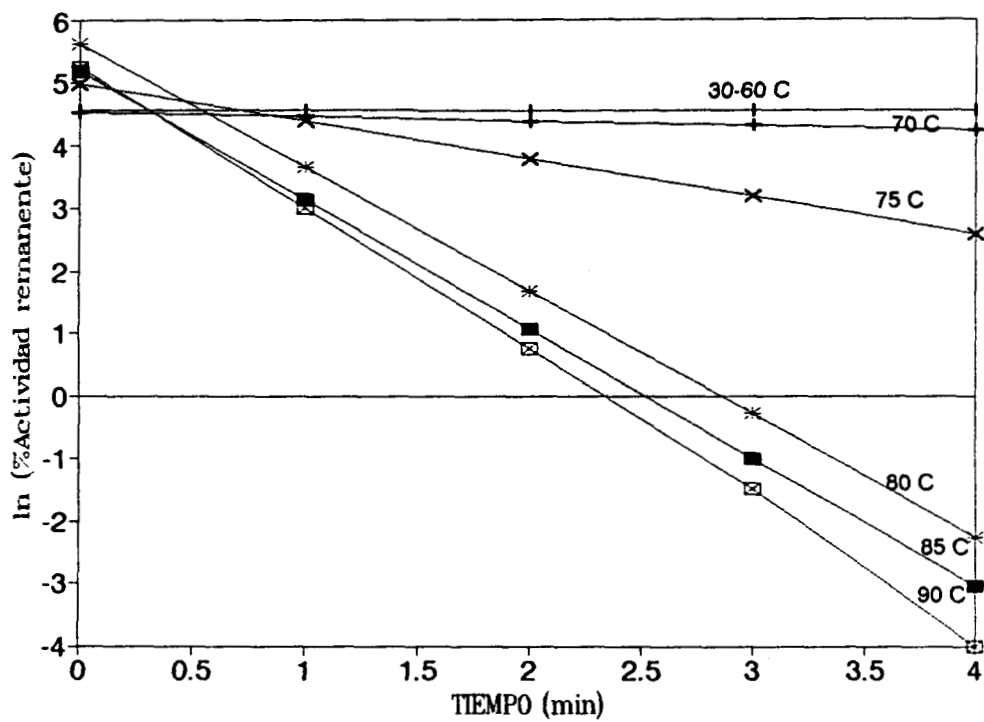


FIGURA 8. Efecto de la temperatura en la velocidad de desnaturalización de la lactasa

TABLA 7

Curvas estimadas para la determinación del efecto de la temperatura en la velocidad de reacción de la lactasa.

TEMPERATURA (°C)	CURVA ESTIMADA	r ² (Nivel de explicabilidad)
30	$\ln Er = 4.549188 - 0.0023117t$	0.002371«
35	$\ln Er = 4.57320870 - 0.00156t$	0.022790
40	$\ln Er = 4.56269950 - 0.00478t$	0.013228
45	$\ln Er = 4.58411990 - 0.012233t$	0.039994
50	$\ln Er = 4.58214240 - 0.015534t$	0.116553
55	$\ln Er = 4.57556900 - 0.007739t$	0.01644
60	$\ln Er = 4.57528020 - 0.018655t$	0.122189
65	$\ln Er = 4.62803295 - 0.022865t$	0.776021
70	$\ln Er = 4.53329160 - 0.076328t$	0.750610
75	$\ln Er = 4.98530760 - 0.600247t$	0.867790
80	$\ln Er = 5.63063615 - 1.974267t$	0.864608
85	$\ln Er = 5.19574020 - 2.063368t$	0.917172
90	$\ln Er = 5.24861680 - 2.247921t$	0.887500
95	$\ln Er = 4.18036000 - 4.163010t$	0.992748

(Er) Porcentaje de actividad enzimática remanente

(t) Tiempo de incubación

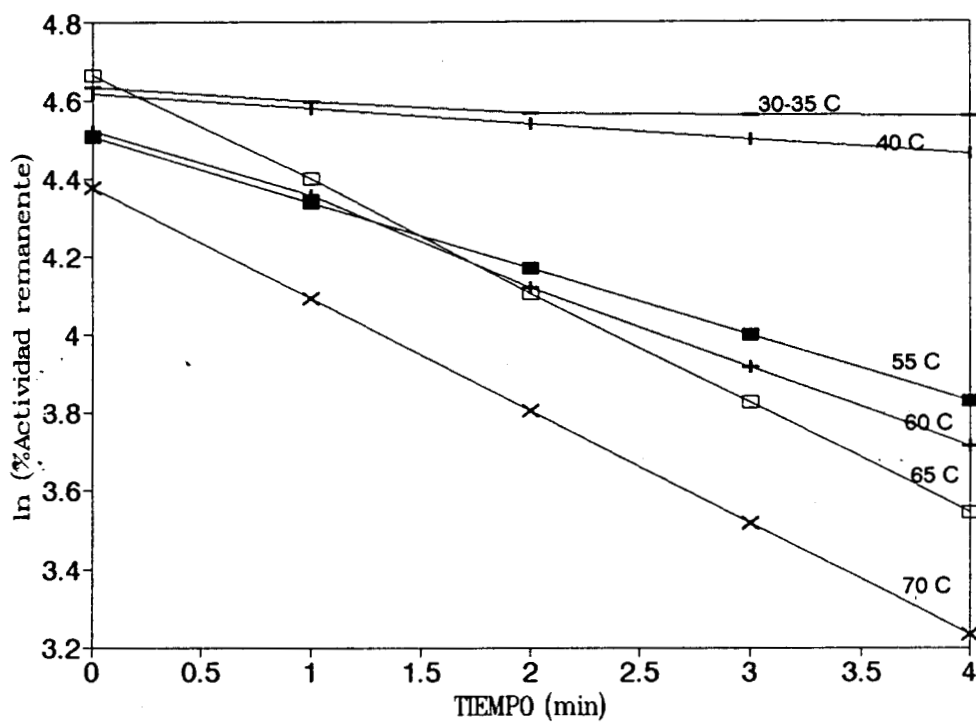


FIGURA 9. Efecto de la temperatura en la velocidad de desnaturalización de las proteasas

TABLA 8

Curvas estimadas para la determinación del efecto de la temperatura en la velocidad de reacción de las proteasas.

