



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50<sup>th</sup> anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

## FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

## CONTACT

Please contact [publications@unido.org](mailto:publications@unido.org) for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at [www.unido.org](http://www.unido.org)

19325

**PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA  
AMERICA LATINA Y EL CARIBE  
PNUD/UNESCO/ONUDI  
RLA/83/003**

Contrato No. 90/044

Proyecto: Desarrollo Tecnológico para la  
obtención de una enzima que hidrolice lactosa  
de leche y suero

Segundo Año de Actividades

País: Colombia

Informe Técnico Final

LACTOS S  
COLOMBIAS

DESARROLLO TECNOLOGICO PARA LA OBTENCION DE UNA  
ENZIMA QUE HIDROLICE LACTOSA DE LECHE Y SUERO

Proyecto : ONUDI/DP/RLA/83/003  
Contrato 90/044

INFORME FINAL SEGUNDO AÑO

Preparado por : Yolanda Rico R.  
Alvaro Rodríguez  
Martha L. Malagón  
Irma L. Rivas  
Temilda Duarte  
Gloria Romero

Bogotá, Marzo de 1991

## TABLA DE CONTENIDO

ACTIVIDADES SEGUNDO AÑO : A, B, C, D, E, F, G.

ACTIVIDAD G :

INTRODUCCION

OBJETIVOS

METODOLOGIA

RESULTADOS

a) A nivel laboratorio

b) A nivel Planta Piloto

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFIA

ANEXO 1 : DETERMINACION DE GLUCOSA POR EL  
METODO DE GLUCOSA - OXIDASA

ANEXO 2 : CROMATOGRAFIA

ANEXO 3 : DETERMINACION DE 5-HIDROXIMETIL-  
FURFURAL

ANEXO 4 : PELICULA FLEXIBLE DE ALUMINIO

\*\*\*\*\*

## ACTIVIDADES SEGUNDO AÑO

- A. Firma del Contrato : , Marzo 19 de 1990
- B. Estudiar la hidrólisis de leche fluída con la enzima de México a nivel de laboratorio.
- Determinación de la actividad enzimática por el método de glucosa oxidasa.
  - Estabilidad de la enzima a 37°C durante períodos de 1, 2, 3 y 4 horas.
  - Cinética de la Hidrólisis seguida por el método criscópico
  - Comparación del comportamiento de la hidrólisis con Maxilact L x 2000 y con la enzima enviada de México en las dos formas de presentación.
- C. Hidrólisis de leche a nivel de planta piloto con enzima enviada a México en las condiciones seleccionadas a nivel de laboratorio.
- Estudio de Costos
- D. Estudiar la estabilidad de la leche hidrolizada en polvo durante el almacenamiento. A nivel de 4 litros.

- E. Entrenamiento de un investigador en la técnica de inmovilización de K.fragilis empleada por México.
- F. Primer Informe de Progreso : Agosto 31 de 1990
- G. Segundo Informe de Progreso : Marzo 15 de 1991

La actividad B se cumplió a satisfacción y el informe correspondiente fue aceptado por la Doctora Lidia T. Casas, según comunicación del 8 de febrero de 1991. En dicho informe se explica porqué la actividad C se realizó con la enzima comercial Lactozym 3000 L y no con la enzima enviada de México.

La actividad E la realizó la Química Farmacéutica Dagmar Ramírez en el período del 3 de agosto de 1990 al 31 de Octubre de 1990. El informe correspondiente fue entregado por ella a la Doctora Lidia T. Casas en Octubre de 1990.

En el presente informe se detallan las actividades C y D.

## ACTIVIDAD G.

## INTRODUCCION

Estudios realizados anteriormente en leche en polvo entera hidrolizada (3) mostraron que las propiedades fisicoquímicas de la leche obtenida ( Humedad 4,5%; materia grasa mínimo 2,6%; acidez expresada como ácido 1,0 al 1,3% e índice de solubilidad máximo  $1,25 \text{ cm}^3$ ), estaban dentro de los valores normales de la leche en polvo (10) y que las concentraciones de 5-hidroximetilfurfural (HMF) para leche hidrolizada eran de  $180 \mu\text{mol/lit}$  y para leche sin hidrolizar de  $10 \mu\text{mol/lit}$ . En este trabajo se hidrolizó la leche pasteurizada, a nivel de Planta Piloto empleando Lactozim 3000L, se encontró hasta 33°Brix, se secó por atomización y se almacenó, determinando en cada etapa el porcentaje de humedad y la concentración de HMF para evaluar en forma global y por etapas el comportamiento de la leche.

También se estudió la estabilidad de la leche en polvo hidrolizada durante el almacenamiento, empleando como parámetros de deterioro el contenido de humedad y la concentración de 5-hidroximetilfurfural (HMF). Se comparó el deterioro de leches empacadas utilizando empaques flexibles de aluminio y de leches sin empacar. Se encontró un modelo matemático para predecir el deterioro durante el almacenamiento, el cual es de gran utilidad para el proyecto porque agiliza el control de calidad de la leche en polvo.

## OBJETIVOS

Generales : Hidrolizar la lactosa de la leche a nivel de Planta Piloto y estudiar la estabilidad durante el almacenamiento de la leche en polvo hidrolizada, estableciendo un modelo de la predicción del deterioro por el método "dinámico" o "No-Modelo" de Mizrahi y Karel.

Específicos :

- a) Verificar las condiciones de hidrólisis a nivel de laboratorio y realizar la hidrólisis de la lactosa de la leche a nivel de Planta Piloto.
- b) Producir leche en polvo con la lactosa hidrolizada al nivel del 75% y del 100%.
- c) Hallar las isotermas de absorción de agua de la leche en polvo para los dos grados de hidrólisis.
- d) Verificar si existe una correlación entre el contenido de humedad de la leche en polvo, con los dos niveles de hidrólisis y la intensidad de pardeamiento, medido como hidroximetilfurfural (HMF). Encontrar un modelo matemático que nos permita, con base en estas dos variables, predecir el deterioro de la leche en polvo durante el almacenamiento.

- e) Efectuar un control de calidad a la leche en polvo hidrolizada después del almacenamiento.

## METODOLOGIA

Para dar cumplimiento a los objetivos propuestos se siguió el esquema de trabajo del diagrama 1.

**CONTROLES**

Grasa, densidad, acidez, sólidos totales, HMF, lactosa, pH.

HMF

HMF

75% hidrólisis 33% sólidos T 100% hidrólisis 27% sólidos T.

Humedad

HMF

Índice solubilidad grasa, densidad acidez, humectabilidad pH.

Humedad

HMF

Humedad

HMF, pH, acidez Humectabilidad, grasa. Índice de solubilidad

LECHE PASTERIZADA  
70 litros

HIDROLISIS  
T=37°C E/s=3120.3UI  
t=2 hr. ml  
agitación constante

Niveles a) 75%  
b) 100%

a y b

CONCENTRACION AL VACIO  
Flujo aliment.=631,34 ml/min  
Flujo de vapor=24,1 Kg/hr.  
T aliment = 45°C  
T evaporación = 63.1-63.2°C  
P vapor = 42 cm Hg

SECADO POR ATOMIZACION  
Flujo aliment. = 12 lt/hr.  
T alimentación= 50°C  
T ent. aire = 200°C  
T sal aire = 70°C

ALMACENAMIENTO c y d

Sales	$a_w$
Acetato de Potasio	0.22
Cloruro de Magnesio	0.32
Nitrito de Sodio	0.63
Cloruro de Sodio	0.75
Sulfito de amonio	0.80
Sulfato de potasio	0.96

Tiempo : 0 - 30 días

c) sin empaque  
d) empaque flexible de aluminio.  
permeabilidad 0,02 g/día/m<sup>2</sup>/mmHg.

CONTROL DE CALIDAD  
a los 0 y 30 días

Se empleó leche entera pasteurizada con las características anotadas en la Tabla 1.

A nivel de laboratorio se verificó la actividad de la enzima (Anexo 1), la relación enzima/sustrato y el tiempo requerido de hidrólisis.

Se encontró que una relación enzima/sustrato de 3120,3 u.I/lit produce una hidrólisis de 100%, a las 2 horas de reacción, a 37°C. El 100% de hidrólisis se verificó por cromatografía en capa fina (Anexo 2).

Con estos datos se realizó la hidrólisis en Planta Piloto empleando una marmita de acero inoxidable con capacidad de 150 litros, con agitador de ancla.

Se concentraron leches con 2 niveles de hidrólisis 100% y 75%, esta última se obtuvo mezclando 3/4 partes de leche 100% hidrolizada y 1/4 parte de leche sin hidrolizar. La concentración se realizó en un evaporador de película delgada, agitada, con una superficie de intercambio de calor de 0.5 m<sup>2</sup> y con capacidad de evaporación de 30 Kg agua/hr. La leche 75% hidrolizada se concentró hasta 33° Brix y la leche hidrolizada 100% se concentró hasta 27° Brix.

