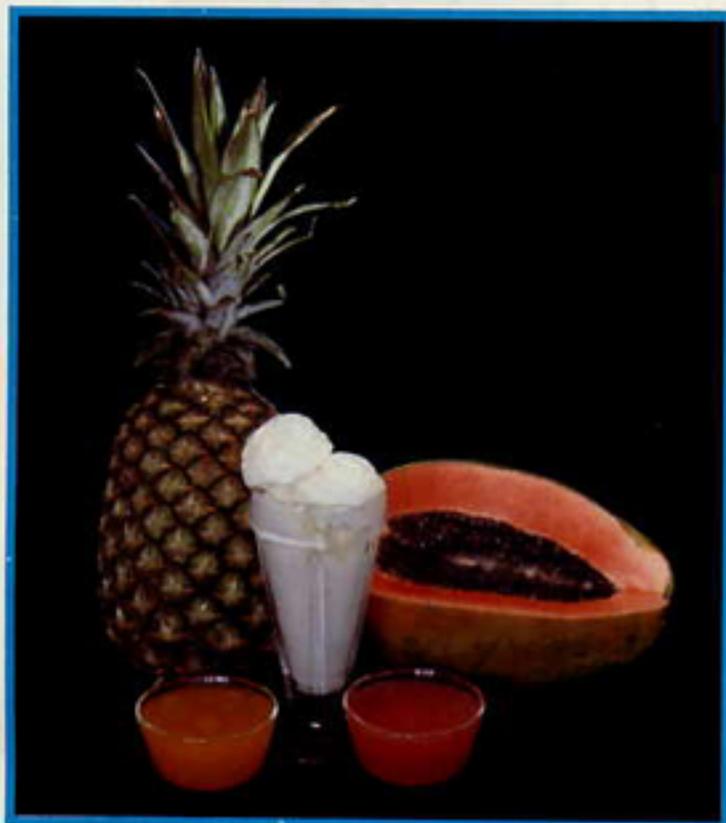


REVITECA

Revista en
Tecnología
y Ciencia
Alimentaria

Publicación Anual del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos * Volumen 4 - 1995 *

Alternativas de aprovechamiento de los almíbares residuales de la deshidratación osmótica de frutas (II): elaboración de coberturas



Evaluación de tres tipos de soportes para la inmovilización de lactasa (β -Galactosidasa)

Se investigó el empleo de tres tipos de polímeros naturales como soportes de la enzima β -galactosidasa de la levadura *Kluyveromyces fragilis*, para la preparación de leche deslactosada a baja temperatura (5 °C). La enzima se inmovilizó en perlas de alginato y de carragenina, y en discos de agar (12%). Se analizó el efecto de la concentración de enzima inmovilizada en agar sobre la hidrólisis de la lactosa (4,8 - 7,2 - 9,6 - 12%), y se realizó un estudio para determinar la estabilidad de la enzima.

Obtención de jugo clarificado de banano en el nivel de planta piloto

Para su implementación en el nivel de planta piloto fue necesario optimizar las etapas de escaldado, molienda y las condiciones de acción de la enzima. Se definió el proceso de extracción mecánica y se realizó un estudio de estabilidad del producto en condiciones ambientales (20-22 °C). Se analizó el jugo desde el punto de vista químico, microbiológico y sensorial, durante un período de diez meses.

Utilización del banano en la elaboración de mezclas de jugos, néctar de frutas y concentrado

La mezcla de jugo clarificado de banano con jugos de otras frutas tropicales, la elaboración de un néctar y la concentración del jugo para la obtención de una miel, fueron las tres alternativas que se analizaron en este estudio para la utilización del banano de rechazo y como medio de utilizar el jugo clarificado.

Un método par evaluar cuantitativamente las condiciones sanitarias de supermercados

El objetivo de esta investigación, fue establecer un método válido para la evaluación sanitaria cuantitativa de los supermercados a nivel nacional. Para tal efecto, de una población de 210 supermercados, se seleccionó una muestra aleatoria al azar de 148 i16 ubicados en zonas urbanas y 32 en zonas rurales.

Revista Anual publicada por el
Centro Nacional de Ciencia y
Tecnología de Alimentos

Director del CITA
Luis Fernando Arias Molina

Editor
Ricardo Quirós Castro

Consejo Editorial
Ing. Luis Fernando Arias Molina
Ing. Fernando Aguilar Villarreal
Ana Ruth Bonilla Leiva, Ph. D.
Lic. Vera García Cortés

Diagramación
Jeanina García Ureña

Diseño de Portada
Ricardo Quirós Castro

La responsabilidad de los trabajos firmados es de
sus autores y no del CITA, excepto cuando se
indique expresamente lo contrario.

