

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# Biblioteca Digital FCEN-UBA

## Preservación de suero de queso por métodos combinados

Jagus de Kanterewicz, Rosa Juana

1985

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

[www.digital.bl.fcen.uba.ar](http://www.digital.bl.fcen.uba.ar)

Contacto: [digital@bl.fcen.uba.ar](mailto:digital@bl.fcen.uba.ar)

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y  
NATURALES  
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS

PRESERVACION DE SUERO DE QUESO POR METODOS COMBINADOS

Tesis presentada por  
ROSA J. JAGUS DE KANTEREWICZ  
para optar por el título de  
Doctor en Ciencias Químicas  
Orientación Química Industrial

Director de tesis: Dr. Jorge Chirife

Tesis 1918  
g. 2

1918

A mi esposo

A mis hijas

## AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Jorge Chirife por su dedicación y apoyo incondicional brindados durante el desarrollo de esta investigación.

A la Doctora Ethel Amato de Lagarde por su guía y colaboración en los aspectos relativos a la parte microbiológica de esta tesis.

Al Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) por permitir la realización de esta investigación en sus instalaciones.

Al Instituto Nacional de Microbiología, "Dr. Carlos G. Malbrán" por permitir la realización de las determinaciones microbiológicas en sus instalaciones.

A la División Optica del Departamento de Física del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) por facilitar sus equipos para la realización de las mediciones de color.

A los Doctores Ricardo Basualdo y Pedro Carrera en cuyo laboratorio se realizó la determinación de lisina disponible.

A la Secretaría de Ciencia y Tecnología (Programa Nacional de Tecnología de Alimentos) por la financiación parcial de esta tesis.

## INDICE

	Página
1. OBJETIVOS	1
2. INTRODUCCION	3
2.1. Elaboración, composición, aplicaciones y aprovechamiento del suero de queso	3
2.2. Consideraciones generales sobre preservación de alimentos por métodos combinados basados en la reducción de la actividad de agua	24
2.2.1. Actividad de agua en alimentos, su predicción y determinación	27
2.3. Efectos de la actividad de agua en el crecimiento microbiano	57
2.3.1. Factores que afecta la estabilidad microbiológica	58
2.4. Reacciones de deterioro en alimentos de actividad de agua reducida	96
2.4.1. Generalidades	96
2.4.2. Características principales del pardeamiento no enzimático	98

2.4.3. Reacción de Maillard	100
2.4.3.1. Factores que afectan la reacción de Maillard	102
2.4.4. Cambios de color producidos por el pardeamiento no enzimático	106
2.4.1. Medida cuantitativa del color	115
2.4.5. Pérdida del valor nutritivo	122
3. PARTE EXPERIMENTAL	128
3.1. Material utilizado	128
3.1.1. Determinación de la actividad de agua	128
3.1.2. Determinación de humedad	134
3.1.3. Determinación de pH	134
3.2. Estudio microbiológico	134
3.2.1. Reactivos	134
3.2.2. Preparación de muestras	135
3.2.3. Microorganismos	136
3.2.4. Medios y enumeración de microorganismos	136
3.2.5. Preparación de inóculos e inoculación	138
3.3. Medición de color	140
3.3.1. Preparación de muestras	140
3.3.2. Equipo	140

3.3.3. Técnica de la medición colorimétrica	141
3.3.4. Error en la medición de color	143
3.4. Pérdida de lisina disponible	143
3.4.1. Preparación de muestras	144
3.4.2. Equipos	144
3.4.3. Reactivos	144
3.4.4. Técnica de medición de lisina disponible	146
4. RESULTADOS Y DISCUSION	149
4.1. Actividad de agua de las soluciones de suero	149
4.2. Estabilidad microbiológica del suero concen- trado	161
4.3. Valor nutricional: pérdida de lisina disponible	178
4.4. Cambio de color	182
4.4.1. Representación del color	182
4.4.2. Cinética del cambio de color	186
4.4.3. Intervalo de confianza de las constantes de velocidad y energía de activación	201
5. CONCLUSIONES GENERALES	206
6. REFERENCIAS	209
7. TABLAS DE DATOS	238



## 1. OBJETIVOS

El suero, subproducto de la industria quesera, es un material altamente nutritivo y a su vez altamente contaminante. Considerando la creciente demanda mundial de fuentes adicionales de proteínas, sumado al alto costo que implica el tratamiento de este afluente como tal, se hace evidente la necesidad de hallar procesos alternativos de transformación a los ya existentes. Si bien son conocidas muchas de las tecnologías implementadas en países desarrollados para la manufactura del suero, no siempre es posible aplicarla en nuestro país por falta de los equipos apropiados, que suelen ser sofisticados en algunos casos y muy costosos en otros. Por estos motivos el objeto de esta investigación fue hallar un proceso simple y económico, que permita obtener un producto de bajo costo, físico-química y microbiológicamente estable y organolépticamente aceptable, para que pueda reemplazar por ejemplo al suero en polvo o al concentrado de proteínas de suero en algunas de sus aplicaciones, o que intervenga en nuevas aplicaciones y formulaciones para consumo humano y animal.

Para ello se adoptó un procedimiento basado en la combinación de distintos métodos: tratamiento térmico moderado, control y disminución de la actividad de agua ( $a_w$ ), disminución del pH y agregado de ciertos agentes químicos antimicrobianos permitidos por el

Código Alimentario Argentino. Para optimizar el proceso de preservación se estudió la efectividad de distintas combinaciones de estos métodos para inhibir el desarrollo de microorganismos contaminantes. Definidas las condiciones para lograr la estabilidad microbiológica del suero de queso, se evaluó la posible influencia de estas condiciones en ciertas características de calidad importantes del producto como su color y su valor nutricional (indicado por la pérdida de lisina disponible).

## 2. INTRODUCCION

### 2.1. Elaboración, composición, aplicaciones y aprovechamiento del suero de queso

El suero es el líquido resultante de la coagulación de la leche en la fabricación del queso, tras la separación de la caseína y de la grasa. La caseína puede ser separada por coagulación o por acidificación, obteniéndose suero dulce o suero ácido respectivamente. La figura 1 ilustra la tecnología de elaboración de queso por coagulación y la obtención de suero dulce, que fue la materia prima utilizada en esta investigación (Spreer, 1973).

El rendimiento en suero varía según el tipo de queso. El queso de pasta dura requiere aproximadamente 100 lt. de leche para producir 10 kg de queso, dando alrededor de 9 lt de suero por kg de queso elaborado. En el caso de quesos de pasta semi-dura o blanda, el rendimiento es de 5 a 7 lt de suero por kg de queso (a mayor blandura, mayor retención de suero de queso).

La tabla 1 muestra la elaboración de queso en nuestro país por tipo de pasta. De la producción total correspondiente al año 1984, se exportó 4.859 toneladas y el resto se comercializó internamente para consumo.