TEMPERATURA (°C)	CURVA ESTIMADA	r ² (nivel de explicabilidad)
30	$\ln Er = 4.598432 - 0.002342t$	0.01230
35	$\ln Er = 4.607284 - 0.012017t$	0.35440
40	$\ln Er = 4.616940 - 0.039017t$	0.77620
45	$\ln Er = 4.5265 - 0.04193830t$	0.87940
50	$\ln Er = 4.522397 - 0.208490t$	0.89627
55	$\ln Er = 4.523124 - 0.202059t$	0.89457
60	$\ln Er = 4.506800 - 0.169246t$	0.888748
65	$\ln Er = 4.664487 - 0.279449t$	0.952024
70	$\ln Er = 4.278730 - 0.280137t$	0.934200
75	$\ln Er = 4.378700 - 0.286409t$	0.979254

(Er) Por ciento de actividad enzimática remanente

(t) Tiempo de incubación

5.3 PERFIL DE TEMPERATURA DE LA LACTASA Y PROTEASAS, Y ESTIMACION DE LA ENERGIA DE ACTIVACION.

Con el fin de estimar la temperatura óptima de la actividad de las enzimas presentes en el preparado comercial, se determinó la actividad enzimática de lactasa y proteolítica a diferentes temperaturas de incubación. Los datos obtenidos fueron ajustados a modelos de regresión lineal, eligiendo el modelo de una parábola en el caso de la lactasa y el de un polinomio cúbico para las proteasas por ser los que mejor explicabilidad presentaron y se calculó la temperatura máxima mediante el proceso usual de primera y segunda derivada. Las Figuras 10 y 11 presentan las curvas estimadas para cada una de las enzimas así como la temperatura óptima calculada bajo las condiciones del experimento. Las proteasas presentaron una temperatura óptima de 40°C, cercana a lo recomendado por el distribuidor para hidrolizar la lactosa de la leche (35-40°C). La incubación del Maxilact a esas temperaturas puede involucrar proteólisis en la leche y ocasionar diferentes efectos en el producto final. La temperatura óptima para la lactasa fue de 30°C, esta temperatura puede estar relacionada con el pH de trabajo ya que de acuerdo a las especificaciones del fabricante, a una temperatura de 30°C el pH óptimo de la enzima se encuentra entre 6.5 y 6.7. El pH al que se llevó a cabo el estudio fue de 6.6, muy cercano al pH de la leche.

Utilizando los mismos datos y mediante la ecuación de Arrhenius estimada se calculó la energía de activación y desnaturalización para la lactasa y proteasas (Figs. 12 y 13) presentes en el Maxilact® LX-5000, en la Tabla 9 se presentan los valores calculados.

TABLA 9

Energías de activación de reacción y de desnaturalización estimada para la lactasa y proteasas presentes en el Maxilact® LX-5000

ENZIMA	Ea(kcal/mol)	Ead(kcal/mol)
Lactasa	6.90	19.200
Proteasas	10.448	17.712

(Ea) Energía de activación de la reacción.

(Ead) Energía de activación desnaturalización

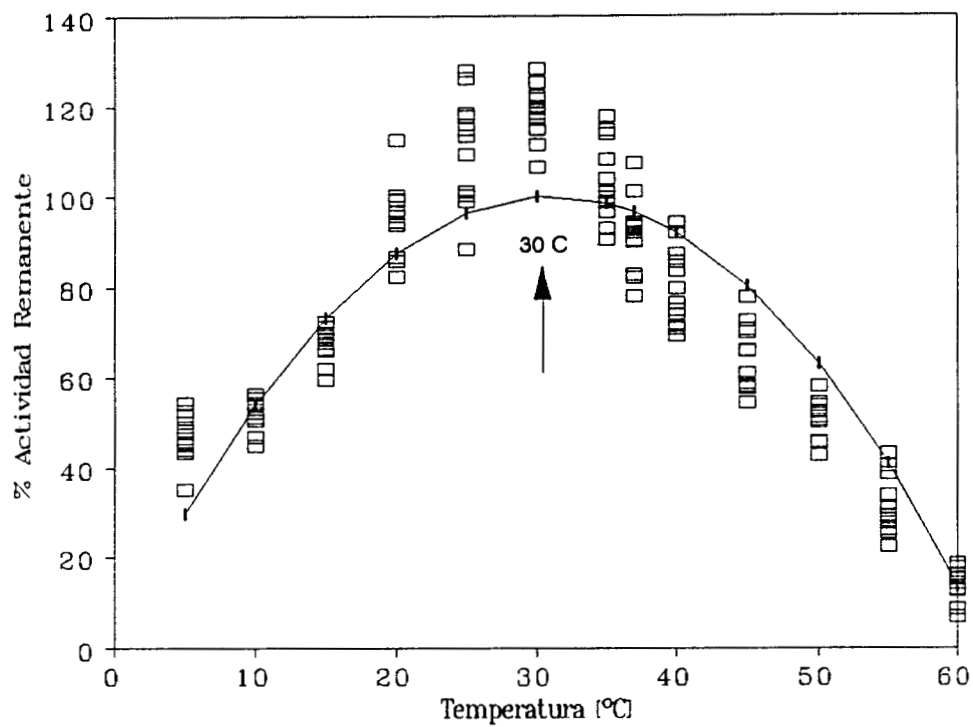


FIGURA 10. Perfil de temperatura de actividad de la lactasa a pH 6.6.

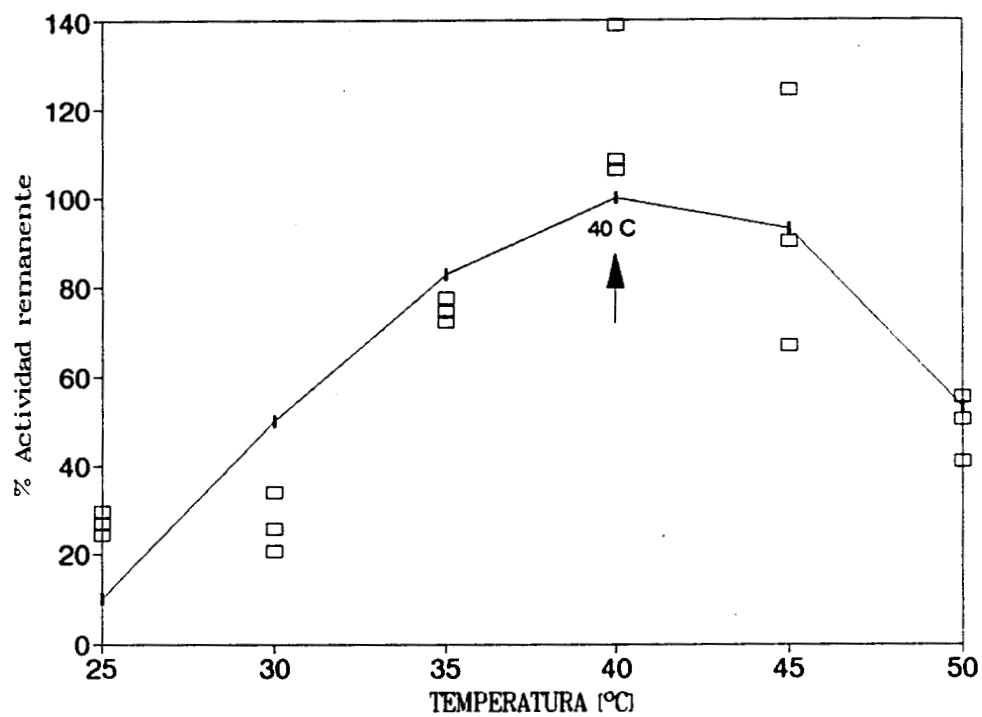


FIGURA 11. Perfil de temperatura de actividad de las proteasas contaminantes del Maxilac® LX-5000 a pH 7.0.