La mención de cualquier empresa o
procedimiento patentado, no supone su
aprobación por parte del CITA.

Los artículos incluidos en REVITECA pueden
reproducirse libremente siempre y cuando se
haga mención expresa de su procedencia y se
envíe copia al Consejo Editorial.

Correspondencia por canje y suscripciones (\$10)
Universidad de Costa Rica - Centro Nacional
de Ciencia y Tecnología de Alimentos
REVITECA
San José - Costa Rica
Telex UNICORI 2544
Tels. 207-3067 / 207-3031 / 207-3057 / 207-4212 / 207-4701

La presente edición de REVITECA es patrocinada
por la Fundación para la Investigación
Agroindustrial Alimentaria (FIAA).

Evaluación de tres tipos de soportes para la
inmovilización de lactasa (β -galactosidasa) 1

Marilé García Vargas
Ana Ruth Bonilla Leiva

Obtención de jugo clarificado de banano en el
nivel de planta piloto 10

Floribeth Víquez Rodríguez

Alternativas de aprovechamiento de los almíbaros
residuales de la deshidratación osmótica de
frutas (II): elaboración de coberturas 16

Ana María Rodríguez Sibaja
Ana Cecilia Segreda Rodríguez

Utilización del banano en la elaboración de
mezclas de jugos, néctar de frutas y concentrado 23

Floribeth Víquez Rodríguez

Un método para evaluar cualitativamente las
condiciones sanitarias de supermercados 30

Eugenie Rivera Valle

EVALUACION DE TRES TIPOS DE SOPORTES PARA LA INMOVILIZACION DE LACTASA (β -GALACTOSIDASA)

Marilé GARCÍA-VARGAS, Ana Ruth BONILLA-LEIVA*

ABSTRACT

EVALUATION OF THREE TYPES OF MATRIX FOR THE IMMOBILIZATION OF LACTASE (β -GALACTOSIDASE)

Three types of natural polymers were evaluated as matrices for the immobilization of the enzyme β -galactosidase (from *Kluyveromyces fragilis*), to produce (at low temperature, 5 °C) milk with low lactose concentration. The enzyme was immobilized as beads in alginate and carrageenan, and as discs in agar. The effect of the concentration of the enzyme (4,8; 7,2; 9,6 & 12%) in the agar on lactose hydrolysis was studied. The stability of the immobilized enzyme during continuous use was analyzed.

The enzyme, immobilized in the three supports, produced partial as well as total hydrolysis of lactose. However, the enzyme immobilized in agar produced a significantly ($p < 0,05$) higher hydrolysis than did the enzyme immobilized in the other supports. There was not a significant difference ($p > 0,05$) between hydrolysis using enzyme immobilized in alginate or in carrageenan. Enzyme immobilized in agar at a concentration of 12% produced 100% hydrolysis in 24 h. The system was used repeatedly 7 times without any significant change ($p > 0,05$) in the hydrolysis percentage and without increase in microbial counts.

RESUMEN

Se investigó el empleo de tres tipos de polímeros naturales como soportes de la enzima β -galactosidasa de la levadura *Kluyveromyces fragilis*, para la preparación de leche deslactosada a baja temperatura (5 °C). La enzima se inmovilizó en perlas de alginato y de carragenina, y en discos de agar (12%). Se analizó el efecto de la concentración de enzima inmovilizada en agar sobre la hidrólisis de la lactosa (4,8 - 7,2 - 9,6 - 12%), y se realizó un estudio para determinar la estabilidad de la enzima durante su uso continuo.

Se encontró que es posible obtener leche parcial o totalmente deslactosada, utilizando lactasa inmovilizada en los tres tipos de soportes y que los porcentajes de hidrólisis de lactosa, al utilizar agar como soporte, son significativamente mayores ($p < 0,05$) que los obtenidos con alginato o carragenina, mientras que entre estos dos últimos no existe diferencia significativa.

Se determinó que se puede obtener un 100% de hidrólisis en 24 h utilizando un 12% de lactasa inmovilizada en agar. Este sistema se pudo reutilizar siete veces sin cambio significativo ($p > 0,05$) en el porcentaje de hidrólisis y sin aumento en la carga microbiana.

INTRODUCCION

La leche es un alimento muy nutritivo y completo, ya que constituye una fuente importante de proteínas, carbohidratos y grasas, así como de otros componentes menores (vitaminas y minerales). La lactosa, el carbohidrato que se encuentra en mayor proporción en la leche (3,5-6,0%), debe descomponerse en sus monosacáridos respectivos, glucosa y galactosa, para ser digerido. Este proceso se lleva a cabo mediante la lactasa intestinal (β -galactosidasa) (Houts, 1988; Cifuentes *et al.*, 1985). Sin embargo, la producción de esta enzima

* Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos

disminuye en las personas a partir del destete hasta alcanzar magnitudes muy bajas en el estado adulto, por lo que es posible observar que la capacidad para digerir lactosa desciende paralelamente. A esta situación se le conoce como «deficiencia primaria de lactasa intestinal de tipo adulto» (Houts, 1988; Cifuentes *et al.*, 1985).