La producción mundial de suero líquido es estimada en

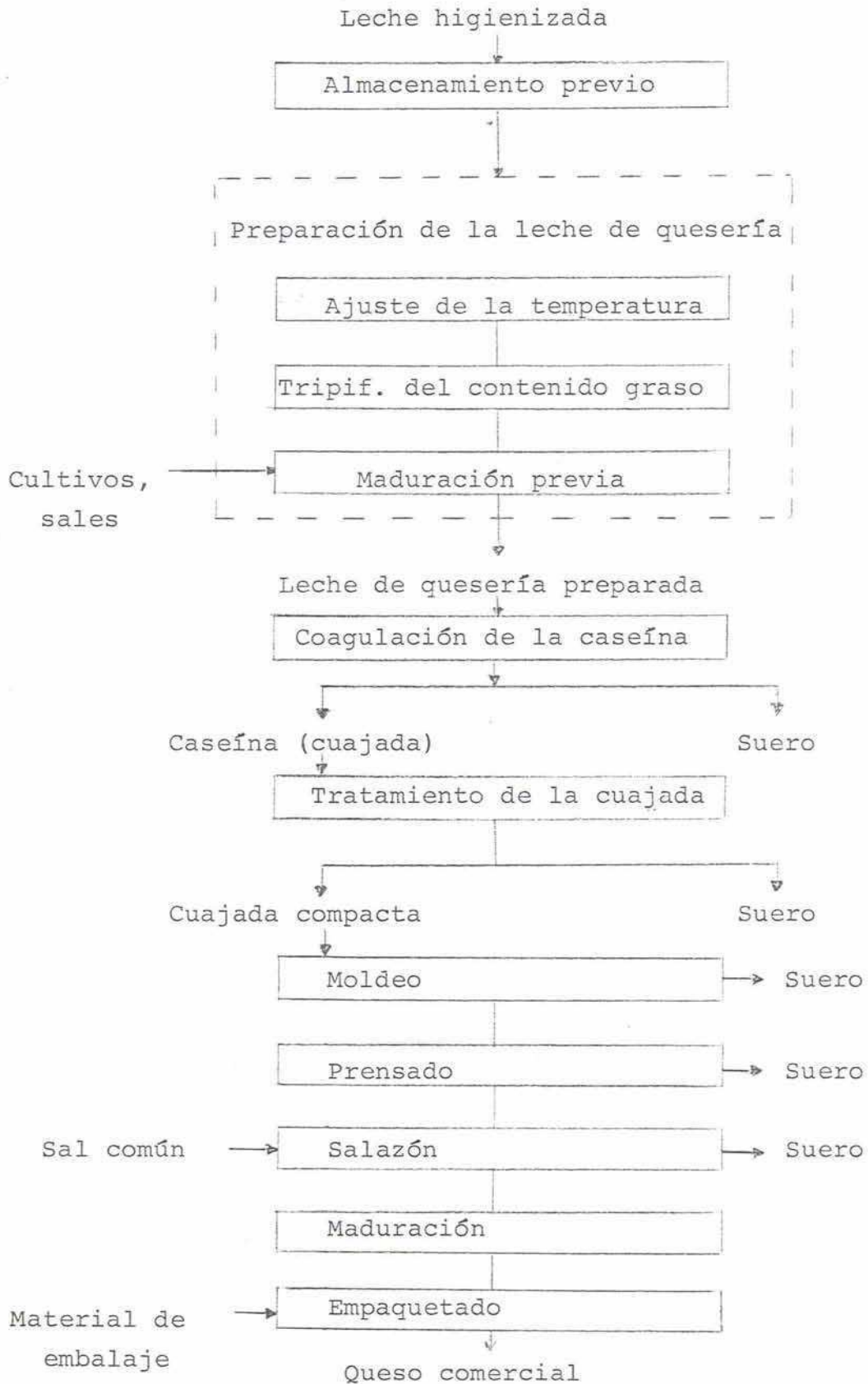


Figura 1: Tecnología de elaboración de queso por coagulación (a)

(a) Spreer (1973)

Tabla 1 : Elaboración de quesos por tipo de pasta en la Argentina (a) (toneladas)

Año	Dura	Semidura	Blanda	Total
1982	45.899	82.434	110.843	239.176
1983	48.714	82.317	116.621	247.652
1984	32.322	80.675	98.881	211.879

(a) Secretaría de Agricultura y Ganadería de la Nación.

$8,5 \times 10^{10}$  toneladas (Zall, 1983) para el año 1982 el que contiene  $6,3 \times 10^8$  toneladas de proteínas. La tabla 2 muestra la producción aproximada de suero líquido para los años 1982 - 1984 en nuestro país, y los valores potenciales de proteína y lactosa que se pueden obtener por el procesamiento de este suero líquido. Estas cifras de niveles de proteínas y lactosa aprovechables nos da una idea de la importancia del suero como materia prima de alto aporte proteico a los fines de la alimentación humana y animal. La composición del suero fresco (líquido), se muestra en la tabla 3 (Josephson y Harper, 1974).

La tabla 4 muestra una comparación de la leche y los dos principales efluentes de la industria láctea: suero procedente de la fabricación de queso y permeato procedente de la fabricación de queso blando por ultrafiltración (UF) en países como Canadá y Francia (Jelen, 1983). El principal problema de estos dos efluentes es el contenido de lactosa. En el caso del suero, hay una cantidad suficiente de proteínas, para que su recuperación resulte interesante. Sin embargo, en el permeato, prácticamente, el problema se reduce al contenido de lactosa y minerales. En la figura 2 se muestra la magnitud relativa del problema del procesamiento de estos efluentes.

Las proteínas contenidas en el suero son de excelente ca-

Tabla 2 : Producción aproximada de suero de queso en la Argentina y valores aproximados de proteínas y lactosa que se pueden obtener por su procesamiento (a)

Año	Suero líquido (toneladas)	Proteínas (toneladas)	Lactosa (toneladas)
1982	$1,57 \times 10^6$	$1,18 \times 10^4$	$7,30 \times 10^4$
1983	$1,63 \times 10^6$	$1,22 \times 10^4$	$7,59 \times 10^4$
1984	$1,37 \times 10^6$	$1,03 \times 10^4$	$6,36 \times 10^4$

(a) Secretaría de Agricultura y Ganadería de la Nación.

Tabla 3 : Composición aproximada del suero de queso (a)

Componentes	Porcentajes (%)	
	Suero por coagulación	Suero por acidificación
agua	93	93,5
lactosa	4,9	4,4
proteínas	0,8	0,7
grasa	0,2	0,04
minerales	0,5	0,8
ácido láctico	0,2	0,5
pH	6,45	5

(a) Josephson and Harper (1979)



Tabla 4 : Composición promedio de efluentes de la industria  
lactea comparada con la leche (a)

Componente	Contenido (%)			
	Proteína	Grasa	Lactosa	Minerales
Leche	3,3	3,8	5,0	0,9
Suero	0,9	0,05	4,8	0,8
Permeato	0,1	0,01	4,8	0,6

(a) Jelen (1983).



Figura 2: Magnitud relativa de los problemas relacionados al reprocesamiento de efluentes tales como suero de queso o permeato procedente de la fabricación de queso por ultrafiltración (a)

(a) Jelen (1983)

lidad, y también es una muy buena fuente de vitaminas y minerales provenientes de la leche. La distribución de las principales sustancias nitrogenadas se muestran en la tabla 5. A pesar de que el contenido proteico es de sólo 13% (en suero deshidratado), se lo reconoce como excelente suplemento para la mayoría de las proteínas que constituyen los alimentos básicos de grandes poblaciones en el mundo (cereales). Estas proteínas están constituidas por una mezcla de proteínas y glicoproteínas. Sus componentes son las albúminas y globulinas que se insolubilizan por calentamiento a aproximadamente 90°C. En contraste con la caseína (proteína más abundante en la leche), las proteínas del suero son solubles al valor del pH isoeléctrico de la caseína (4,5-4,6). Cuando están desnaturalizadas (por acción del calor), su solubilidad en la región isoeléctrica (o en soluciones salinas) está disminuída en gran medida y coprecipita con la caseína. La fracción proteica coagulable por calor del suero es fundamentalmente globulina y albúmina. La no coagulable pero precipitable en parte por ácido tricloroacético, se la designa fracción "proteasa-peptona" (sustancias de PM intermedio entre proteínas y péptidos). Las sustancias "nitrogenadas no proteicas" son materiales dializables, de PM inferior a 500, que permanecen en solución en las distintas condiciones en que se produce la precipi-

Tabla 5: Distribución de las principales sustancias nitrogenadas de la leche de vaca (a)

	Proporciones	
	Relativas	gramos por litro
<u>Prótidos totales</u>	100	32
<u>Caseína entera</u>	78	25
Caseína $\alpha_S$	40	10,0
Caseína $\beta$	30	7,5
Caseína $\chi$	15	3,8
Diversos	15	3,7
<u>Proteínas del suero</u>	17	5,4
$\beta$ - lactoglobulina	50	2,70
$\alpha$ - lactoalbúmina	22	1,20
Globulina (inmunes)	12	0,65
Sero-albúmina	5	0,25
Proteosas-peptonas	10	0,60
<u>Sustancias nitrogenadas no proteicas</u>	5	1,6

(a) Alais (1971).

tación de las proteínas, y son de estructura química muy variable (junto a aminoácidos libres se encuentran urea, creatina, creatinina, ácido úrico, amoníaco, nucleótidos, fosfolípidos). (Alais, 1971).

Hasta no hace muchos años, el suero se consideraba como un residuo de eliminación costosa. Dada su composición, pH y  $a_w$  ( $> 0,99$ ), este sufre un rápido deterioro si se lo mantiene a temperatura ambiente. Lo habitual era derivarlo a los ríos. Con el desarrollo de la industria quesera, se crearon serios problemas de contaminación producidos por la eliminación de este efluente. En este sentido, las reglamentaciones en prevención de la contaminación, obligaron a los fabricantes a elaborar el suero o a montar instalaciones propias de evacuación. La primera alternativa, que es la más beneficiosa, a llevado a muchos investigadores a estudiar caminos alternativos de utilización de este subproducto (Jelen, 1983; Schingoethe, 1975; Hargrove et al., 1975).

Los procesos más comúnmente utilizados se pueden clasificar en:

- Procesos de separación o fraccionamiento: entre éstos se encuentran la ultrafiltración, electrodiálisis, e intercambio iónico entre otros, aplicados para obtener los ingredientes

funcionales del efluente.

- Procesos de concentración: Se utiliza para concentrar el suero o su fracción proteica, aplicándose para esto evaporación bajo vacío u ósmosis inversa (Wesley, 1981).
  