Las leches concentradas se secaron en un secador por atomización, en flujo paralelo entre el líquido alimentado y el aire, con un sistema de alimentación discontinuo, a través de bombeo con pistón.

De las leches en polvo hidrolizadas se tomaron muestras de aproximadamente 3 g., se colocaron en recipientes de vidrio y se secaron en estufa al vacío (50°C, 20 mmHg) durante 24 horas. Posteriormente fueron depositadas en desecadores que contenían soluciones saturadas de sales, obteniendo así atmósferas con humedades relativas constantes. Los desecadores fueron colocados en incubadoras con el fin de mantener una temperatura constante de 30°C. Las muestras se pesaron diariamente para obtener peso constante y se determinó la cantidad de agua absorbida. Los ensayos se realizaron por duplicado para cada uno de los grados de hidrólisis. Posteriormente se estudió el deterioro de la leche en polvo (Anexo 3) a las diferentes humedades relativas y se observó el efecto del empaque sobre el grado de deterioro, empacando la mitad de las muestras en películas flexibles de aluminio cuya permeabilidad se determinó siguiendo la metodología descrita en el Anexo 4. Se tomaron muestras cada 6 días y se determinó la humedad y el contenido de HMF.

Con estos parámetros se estableció el modelo de isoterma de absorción que más ajusta a los datos experimentales, se aplicaron los modelos lineal, Henderson, Mizrahi y Oswin. Para conocer las constantes de cada modelo se utilizó un programa en SAS (Statistical Analysis System) ejecutado en el Computador IBM de la Universidad Nacional de Colombia.

Para encontrar un modelo matemático que nos permitiera predecir el deterioro durante el almacenamiento se ajustaron los datos experimentales a funciones que relacionan la intensidad de deterioro (HMF) con el contenido de humedad del producto, para cada grado de hidrólisis, para las cuales se ensayaron tres (3) modelos matemáticos, uno exponencial de la forma  $Y = K_1 * K_2^X$ , y dos polinomiales de las formas  $Y = B_0 + B_1x + B_2X^2$  y  $B_0 + B_1X + B_2X^2 + B_3X^3$ . Para conocer las constantes de cada modelo se utilizó un programa SAS ejecutado en el Computador IBM de la Universidad Nacional de Colombia.

## RESULTADOS

a) A nivel de Laboratorio

Se realizaron los controles a la leche entera pasteurizada, utilizada como materia prima, los cuales muestran que las características fisicoquímicas tales como densidad 1030,0 -1033,0 Kg/m<sup>3</sup>, materia grasa mínimo 3,0%, sólidos totales mínimos 11,3%, acidez expresada como ácido láctico 0,14 a 0,19%, están dentro de los valores permitidos para la leche higienizada entera (10). Los resultados se muestran en la Tabla 1.

En la Tabla 2 se observa que a las dos horas se alcanzó el 100% de hidrólisis con una relación enzima/sustrato de 5183,4 U/litro de leche (1,5 ml. de enzima) a 37°C. Estos datos fueron empleados para realizar la hidrólisis de leche a nivel de Planta Piloto.

b) A nivel de Planta Piloto (70 litros)

En la Tabla 3 se observa que la concentración de HMF se incrementa a medida que la leche es sometida a mayor calentamiento al pasar de una etapa a otra del proceso. La etapa en la que se presenta más deterioro de la leche es en la de concentración, para la cual el HMF constituye el 58,66% del total formado en el proceso para leche 75% hidrolizada y el

62,35% para leche 100% hidrolizada. Debido a la baja capacidad de evaporación que tiene el equipo, lo que implica que la leche se debe realimentar repetidas veces y ésto hace que la leche presente un mayor deterioro por los sucesivos calentamientos a que es sometida. Por lo tanto sería conveniente evaporar la leche en un evaporador de múltiple efecto, para obtener en una sola corrida una concentración de sólidos de aproximadamente 50% para luego ser alimentada al secador.

Comparando el pardeamiento producido durante el proceso la leche en polvo 75% hidrolizada alcanza una concentración de HMF de 85.276 mol/lit y la leche en polvo 100% hidrolizada alcanza un valor de 104.633 mol/lit. El mayor pardeamiento producido con la leche 100% hidrolizada, se debe a que la reacción de Maillard se vé favorecida por la producción de azúcares reductores en la hidrólisis de la leche.

En los gráficos 1 y 2 se observa que la leche en polvo hidrolizada 100% sin empacar y empacada, respectivamente presentan mayor intensidad de deterioro a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, comparado con la leche 75% hidrolizada, debido a una mayor concentración de azúcares reductores y mayor contenido de humedad, factores que favorecen la reacción de Maillard.

Del gráfico 3 se puede concluir que la leche hidrolizada 100% no empacada alcanzó 6,45% de humedad y la leche hidrolizada 75% alcanzó 6,92% de humedad, a los 24 días de almacenamiento. Y del gráfico 4 se concluye que la leche hidrolizada 100% empacada alcanzó 6,50% de humedad y la leche hidrolizada 75% contenía 5,99% de humedad, a los 30 días de almacenamiento. Esto se debe a la mayor capacidad higroscópica de la glucosa y la galactosa formada durante la hidrólisis.

En las Tablas 4a y 4b se resumen los resultados del programa en SAS de ajuste de datos experimentales a los modelos de isoterma ensayados.

Los resultados para las isotermas de absorción de agua utilizando el modelo gravimétrico se presentan en las Tablas 5a y 5b, las cuales muestran los valores promedio de las humedades de equilibrio a diferentes actividades de agua con sus respectivas desviaciones standard. Los gráficos 5 y 6 representan las Isotermas de absorción para los dos tipos de leche.

La selección de la función que relaciona la intensidad de deterioro con el contenido de humedad se hizo con base en el valor de C-cuadrado y ajuste gráfico de cada modelo. Se escogió el modelo polinomial de tercer grado por presentar los valores más altos de

R-Cuadrado y el mejor ajuste a los valores experimentales.

El polinomio es de la siguiente forma :

$$\text{HMF} = B_0 + B_1 \cdot \text{CH} + B_2 \cdot \text{CH}^2 + B_3 \cdot \text{CH}^3$$

donde : HMF = Índice de deterioro o concentración de HMF expresado en micromoles/litro.  
 CH = Contenido de humedad (%).

B0, B1, B2, B3 = Constantes

Las constantes para cada grado de hidrólisis son:

#### LECHE 75% HIDROLIZADA

	Leche empacada	Leche no empacada
B0	-47668.784478	13731.182634
B1	27809.939577	-6917.821528
B2	-5393.100340	1140.038199
B3	348.300850	-60.544537

#### LECHE 100% HIDROLIZADA

	Leche Empacada	Leche no Empacada
B0	-4455.678286	2410.321599
B1	2861.459509	-1358.355217
B2	-596.994393	254.831711
B3	41.554924	-14.852951

#### Evaluación del modelo de predicción

De acuerdo con el enfoque "No-Modelo", para una condición isotérmica, la velocidad de deterioro del producto es una función del

contenido de humedad y se tiene :

$$CH = CH_0 + F_1(t)$$

$$H.MF = H.MF_0 + F_2(CH)$$

donde :

CH = contenido de humedad (%)

HMF = intensidad de deterioro (concentración de HMF)

t = tiempo

CH<sub>0</sub> y HMF<sub>0</sub> = condiciones iniciales

F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> = funciones

La velocidad de deterioro será :

$$dHMF/dt = dHMF/dCH * dCH/dt = dF_2(CH)/dCH * dCH/dt$$

La función F<sub>2</sub> se obtuvo mediante el ajuste de los datos experimentales a un polinomio.

La velocidad de ganancia de humedad está dada por :

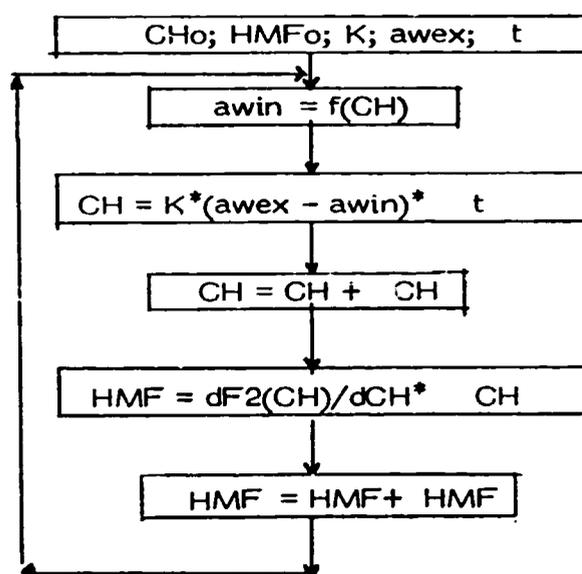
$$dCH/dt = dF_1(t)/dt = K (a_{wex} - a_{win})$$

donde : K = constante que depende del material de empaque.

a<sub>wex</sub> = actividad de agua externa

a<sub>win</sub> = actividad de agua interna, relacionada con CH por la isoterma de absorción obtenida.