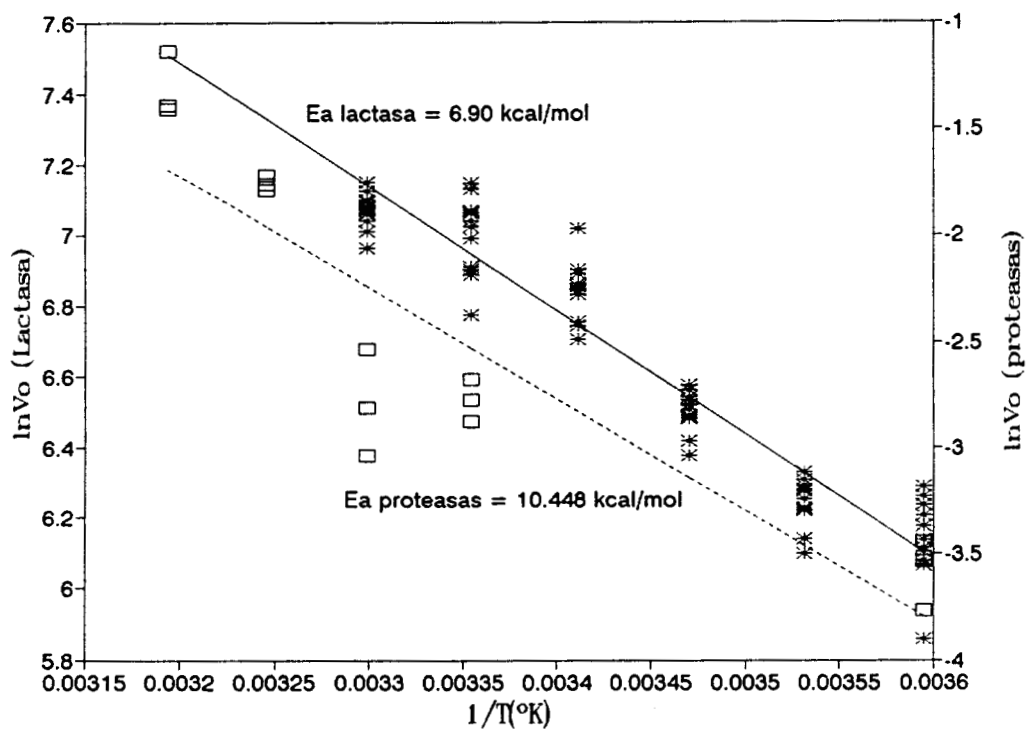


FIGURA 12. Gráfica de Arrhenius para la lactasa (—*)— y proteasas(---□---) : Energía de activación de la reacción.

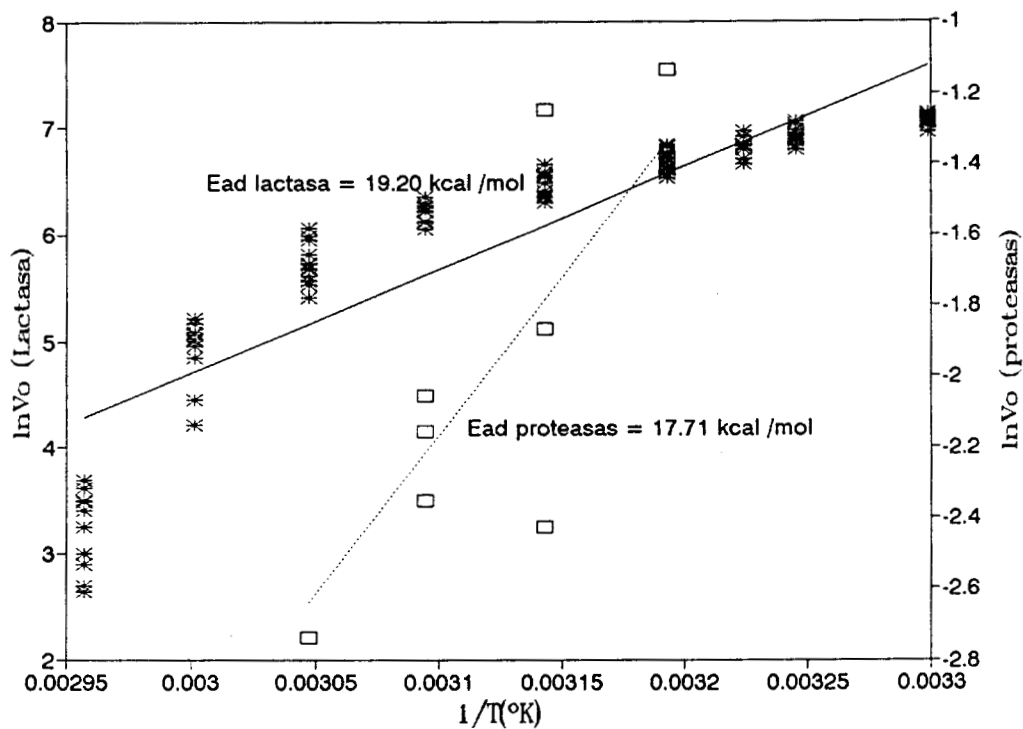


FIGURA 13. Gráfica de Arrhenius para la lactasa (—*)— y proteasas (—□—): Energía de activación de desnaturalización.

La energía requerida para que la reacción catalizada por las proteasas se efectúe es mayor que la requerida por la lactasa, lo cual nos sugiere que es la reacción catalizada por la lactasa la que con pequeños incrementos de temperatura se tendrían mayores aumentos en la velocidad de reacción, tomando en consideración que la temperatura óptima de la lactasa estimada fue de 30°C.

En cuanto a la energía de activación de desnaturalización ésta es mayor para la reacción catalizada por la lactasa. En la Figura 13, podemos notar que con incrementos en la temperatura la velocidad de reacción es ligeramente mayor para la actividad proteolítica, lo cual puede conducir a una más rápida desnaturalización de éstas con respecto a la lactasa y con ello minimizar los efectos de su actividad proteolítica, no obstante esta diferencia resulta ser muy pequeña y por tanto, incrementos en la temperatura también afectaría la actividad enzimática de la lactasa.

Dado que las energías de activación para la lactasa y proteasas contaminantes presentan valores similares, fue difícil establecer las condiciones de temperatura en la que se minimiza la actividad proteolítica en el preparado comercial.

5.4 EFECTO DE LAS PROTEASAS CONTAMINANTES PRESENTES EN EL MAXILACT® LX-5000 EN LA ELABORACION DEL YOGURT EMPLEANDO LECHE LACTOSA HIDROLIZADA.