- Procesos de secado: Este es un proceso importante en la elaboración de ingredientes para la industria alimentaria; habitualmente se utiliza secado spray o liofilización. Se deben tener algunas precauciones debido a la higroscopicidad del producto final y la necesidad de evitar el daño térmico de las proteínas.

Se sabe que actualmente, en países desarrollados como los Estados Unidos, el 50% del suero total producido se lo envía a sistemas municipales o industriales de tratamiento (Morr, 1984). El 50% restante es elaborado para distintos usos (Tabla 6). Más del 50% del suero manufacturado es transformado en suero en polvo. Este se obtiene por concentración hasta el 50% de sólidos y un posterior secado spray, lo que implica un costo significativo. Su composición aproximada se muestra en la tabla 7 (Weisberg, 1976).

Tabla 6: Valores estimados de elaboración de suero de queso en U.S.A., 1982 (a)

Producto	Toneladas
Suero condensado	$5,4 \times 10^4$
Suero en polvo, consumo humano	$2,8 \times 10^5$
Suero en polvo, consumo animal	$8,0 \times 10^4$
Suero parcialmente delactosado	$5,6 \times 10^4$
Suero parcialmente desmineralizado	$1,4 \times 10^4$
Proteínas de suero concentrado	$3,2 \times 10^4$
Mezclas húmedas con caseína o proteína de soja	$6,3 \times 10^4$
Lactosa	$1,0 \times 10^5$

(a) Morr (1984).

Tabla 7: Composición aproximada de suero de queso deshidratado (a)

Componentes	(%)	Aminoácidos	(%)	Vitaminas	
Proteína	12,9	Arginina	0,32	Vitamina A	200 UI/lb
Grasa	0,9	Metionina	0,25	Vitamina E	0,11 UI/lb
Fibra	0,0	Lisina	1,07	Vitamina B <sub>12</sub>	10,0 ug/lb
Cenizas	8,0	Triptofano	0,22	Tiamina	2,2 mg/lb
Humedad	4,5	Histidina	0,20	Riboflavina	10,0 mg/lb
Calcio	0,6	Isoleucina	0,74	Niacina	4,0 mg/lb
Fósforo	0,6	Leucina	1,14	Acido pantoténico	20,0 mg/lb
Sodio	0,7	Fenilalanina	0,36	Colina	900,0 mg/lb
Lactosa	73,0	Valina	0,73	Acido fólico	0,44 ug/lb
Energía (Kcal/lb)	1500,0	treonina	0,83		

(a) Weisberg (1976).



En nuestro país se produjeron 2.380 toneladas de suero en polvo en el año 1984. Actualmente este polvo es un componente en muchos alimentos para consumo humano, entre los que se incluyen productos de panificación y pastelería, helados, sopas preparadas, quesos fundidos, bebidas analcohólicas y formulaciones para niños (Bates et al., 1974). Las desventajas del suero en polvo son su tendencia al apelmazamiento y el ser pulverulento. La higroscopicidad es provocada principalmente por su contenido de lactosa amorfa, pero las proteínas y sales también participan en la absorción de humedad. Sin embargo, la lactosa como componente predominante del suero tiene una influencia decisiva sobre su higroscopicidad. Por lo tanto, la misma puede rebajarse considerablemente si la lactosa está presente en el producto final en forma de un monohidrato de alfa-lactosa, no higroscópico, aunque el suero en polvo con un 100% de contenido de lactosa en forma de cristales es todavía hasta cierto punto higroscópico, debido a la presencia de las sales y las proteínas. La tabla 8 muestra la cantidad y porcentajes de utilización de suero en polvo en Estados Unidos para el año 1982 (Morr, 1984). Entre los otros procesos mencionados, los más utilizados son los necesarios para separar las proteínas y la lactosa. Para la recuperación de las proteínas existen dos procesos comúnmente aplicados. Si tanto la lactosa como el suero parcialmente delactosa-

Tabla 8: Utilización de suero en polvo y concentrado de proteínas de suero en consumo humano, 1982 (a)

Aplicación	Suero en polvo		Concentrados de proteínas	
	(Kg)	(%)	(Kg)	(%)
Panadería	35,86	30	0,045	0,6
Mezclas con proteínas	29,51	25	3,632	46,0
Industria láctea	29,51	25	4,086	51,0
Mezclas con cereales	16,80	14	-----	----
Sopas	1,73	1,4	-----	----
Confituras	1,14	1,0	-----	----
Carne procesada	0,68	0,6	0,045	0,6
Margarina	0,64	0,5	-----	----
Institucionales	0,18	0,2	-----	----
Comidas de infantes	-----	---	0,045	0,6
Bebidas/comidas dietéticas	-----	---	0,045	0,6
Total	119,76	100	7,900	100

(a) Morr (1984)

do son de interés, se debe desmineralizar y concentrar por ósmosis inversa (RO) o evaporación al vacío, cristalizar la lactosa y secar el concentrado de proteína (30%). Si lo que se busca es una proteína concentrada de mayor pureza (35-80%) se debe utilizar ultrafiltración (UF), seguida de concentración y secado. Sin embargo, el costo de proceso por Kg de proteína, en este último caso, es sumamente elevado. El punto principal de esta recuperación no es la dificultad del proceso, sino su costo. Por este motivo varios investigadores han propuesto pretratamientos para la UF, tendientes a aumentar el flujo de proceso más que a mejorar la calidad del producto final, motivados en consideraciones económicas tales como costo de equipamiento, depreciación, reemplazo de la membrana, etc. (Matthews, 1979). Como ejemplo de este pretratamiento se puede mencionar el tratamiento de clarificación utilizado en Holanda para suero ácido, que involucra una desmineralización y una floculación. Otro ejemplo es el tan discutido tratamiento Australiano que consiste en calentar el suero a 80°C por 15 segundos, controlando el pH en alrededor de 5,5 (Hayes, et al., 1974). Si bien este tratamiento supuestamente aumenta el flujo del proceso de UF, paralelamente disminuye la solubilidad final de la proteína obtenida. En estudios relativamente recientes, se ha concentrado la atención en el uso de

métodos basados en la separación de proteínas de suero con electrolitos (formación de complejos insolubles con carboximetilcelulosa, trimetafosfato, hexametafosfato y tetrametafosfato de sodio), incrementando el contenido proteico por filtración en gel o por intercambio iónico.

En la tabla 9 se muestra la composición del concentrado de proteína de suero y la comparación con leche en polvo descremada (Morr, 1984), y en la tabla 8 se dan las aplicaciones que este concentrado tiene en Estados Unidos. El concentrado de proteínas se lo obtiene en forma de polvo. Las formas obtenidas con un mínimo de desnaturalización presentan propiedades físicas altamente deseables para uso alimentario. Por ejemplo su "flavor" relativamente suave, su alta solubilidad y su facilidad para coagular (fenómeno que es responsable de interesantes interacciones con otras proteínas) (Wingerd, 1970).

Una importante aplicación de estos concentrados es en la preparación de proteínas texturizadas. Estos gránulos son preparados a partir de formulaciones en las que intervienen grasa, concentrado de proteínas de suero y "flavors" (a queso, pollo, jamón, etc.). Al ser agregados a una sopa, en el comienzo de su ebullición, los gránulos se hidratan y las proteínas coagulan para dar piezas con "flavor" y textura similar al producto desea-

Tabla 9: Composición del concentrado de proteínas de suero (CPS) y leche en polvo condensada (LPD) (a)

Componente	35% CPS	70-80% CPS	LPD
	(%)		
Proteína, mín. (Nx6,38)	35	76	35,8
Lactosa, máx.	40-60	8,0	51,4
Minerales, máx.	2-20	3,0	7,9
Grasa, máx.	2,4-4,5	8,0	0,7
Humedad	4,0	4,0	4,0

(a) Morr (1984)

do. También se preparan gránulos con "flavor" a fruta, de particular interés en productos de horneado y de cereales para desayuno. Estas proteínas muestran propiedades funcionales únicas que las hacen convenientes para la fortificación de bebidas analcohólicas carbonatadas. Considerando el volumen significativo de este tipo de bebidas que se consumen, especialmente por los niños, la incorporación de sólo un 1% en peso de concentrado de proteínas (80%), representaría un aumento del valor nutritivo con un ligero incremento en los costos. Es obvio que las proteínas aisladas deberán sufrir un mínimo de desnaturalización en razón de su principal propiedad funcional que es la solubilidad. El concentrado de proteínas de suero (35%) podrá reemplazar a la leche descremada en polvo en preparaciones para lactantes, ya que el efecto de suplementación del suero es más pronunciado que el de la leche descremada. De especial interés son los elevados niveles de lisina, triptofano y azufrados en las proteínas del suero, los que hacen que este subproducto sea valioso como suplemento de proteínas vegetales de baja o relativamente baja calidad nutricional (cereales, lino, etc.). El nivel relativamente bajo del aminoácido fenilalanina en las proteínas del suero, lo señala particularmente conveniente como una fuente natural de proteínas en la dieta recomendada para el tratamiento de niños con fe-

nilcetonuria.