Para evaluar la predicción del deterioro se combinaron las ecuaciones obtenidas en el modelo y mediante un procedimiento iterativo se calculó la intensidad de pardeamiento (HMF) y el contenido de humedad alcanzados por las leches 75 y 100% hidrolizadas. Mediante un programa FORTRAN ejecutado en el Computador IBM de la Universidad Nacional de Colombia, se evaluó el procedimiento descrito. El diagrama de flujo seguido en el programa es el siguiente :



Para la ejecución del programa se tomaron los siguientes datos :

	<u>Leche 75%</u>	<u>Leche 100%</u>
$CH_o$	4.9685	4.2422
$HMF_o$	85.286	104.633
$K$	0.0205992	0.0205992

awex	0.8605	0.8605
t	0.05 días	0.05 días
awin	obtenida de 6.5.1	Obtenida de 3.5.1

$dF_2(CH)/dCH$ : = Es la derivada de la ecuación de ajuste de datos experimentales

$$= 27809.939 - (10786.201 * CH) + 144.902 * CH^2 \text{ para leche 75\%.}$$

$$= 2861.4595 - (1193.9887 * CH) + 124.6648 * CH^2 \text{ para leche 100\%.}$$

A los valores obtenidos para la predicción de la intensidad del de -  
terio aparecen en la Tabla 6a y b y Gráficos 7 y 8.

Las características fisicoquímicas de la leche en polvo entera hidrolizada sin almacenar tales como grasa, densidad, índice de solubilidad, acidez titulables, están dentro de los valores permitidos por el Ministerio de Salud (10). También se determinaron dichas características para la leche en polvo entera marca "PRO-LECHE", que como era de esperarse, están dentro de las disposiciones sanitarias sobre leche, su sabor es característico y presenta  $2,63 \mu\text{mol/lit.}$  de HMF, a diferencia de la leche hidrolizada que tiene un sabor dulce y una concentración de HMF de  $85,28 \mu\text{mol/lit}$  para leche hidrolizada 75% y  $104,63 \mu\text{mol/lit}$  para leche hidrolizada 100%. La concentración de HMF, no está reglamentada en la legislación colombiana. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Al cabo de 30 días de almacenamiento se determinaron las características de la leche en polvo empacada Tabla 8, las cuales indicaron que la leche 75% hidrolizada había alcanzado una humedad de 5.98% y la leche 100% hidrolizada de 6,05%. La leche en polvo no hidrolizada alcanzó una concentración de HMF de  $15,45 \mu\text{mol/lit}$ , para la leche en polvo 75% hidrolizada fue de 18.67 veces esta concentración y para la leche en polvo 100% hidrolizada fue 32,14 veces más.

El olor y el color indicaron un elevado deterioro alcanzado por la leche durante este tiempo.

Debido a la aparición de hongos en la superficie de la leche no empacada no fue posible hacer las caracterizaciones respectivas.

TABLA No.1

## ANALISIS DE MATERIAS PRIMAS

Análisis realizados a la leche utilizada para los ensayos a nivel de laboratorio.

Densidad	1030.8 Kg/m <sup>3</sup> a 20°C
Grasa	3.4 %
Sólidos totales	12.0 %
Acidez	0.16 % ácido láctico
pH	6.50

Análisis realizados a nivel de laboratorio a la enzima comercial Lactozim 3000L HP-G.

Actividad	3455.6 U/ml.
Densidad	1.1708 g/ml.

TABLA No.2

## HIDROLISIS DE LECHE A NIVEL LABORATORIO

Determinación del tiempo de hidrólisis a nivel de laboratorio y seguimiento del pardeamiento.

Temperatura de hidrólisis :	37°C
Dosis de enzima :	3455,6 U/ml.(1,5 ml./lt de leche.
Actividad de la enzima :	3455.6 U/ml.

<u>Tiempo</u> (h)	<u>Lactosa</u> (1)
0.0	+
1.5	+
2.0	-
2.5	-
3.0	-

(1) Cromatografía en capa fina sobre celulosa F.Merk. Fase móvil: Butanol; ácido acético ; agua (80:20:20). Revelador:ftalato de anilina.

TABLA No.3

## CUANTIFICACION DE HMF. HIDROLISIS DE LECHE

<u>Tipo de Leche</u>	<u>75% Hidrólisis HMF ( mol/lt )</u>	<u>100% Hidrólisis HMF ( mol/lt )</u>
Leche pasteurizada	1.646	1.646
Leche hidrolizada	3.759	6.014
Leche concentrada	53.780	71.253
Leche en polvo	85.276	104.633

TABLA 4a

AJUSTE DE DATOS EXPERIMENTALES A MODELOS  
DE ISOTERMA - LECHE 75% HIDROLIZADA

<u>Modelo de Isoterma</u>	<u>Subrutinas empleadas</u>	<u>Variable dependiente</u>	<u>R-Cuadrado</u>	<u>Error estándar</u>
Lineal	General linear Models (GLM SAS )	CH	0.640225	6.559737* 9.788345**
Henderson	GLM SAS	Log.CH	0.872112	0.077669* 0.088001**
Mizrahi	Nonlinear least Squares ( Nl in SAS )	CH	0.9977	C1 1.3992180 C2 1.4861884
Oswin	GLM SAS	Log CH	0.934761	0.0615355* 0.036712**

\* Intercepto

\*\* Pendiente

C1, C2 Constantes del Modelo de Mizrahi.

TABLA 4b

AJUSTE DE DATOS EXPERIMENTALES A MODELOS  
DE ISOTERMA - LECHE 100% HIDROLIZADA

<u>Modelo de Isoterma</u>	<u>Subrutinas empleadas</u>	<u>Variable dependiente</u>	<u>R-cuadrado</u>	<u>Error estándard</u>
Lineal	Gral Linear Models (GLM SAS)	CH	0.663103	6.866659* 10.246330**
Handerson	GLM SAS	Log CH	0.908688	0.064889* 0.073521**
Mizrahi	Nonlinear least Squares (NL in SAS )	CH	0.9977	C1 1.403615 C2 1.4707961
Oswin	GLM SAS	Log CH	0.961536	0.046716* 0.027871**

\* Intercepto

\*\* Pendiente

C1, C2 Constantes del Modelo de Mizrahi.

TABLA 5a  
ISOTERMA DE ABSORCION DE AGUA  
Leche 75% Hidrolizada

Humedad de equilibrio (CH) para diferentes actividades de Agua ( $a_w$ ).

$a_w$	CH*	Desviación Estándard	CH(%)
0.966	0.45783	$1.5556 \cdot 10^{-4}$	45.78
0.800	0.22421	$7.6367 \cdot 10^{-4}$	22.42
0.755	0.12155	$1.9516 \cdot 10^{-4}$	12.15
0.633	0.10992	$1.2021 \cdot 10^{-4}$	10.99
0.320	0.08540	$1.3435 \cdot 10^{-4}$	8.54
0.220	0.05490	$7.0003 \cdot 10^{-4}$	5.49

TABLA 5b  
ISOTERMA DE ABSORCION DE AGUA  
Leche 100% Hidrolizada

$a_w$	CH*	Desviación Estándard	CH (%)
0.966	0.50173	$1.2728 \cdot 10^{-4}$	50.17
0.800	0.23690	$9.8995 \cdot 10^{-4}$	23.69
0.755	0.15252	$1.4142 \cdot 10^{-4}$	15.25
0.633	0.12372	$2.6870 \cdot 10^{-4}$	12.37
0.320	0.09483	$2.2627 \cdot 10^{-4}$	9.48
0.220	0.05982	$1.1313 \cdot 10^{-4}$	5.98

\* Promedio de dos determinaciones.