Para estudiar el efecto de las proteasas contaminantes del Maxilact® LX-5000, se prepararon yogures a partir de leche lactosa-hidrolizada al 100% utilizando Maxilact® LX-5000 y β -galactosidasa libre de proteasas y un control con leche sin hidrolizar. De los resultados obtenidos se llevaron a cabo cuatro análisis de varianza (ANOVA) para probar el efecto de los tratamientos sobre las variables: acidez, pH, viscosidad, acetaldehído y cuenta total y diferencial de los microorganismos iniciadores. Los datos correspondientes a las mediciones hechas de estas variables en la sexta hora de fermentación mostraron que hay efecto de los tratamientos sobre acidez a un nivel de significancia de 0.06, indicando por una prueba de Duncan que en el control se obtiene la mayor producción de ácido láctico, seguida de la leche hidrolizada con Maxilact® LX-5000 y por último la leche tratada con la β -galactosidasa. Esta misma prueba indica que la producción de ácido entre los yogures elaborados con leche hidrolizada bajo las dos condiciones, no presentan diferencias significativas. Por otra parte, no se encontró efecto de tratamientos sobre el resto de las variables (Tabla 10).

Contrariamente a lo reportado en la literatura en donde se establece que la hidrólisis previa de la lactosa presente en la leche favorece las características finales del yogurt y además incrementa la velocidad de producción de ácido (Guilliland y col. 1972; Thompson y Gyuricksec, 1974; O'Leary y Woychick, 1976b; Tamime, 1977), se encontró que la hidrólisis de la lactosa, previa a la elaboración del yogurt bajo las condiciones del experimento, no influyó para mejorar las características del producto final respecto al control. Tampoco se encontraron diferencias de los yogures elaborados con leche hidrolizada empleando el Maxilact® LX-5000 y la enzima purificada, ya que la cantidad de ácido producida en ambos yogures es la misma al igual que las demás variables medidas (Tabla 10). Esto podría sugerir que las proteasas presentes en el preparado comercial se encuentran en una concentración que no es suficientemente alta como para que el yogurt obtenido a partir de leche hidrolizada con Maxilact® LX-5000 mostrara diferencias respecto al yogurt elaborado con leche tratada con la enzima sin proteasas y, aun cuando estas enzimas pudieran estar hidrolizando las proteínas de leche, esta hidrólisis no estimuló a los microorganismos iniciadores para obtener una mayor producción de ácido o bien presentar cambios en las demás variables de respuesta (producción de acetaldehído, viscosidad, cuenta total y diferencial de los microorganismos).

Si la actividad proteolítica hubiera sido considerablemente mayor, es posible que la cantidad de acetaldehído producido en el yogurt elaborado con leche hidrolizada con Maxilact® LX-5000 incrementara su concentración final ya que la síntesis de este compuesto se realiza a través de la reacción de aminoácidos tales como valina, treonina y metionina (Tamime y Robinson, 1991). Asimismo, la hidrólisis intensiva de las proteínas ocasionada por las proteasas hubieran afectado la viscosidad del producto final y la estimulación del desarrollo de los microorganismos iniciadores, ambos fenómenos no fueron observados en este estudio bajo las condiciones empleadas. Por otro lado muchos autores (Guilliland y col. 1972; O'Leary y Woychick, 1976b, entre otros) atribuyen el incremento en la producción de ácido láctico a la disponibilidad de azúcares más simples en el medio y a que los microorganismos tienden a metabolizar más rápidamente la glucosa, misma que estimula la producción de ácido y que se refleja en un mayor crecimiento de los mismos. Es posible que, debido a que se hidrolizó el 100% de la lactosa presente en la leche, el metabolismo de los microorganismos iniciadores se viera afectado por no estar presente la lactosa, aun cuando existiera mayor disponibilidad de glucosa y galactosa en el medio, ya que tanto *S. thermophilus* como *L. bulgaricus*, carecen de un sistema de transporte específico para los monosacáridos (Zourari y col. 1992) reflejándose en una menor producción de ácido en el producto final respecto al control.

TABLA 10

Valores promedio y desviaciones estándar encontrados para cada una de las variables medidas en los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTO	CONTROL		MAXILACT® LX-5000		β- GALACTOSIDASA		Nivel de significancia (α)
	Media	Desv. Est.	Media	Desv. Est.	Media	Desv. Est.	
Acidez (%)	1.4	±0.04	0.99	±0.06	0.98	±0.06	0.0608**(S)
pH	4.34	±0.06	4.39	±0.10	4.40	±0.12	0.2304
Viscosidad(Cp)	2260	±142 8	1710	±270	1560	±508	0.1174
Acetaldehído (ppm)	8.00	±0.30	8.30	±0.10	7.30	±0.08	0.3910
Cuenta total m.o (UFC/ml) x 10 ⁸	7.5	±2.9	6.9	± 4.6	6.8	±1.7	0.3910
No. de <i>S. thermophilus</i> (UFC/ml)x10 ⁸	7.2	± 2.7	5.7	± 4.0	5.9	±1.9	0.9378
No. de <i>L. bulgaricus</i> (UFC/ml)x 10 ⁸	0.3	± 0.2	1.2	± 0.8	0.9	±0.6	0.1960

**** (S) Significativamente diferente.**
(DESV. EST) Desviación Estándar.

5.5 EFECTO DEL GRADO DE HIDROLISIS EN LA LECHE EN LA PRODUCCION DEL YOGURT.

Considerando los resultados anteriores en donde se observó que la hidrólisis al 100% de la lactosa en la leche no incrementó la producción de ácido láctico ni en los demás variables medidas respecto al control, se planteó un experimento para observar si el grado de hidrólisis estaba influyendo en el metabolismo de los microorganismos iniciadores y por tanto no era posible obtener mayor producción de ácido láctico respecto al control. Dado que la cantidad de enzima purificada no era la suficiente, se utilizó para la hidrólisis de la leche únicamente el extracto comercial. Se empleó leche sin hidrolizar (control), leche lactosa-hidrolizada al 100% (tratamiento m) y leche en la que se adicionó simultáneamente Maxilact® LX-5000 y los cultivos iniciadores (tratamiento s). Las variables medidas fueron pH y acidez.

Para comparar el comportamiento de la acidez y pH a través del tiempo en los tres tratamientos experimentales (c, m y s) se ajustaron modelos de regresión lineal, eligiéndose el modelo parabólico de la forma: $\text{acidez} = \alpha_1 + \beta_1 t^2 + \epsilon_i$ y $\text{pH} = \alpha_1 + \beta_1 t^2 + \epsilon_i$, por ser el que da una mejor explicabilidad para todos los tratamientos. Los modelos ajustados obtenidos de ambas variables para cada tratamiento son los indicados en la Tabla 11.

TABLA 11

Modelos ajustados obtenidos para acidez y pH para las cinéticas de fermentación bajo diferentes condiciones de hidrólisis

$\text{Acidez (c)} = 0.1399 + 0.01589t^2$
$\text{Acidez (m)} = 0.2012 + 0.0037t^2$
$\text{Acidez (s)} = 0.1663 + 0.91932 t^2$
$\text{pH(c)} = 6.3558 - 0.04739t^2$
$\text{pH(m)} = 6.1342 - 0.01301t^2$
$\text{pH(s)} = 6.3038 - 0.032279t^2$

Las gráficas respectivas de cada modelo se presentan en las Figura 14.