La otra recuperación indispensable en el procesamiento del suero, es la de la lactosa. Se sabe que ningún proceso de recuperación de proteína puede hacer económico el reprocesamiento del suero, si no se intenta paralelamente una solución para el manejo del gran caudal de lactosa emergente de este efluente. La hidrólisis de la lactosa para obtener jugos azucarados parece ser uno de los procesos con más futuro para solucionar este problema. La hidrólisis puede ser química o enzimática. En el caso de hidrólisis química, se aplican altas temperaturas (90-140°C) y muy bajos pH (1,5), controlado por el agregado de ácidos y por columnas de intercambio iónico (Mac Bean, 1979). En ambos casos los problemas ingenieriles que se presentan, tales como el de corrosión, son muy serios, y por lo tanto no se conocen muchas aplicaciones industriales. La hidrólisis enzimática es la más frecuentemente aplicada en la industria. La enzima  $\beta$ -galactosidasa, se adquiere comercialmente, en su forma libre. Coton (1981) sugiere que el camino más económico es la utilización de la enzima inmovilizada. Hay dos rutas posibles para la hidrólisis enzimática:

- la hidrólisis puese ser llevada a cabo en el permeato despro-

teinizado, conjuntamente con una operación de recuperación de la proteína.

- el suero completo es tratado sin remover previamente la proteína

La conversión del permeato en el jugo azucarado requiere un paso adicional de desmineralización. Para la desmineralización de suero en forma industrial, cuando se requiere más del 90% de desmineralización, se aplica el proceso de intercambio iónico, pero tiene la desventaja de la inespecificidad respecto a que iones se remueven. Si se desea sólo un 70% de desmineralización, la electrodiálisis es más económica que el intercambio iónico. Estos jugos azucarados son utilizados en helados, confituras, productos frutales y producción de levaduras entre otros.

## 2.2. Consideraciones generales sobre preservación de alimentos por métodos combinados basados en la reducción de la actividad de agua

Los objetivos que se persiguen en la preservación de alimentos son:

- a- estabilidad microbiológica
- b- estabilidad nutricional



c- estabilidad organoléptica

Es evidente que la estabilidad microbiológica es prioritaria debido a que está directamente relacionada con la salud humana, por lo tanto este objetivo se debe conseguir independientemente del tipo de alimento que se quiera preservar. La estabilidad nutricional y organoléptica puede variar dentro de un cierto rango de aceptabilidad que depende de cada alimento en particular.

Desde la antigüedad, el hombre observó que el deterioro podía ser retrasado o prevenido con la reducción del contenido de agua. Fue así que se realizó el secado natural o la deshidratación mecánica como métodos de conservación. Posteriormente se vio que la humedad de un producto no era el parámetro más adecuado para predecir su estabilidad y que ésta estaba vinculada a otra propiedad relacionada con el estado del agua en el alimento. Surge entonces el término de actividad de agua como expresión de la cantidad de agua "disponible" para intervenir en las reacciones de deterioro (Scott, 1957). Basados en este concepto aparecen los llamados "alimentos de humedad intermedia" (IMF), definidos como alimentos suficientemente húmedos para ser consumidos sin rehidratación previa y estables sin refrigeración o proceso térmico (Kaplow, 1970). Estos alimentos contienen una humedad ex-

presada en base seca, del 20 al 50%, la que implica valores de actividad de agua en el rango 0,70-0,86. Su estabilidad se debe a la reducción de  $a_w$  impidiendo de esa forma el desarrollo microbiano. Luego del éxito obtenido con los alimentos de humedad intermedia para perros, se intentó desarrollar alimentos de humedad intermedia para consumo humano (Heidelbourgh y Karel, 1975; Davis et al., 1976; Flink, 1978). Sin embargo, éstos no resultaron exitosos debido, básicamente, a que las concentraciones necesarias de los humectantes agregados (sal, azúcar, polioles) para reducir la  $a_w$  al valor deseado, lo hacen inaceptable desde el punto de vista organoléptico. Es importante destacar también, que si bien los alimentos de humedad intermedia presentan buena resistencia al deterioro microbiano, sus condiciones los hacen particularmente favorables al desarrollo de otras reacciones de deterioro como el pardeamiento no enzimático y la oxidación de lípidos (Labuza, 1975), disminuyendo de esta forma su calidad y aceptabilidad. Por esta razón es importante hallar una formulación tal que permita obtener un alimento organolépticamente aceptable y donde además se minimicen todas las reacciones de deterioro. Este enfoque ha sido últimamente aplicado, desarrollándose técnicas que permiten obtener alimentos microbiológicamente estables, de actividades de agua más elevadas que los

de humedad intermedia, superando de esta forma los inconvenientes anteriormente mencionados (Fox y Loncín, 1982). Estos alimentos se obtienen como resultado del efecto combinado del control y disminución de la actividad de agua, disminución del pH, control de la composición y agregado de aditivos antimicrobianos. El alimento resultante puede ser conservado sin refrigeración y sin llegar a su deshidratación, disminuyendo de esta forma el costo energético y obteniéndose además un alimento de buena calidad organoléptica y nutricional.

Estas fueron las razones que impulsaron la idea de estudiar la posibilidad de estabilizar el suero de quesería, sin utilizar refrigeración y sin llegar a la deshidratación.

#### 2.2.1. Actividad de agua en alimentos, su predicción y determinación

En un sistema líquido/vapor de un sólo componente, la tendencia que presentan las moléculas al escape se mide en términos de la energía libre de Gibbs ( $G$ ). En un sistema de multicomponentes, la tendencia al escape del solvente (denominado componente 1) está dada en términos de su potencial químico ( $\mu_1$ )

$$\mu_1 = \left( \frac{\partial G}{\partial n_1} \right)_{T, P, n_2, \dots, n_i} \quad (1)$$

donde  $n_i$  es el número de moles de la especie  $i$ .

Es útil definir fugacidad ( $f_i$ ), la cual para ciertas situaciones es asimilable a la presión de vapor ( $p_i$ ). Para vapores saturados a temperaturas ordinarias, la diferencia entre fugacidad y presión de vapor es muy pequeña; por ejemplo a 293 K la relación  $f/p$  para el agua es 1,001 (Franks, 1982). El potencial químico del agua está dado por

$$\mu_1 = R T \ln f_1 + A_1 \quad (2)$$

donde  $A_1$  es una constante a una dada temperatura. Para un cambio en la concentración de agua a una dada temperatura

$$\mu_1 - \mu_1^0 = \Delta\mu_1 = R T \ln(f_1 - f_1^0) \quad (3)$$

El concepto termodinámico de actividad de agua ( $a_i$  o  $a_w$ ), fue definido básicamente por Lewis (1907) como relación entre la fugacidad real y la fugacidad del componente en el estado standard,

$$a_w = f_1 / f_1^{\circ} \quad (4)$$

donde  $f_1$  es la fugacidad del agua en el alimento y  $f_1^{\circ}$  es la fugacidad del agua en un estado standard definido. Luego en este estado,  $a_1^{\circ} = 1$  y en cualquier otro estado

$$\mu_1 - \mu_1^{\circ} = R T \ln a_1 \quad (5)$$

El estado standard es arbitrario y las limitaciones que esto implica son:

- a- que la temperatura del estado standard de referencia sea igual a la temperatura del sistema.
- b- que la presión total esté definida.

La comparación de  $a_w = f_w / f_w^{\circ}$  con la humedad relativa de equilibrio del mismo sistema ( $p_w / p_w^{\circ}$ ) muestra que hay una diferencia no mayor del 0,2% a temperatura y presión ambiente. La fugacidad es una presión corregida y la presión de vapor del agua a temperatura ambiente es baja y se comporta como ideal, lo que justifica la siguiente definición operativa de actividad de agua

$$a_w = p_w/p_w^0 \quad (6)$$

donde  $p_w$  es la presión de vapor de agua en el alimento y  $p_w^0$  la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura y presión. Se deduce que la  $a_w$  del agua pura es 1; la presencia de distintos constituyentes químicos, provocan la inmovilización parcial del agua y por lo tanto disminuyen su capacidad de vaporizarse, provocando en consecuencia una disminución de la actividad de agua. La ecuación anterior indica que la actividad de agua también puede relacionarse con la humedad relativa de equilibrio (HRE) por la ecuación

$$a_w = \text{HRE}/100 \quad (7)$$

El parámetro actividad de agua da idea de la "disponibilidad" de agua para participar de reacciones química, enzimáticas (Acker, 1962) y de crecimiento de microorganismos (Scott, 1957). Esto indica que el agua contenida en los tejidos animales, vegetales y por lo tanto en los alimentos, no indica de por sí sola la "disponibilidad" del agua y por lo tanto la  $a_w$  es el parámetro que caracteriza el estado físico-químico de la misma o sea su disponibilidad. Como consecuencia de esto, la

actividad acuosa es una de las variables de control más importante en la tecnología de preservación de alimentos. El efecto global de la  $a_w$  en las alteraciones más típicas que puede sufrir un alimento fue condensada por Labuza (1975), en el denominado "mapa de estabilidad de los alimentos" (figura 3). La información que este mapa da es general, ya que muchas variables del alimento (composición, pH, potencial de óxido-reducción, tipo de aditivos, etc.) y la relación de éstas con la  $a_w$  determinan para cada alimento un comportamiento específico.