TABLA 6a

PREDICCIÓN DE LA INTENSIDAD DE DETERIORO Y DEL  
CONTENIDO DE HUMEDAD  
Leche empacada 75% Hidrolizada

Tiempo (días)	Intensidad de deterioro HMF (micromoles/litro)			Contenido de humedad (%)		
	Observed	Pre - dicho	Desvia- ción	Observed	Pre - dicho	Desvia- ción
0	85.286	-----	-----	4.9685	-----	-----
6	87.064	82.3238	4.7399	5.1652	5.1825	0.0173
12	95.421	81.2186	15.2029	5.4592	5.3938	0.0554
18	111.133	100.9332	10.1998	5.6362	5.6036	0.0356
24	161.252	158.0397	3.2120	5.8047	5.8030	0.0017
30	240.903	266.8683	25.9648	5.9987	6.0009	0.0012

TABLA 6b

PREDICCIÓN DE LA HUMEDAD DE DETERIORO Y DEL  
CONTENIDO DE HUMEDAD  
Leche empacada, 100% Hidrolizada

Tiempo (días)	Intensidad de deterioro HMF (micromoles/litro)			Contenido de Humedad (%)		
	Observed	Pre - dicho	Desvia- ción	Observed	Pre - dicho	Desvia- ción
0	104.633	-----	-----	4.2422	-----	-----
6	116.286	112.7281	3.5584	4.6900	4.7257	0.0357
12	135.514	116.7318	18.7827	5.2022	5.1966	0.0056
18	166.836	141.5473	25.2884	5.8265	5.6506	0.1759
24	239.689	206.8823	31.8072	6.2280	6.0874	0.1406
30	339.737	327.6080	12.1290	6.4997	6.5073	0.0076

TABLA 7  
 CARACTERISTICAS DE LA LECHE EN POLVO OBTENIDA  
 HIDROLISIS DE LECHE

Parámetro	75% Hidr.	100 % Hidr....	No Hidrolizada*
Humedad	4.96%	4.24%	4.02%
Grasa	31.30%	27.83%	30.02%
Densidad 20°C (Kg/m <sup>3</sup> )	481.1%	437.8%	559.79%
Indice de solubilidad ( ml. sedimento )	0.08%	0.11%	0.50%
Humectabilidad	48 h	48 h	45.13
Acidez titulable ( % ácido láctico )	1.58%	1.14%	1.08%
pH	6.42 %	6.73%	6.78%
Sabo.	dulce	dulce	sabor característico
Pardeamiento ( micromoles HMF/1)	85.286%	104.633 %	2.632 %

\* Leche entera marca PROLECHE.

TABLA 8

CARACTERISTICAS DE LA LECHE EN POLVO AL FINAL DEL ALMACENAMIENTO

Leche almacenada en empaques flexibles de aluminio

Parámetro	75% Hidr.	100% Hidr.	No Hidrolizada *
Humedad	5.98%	6.50%	4.80%
Grasa	30.72%	26.64%	29.83%
Densidad 20°C (Kg/m <sup>3</sup> )	435.3 %	411.2 %	621.3 %
Indice solubilidad ( ml. de sedimento)	0.09%	0.13%	0.55%
Humectabilidad	48h	48h	5 min.
Acidez titulable ( % ácido láctico )	1.67%	1.34%	1.58%
pH	6.22%	6.61%	6.42%
Olor	rancio	rancio	rancio
Pardeamiento ( micromol HMF/1 )	288.406	496.568	15.454

\* Leche entera marca PROLECHE.

Gráfico 1-

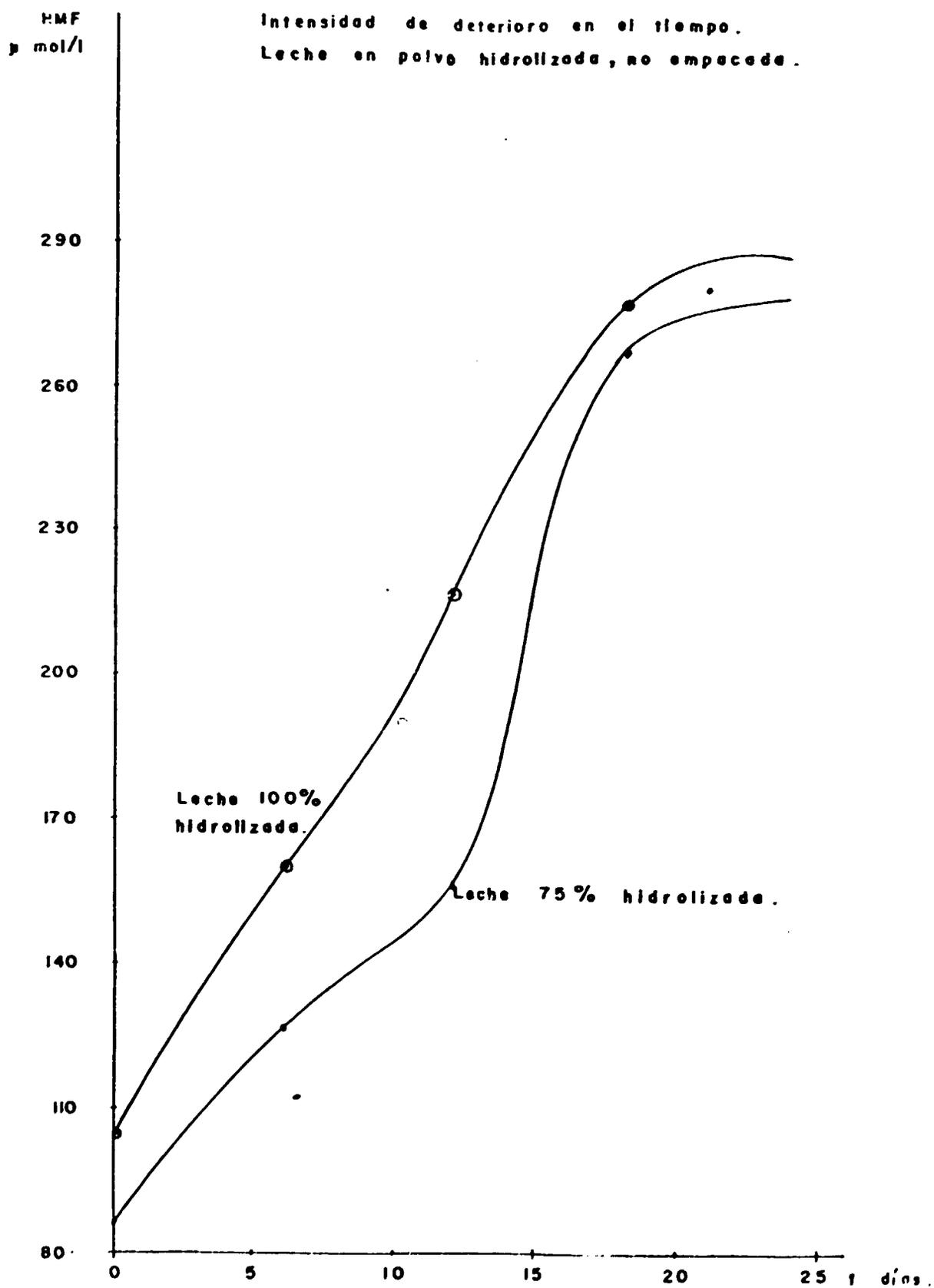


Gráfico 2

Intensidad de deterioro en el tiempo.  
Leche en polvo hidrolizada, empecada.