Un porcentaje variable de individuos portadores de esta característica (30-95%) manifiestan síntomas y molestias gastrointestinales, tales como cólico abdominal, flatulencia, meteorismo y diarrea, después de la ingestión de leche y productos lácteos (Houts, 1988; Rosado *et al.*, 1987). Esta es una condición muy frecuente en la mayoría de la población mundial, excluyendo los países del noroeste de Europa y poblaciones aisladas en el Mediterráneo y el Cercano Este, Africa y el subcontinente de la India (Houts, 1988).

Estudios realizados en varias poblaciones de Africa, Asia, América Latina y Estados Unidos, indican que una proporción elevada de adultos, que puede llegar al 70-90%, presenta este problema. En México, diversos investigadores han encontrado baja actividad de lactasa en el 80% de la población indígena (Cifuentes *et al.*, 1985).

En países del Tercer Mundo como Perú, Tailandia y Uganda, aproximadamente el 25% de la población presenta una actividad enzimática deficiente a los dos años de edad, y a los cinco años, casi el 50% de los niños estudiados son incapaces de absorber adecuadamente la lactosa (Paige *et al.*, 1979).

En Costa Rica no se encontraron publicaciones que den una idea de la magnitud del problema, sin embargo, existen indicios de la presencia de este fenómeno en la población.

Por lo tanto, aunque la leche y sus derivados contribuyen con diversos nutrimentos en la dieta de niños y adultos, la presencia de un bajo nivel de lactasa impide el óptimo aprovechamiento de los mismos. Esta es la razón principal por la que se han evaluado diversos métodos con el fin de extraer o modificar la lactosa en la leche sin perder su valor nutritivo, siendo la hidrólisis enzimática por medio de β -galactosidasa, el procedimiento más utilizado en la

actualidad. Tradicionalmente, la fuente microbiana más usada es *Kluyveromyces fragilis*, cuya enzima presenta actividad aún a baja temperatura (5 °C) (Pastore *et al.*, 1974; Kosikowski y Wierzbicki, 1973).

En la mayoría de las aplicaciones industriales, las enzimas son utilizadas en su estado soluble, lo cual tiene como resultado su pérdida una vez que ha sido empleada. Debido al alto costo que esto implica, se han desarrollado técnicas que permiten inmovilizar las enzimas en soportes inertes, lográndose retener un porcentaje considerable de la actividad catalítica original (Hultin, 1983). El uso de lactasa inmovilizada para hidrolizar lactosa en leche y productos lácteos, ha sido objeto de numerosos estudios (Brena *et al.*, 1994; Pinsiroadom *et al.*, 1993; Shul'chishin *et al.*, 1993; Mann y Thompkinson, 1988).

Una técnica de inmovilización muy utilizada por su relativa sencillez es la inclusión, en la cual la enzima es atrapada físicamente dentro de una matriz porosa. Esta técnica es económica y se utiliza para inmovilizar células productoras de enzimas (Gobbetti y Rossi, 1994; Zayed y Zahran, 1991; Sola *et al.*, 1991), y enzimas (Tae Gwan Park y Hoffman, 1993; Axelsson y Zacchi, 1991). Los materiales usados con más frecuencia para esta aplicación son los hidrocoloides, como los geles naturales (alginato, carragenina, agar, agarosa) o los polímeros sintéticos (poliacrilamida).

La inmovilización de la lactasa en discos de agar no ha sido reportada con anterioridad, pero una técnica similar utilizando cubos de carragenina fue empleada por Tosa *et al.* (1979), para inmovilizar células vivas de diversos microorganismos y enzimas purificadas, con resultados satisfactorios. Este procedimiento de inmovilización tiene la ventaja de que no requiere de un agente químico para obtener el gel, el cual podría afectar la estructura de la enzima (Tosa *et al.*, 1979).

A través de este estudio se evaluó la hidrólisis de la lactosa en la leche por medio de lactasa (β -galactosidasa) inmovilizada en tres tipos de soportes: alginato, carragenina y agar.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó leche reconstituida al 15% de sólidos lácteos, preparada a partir de agua destilada estéril y leche en polvo descremada tipo "low heat", de un solo lote de fabricación. La leche se preparó con agua a 50 °C utilizando una mezcladora Silverson y un tiempo de mezclado de 5 min/L. Se mantuvo a 50 °C durante 15 min, se pasteurizó a 85 °C por 30 min y se almacenó en refrigeración a 5 °C hasta su uso.