Numerosos procesos de preservación de alimentos se basan en la reducción de la actividad acuosa. Por esta razón se hace necesario definir cuáles son los fenómenos que determinan la reducción de la actividad de agua en los alimentos; estos son:

- 1- Sorción
- 2- Disolución de solutos
- 3- Fuerzas capilares

Se puede considerar que un alimento es una mezcla de agua con varios constituyentes como biopolímeros, azúcares, sales inorgánicas y orgánicas, etc. que pueden variar cualitativa y cuantitativamente en función de factores tales como suelo, clima, va-

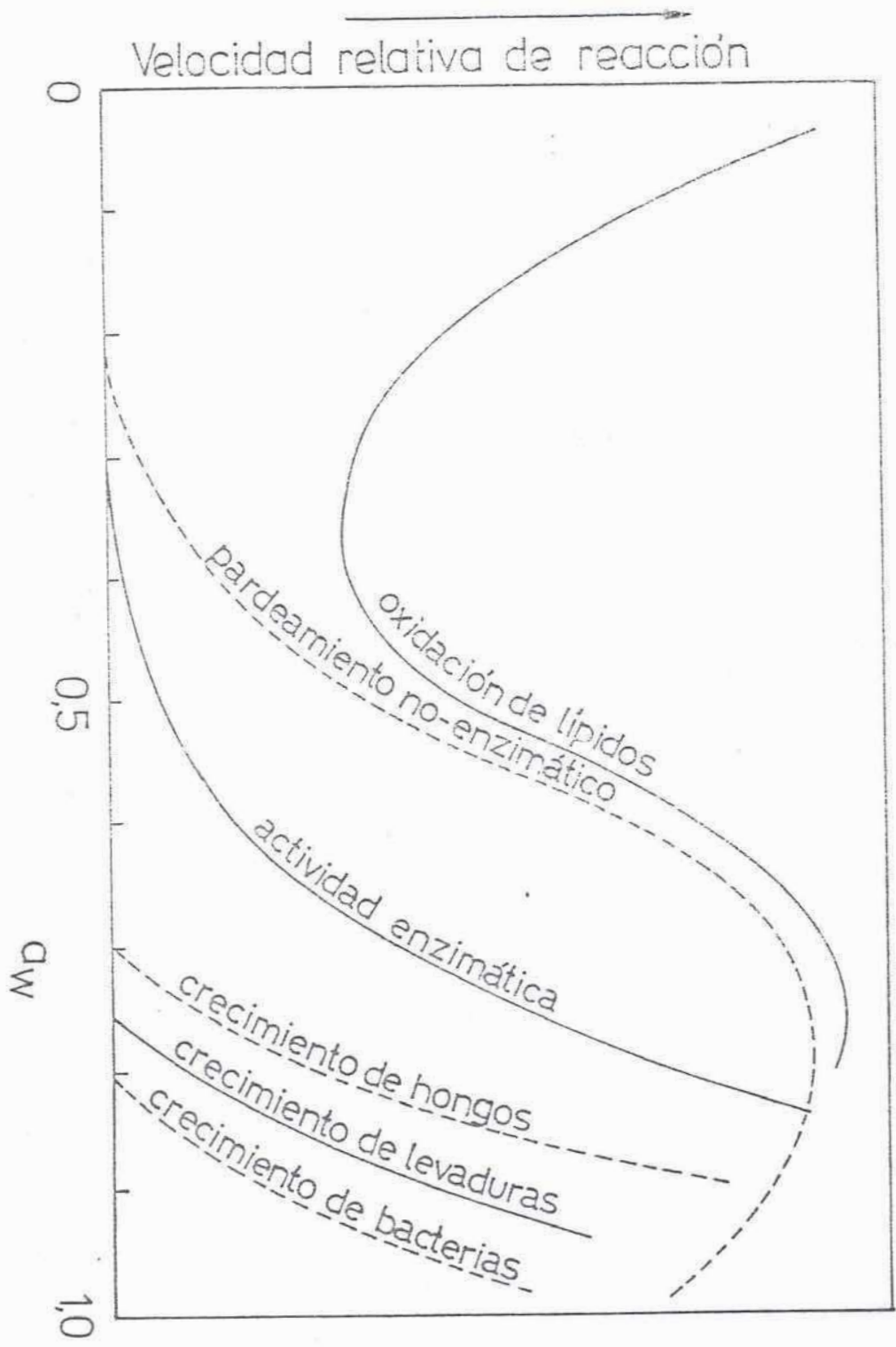


Figura 3: Mapa de estabilidad de los alimentos (a)

(a) Labuza et al. (1970)



riedad, procesamiento, almacenamiento, etc. Dada esta composición, los primeros dos fenómenos mencionados son los de mayor importancia y el conocimiento de los mismos provee la herramienta necesaria para predecir la actividad de agua de los alimentos.

### Sorción

Los componentes de los alimentos que no se solubilizan, que son usualmente biopolímeros (proteínas, almidones, pectinas, celulosa, etc.) ligan agua en su estructura, lo que produce una reducción de la  $a_w$ . Este efecto por lo general, comienza a predominar cuando el porcentaje de agua en base seca es menor que el 50%. El término sorción indica todos los procesos en los que un sólido se combina reversiblemente con las moléculas de agua. Para indicar la dirección del proceso se utilizan los términos adsorción y desorción. Este proceso involucra adsorción física y condensación capilar. El método más efectivo de estimar la cantidad de agua ligada de esta manera es a través de las isotermas de sorción, que son curvas que relacionan el contenido de agua del sólido con su presión de vapor de agua en el equilibrio o sea con su  $a_w$ . Básicamente se observan dos tipos de curvas en los alimentos, la sigmoidea (en la mayoría de los casos) y la de

incremento gradual (figura 4).

La mayoría de los investigadores están de acuerdo en delimitar tres secciones diferentes de las isotermas de sorción (figura 5).

1. Zona I

Corresponde al agua fuertemente ligada; en esta zona el agua se fija a los grupos polares del sustrato. La energía de adsorción de esta capa monomolecular es del orden de 1 a 15 Kcal/mol. Esto explica que el agua de esta capa sea difícil de extraer y que no congele.

2. Zona II

Corresponde al agua débilmente ligada. Se trata de sucesivas capas de agua, fijas sobre la primera por intermedio de enlaces hidrógeno.