Se observó que en el caso de acidez, en el control se tiene una velocidad o pendiente mayor (0.61589) aunque el punto de arranque sea el más pequeño (0.1399). En el tratamiento m (hidrólisis al 100%) ocurrió lo contrario, la velocidad de cambio es la más pequeña de 0.00377 aunque su punto de arranque sea el mayor. Asimismo para el tratamiento s (hidrólisis simultánea a la fermentación) se

observó que la velocidad de desarrollo de ácido se encontró en un valor intermedio a los tratamientos c y m. Para los tres tratamientos la velocidad de producción de ácido láctico fué significativamente diferente. Lo que podría sugerir que el porcentaje de hidrólisis de la lactosa es determinante para el mejor desarrollo de los microorganismos, ya que como se observa en la Figura 14 la velocidad de producción de ácido láctico es menor cuando la hidrólisis de la lactosa es total y aumenta cuando la hidrólisis es simultánea a la fermentación. No obstante, el cultivo mixto de los microorganismos no parece ser estimulado por la hidrólisis sino por el contrario parece que existe una inhibición en la producción de ácido láctico por parte de los microorganismos iniciadores, lo anterior es posiblemente debido a las características de las cepas y a su metabolismo (Hemme y col. 1979; Zourari y col. 1992).

La misma metodología se siguió con los modelos ajustados para pH (Fig. 14), obteniéndose que no son paralelos, es decir sus pendientes son significativamente diferentes. Se trata de curvas distintas aunque en los modelos de pH para c y s las ordenadas al origen son significativamente iguales. Para pH se encontraron resultados similares a los de acidez, en donde el control resultó ser el que presentó la mayor velocidad en cuanto a la disminución de pH, seguido por el yogurt en donde se adicionó simultáneamente el Maxilact® LX-5000 y los cultivos iniciadores y finalmente el yogurt en donde se realizó una hidrólisis al 100%.

Tomando en consideración los resultados anteriormente obtenidos, se realizó un experimento en donde se realizó una hidrólisis de la lactosa de la leche al 70%, para estudiar el comportamiento de los microorganismos iniciadores respecto a la producción de ácido. Los resultados se presentan en la Figura 15. La producción de ácido láctico nuevamente fue mayor en el control, aun cuando hubo una producción ligeramente mayor comparada con el yogurt en el que se adicionó la lactasa simultáneamente al medio de fermentación. Lo anterior corrobora la hipótesis de que a diferentes porcentajes de hidrólisis de la lactosa presente en la leche destinada a la elaboración del yogurt, la producción de ácido puede ser estimulada, aun cuando en este caso en todos los yogures preparados con leche lactosa hidrolizada la producción de ácido láctico fue menor respecto al yogurt control. Esto puede deberse a que *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* presentan preferencia por la lactosa y además el transporte de la glucosa y galactosa es más lento ya que presentan limitaciones en el transporte de estos monosacáridos. Por otra parte una gran cantidad de galactosa y glucosa en el medio inhibe el transporte de la lactosa en ambos microorganismos (Zourari y col. 1992).

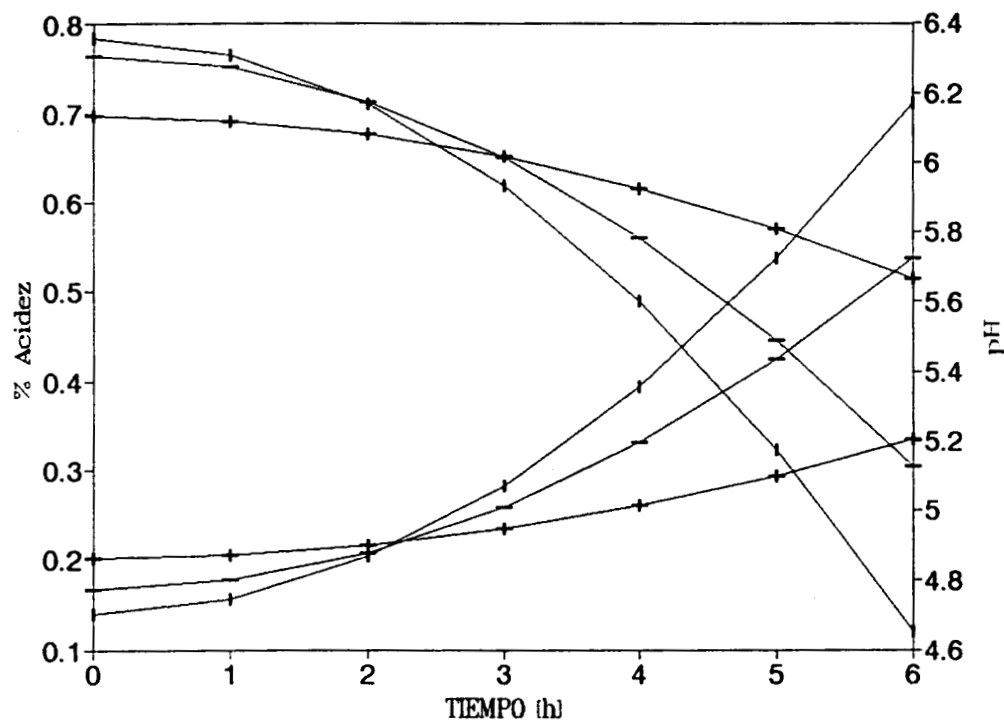


FIGURA 14. Desarrollo de acidez y pH durante la fermentación de yogurt bajo diferentes condiciones de hidrólisis. (—+—)Control; (---+---)Hidrólisis al 100%; (—) adición simultánea de Maxilact® LX-5000 y cultivos iniciadores.

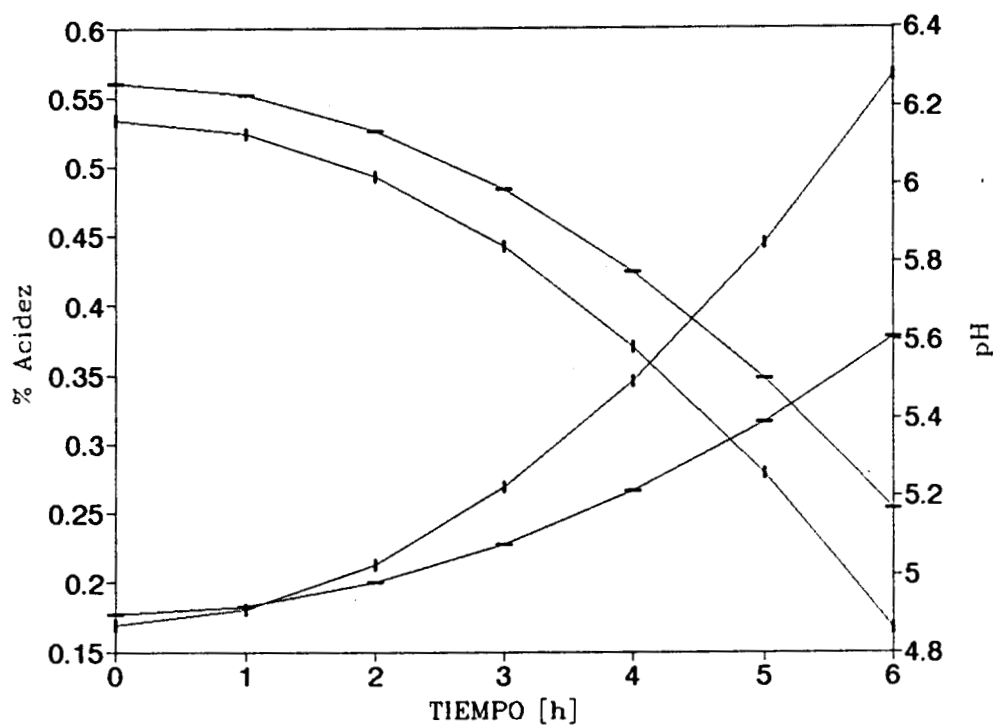


FIGURA 15. Desarrollo de acidez y pH durante la fermentación de yogurt considerando el 70% de hidrólisis. (+)Control; (—)Hidrólisis al 70%.