Caracterización química de la leche

Se realizó el análisis por duplicado de cuatro muestras de leche por medio de los siguientes métodos: - Lactosa, sólidos totales, materia grasa y proteína: métodos No. 16.082, 16.084, 16.086 y 16.087 del AOAC (1980) y utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo (Milko Scan 133). - Acidez: mediante una titulación directa, según el método No. 16.023 del AOAC (1980); los resultados se expresaron como porcentaje de ácido láctico. - pH: con un medidor de pH digital (Orion Research, modelo 601A).

Determinación del porcentaje de hidrólisis de la lactosa

Se siguió el procedimiento descrito por Jeon y Bassette (1982), basado en el método crioscópico que consiste en determinar el punto de congelación de la leche. Esta medición se realizó con un crioscopio Fiske (Fiske Associates, modelo MS). Los resultados se expresaron en milésimas de grado Horvet y se correlacionaron con el porcentaje de hidrólisis mediante una curva patrón. Esta curva se preparó según el procedimiento descrito en la ficha técnica de "Maxilact" (Gist Brocades nV), modificando la concentración de lactasa soluble (0,7% v/v) usada en la preparación de la leche 100% hidrolizada, así como el tiempo y la temperatura de incubación (6 h a 40 °C). Se realizó la corrección por la presencia de material disuelto en la preparación enzimática. Las muestras de leche se diluyeron con agua destilada estéril en una proporción 2:3 (leche:agua) para determinar el punto de congelación.

Inmovilización de la lactasa

Todos los procedimientos que se describen a continuación, se efectuaron en una cámara de flujo laminar y se utilizó equipo estéril.

Alginato de calcio

Se siguió el procedimiento descrito por Rao *et al.* (1988), sustituyendo las células por enzima purificada, variando la concentración de la solución de alginato de sodio y el tiempo de reposo en la solución de CaCl₂. Se utilizó una solución de alginato de sodio BDH (British Drug Houses Ltd., England) con una concentración final en las perlas del 3%, la cual se preparó con agua destilada estéril y se calentó en ebullición por 3 min. Se utilizó lactasa comercial de *Kluyveromyces fragilis* (Lactozym 3000 LAU1/mL, tipo HP, Novo Industri A/S, Dinamarca) y se adicionó un 12% a la solución de alginato fría. Esta mezcla se agitó por 1 min y se dejó caer gota a gota en una solución estéril de CaCl₂ al 1%, utilizando una bomba peristáltica con una manguera de 2,5 mm de diámetro. Las perlas se mantuvieron en reposo por 30 min en la solución de CaCl₂, luego se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se dejaron en leche a 5 °C por 36 h con agitación (150 rpm). Se prepararon blancos (perlas sin enzima) siguiendo el mismo procedimiento.

Carragenato de potasio

Se siguió el procedimiento descrito por Tosa *et al.* (1979) con las modificaciones que se presentan a continuación. Se preparó una solución estéril de carragenina (Tic Pretested Colloid 710H-3112) en agua al 1,5%, y se mantuvo a 43 °C. Se adicionó un 12% de lactasa (Lactozym), previamente calentada a 43 °C, y se agitó por 3-4 min. La preparación de las perlas y el tratamiento posterior se realizaron de la forma descrita anteriormente, usando una solución estéril de KCl al 3%.

Agar

Se siguió el procedimiento detallado a continuación: se preparó una solución estéril de agar cuya concentración final en los discos fue de 2,5%, a la cual se adicionó lactasa

(Lactozym) para obtener una concentración final de 12 %. Tanto la solución de agar como la enzima se mantuvieron en un baño a 40 °C. La mezcla anterior se vertió en tubos plásticos estériles (Tygon R-3603) de 30 cm de longitud y 12,5 mm de diámetro interno, que se cerraron con tapones en sus extremos. Los tubos se mantuvieron durante 15 min a 5-7 °C y luego se procedió a cortar los discos de 4,5-5,0 mm. Los discos se dejaron durante 36 h en leche a 5 °C y luego se utilizaron en la hidrólisis.

Procesos de hidrólisis de la lactosa

Se incubaron 7,0 g de la enzima inmovilizada y 7,0 mL de leche reconstituida a una temperatura de 5 °C y con agitación (150 rpm). La hidrólisis se detuvo separando por filtración la enzima inmovilizada de la leche y se procedió a determinar el porcentaje de hidrólisis de lactosa. En las pruebas en que se usó como soporte alginato y carragenina se analizaron muestras en los siguientes tiempos: 1, 2, 4, 6 y 24 h. En el caso de los discos de agar se retiraron muestras al finalizar la primera y segunda h, cada 2 h durante 10 h y finalmente a las 24 h. Estas pruebas se realizaron por triplicado. Una vez establecido el soporte (agar) que dio los mejores resultados en cuanto al porcentaje de hidrólisis de lactosa, se elaboraron discos con una concentración de lactasa de 4,8 - 7,2 y 9,6 %. Se llevó a cabo el proceso de hidrólisis y se analizaron muestras en los tiempos indicados para los discos de agar.