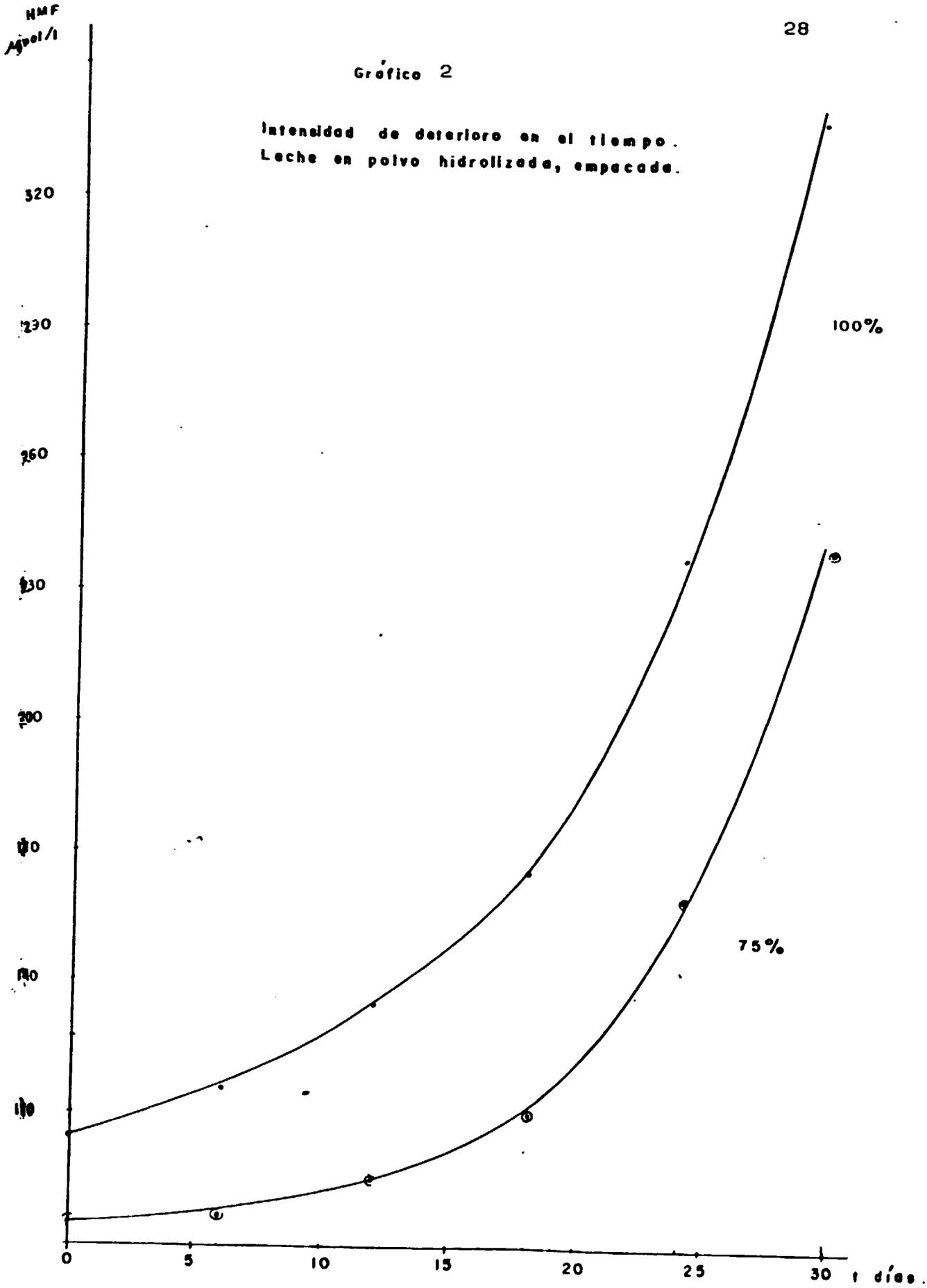


Gráfico 3

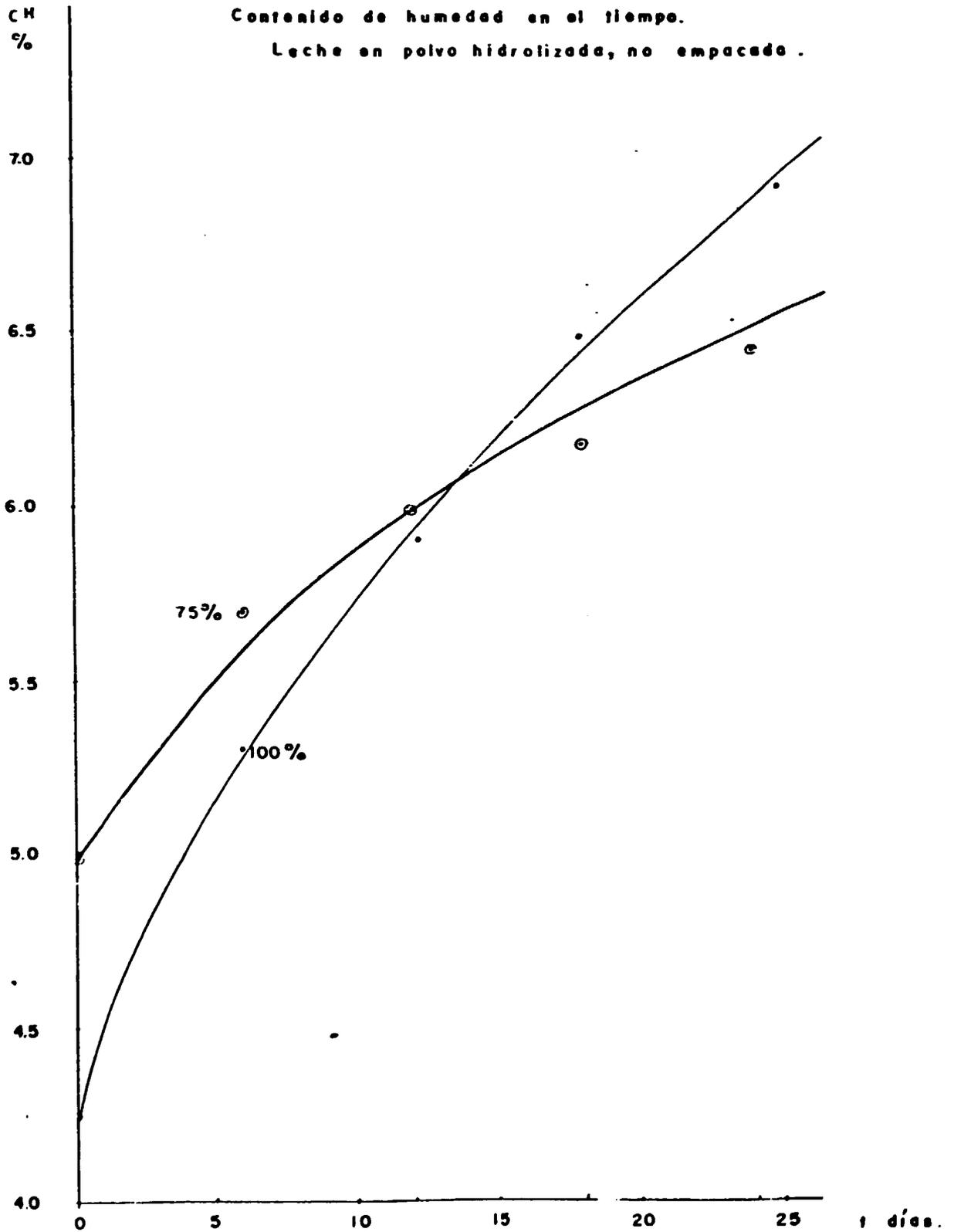


Gráfico 4

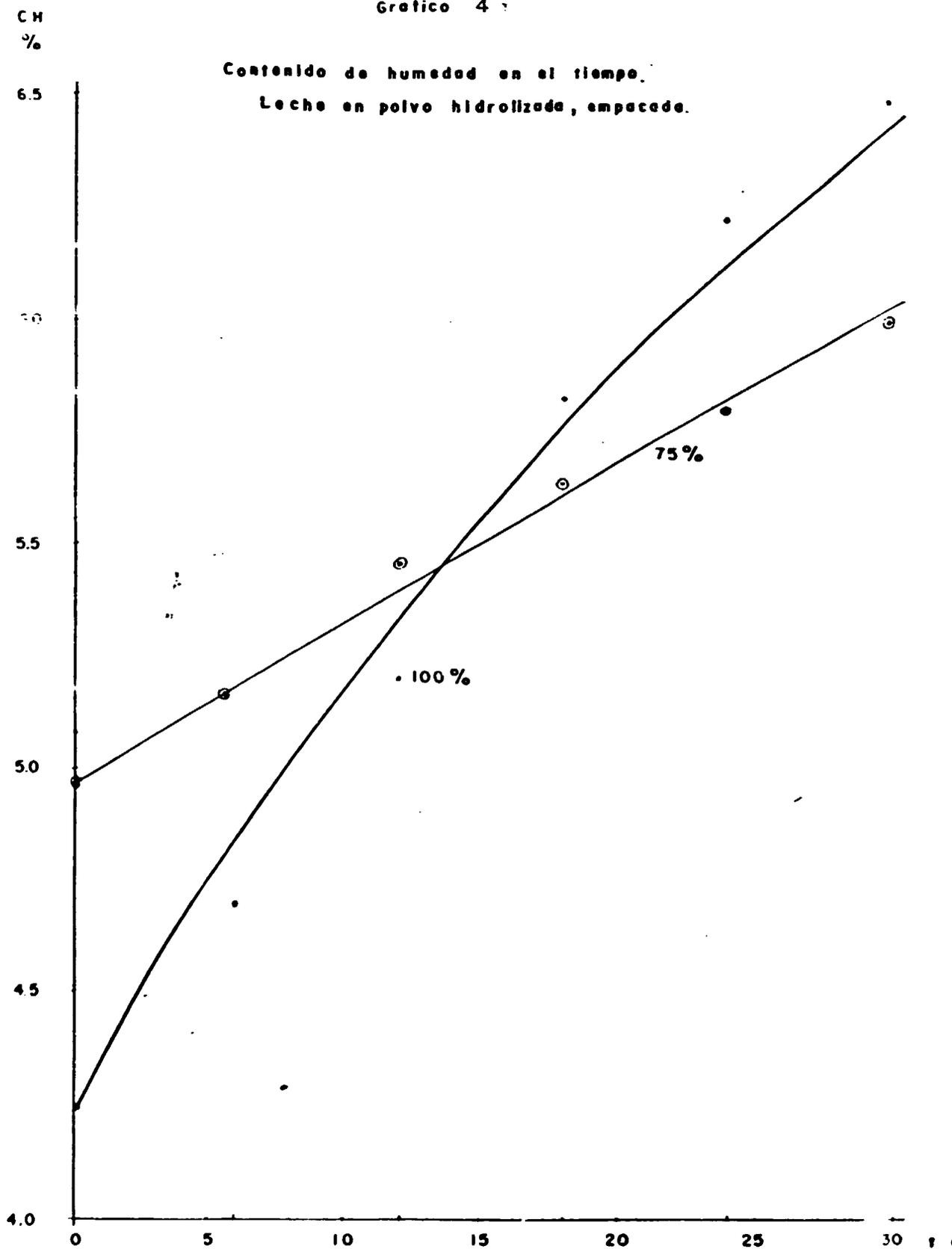


Gráfico 5

Isoterma de absorción experimental.  
Leche en polvo 75% hidrolizada.