Los resultados encontrados difieren a lo reportado por Guilliland y col. 1972, Thompson y Gyuricsek, 1974 y O'Leary y Woychik, 1976a y b, entre otros. Estos autores reportan que la hidrólisis de la lactosa estimula el desarrollo de ácido láctico y en algunos casos el crecimiento de los microorganismo. Si se toma en consideración el tipo de tratamiento que estos autores realizaron al llevar a cabo la hidrólisis de la lactosa en la leche y además la naturaleza del preparado comercial y su grado de pureza, es posible que esta estimulación se debiera a la presencia de actividad proteolítica contaminante (Marschke y col. 1980; Olano y col. 1983) que estimulara a los microorganismos iniciadores o bien también debido a las características de los microorganismos utilizados.

6. CONCLUSIONES

La actividad proteolítica detectada en el preparado Maxilact® LX-5000 fue de 0.2830 UE/ml.

Mediante filtración en gel se encontró en el Maxilact® LX-5000 la presencia de al menos dos proteasas cuyo peso molecular es de 59000 y 11000Da. El peso molecular estimado para la lactasa, fue de 175000Da.

El resultado de la cromatografía de intercambio iónico indicó que es posible separar la lactasa de las proteasas contaminantes empleando un gradiente lineal de NaCl (0-0.5N).

El patrón electroforético sugirió la presencia de una proteasa con un peso molecular de 51560Da, no obstante, se encontraron bandas de proteínas con un peso molecular comprendido entre 44700 y 20000Da, las cuales podrían también ser proteasas que eluyeran en una fuerza iónica muy próxima o impurezas resultantes de la purificación. Respecto a la lactasa se encontró que es una enzima constituida por diferentes subunidades que oscilan entre 43000 y 63000 Da.

Mediante ESMS (espectrofotometría de masas por electroaspersión) fue posible determinar el peso molecular de los componentes del Maxilact® LX-5000; aunque fue difícil diferenciar si corresponden a subunidades de lactasa, proteasas o bien cualquier otra proteína contaminante, debido a que en el extracto están presentes muchas impurezas.

El análisis de la lactasa parcialmente purificada por ESMS reveló la presencia de diferentes componentes; los que se encontraron en mayor concentración presentan un peso molecular de 66371, 50929, 47379 y 44619 Da los cuales pueden ser subunidades de la enzima. Estos resultados fueron semejantes a los determinados por electroforesis.

Mediante el análisis realizado a las proteasas por ESMS, se encontró la presencia de diferentes componentes en la muestra, los pesos moleculares semejantes a los determinados por filtración en gel y electroforesis.

Se determinó el efecto de la temperatura en la velocidad de desnaturalización de la lactasa y proteasas contaminantes en el preparado comercial. Se encontró que la velocidad de desnaturalización de la lactasa en el preparado comercial es más lenta que la de las proteasas contaminantes. La temperatura óptima fue de 30°C y su energía de activación de 6.90 kcal/mol. Por otra parte la actividad proteolítica mostró una temperatura óptima de 40°C y una energía de activación de 10.44 kcal/mol y mostraron baja estabilidad a temperaturas superiores a 50°C. Lo anterior puede permitir minimizar los efectos que pueden presentarse en la leche debido a esta actividad proteolítica presente en el preparado comercial, lo que puede conducir a repercusiones desfavorables en su aplicación en productos lácteos.

Se encontró que bajo las condiciones del experimento los yogures preparados con leche lactosa hidrolizada al 100% utilizando el preparado comercial de lactasa, y además utilizando β -galactosidasa libre de proteasas no presentaron diferencias en cuanto a la producción de ácido láctico y las demás variables medidas las cuales fueron pH, viscosidad, producción de acetaldehído, cuenta total y diferencial de los microorganismos. Esto nos conduce a plantear que la actividad proteolítica no fue suficiente como para modificar las características físico-químicas del yogurt y presentar efectos adversos o favorables.

La hidrólisis total de la lactosa en la leche utilizada en la elaboración del yogurt puede disminuir la producción de ácido láctico y modificar las características metabólicas de los microorganismos dependiendo de la naturaleza de éstos. Se encontró que el yogurt elaborado con leche sin hidrolizar presentó mayor producción de ácido láctico que los yogures elaborados con leche lactosa hidrolizada, aun cuando en el medio se encontraban presentes la glucosa y galactosa resultantes de la hidrólisis. Los microorganismos iniciadores no fueron capaces de utilizar éstos azúcares más eficientemente probablemente por carecer de un transporte específico para éstos monosacáridos. Por otra parte, es posible que debido a la concentración de los monosacáridos se presentara una inhibición y como consecuencia la producción de ácido láctico fuera menor. Cuando la hidrólisis de la lactosa en la leche fue simultánea a la fermentación, se observó una mayor producción de ácido láctico lo que corrobora la hipótesis anterior. Un comportamiento similar se encontró cuando la hidrólisis de la lactosa fue al 70%.

7. RECOMENDACIONES

Primeramente sería muy importante terminar con el proceso de purificación de la lactasa y con ello establecer el número de subunidades que la constituyen y otras de sus características moleculares. Se cuentan con las técnicas establecidas de separación y mediante cromatografía de alta resolución (HPLC) es posible purificar en su totalidad la lactasa del Maxilact® LX-5000, lo que aportaría información básica para estudios futuros.

En cuanto al efecto de la hidrólisis de lactosa en leche para la producción de yogurt, considero relevante realizar barridos experimentales empleando mayores concentraciones del preparado comercial. Al emplear mayores concentraciones de Maxilact® LX-5000, se incrementa la concentración de enzimas proteolíticas y el tiempo de hidrólisis se modifica, esto permitiría observar bajo condiciones diferentes si existen cambios en el producto debido a la presencia de actividad proteolítica contaminante en el Maxilact® LX-5000. Paralelamente se puede realizar el mismo experimento utilizando un preparado comercial de menor pureza, es decir con una actividad proteolítica contaminante mayor y comparar los efectos.