Estabilidad de la lactasa inmovilizada en agar

Se definieron las siguientes condiciones para el proceso de hidrólisis: 4,8% de lactasa, relación enzima inmovilizada: leche de 1:1, temperatura de 5 °C y tiempo de incubación de 4 h. Este proceso se repitió 14 veces con los mismos discos durante 20 días. A las muestras de leche se les determinó el porcentaje de hidrólisis y se les realizó un análisis microbiológico (recuento total), utilizando el método descrito por Speck (1984) para los microorganismos aerobios mesófilos. La prueba se hizo por duplicado.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza a los resultados obtenidos en los procesos de hidrólisis, para determinar si había diferencias significativas atribuibles al tipo de soporte o a la concentración de lactasa. Se usó un nivel de significancia de 5%. En los casos en que se encontraron diferencias, se aplicó un análisis de comparación de medias por el método de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSION

La leche descremada reconstituida al 15% de sólidos totales (ST), constituye un sustrato adecuado para el empleo de la lactasa comercial «Lactozym», debido a que su pH (6,59) se encuentra en el ámbito óptimo (6,5-7,0) y la concentración de lactosa (8,65%) está dentro del intervalo recomendado (0-35%), muy cerca del óptimo (5%), como se observa en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Características químicas de la leche descremada reconstituida

Característica	Resultado * ± D E
Grasa (%)	0,02 ± 0,01
Proteína (%)	5,90 ± 0,03
Lactosa (%)	8,65 ± 0,04
Sólidos totales (%)	15,10 ± 0,06
Acidez (% ácido láctico)	0,197 ± 0,002
pH	6,59 ± 0,02

* Cada resultado es el promedio global del análisis por duplicado de cuatro muestras.

En la Figura 1 se observa que el soporte que da los mejores resultados, en lo que a conversión de lactosa se refiere, es el agar. Al finalizar las 24 h de incubación, únicamente con el uso de agar como matriz es posible obtener un 100% de reducción en el contenido de lactosa. Asimismo, desde el inicio del proceso, el porcentaje de hidrólisis alcanzado usando agar (92%) es significativamente mayor ($p < 0,05$) que los obtenidos con alginato (48%) o carragenina (56%). Esta diferencia en el porcentaje de hidrólisis se ve reducida durante el curso de la reacción, de un 44% a un 25% usando alginato y de un 36% a un 17% usando carragenina.

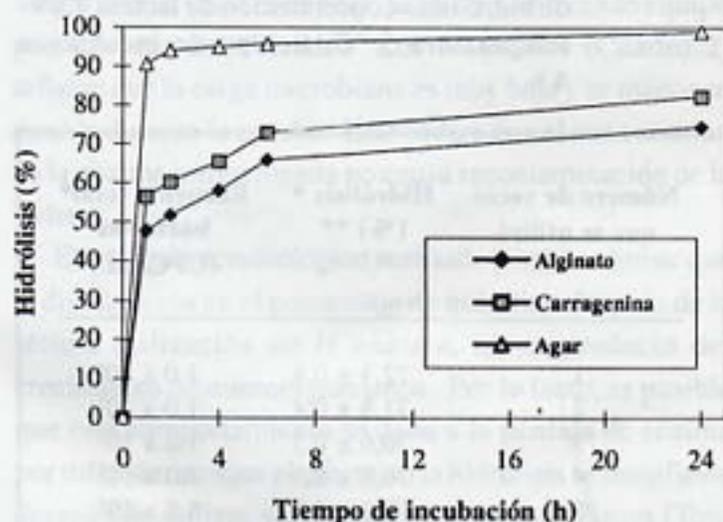


Figura 1. Efecto de la inmovilización de lactasa (12%) en tres soportes sobre la hidrólisis de lactosa en la leche a 5 °C

Las diferencias entre los porcentajes de hidrólisis obtenidos con los tres tipos de soportes se pueden atribuir a las características propias de cada soporte, como la porosidad del material y la temperatura de gelificación, así como la forma de inmovilización en perlas o discos (Tosa *et al.*, 1979).