3. Zona III

Corresponde al agua libre. Esta representa la mayor parte

///

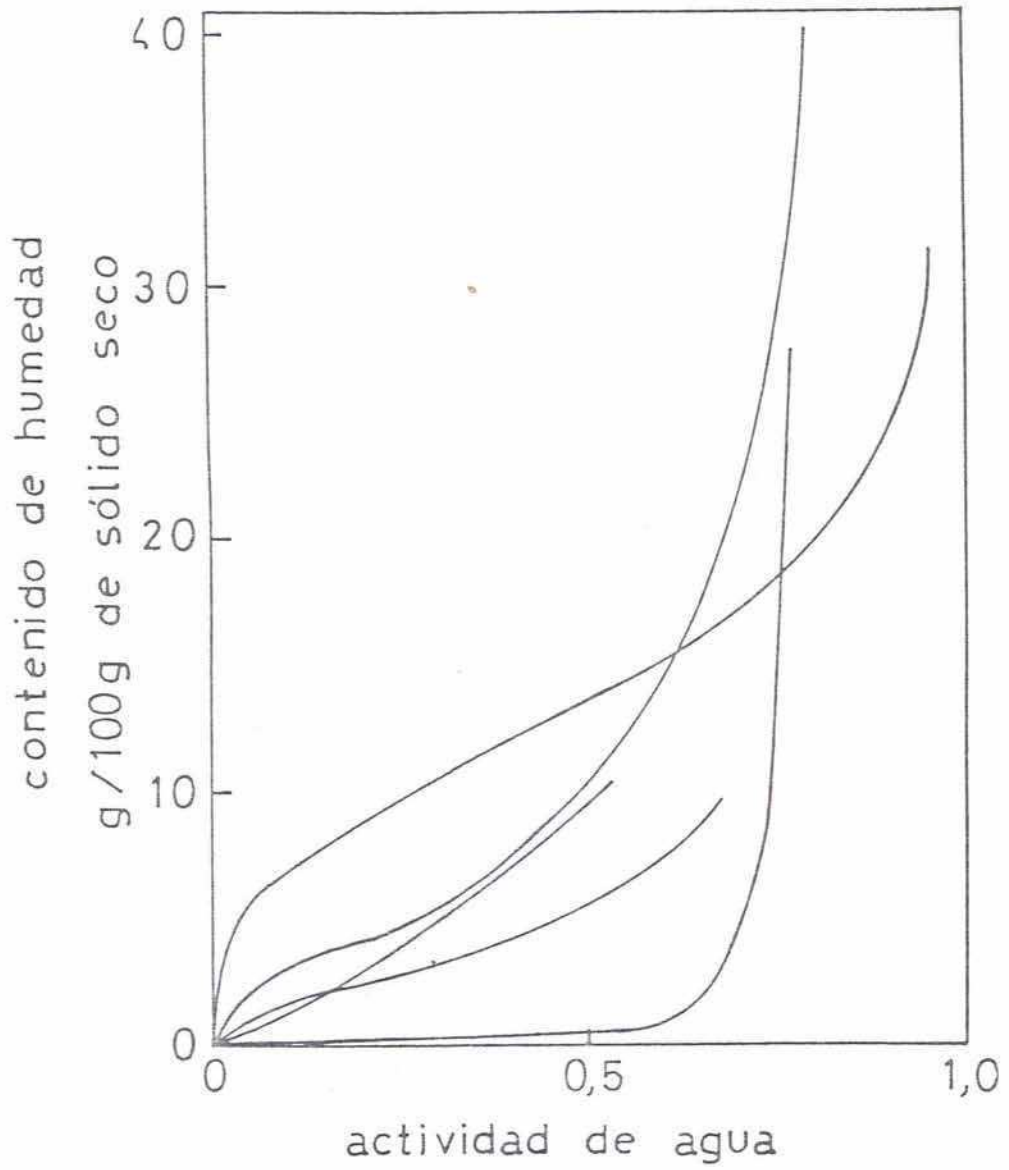


Figura 4: Tipos de isothermas de sorción (a)

(a) Van der Berg et al. (1978)

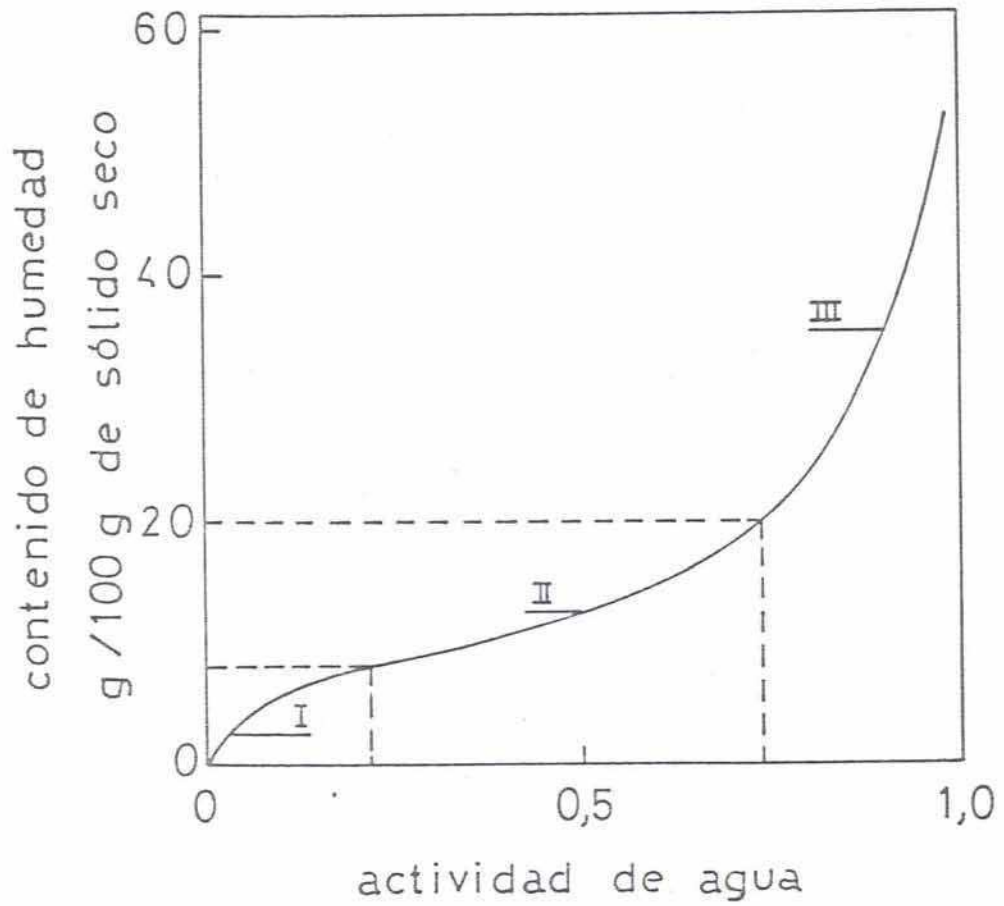


Figura 5: Zonas correspondientes a una isoterma de sorción ideal de un alimento (a)  
(a) Van der Berg et al. (1979)

del agua de los alimentos frescos. El agua por muy "libre" que sea no sale espontáneamente de los tejidos ya que se encuentra retenida dentro de la estructura del gel que conforman los biopolímeros.

Usualmente existe histéresis en el rango intermedio de  $a_w$ , hallándose la rama de adsorción por debajo de la de desorción.

Las isotermas de sorción permiten conocer:

- a. La relación entre el contenido de agua del sistema y su  $a_w$ .
- b. Calor de sorción, importante desde el punto de vista del secado.
- c. Contenido de agua de la monocapa.

Si bien existen más de 75 ecuaciones para describir matemáticamente las isotermas de sorción, desde el punto de vista práctico se usan unas pocas que cumplen con el compromiso de justificar teóricamente los datos y resultan sencillas de utilizar. Entre ellas, la más conocida y ampliamente utilizada es la Ecuación BET (Braunauer- Emmet-Teller)

$$\frac{a_w}{m(1 - a_w)} = \frac{1}{m_1 c} + \frac{a_w(c - 1)}{m_1 c} \quad (8)$$

///

donde:

$m$  = humedad ( $\text{g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{sólidos}}$ )

$m_1$  = humedad correspondiente al valor de monocapa

$c$  = constante relacionada con el calor de sorción

Esta ecuación se aplica para sistemas con  $a_w$  menor que 0,5. Las variaciones de temperatura afectan marcadamente esta relación en los alimentos (Wolf et al., 1973). Los gradientes de temperatura conducen a gradientes de presión de vapor de agua, produciendo una transferencia de humedad y cambios en los niveles de  $a_w$  hasta alcanzar nuevamente el equilibrio. Varios autores han propuesto ecuaciones que tratan de describir su dependencia con la temperatura para cada alimento en particular, llegando generalmente a relaciones muy complejas.

#### Disolución de solutos

En el caso de alimentos frescos y de aquellos denominados semihúmedos ( $a_w > 0,75$ ), el principal responsable de la reducción de la actividad acuosa es el fenómeno de disolución de solutos. Estos solutos pueden estar presentes naturalmente en el alimento o ser agregados durante su procesamiento. Cuando los solutos

se disuelven en agua, la entropía disminuye porque las moléculas se orientan con respecto al soluto. El agua tiene menor libertad de escapar a la fase vapor y como consecuencia de ello, disminuye la presión de vapor. Este concepto es la base de la teoría de disminución de la  $a_w$ .

Por su naturaleza dipolar, el agua disuelve o dispersa muchas sustancias iónicas. Existen además un grupo grande de sustancias no iónicas que también son solubles en agua, tales como alcoholes, aldehidos, cetonas, etc., y cuya solubilidad radica en la tendencia a formar uniones hidrógeno entre el agua y los grupos polares característicos. En estas disoluciones pueden aparecer distintas entidades, tales como moléculas unidas covalentemente, iones solvatados y no solvatados, grupos de iones asociados electrostáticamente o iones complejos. Estos afectan el agua libre en condiciones de intervenir en reacciones de deterioro.