Una vez establecida la concentración de Maxilact® en donde se observara algún cambio en el producto final, sería muy interesante variar la temperatura de hidrólisis de manera que se trabajara en diferentes intervalos y comparar lo que ocurre en el yogurt, cuando se hidroliza la leche a temperaturas en las que la actividad proteolítica es máxima.

Dado que el efecto de hidrólisis de la lactosa en el incremento de la velocidad de producción de ácido láctico y estimulación de microorganismos iniciadores, es atribuido principalmente, a la disponibilidad de azúcares más simples y fácilmente digeribles, sería interesante estudiar el efecto de los microorganismos iniciadores en medios en donde únicamente se tenga uno de los monosacáridos, glucosa o galactosa, comparado con uno en donde existiera hidrólisis parcial y un control en donde la lactosa estuviera presente, de esta manera sería posible estudiar como influye el transporte de los monosacáridos en la producción de ácido láctico.

Por otro lado sería interesante estudiar el efecto de la hidrólisis de la lactosa de la leche destinada a la elaboración de yogurt, en diferentes cepas de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, para observar el comportamiento de cada una bajo diferentes condiciones de hidrólisis.

Dado que se ha reportado que en quesos existe un incremento en la proteólisis y como consecuencia una disminución en el tiempo requerido para la maduración de los mismos, cuando la lactosa de la leche es hidrolizada, sería interesante comparar el efecto de la hidrólisis en los microorganismos participantes de la maduración del queso con los del yogurt y establecer diferencias en su metabolismo respecto a la utilización de los monosacáridos resultantes de la hidrólisis.

8. BIBLIOGRAFIA

Alatorre, B., García-Garibay, M. y Gómez, R.L. 1993. Determinación de actividad proteolítica en lactasa comercial y II Congreso Latino Americano y del Caribe. XXIV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (México). R. 131.

Andrews, P. 1964. Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel-filtration. *Biochem. J.* 91:222-233.

Broome, M.C., Roginski, H. y Hickey, M.W. 1983. The enzymic hydrolysis of lactose in skim milk yoghurt. *Aust. J. Dairy Technol.* 38:35-37.

Cardwell, J.T., y Prombutara. 1976. Effect of partial hydrolysis of lactose on quality of certain dairy products. *J. Dairy Sci.* 59:26-27.

Dariani, D.N, Frank, J.F., y Loewenstein, M. 1982. Manufacture of low lactose yogurt by simultaneous lactose hydrolysis and bacterial fermentation. *Cult. Dairy Prod. J.* 17(2):18-19, 22.

Dickson, R.C., Dickson, L.R. y Markin J.S. 1979. Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* 137(1):51-61.

Dumont, J.P. y Adda, J. 1973. Méthode rapide [d'étide] des composés très volatils de l'arôme des produits laitiers. Application au yoghurt. *Lait* 53:12-22.

Dutta, S.M., R.K. Kvila, B. Ranganthan. 1971. Effect of different heat treatments of milk on acid and flavour production by five single strain cultures. *Milchwissenschaft.* 28:231-233.

Engel, W.G. 1973. The use of lactase to sweeten yogurt without increasing calories. *Cult. Dairy Prod. J.* 8(3):6-7.

García-Garibay, M. 1986. Yogurt. Aspectos microbiológicos y de elaboración. *Tecnol. Aliment. (México).* 21(6):5, 6, 9, 10, 12-14.

García-Garibay, M. 1992. Recuperación de enzimas intracelulares de interés industrial β -galactosidasa de levadura. *Ciencia.* 43:23-33.

García-Garibay, M., Torres, J., López-Munguia, Canales, A. y Casas, L.T. 1987. Influence of the oxygen transfer rate on the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.*, 9, 417-420.

Geisow, M.J. y Green, B.N. 1990. An Introduction to protein electrospray mass spectrometry. *Biospec Bulletin* No. 1. Fisons Instruments. VG Biotech. United Kingdom.

Gooda, E., Bednarski, W., Kunciewicz, A., Poznanski, S. y Cudna, Z. 1980. Use of β -galactosidase in intensification of cheddar cheese ripening. *Dairy Sci. Abstr.* 43:5538.

Gooda, E., Bednarski, W., Kunciewicz, A., Poznanski, S. y Kowalewska, J. 1982. Increasing hydrolysis during the manufacture of cheddar cheese. *Dairy Sci. Abstr.* 45:8099.

Gooda, E., Bednarski, W. y Poznanski, S. 1983. The protein degradation in cheddar cheese manufactured from milk treated with lactase. *Milchwissenschaft*. 38:83-86.

Grieve, P.A., Kitchen, B.J. y Dulley, J.R. 1983. Partial characterization of cheese-ripening proteinases produced by the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Dairy Res.* 50:469-480.

Guilliland, S.E., Speck, M.L., y Woodward, J.R. Jr. 1972. Stimulation of lactic streptococci in milk by β -galactosidase. *Appl. Microbiol.* 23(1):21-25.

Gyuricsek, D.M., y Thompson, M.P. 1976. Hydrolyzed lactose cultured dairy products. II. Manufacture of yoghurt, buttermilk and cottage cheese. *Cult. Dairy Prod. J.* 11(3):12-13.

Hata, T., Hayashi, R. y Doi, E. 1967. Purification of yeast proteinases. Part Y: Fractionation and some properties of the proteinases. *Agr. Biol. Chem.* 31:150-159.

Hemme D., Vassal, L., Foyen, H. y Auclair, J. 1979. Effet de l'addition de lactase au lait sur le développement des lactobacilles et des streptocoques thermophiles. *Lait* 589:597-614.

Hilgendorf, M.J. 1981. Optimization of fungal lactase levels in yogurt manufacturing. *Cult. Dairy Prod. J.* 16(1):5-7.

Holsinger, V.H. 1978. Lactose-modified milk and whey. *Food Technol.* 32(3):35-36, 38 y 40.

Holsinger, V.H. y Kligerman, A.E. 1991. Applications of lactase in dairy foods and other foods containing lactose. Food Tech. 45(1):93-95.

Houst, S.S. 1988. Lactose intolerance. Food Technol. 42(3):110

Hull, M.E. 1947. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. J. Dairy Sci. 30:881-884.

Kosikowski, F.V. 1977. Cheese and fermented milk foods. 2a. Ed. F.V. Kosikowski and Associates. Brooktondale.

Kroger, M. 1976. Quality of yogurt. J. Dairy Sci. 59(2):344-350.

Kroger, M. 1989. Food misinformation in major reference works: setting the record straight on yogurt. Food Technol. 43(6):63-67.

Labuschagne, J.H y Nieuwoudt. 1978. Shortening of cheddar cheese manufactured by (i) elimination of the cheddaring process and (ii) the addition of beta-galactosidase. Dairy Sci. Abstr. 41:72.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.

Lenney, J.F. y Dalbec, J.M. 1969. Yeast proteinase B: identification of the inactive form as an enzyme inhibitor complex. Arch. Biochem. Biophys. 129:407-409.

Lowry, O.R., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Mahoney, R.R. 1980. Number and nature of the sulphydryl groups of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. J. Food Biochem. 4:189-199.