Cuando se utiliza alginato y carragenina, las curvas que describen el proceso de hidrólisis son de formas

semejantes, pero se presenta una diferencia de aproximadamente un 8% en la cantidad del azúcar hidrolizada a partir de la primera hora. Esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

En el caso del alginato, es posible que la inhibición por iones de calcio sea la responsable de que los resultados obtenidos sean menores comparados con los de la carragenina, pues estos iones actúan como inhibidores. Por el contrario, los iones potasio actúan como activadores de la lactasa de *K. fragilis* (Novo Industri A/S; Mahoney y Adamchuk, 1980), y pueden contribuir a que los porcentajes de hidrólisis obtenidos con carragenina sean mayores a los conseguidos con alginato.

La alta viscosidad de la solución de carragenina dificultó su manejo y posiblemente la dispersión homogénea de la enzima y la formación de las perlas. Por el contrario, el manejo de las soluciones de alginato y agar resulta más sencillo, ya que tienen viscosidades más bajas, pese a que se utilizaron en mayor concentración que la carragenina.

Al analizar el efecto de la concentración de lactasa inmovilizada en agar, se encontró que los resultados obtenidos en el porcentaje de hidrólisis difieren significativamente ($p < 0,05$) con las cuatro concentraciones de enzima empleadas.

Como se muestra en la Figura 2, la reacción depende directamente de la concentración de enzima. Se observa que, con todas las concentraciones enzimáticas usadas y una vez concluida la primera hora de proceso, se produce una disminución en la velocidad de reacción, es decir, una reducción en la concentración del sustrato en función del tiempo transcurrido. Esta disminución se puede atribuir a la inhibición causada por los productos de hidrólisis. En el caso específico de la lactasa de *K. fragilis*, Chen *et al.* (1985) coinciden en que la galactosa y la glucosa actúan como inhibidor competitivo y no competitivo, respectivamente, alterando el curso normal de la reacción. Conforme aumenta el porcentaje de lactosa hidrolizada, se incrementa la cantidad de glucosa y galactosa en el medio, lo cual contribuye a aumentar el grado de inhibición; por esta razón, la velocidad de reacción se reduce a medida

que aumenta el tiempo de incubación. Lo anterior concuerda con lo indicado por Woychik y Wondolowski (1973), quienes señalan que la inhibición aumenta durante el curso de la hidrólisis de la lactosa y reduce sustancialmente la eficiencia de la enzima.

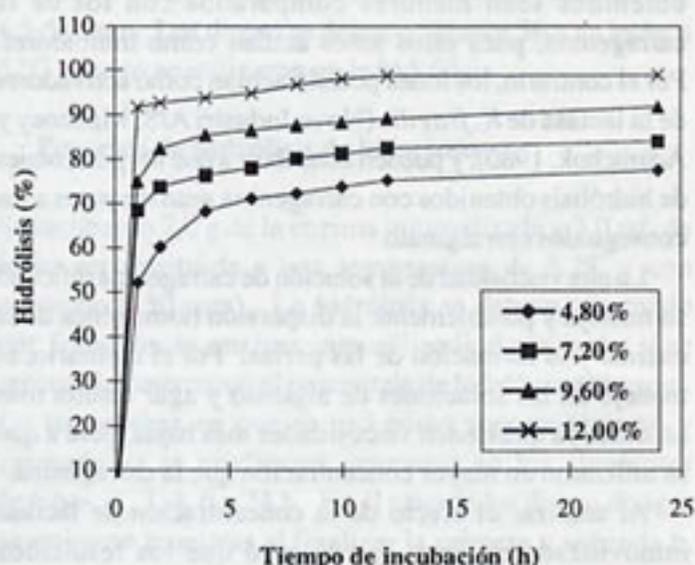


Figura 2. Efecto de la concentración de lactasa inmovilizada en agar sobre la hidrólisis de lactosa en la leche a 5 °C. p/p: de lactasa por g de soporte

Los cuatro procesos de hidrólisis variando la concentración de enzima inmovilizada, se caracterizan por ser rápidos, porque en todos ellos se obtiene más del 50% de conversión de la lactosa en 1 h, pero tienen el inconveniente de que requieren una cantidad considerable de enzima (37-87 mL/L leche).

Es posible definir la concentración de lactasa por utilizar en función del porcentaje de hidrólisis que se desea alcanzar. De esta manera es posible obtener con 1 h de proceso, aproximadamente un 50% de conversión usando una proporción de enzima de 4,8%, 70% utilizando 7,2%; 75%

empleando 9,6% o un 90% de hidrólisis utilizando 12% de lactasa.

Los resultados de la prueba de estabilidad se presentan en el Cuadro 2, donde se observa que el porcentaje de conversión de la lactosa se mantiene constante las primeras siete veces que se reutiliza la enzima inmovilizada y posteriormente empieza a disminuir. El porcentaje de hidrólisis se reduce en un 64% después de usar 14 veces los mismos discos.

Cuadro 2. Resultados de la prueba de reutilización de lactasa inmovilizada en agar. Condiciones de hidrólisis: concentración de lactasa 4,8%, temperatura 5 °C, tiempo de incubación 4 h.