Los solutos pueden clasificarse en electrolitos y no electrolitos de acuerdo con el comportamiento de sus soluciones acuosas con respecto a la corriente eléctrica. Esta clasificación no es absoluta pero permite definir tratamientos diferenciales en cuanto a la presencia de uno u otro soluto para la predicción de la  $a_w$  en alimentos. Los no-electrolitos, por ejemplo sustancias orgánicas en solución tales como los polialcoholes, pueden

interactuar con el agua u otros componentes mediante formación o ruptura de uniones puente hidrógeno. Teniendo en cuenta esta propiedad, Rowlin (1969) clasifica las soluciones orgánicas acuosas binarias por la fuerza de las uniones hidrógeno con los grupos oxhidrilos de agua. De la serie nitrilos, cetonas, ésteres, alcoholes, poliéteres, aminas, polialcoholes y poliaminas, los primeros dos, muestran con el agua una solubilidad crítica con la temperatura, hasta tener lugar una separación de fases. Los últimos dos son completamente miscibles con el agua, y los otros muestran características intermedias.

Los electrolitos al disolverse en agua tienen un comportamiento más complejo que los no electrolitos debido a la presencia de múltiples entidades. Existen diversos criterios para su clasificación. Sin embargo la división más corriente en la bibliografía, que toma en cuenta su capacidad de disociación en el solvente, es la de electrolitos fuertes y electrolitos débiles. Es conveniente, sin embargo, considerarlos como electrolitos asociados y no asociados (Robinson y Stokes, 1965). Los electrolitos no asociados comprenden aquellos solutos que al disolverse en el solvente producen sólo iones, cationes y aniones, posiblemente solvatados. La ionización es completa y no existe evidencia de la existencia de moléculas covalentes o de asociaciones



entre iones de cargas opuestas. El cloruro de sodio en agua es el ejemplo típico de este grupo. En general, cuando el solvente es agua, se comparten así los haluros y percloratos alcalinos y alcalinos térreos, los nitratos y algunos haluros y percloratos de los metales de transición. Esta subdivisión podría asimilarse en parte a la de los electrolitos fuertes. Los electrolitos conocidos como asociados pueden subdividirse en electrolitos débiles y pares iónicos. Los primeros comprenden aquellos solutos que pueden existir como moléculas covalentes no disociadas y como iones. Todos los ácidos pertenecen a esta clase, incluyendo los llamados ácidos fuertes como el ácido clorhídrico y perclórico. Las bases, (con excepción de las de los metales alcalinos y de los hidróxidos de sales cuaternarias y algunas sales como el  $\text{HgCl}_2$  pueden ser consideradas electrolitos débiles. Los pares iónicos no son moléculas definidas, pero se comportan como si fueran moléculas no ionizadas. En ellos ocurre asociación por atracción puramente electrostática entre iones de signos opuestos. Los sulfatos especialmente de metales divalentes son los componentes más típicos de esta clase. Esta clasificación no es rigurosa, pero permite un mejor tratamiento para el estudio de soluciones acuosas, especialmente las que contienen especies iónicas que se halla normalmente en alimentos. Todas estas consideraciones de interacción de solutos en medio acuoso deberán, por lo tanto, tomarse en cuenta en la elección del humectante a utilizar para disminuir la

En la elección del soluto mas adecuado, además del factor  $a_w$ , deberán considerarse otros factores tales como solubilidad, textura, sabor, pH, límite fisiológico, costo, etc.

### Predicción de la actividad de agua

El primer paso para la predicción de la actividad de agua de un alimento consiste en conocer cuales son los principales constituyentes y sus cantidades relativas respecto al agua presente en el mismo. En alimentos frescos, el agua es el principal constituyente, representando el 75-95% del peso de los mismos. Su  $a_w$  está determinada solamente por la naturaleza y concentración de las especies químicas (de peso molecular relativamente bajo) naturalmente disueltos en el alimento. Dado que la concentración de estos solutos (no iónicos o ionizables) en alimentos frescos es relativamente pequeña, la actividad acuosa de los mismos difiere poco de la unidad. Chirife y Ferro Fontán (1982) calcularon la actividad de agua para una gran cantidad de frutas, vegetales y carnes y encontraron que la misma se encuentra en el intervalo 0,970-0.996. En alimentos procesados, se pueden considerar dos tipos principales: a- los alimentos deshidratados con una  $a_w$  inferior a 0,750, en los cuales debido a la baja proporción relativa de agua, el fenómeno de adsorción es el principal responsable de la reducción

de la actividad acuosa y b- los alimentos semihúmedos, con  $a_w$  superior a 0,750, en los que el agua constituye una proporción considerable de su peso y por lo tanto la depresión de la actividad de agua se debe a fenómenos de disolución de solutos.

Dado que el material utilizado en esta investigación se encuadra en la categoría b, (es decir alimentos semihúmedos), se desarrollará la teoría necesaria para la predicción de la actividad de agua de este tipo de alimentos. El estudio de la actividad de agua de los alimentos semihúmedos es básicamente el estudio de la  $a_w$  de soluciones, el cual es conocido en sus bases físico-químicas. Idelamente, la disminución de la  $a_w$  responde a la ley de Raoult; de acuerdo a ella,  $p_i = x_i p_i^0$ , es decir que la presión parcial de cualquier componente de una solución es igual a la presión parcial del componente puro por su fracción molar en la solución. Por lo tanto,

$$a_w = x_w = \frac{n_{H_2O}}{n_{H_2O} + n_{\text{solute}}} \quad (9)$$

En muchos casos, existen desviaciones de este comportamiento ideal debido a:

- no toda el agua es capaz de actuar como solvente.
- no todo el soluto está en solución.
- las interacciones entre moléculas de soluto causan desviaciones de la idealidad.

El comportamiento ideal es seguido por soluciones diluídas. Por ejemplo, la ecuación 9 predice con un error de 1% la  $a_w$  para soluciones de glucosa o glicerol hasta una concentración 4M, para soluciones de sacarosa hasta 2M y para muchos electrolitos hasta 1M.

La tabla 10 muestra la validez de la ley de Raoult para estas y otras soluciones de alta actividad de agua.

Las propiedades termodinámicas de electrolitos fuertes fueron extensamente estudiadas por Bromley (1973) y Pitzer (1973). Pitzer (1973) desarrolló un sistema de ecuaciones para las propiedades termodinámicas sobre la base de un análisis modificado del clásico modelo de Debye-Hückel. El coeficiente osmótico,  $\beta$ , está dado por la ecuación desarrollada por Pitzer (1973) como:

$$\beta - 1 = |z_M z_X| f + m \frac{(2\nu_M \nu_X)}{\nu} B_{MX} + m^2 z \frac{(\nu_M \nu_X)^{3/2}}{\nu} C_{MX} \quad (10)$$

///

Tabla 10: Validez de la ley de Raoult para soluciones de alta  $a_w$

	Raoult	Experimental
Sacarosa	0,960	0,951
Glucosa	0,938	0,929
Glicerol	0,909	0,898
Maltosa	0,952	0,942
Sorbitol	0,931	0,923
Propilenglicol	0,908	0,900
NaCl	0,902	0,892
KCl	0,855	0,846

donde:

$v_M$  y  $v_X$  = número de iones de M y de X

$Z_M$  y  $Z_X$  = cargas respectivas de los iones

$$v = v_M + v_X$$

Los otros valores son:

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

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

donde:

$A = 0,395$  a  $25^\circ\text{C}$  (coeficiente de Debye-Hückel)

$b = 1,2$  (Pitzer, 1973)

$\alpha = 2$  (Pitzer y Mayorga, 1973)

$I = \frac{1}{2} \sum m_i Z_i^2$  = fuerza iónica

$B_{MX}$  y  $C_{MX}$  = segundo y tercer coeficiente viriales

Para cada sustancia los dos parámetros  $\beta_{MX}^{(0)}$  y  $\beta_{MX}^{(1)}$  definen el segundo coeficiente virial. El tercer coeficiente virial

///

es usualmente despreciable. El factor numérico  $2v_M v_X$  que multiplica el segundo y tercer coeficiente virial en la ecuación de Pitzer, se mantiene en función de conservar la simplicidad de la misma. Estos coeficientes representan las interacciones en un corto rango para pares y tripletes iónicos. En la ecuación  $(2 v_M v_X)/v$  y  $2(v_M v_X)^{3/2}/v$  son unitarios para un electrolito MX simétrico.

Bromley (1973) desarrolló un sistema de representación y estimación de propiedades termodinámicas de electrolitos fuertes, que fue descrito por Pitzer y Mayorga (1973) como una simplificación del modelo de Pitzer. El tercer coeficiente virial es omitido, y el segundo es modificado a una forma que también depende de la fuerza iónica pero sólo con un parámetro (B). Esta ecuación, a pesar de ser menos exacta, es sin embargo satisfactoria para altas concentraciones de soluto (6M).