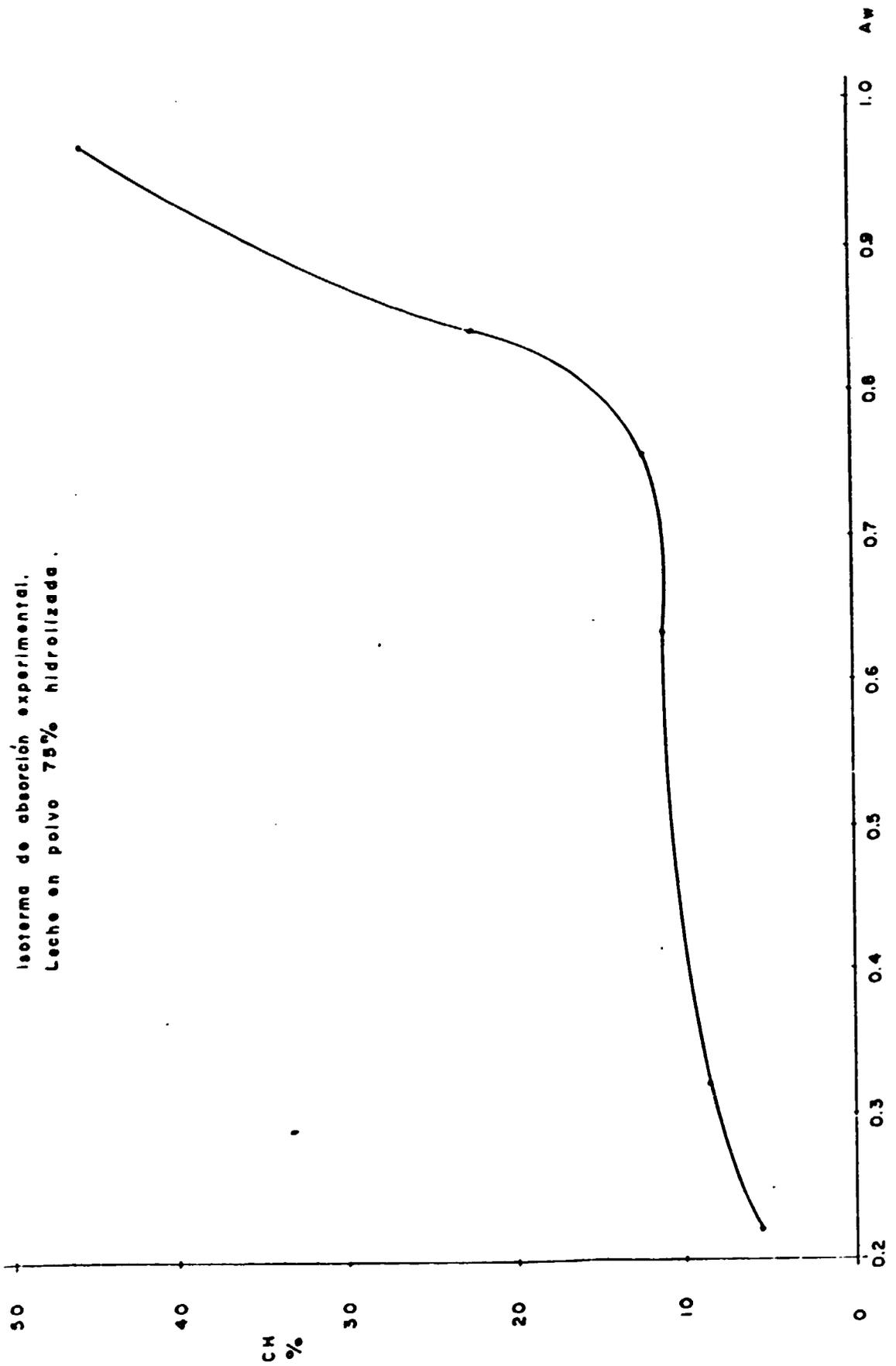


Gráfico 6.

Isoterma de absorción experimental.  
Leche en polvo 100% hidrolizada.

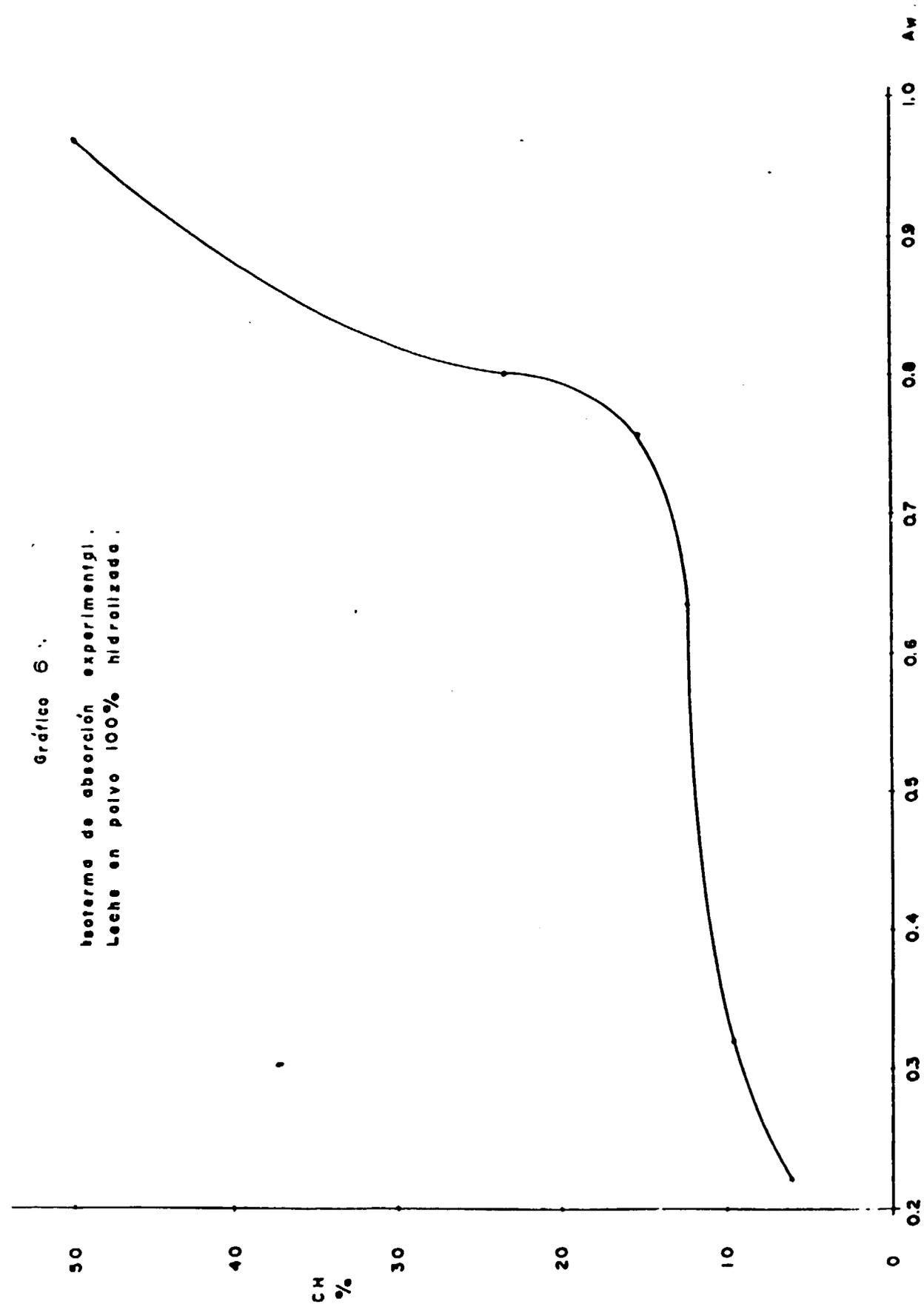
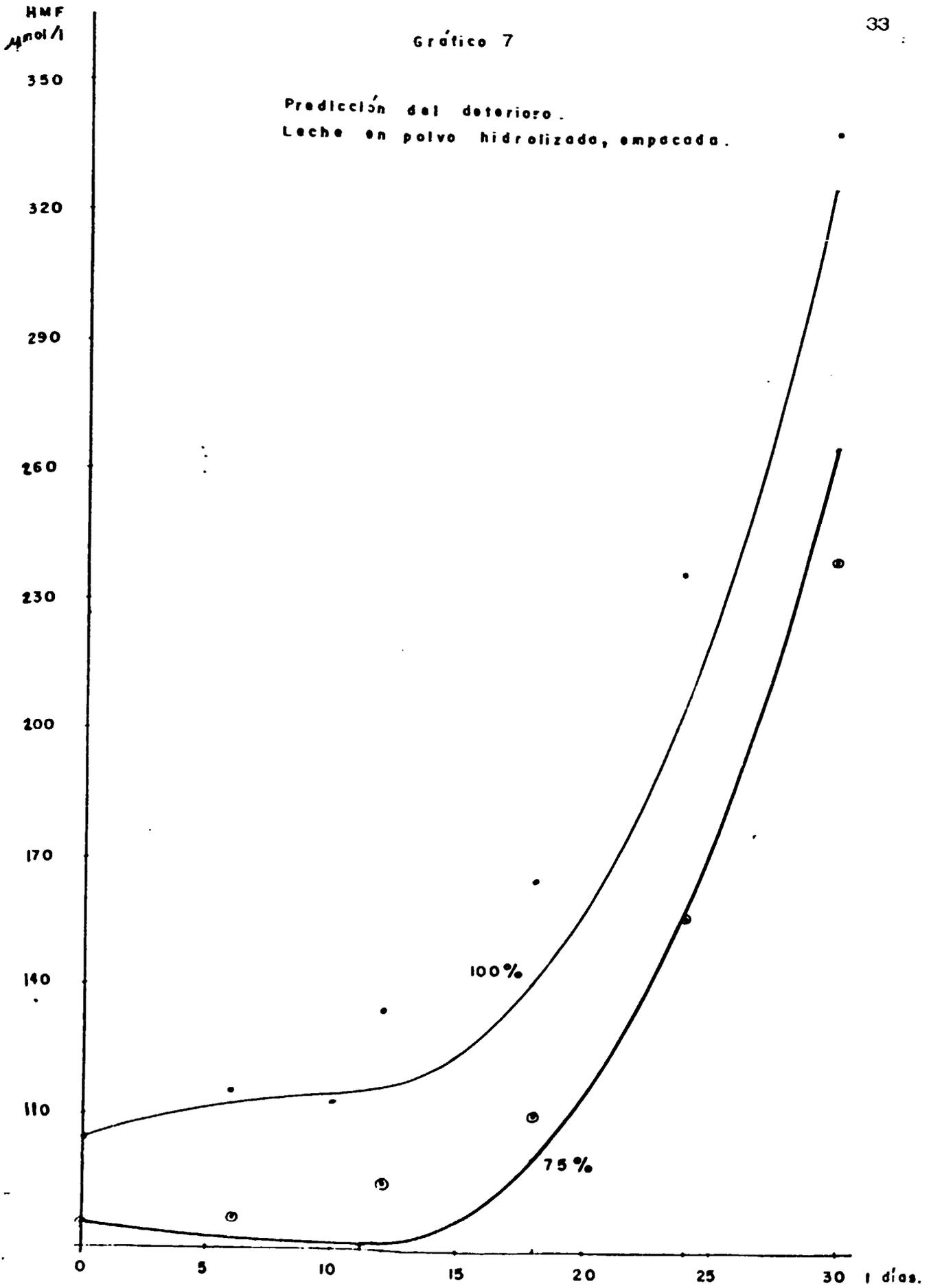