Número de veces que se utilizó	Hidrólisis * (%) **	Recuento total* bacterias (UFC/mL)
1	72,3 ± 0,4	1,0 x 10 ¹
2	71,8 ± 0,4	1,0 x 10 ¹
3	70,6 ± 0,3	1,0 x 10 ²
4	70,8 ± 0,3	7,0 x 10 ¹
5	70,8 ± 0,3	8,5 x 10 ¹
6	71,4 ± 0,8	6,0 x 10 ¹
7	71,2 ± 0,3	1,5 x 10 ¹
8	63,1 ± 1,4	4,8 x 10 ¹
9	60,8 ± 0,4	1,8 x 10 ¹
10	52,2 ± 0,5	4,2 x 10 ¹
11	48,8 ± 0,0	1,2 x 10 ¹
12	44,0 ± 1,8	1,0 x 10 ¹
13	37,6 ± 1,8	1,8 x 10 ¹
14	25,6 ± 0,5	1,5 x 10 ¹

* Cada resultado es el promedio global de las mediciones obtenidas en las dos pruebas realizadas.

** Se presenta el error estándar para cada resultado.

Cuando la actividad de la lactasa inmovilizada comienza a decaer, es posible modificar el tiempo de incubación para lograr que el porcentaje de hidrólisis de la lactosa permanezca constante, de esta forma se podría aumentar la vida útil de la enzima.

Los soportes orgánicos así como la lactasa inmovilizada, están expuestos a problemas de contaminación microbiana, lo que causa el deterioro del soporte, disminuye la actividad de la enzima y constituye una fuente potencial de contaminación para el sustrato (Hultin, 1983; Pastore *et al.*, 1974). Por estas razones, el proceso de inmovilización de la enzima y su manipulación se llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar y utilizando equipo previamente esterilizado. Los resultados (Cuadro 2) señalan que la carga microbiana es muy baja y se mantiene estable durante la prueba. Esto indica que el uso continuo de la enzima inmovilizada no causa recontaminación de la leche.

El estudio microbiológico realizado permite afirmar que la disminución en el porcentaje de hidrólisis después de la séptima utilización de la enzima, no es producto del crecimiento de microorganismos. Por lo tanto, es posible que este comportamiento se deba a la pérdida de enzima por difusión, aunque el efecto en la hidrólisis se manifieste después de utilizar varias veces los mismos discos (Tosa *et al.*, 1979).

Además, la presencia de iones calcio y sodio en la leche puede causar una desestabilización de la enzima, debido a que la disminución en la actividad de la lactasa es controlada por el entorno iónico, como se indicó anteriormente (Mahoney y Adamchuck, 1980). Esta influencia es mayor si se considera que el sustrato empleado tiene un alto contenido de sólidos totales (mayor que la leche comercial), y por lo tanto el porcentaje de estos iones es más elevado.

La adición de activadores en la leche, tales como iones potasio y manganeso, ha probado ser efectiva para aumentar la actividad de la lactasa de *K. fragilis* (Wendorff *et al.*, 1971; Mahoney y Adamchuk, 1980). Por esta razón,

sería conveniente analizar la posibilidad de incrementar la actividad de la enzima inmovilizada en agar, ya sea agregando directamente una solución con los iones al soporte en estado soluble o al sustrato en que se almacena la enzima inmovilizada, previo a su empleo en el proceso de hidrólisis.

BIBLIOGRAFIA

- AOAC. 1980. Official Methods of Analysis. 13 ed. Washington D. C.
- AXELSSON, A. & ZACCHI, G. 1991. Simulation of batch and continuous reactors with co-immobilized yeast and beta-galactosidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 52 (4): 481.
- BRENA, B. M.; RYDEN, L. G. & PORATH, J. 1994. Immobilization of beta-galactosidase on metal-chelate-substituted gels. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 19 (2): 217.
- CHEN, S. Y.; HOUNG, J. Y. & LING, A.C. 1985. Product inhibition of the enzymatic hydrolysis of lactose. *Enzyme Microbiol. Technol.* 7 (10): 510.
- CIFUENTES, E.; FLORES, J. J. & LIMÓN, N. E. 1985. Deficiencia de lactasa intestinal en un pueblo Nahuatl: Alternativas para los programas de intervención nutricional. *Rev. Invest. Clin.* 37 (4): 311.
- GIST-BROCADES nv. s. f. Maxilact. Technical data sheet. Holland.
- GOBBETTI, M. & ROSSI, J. 1994. Batchwise fermentation with Ca-alginate immobilized multistarter cells for kefir production. *Int. Dairy J.* 4 (3): 237.
- HOUTS, S. S. 1988. Lactose intolerance. *Food Technol.* 42 (3): 110.