Mahoney, R.R. 1985. Modification of lactose-containing dairy products with β -galactosidase. En Developments in Dairy Chemistry-3. P.F., Fox (De) Elsevier, Londres.

Mahoney, R.R., Nickerson, T.A. y Whitaker, J.R. 1975. Selection of strain, growth conditions, and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. J. Dairy Sci. 58(11):1620-1629.

Mahoney, R.R. y Whitaker, J.R. 1977. Stability and enzymatic properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. J. Food Biochem. 1:327-350.

Mahoney, R.R. y Whitaker, J.R. 1978. Purification and physicochemical properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. J. Food Sci. 43:584-591.

Marschke, R.J., y Dulley, J.R. 1978. The effect of partial lactose hydrolysis on the manufacture and ripening of cheddar cheese. Aust. J. Dairy Technol. 33:139-142.

Marschke, R.J., Nickerson, D.E.J., Jarrett, W.D., y Dulley, J.R. 1980. A cause of increased proteolysis in cheddar cheese manufactured from milk containing added Maxilact. Aust. J. Dairy Technol. 35:84-88.

Marshall, V.M.E. 1987. Fermented milk and their future trends. I. Microbiological aspects. J. Dairy Res. 54:559-574.

Matalon, M.E. y Sandine W.E. 1986. Improved media for differentiation of rods and cocci in yogurt. J Dairy Sci 69:2569-2576.

Martínez-Garza, A. y Castillo-Morales, A. 1987. Regresión simple. En Teoría de la regresión. Taller de impresión del Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. pp:53-141.

Meusdsdoerffer, F., Tortora, P. y Holzer, H. 1980. Purification and properties of proteinase A from yeast. J. Biol. Chem. 255:12087-12093.

Miller, J.H. 1972. En Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 352.

Mittal, S.B., Newell, G., Hourigan, J.A. y Zadow, J.G. 1991. The effect of protease contamination in lactase on the flavour of lactose-hydrolyzed milks. Aust J. Dairy Technol. 46(1):46-47.

Nijpels, H.H. 1981. Lactases and their applications. En Enzymes and Food Processing. G.G. Birch, N. Blakebrough y K.J. Parker (Ed.) Applied Science Publishers. pp 89-104.

O'Leary, V.S. y Woychik, J.H. 1976a. Utilization of lactose, glucose, and galactose by a mixed cultured of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk treated with lactase enzyme. Appl Environ. Microbiol. 32(1):89-94.

O'Leary, V.S. y Woychik, J.H. 1976b. A comparison of some chemical properties of yogurts made from control and lactase-treated milks. J. Food Sci. 41:791-793.

-Olano, A., Ramos, M., y Martínez-Castro, I. 1983. Enzymatic activities of Maxilact. Food Chem. 10(1):57-67.

Ponce, E., Linfort, R., Hall, M., Guerrero, I. y Taylor, A.J. 1993. Potential of pigments in model systems and cooked meat. *Meat Sci.* 38:141-151.

Reed, G. y Pepler, H.J. 1973. *Yeast Technology*. AVI. Westport.

Rhida, S.H., Crawford, R.J.M. y Tamime, A.Y. 1983. The quality of cheddar cheese produced from lactose hydrolyzed milk. *Dairy Ind. Int.* 48:17:31.

Rhida, S.H., Crawford, R.J.M. y Tamime, A.Y. 1984. Comparative studies of casein breakdown in cheddar cheese manufactured from lactose hydrolyzed milk. *J. Food Prot.* 47:381-387.

Robinson, R.K. y Tamime, A.Y. 1975. Yoghurt. A review of the product and its manufacture. *J. Soc. Dairy Technol.* 28(3):149-163.

Sahki, T. y Holzer, H. 1974. Comparisons of the tryptophan synthase inactivating enzymes with proteinase from yeast. *Europ. J Biochem.* 42:621-626.

Sas, Institute. 1986. *SAS User's Guide*. Sas Institute. Cary, N.C.

Smith, K.E. y Bradley, R. L. Jr. 1984. Acceptance of yogurt made with and without lactose hydrolysis. *Cult. Dairy Prod. J.* 19(4):31, 33, 35-37.

Steel, R.G.D. y Torrie, J.H. 1988. En *Bioestadística: principios y procedimientos*. (Ed.) McGraw Hill. México. pp 622-630.

Tamime, A.Y. 1977. The behaviour of different starter cultures during the manufacture of yogurt from hydrolysed milk. *Dairy Ind. Intl.* 42(8):7-11.

Tamime, A.Y. 1978. The production of yogurt & concentrated yogurt from hydrolysed milk. *Cult. Dairy Prod. J.* 13(3): 16-21

Tamime, A.Y., y Deeth, H.C. 1980. Yogurt: Technology and Biochemistry. *J. Food Prot.* 43:939-977.

Tamime, A.Y. y Robinson, R.K. 1991. En *Yogur, Ciencia y Tecnología*. Ed. Acribia, España.

Thakar, P.N., Vyas, S.H. y Upadhyay, K.G. 1987. Lactase-treated milk in the manufacture of cheddar cheese and acceleration of cheese ripening. A Review. *Cult. Dairy Prod. J.* 22(3):20-21.

Thakar, P.N., Vyas, S.H., Prajapati, P.I., Miyani, R.V. y Upadhyay, K.G. 1992. Lactose prehydrolysis of buffalo milk with β -galactosidase in order to accelerate ripening of cheddar cheese. II. Ripening of cheddar cheese. *Cult. Dairy Prod. J.* 27(2):6-9.

Thompson, M.P. y Brower, D.P. 1974. Manufactured of cheddar cheese from hydrolyzed lactose milks. *J. Dairy Sci.* 57(5):598.

Thompson, M.P. y Gyuricsek, D.M. 1974. Manufacture of yogurt, buttermilk, and cottage cheese from hydrolyzed lactose milks. *J. Dairy Sci.* 57(5):584.

Uwajima, T., Yagi, H. y Terada, O. 1972. Purification, crystallization and some properties of β -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. *Agr. Biol. Chem.* 36: 570-577.

Vedamuthu, E.R. 1978. Natural (unhydrolyzed) milk versus lactose-hydrolyzed milk for cultured dairy products: physiological and practical implications for the starter industry. *J. Food Protection.* 41(8):654-659.

Whitaker, J.R.: 1994. Effect of temperature on rates of enzyme-catalyzed reactions. *En Principles of enzymology for the food science.* J. R. Whitaker (De.) Marcel Dekker, Inc., N: Y: pp:301-328.

Weaver, J.C., y Kroger, M. 1978. Free amino acid and rheological measurements on hydrolyzed lactose cheddar cheese during ripening. *J. Food Sci.* 43:579-583.

Woodward, G.J. y Kosikowski, F.V. 1975. Manufacture of cheddar cheese from milk with added glucose and from hydrolyzed lactose milk. *J. Dairy Sci.* 58(5):792.

Zourari, A., Accolas, J.P. y Desmazeaud, M.J. 1992. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria, a review. *Lait.* 71:1-34.