Gráfico 7

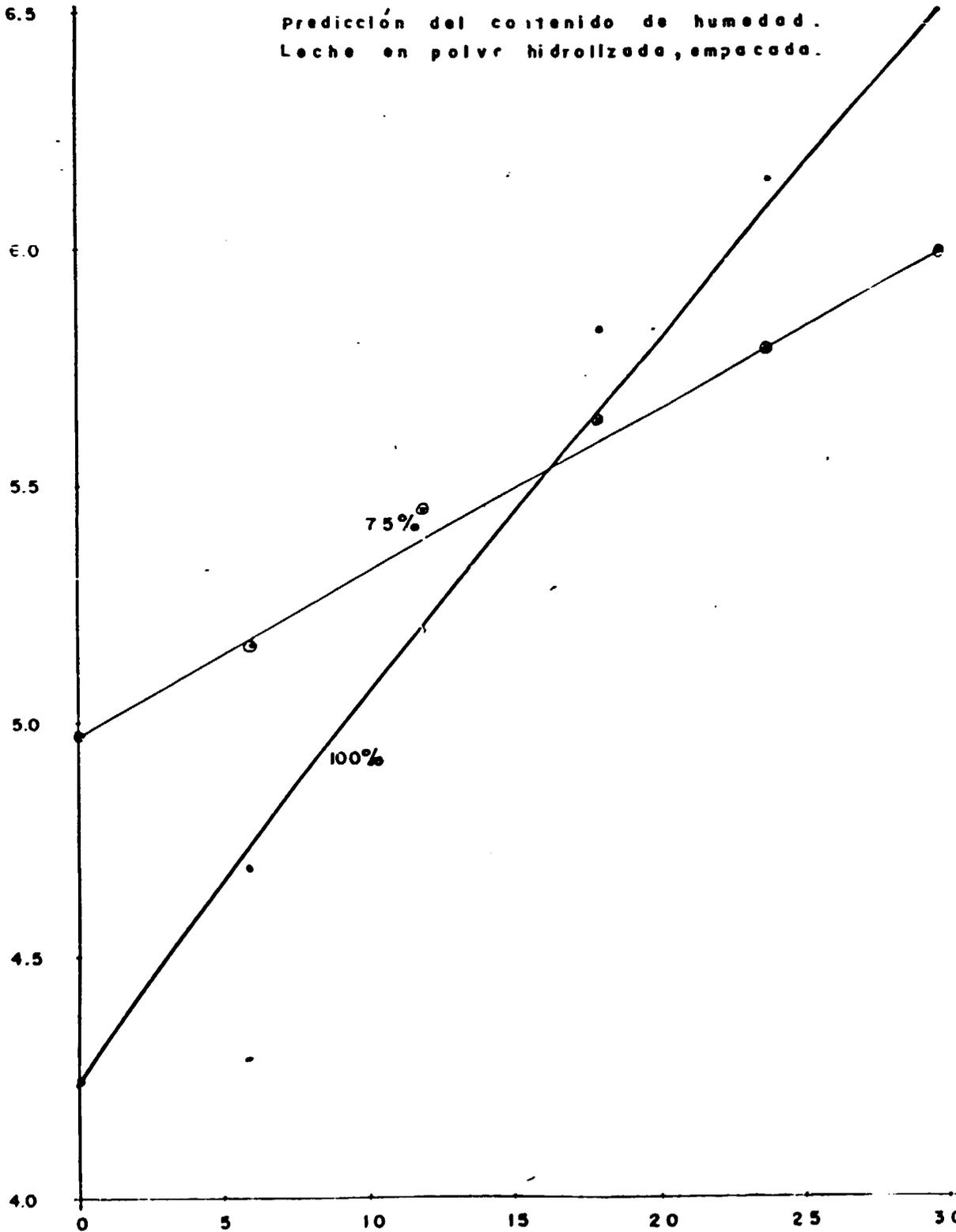
Predicción del deterioro.  
Leche en polvo hidrolizada, empacada.



CH  
%

Gráfico 8

predicción del contenido de humedad.  
Leche en polvo hidrolizado, empaquetado.



## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El fenómeno de absorción de agua de la leche en polvo hidrolizada puede describirse mediante el modelo de isoterma de Mizrahi para contenidos de humedad superiores al 9%, y para valores inferiores el modelo que más se ajusta es el de Oswin.

La relación del contenido de humedad con la intensidad de pardeamiento puede describirse adecuadamente con un polinomio de tercer grado, tanto para leche en polvo hidrolizada empacada como para leche en polvo hidrolizada no empacada en sus dos niveles de hidrólisis.

Los resultados de este trabajo nos permiten predecir rápidamente la estabilidad de leche en polvo.

La eficiencia del proceso se ve limitada a la etapa de evaporación siendo posible solo concentrar hasta 33°Brix, lo cual no permite obtener leche en polvo con valores de humedad inferiores al 4%, valor reglamentado por el Ministerio de Salud, por encima del cual el proceso de deterioro se acelera, no siendo posible almacenar dicha leche. A excepción de la etapa de evaporación, todas las etapas pueden realizarse satisfactoriamente en la planta de

leches elegida para el proyecto.