- HULTIN, H. O. 1983. Current and potential uses of immobilized enzymes. *Food Technol.* 37 (10): 66.
- JEON, I. J. & BASSETTE, R. 1982. Potential implication of the freezing point depression by enzymatic hydrolysis of lactose in milk. *J. Food Prot.* 45 (1): 14.
- KOSIKOWSKI, F. V. & WIERZBICKI, L. E. 1973. Lactose hydrolysis of raw and pasteurized milks by *Saccharomyces lactis* lactase. *J. Dairy Sci.* 56 (1): 146.
- MAHONEY, R. R. & ADAMCHUK, C. 1980. Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Sci.* 45: 962.
- MANN, S. & THOMPSON, D. K. 1988. Immobilized beta-galactosidase for lactose hydrolysis. *Aust. J. Dairy Technol.* 43(2): 47.
- NOVO INDUSTRI A/S. s. f. Ficha Técnica Lactozym. División de enzimas. Novo Industri A/S, Bagsvaerd, Dinamarca.
- PAIGE, D. M.; BAYLESS, T. M.; MELLITS, E. D.; DAVIS, L.; DELLINGER, W.S. & KREITNER, M. 1979. Effects of age and lactose tolerance on blood glucose rise with whole cow and lactose-hydrolysed milk. *J. Agric. Food Chem.* 27 (4): 677.
- PASTORE, M.; MORISI, F. & VIGLIA, A. 1974. Reduction of lactose in milk by entrapped β -galactosidase. II. Conditions for an industrial continuous process. *J. Dairy Sci.* 57 (3): 269.
- PINSIRODOM, P.; NARKJIRANGKHUR, U. & LUANGTHAWORNKUL, W. 1993. Lactose hydrolysis in milk using immobilized beta-galactosidase. *Food.* 23 (4): 272.
- RAO, B. Y. K.; GODBOLE, S. S. & D'SOUZA. 1988. Preparation of lactose free milk by fermentation using immobilized *Saccharomyces fragilis*. *Biotechnol. Lett.* 10 (6): 427.
- ROSADO, J. L.; ALLEN, L. H. & SOLOMONS, N. W. 1987. Milk consumption, symptom response, and lactose digestion in milk intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 1457.
- SHUL'CHISHIN, V. A.; MATVEEV, D. V. & VIRNIK, A. D. 1993. Kinetics of lactose hydrolysis involving biocatalyst based on modified fungal beta-galactosidase immobilized in structure of triacetate fiber. *Appl. Biochem. Microbiol.* 29 (1): 84.
- SPECK, M. L. ed. 1984. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: American Public Health Association.
- SOLA, C.; CASAS, C. & GODIA, F. 1991. An effectiveness factor you can see: experimental visualization of the effectiveness factor concept in a biological system. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 30 (2): 121.
- TAE GWAN PARK & HOFFMAN, A. S. 1993. Thermal cycling effects on the bioreactor performances of immobilized beta-galactosidase in temperature-sensitive hydrogel beads. *Enzyme Microbiol. Technol.* 15 (6): 476.
- TOSA, T.; SATO, T.; MORI, T.; YAMAMOTO, K.; TAKATA, I.; NISHIDA, Y. & CHIBATA, I. 1979. Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix. *Biotechnol. Bioeng.* 21: 1697.

OBTENCIÓN DE JUGO CLARIFICADO DE BANANO EN EL NIVEL DE PLANTA PILOTO

WENDORFF, W. L.; AMUNDSON, C. H.; OLSON, N. F. & GARVER, J. C. 1971. Use of yeast beta-galactosidase in milk and milk products. *J. Milk Food Technol.* 34 (6): 294.

WOYCHIC, J. H. & WONDOLOWSKI, M. V. 1973. Lactose hydrolysis in milk products by bound fungal beta-galactosidase. *J. Milk Food Technol.* 36 (1): 31.

ZAYED, G. & ZAHRAN, A. S. 1991. Lactic acid production from salt whey using free and agar immobilized cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 12 (6): 241.

El presente artículo describe el desarrollo de un proceso piloto para la obtención de jugo de banana clarificado. Se evaluó el uso de la enzima beta-galactosidasa de levadura para la hidrólisis de la lactosa presente en el jugo de banana. Se estudió el efecto de diferentes condiciones de reacción (temperatura, pH, tiempo) sobre la actividad enzimática y la clarificación del jugo. Se encontró que la clarificación se optimizó a 40°C y pH 6.5. Se realizó un estudio de estabilidad térmica de la enzima inmovilizada en agar. Se concluye que el uso de la enzima beta-galactosidasa de levadura es una alternativa viable para la clarificación del jugo de banana en un nivel de planta piloto.