Se recomienda adecuar el evaporador existente en la Planta de Leches para poder concentrar leche hasta 50° Brix, y obtener un producto con menor humedad a la salida del secador.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abdou, Sonia, M.; Abd-E!-Hady.S; Dawood, A; Younis, M. 1984. The use of milk partially hydroiysed lactose in the manufacture of some dairy product. *Egyption Journal of Dairy Science*. 12 (2); 275.
2. ASTM. 1980. *Annual Book of ASTM Standards*. American Society for Testing and Materials, Easton, Md. USA; 87-96.
3. COY, Miguel. Efectos de la hidrólisis enzimática de la lactosa sobre la calidad de la leche deshidratada. Tesis (posgrado en Alimentos ) Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1988.
4. Burvall. A.; Asp, N.G.; Bosson, A.; San José, C. and Dahlqvist, A. 1978. Almacenamiento de la leche en polvo con lactosa hidrolizada: efecto de la actividad de agua en el valor nutricional de la proteína. *Journal of Dairy Research*. 45 (3): 381 .
5. Equipo Regional de Fomento y Capacitación en Lechería para América Latina 1981. *Manual de control de calidad*. Santiago de Chile, Chile . Anexo 3.
6. Kahlhofer, H. 1982. Examinations on the Keeney-Bassette method for the determination of HMF in milk powder. *Osterreichische Milchwirtschaft* 37:1 .
7. Kim, N.N.; Saltmarch, M. and Labuza T. 1981. Nonenzymatic browning of hygroscopic whey powder in open versus sealed pouches. *Journal of food processing and preservation*. 5:49.

8. Labuza, T.P. 1980. The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Food Technology*, 34 (4): 36.
9. Labuza, T.P. and Saltmarch 1982. Kinetics of browning and protein quality loss in whey powders during steady state and non-steady state storage conditions. *Journal of food Science*. 47:92.
10. Ministerio de Salud. Disposiciones Sanitarias sobre leche Ley 9 de 1979. Decreto 2437 de 1983. Bogotá-Colombia.
11. Mosaffar, P; Nakanish, L. and Matsunor, J. 1985. Formation of oligosaccharides during hydrolysis of lactose in milk using beta galactosidase from bacillus circulans. *Journal of food Science* 50:1602.
12. Rodríguez, A. 1985. Predicción de pardeamiento de leche en polvo almacenada en envases flexibles. Tesis MSc. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
13. Saguy, I. and Karel, M. 1980. Modeling of quality deterioration during food processing and storage *Food Technology*. Febr.: 78.

\*\*\*\*

## ANEXO No.1

DETERMINACION DE GLUCOSA POR EL METODO DE  
GLUCOSA-OXIDASASolución reactiva

- Disolver el contenido del frasco de enzima (1.25 ml) en la solución tampón (500 ml).
- Estabilidad : 4 semanas entre 2 y 8 oC.  
1 semana entre 15 y 25°C

Preparación de las muestras

- Tomar 4 ml de leche
- Adicionar 1 ml. de ácido tricloroacético al 10%.
- Centrifugar, y transferir el sobrenadante a un tubo de ensayo.
- Neucralizar con NaOH al 10%.
- Tomar 30 microlitros y adicionarlos a 3 ml de solución reactiva.
- Agitar y dejar en reposo durante 25 minutos.
- Leer absorvancia a 510 nm en espectrofotómetro.
- Utilizar como blanco 30 microlitros de agua destilada en 3 ml. de solución reactiva.

## ANEXO No.2

## CROMATOGRAFIA

Preparación de las muestras

- Tomar 10 ml. de leche y desproteinizarla con 3 ml. de ácido tricloroacético al 40%.
- Neutralizar con NaOH al 10%
- Utilizar columna empacada con resina catiónica (Amberlita IRC-501 para eliminar cationes.
- Lavar columna con agua desmineralizada y activarla con ácido clorhídrico 0.1N. Lavarla nuevamente con agua desmineralizada hasta neutralidad.
- Pasar la muestra por la columna y agregar agua desmineralizada.
- Tomar muestras de la columna y hacer prueba de Antrona (0.2% de antrona en ácido sulfúrico concentrado) para determinar la presencia de carbohidratos, agregando 2 gotas de reactivo por 1 gota de muestra. Esta prueba es positiva cuando se forma un anillo verde en el tubo de ensayo.

- Reactivar la columna cada vez que se pasa una muestra.
- Evaporar la muestra hasta llevarla al volumen inicial.

### Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas de celulosa

Fase móvil : Preparar una solución de n-butanol, ácido acético y agua en una relación 80:20:20 respectivamente.

- Depositar la fase móvil en una cámara de cromatografía y dejar que se sature con los vapores.
- Preparar patrones de glucosa y lactosa al 5% (p/v) en agua desmineralizada.
- Colocar 5 gotas de las muestras patrón y de las muestras a analizar sobre la placa. Dejar secar después de cada aplicación.
- Colocar las placas dentro de la cámara saturada cuidando que las muestras sembradas no toquen el solvente.
- Dejar correr el solvente hasta una altura de 15 cm. Sacar la placa y dejarla secar. Repetir esta operación tres veces.

### Revelado

- Preparar una solución de talato de anilina (0.95 ml de anilina y 1.66 g de ácido oftálmico disueltos en butanol saturado con agua desmineralizada).
- Calentar la solución reveladora durante 10 minutos.
- Atomizar la placa y secarla a 70°C.

## ANEXO No.3

## DETERMINACION DE 5 - HIDROXIMETILFURFURAL

Para determinar la intensidad de la Reacción de Maillard se determinó la formación de 5-hidroximetilfurfural (HMF) siguiendo el método descrito por Keeney y Bassette modificado por Craig et al. Para los análisis de cada muestra se hicieron determinaciones por duplicado siguiendo las recomendaciones sugeridas por Della Mónica et al, Samuelsson y Nielsen y Kalhofer (6). La determinación cuantitativa del HMF se hizo por medición espectrofotométrica de los productos de la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el producto reconstituído.

El procedimiento se detalla a continuación :

- Pesar 1,2 g. de leche en polvo directamente en un tubo de reacción (tubo de ensayo de 50 ml con tapa rosada).
- Reconstituir con 8.8 ml. de agua destilada, tomados con una pipeta graduada.
- Agregar 5 ml. de ácido oxálico 0.3N ( preparado diariamente); tapar y mezclar.
- Colocar en un baño de agua en ebullición durante 1 hora.

- Retirar los tubos y enfriar hasta temperatura ambiente.
- Agregar 5 ml. de ácido tricloroacético al 40% (TCA) y mezclar.
- Filtrar a través de papel filtro Whatmann No. 42.
- Pipetear 8 ml. de filtrado en un tubo de ensayo.
- Agregar 2 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.05 M.
- Colocar el tubo en un baño a 40°C durante 40 minutos.
- Retirar el tubo y enfriar a 25°C.
- Medir absorbancia en espectrofotómetro a 445 nm contra un blanco preparado sustituyendo la muestra de leche por 10 ml de agua destilada.

Para determinar la curva de calibración de HMF se midió la absorbancia para diferentes concentraciones de HMF, reemplazando en el procedimiento descrito, 10 ml de una solución de HMF por la leche reconstituida.

## ANEXO No.4

## PELICULA FLEXIBLE DE ALUMINIO

Características del empaque : Empaque producido por INTALPEL Ltda. Ofrece una permeabilidad al vapor de agua de  $0 \text{ g/m}^2$  en 24 horas ( dato suministrado por el fabricante ), determinada según la norma ASTM E-96, a 90% de humedad relativa,  $40^\circ \text{C}$ , durante 96 horas.

Este empaque está compuesto por tres capas :

- Capa externa : polipropileno biorientado de  $27 \text{ g/m}^2$ , con impresión al dorso.
- Capa media : aluminio de 9 micrones de espesor,  $24 \text{ g/m}^2$
- Capa interna: polietileno de  $48 \text{ g/m}^2$ .

Permeabilidad del material de empaque. Para determinar la velocidad de transmisión de vapor de agua del material de empaque se siguió en Método del desecante Standard E-96-80 de la ASTM de 1980 con una adaptación del método según recomendación de Davis et al. Pequeñas bolsas de empaque se llenaron de sulfato de calcio anhidro y se sellaron térmicamente. Las bolsas se colocaron en desecadores bajo la acción de dos soluciones de sales saturadas ( $\text{K}_2\text{SO}_4$  y  $\text{NaCl}$ .) y se dejaron a  $30^\circ \text{C}$  en una incubadora. Se

determinó el aumento de peso de las muestras de sulfato de calcio cada 24 horas, durante un período de 10 días. Se realizaron ensayos por duplicado.

Los valores de permeancia se obtuvieron a partir de los datos experimentales de ganancia de peso del desecante en cada ensayo. Mediante una regresión lineal por mínimos cuadrados, se correlacionó la ganancia de peso con el tiempo, a partir del tercer día cuando se tiene un aumento de peso constante y se determinó el valor de la pendiente de la relación de aumento de peso contra el tiempo. La velocidad de transmisión de vapor de agua (WVT) se obtuvo al dividir la pendiente por el área del material usado en cada ensayo. La permeancia ( $K_{H_2O/X}$ ) se calculó dividiendo el valor de WVT por el gradiente de presión. Los factores de correlación conseguidos en la regresión son del orden de 0.99.