Esta se expresa como:

$$\phi = 1 - 2,303 \left\{ A_V |z_+ z_-| \frac{I^{1/2}}{3} \tau (\rho I^{1/2}) - (0,06 + 0,6 B) \right\}$$

$$\cdot |z_+ z_-| \frac{I}{2} \psi(a I) - B \frac{I}{2} \quad (11)$$

///

donde:

$$A_v = 0,511 \text{ Kg}^{\frac{1}{2}} \text{ mol}^{\frac{1}{2}} \text{ a } 25^\circ\text{C}$$

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

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

$\rho$  se toma igual a 1 (para todos los solutos)

B es un parámetro para cada soluto

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

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

Los datos obtenidos de coeficiente osmótico para cualquiera de las dos ecuaciones anteriores, se puede utilizar para calcular la  $a_w$

$$a_w = \exp(-\phi m_1 mv) \quad (12)$$

donde:



- $\phi$  = coeficiente osmótico
- $m_1$  = peso molecular
- $m$  = molalidad del soluto
- $\nu$  = número de moles de todas las especies que dan un mol de soluto en solución

Para el caso de no electrolitos en solución acuosa, Norrish (1966) desarrolló una ecuación basada en un simple análisis termodinámico de soluciones,

$$a_w = x_1 \exp(-K x_2^2) \quad (13)$$

donde:

- $x_1$  = fracción molar del agua
- $x_2$  = fracción molar del soluto
- $K$  = constante característica de cada no electrolito

Los valores de  $K$  para el cálculo de la  $a_w$ , se pueden obtener en bibliografía. Algunos de estos valores se muestran en la tabla 11.

Como ya se mencionó anteriormente, los alimentos no son soluciones simples sino mezclas complejas. Por lo tanto para po-

Tabla 11: Valores de la constante de Norrish, K, para no electrolitos (25°C) (a) (b) (c)

Soluto	K
PEG 600	56
PEG 400	26,6
lactosa	10,2
lactulosa	8,0
sacarosa	6,47
PEG 200	6,1
d- ácido tartárico	4,68
maltosa	4,54
glucosa	2,25
fructosa	2,25
ácido málico	1,82
sorbitol	1,65
eritritol	1,34
glicerol	1,16
propilenglicol	1,0

(a) Chirife y Ferro Fontán (a) (1980)

(b) Chirife y Ferro Fontán (b) (1980)

(c) Chirife et al., (1980)

der predecir la  $a_w$  de la mayoría de los alimentos es necesario poseer ecuaciones de predicción en soluciones de multicomponentes. Una forma rigurosa de calcular la  $a_w$  tanto para soluciones simples como para complejas es la dada por la ecuación de Gibbs-Dühem (Rockland y Stewart, 1981).

$$\sum_i n_i d(\ln a_i) = 0 \quad (\text{presión y temperatura constantes}) \quad (14)$$

donde:

$n_i$  = número de moles del componente  $i$

$a_i$  = actividad del componente  $i$

Para una solución binaria que contiene un sólo soluto en agua, con una molalidad  $m_i$ , la ecuación anterior se transforma en:

$$55,5 d(\ln a_w) = - m_i d(\ln a_i) \quad (15)$$

La actividad del soluto  $a_i$  en esta mezcla binaria es expresada como

$$a_i = m_i \gamma_i^0 \quad (16)$$

///

donde:

$\gamma_i^0$  = coeficiente de actividad del soluto en el sistema binario

Reemplazando en la ecuación 15 se obtiene la siguiente ecuación:

$$d \ln(a_w) = - \frac{1}{55,5} m_i d \ln(m_i \gamma_i^0) \quad (17)$$

En una solución de multicomponentes la ecuación anterior se generaliza de la forma:

$$d \ln(a_w) = - \frac{1}{55,5} \sum_{i=1}^n d \ln(m_i \gamma_i^i) \quad (18)$$

donde:

$\gamma_i^i$  = coeficiente de actividad del componente soluto i del sistema.

Como resultado de las interacciones de los solutos presentes, los coeficientes de actividad en la mezcla no tiene el mismo valor que en una solución simple. Estas interacciones, de las

///

cuales no se sabe mucho, hacen muy difícil la resolución de esta ecuación si no se realizan algunas simplificaciones. Si la solución no es muy concentrada, la interacción entre los distintos componentes puede ser despreciada. Ross (1975) asumió que los efectos de interacción entre estos componentes se cancelan en promedio, lo que matemáticamente significa que:

$$\gamma_i^1 = \gamma_i^0 \quad (19)$$

entonces,

$$\begin{aligned} d \ln(a_w) = \frac{1}{55,5} [m_1 d(\ln m_1 v_1^0) + m_2 d(\ln m_2 v_2^0) + \\ + m_3 d(\ln m_3 v_3^0) + \dots] \end{aligned} \quad (20)$$

sustituyendo la ecuación 16 e integrando

$$\ln a_w = \ln a_{w_1}^0 + \ln a_{w_2}^0 + \ln a_{w_3}^0 + \dots + \ln a_{w_n}^0$$

que es la ecuación derivada por Ross (1975)

$$a_w = a_{w_1}^0 \cdot a_{w_2}^0 \cdot a_{w_3}^0 \cdot \dots \quad (21)$$

Por lo tanto la  $a_w$  de una solución compleja se reduce a la productoria de la actividad de agua de la solución acuosa de cada componente, medidos a la misma molalidad que en la solución compleja. Ross (1975) demostró la validez de su ecuación para mezclas de azúcares, sales e ingredientes no solubles; en estos casos ( $a_w > 0.8$ ) el error porcentual fue menor que el 2%. A altas  $a_w$ , la ecuación de Ross da una razonable estimación. A bajas  $a_w$ , para mezclas sólidas, la ecuación da desviaciones importantes. Esta ecuación fue aplicada a carnes de humedad intermedia registradas en la literatura (Chirife et al., 1978) y a alimentos "semi-húmedos" elaborados en la Argentina (Vigo et al., 1979). El resultado de estos trabajos demuestra que la ecuación de Ross es un método simple y razonable para predecir la  $a_w$  en soluciones de multicomponentes.

#### Medición de la actividad de agua

La determinación de la actividad acuosa puede realizarse mediante la medición de la humedad relativa de equilibrio o la medición del descenso crioscópico. Dentro del primer grupo se pueden mencionar los manómetros de presión de vapor, los higrómetros de fibra y los higrómetros eléctricos. Los manómetros son utili-

zados para determinar la  $a_w$  de alimentos por medición de su presión de vapor (Acott y Labuza, 1975; Karel y Nickerson, 1964; Vos y Labuza, 1974). La muestra es colocada en un recipiente conectado a un manómetro y evacuado. El sistema se mantiene a temperatura constante permitiendo que la muestra llegue al equilibrio en aproximadamente una hora. Se mide la presión de vapor, se remueve el agua evaporada y a continuación se mide la presión de vapor de los gases remanentes y de los volátiles. La actividad acuosa del alimento se obtiene por diferencia de las dos lecturas precedentes dividida la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura (Labuza et al., 1976). Este método es efectivo en un rango de  $a_w$  de 0 a 0,9 (Vos y Labuza, 1974). El método tiene mucha precisión pero poca exactitud por no poder alcanzar el equilibrio térmico de la muestra. No es aconsejable realizar mediciones de comidas fermentadas o muestras que mantengan un crecimiento microbiano debido a que la evolución de gas invalida la medición.

Los higrómetros de fibra son ampliamente utilizados debido a su bajo costo comparado con otros equipos como por ejemplo los higrómetros eléctricos. El instrumento consta de una caja de acero inoxidable donde se coloca la muestra, con una tapa que contiene el elemento sensor para medir la actividad de agua,

además posee un capilar termométrico de compensación de temperatura. La propiedad utilizada por el instrumento es el cambio de dimensión longitudinal de una fibra sintética que absorbe humedad. Esta fibra de respuesta sensitiva, es una poliamida y el valor de  $a_w$  medido es leído directamente en un dial ubicado en la parte superior de la tapa. Estos instrumentos son calibrados con soluciones salinas saturadas en el rango en que se va a realizar la medición y ésta debe ser chequeada periódicamente. Si se expone tiempos prolongados a muestras que contengan volátiles puede presentar problemas de contaminación. El tiempo de equilibrio es de 3-4 horas y el rango de actividad de agua en que se puede utilizar es de 0,4 a 1,0.

Los higrómetros eléctricos se basan en la medición de la conductividad, resistencia o capacidad de una sal higroscópica, una resina de intercambio iónico y un capacitor polimérico respectivamente en equilibrio con la atmósfera (Troller y Christian, 1978). Como en el caso anterior (higrómetro de fibra), el equipo debe ser calibrado con soluciones salinas saturadas en el rango de medición (Favetto et al., 1983), pero su tiempo de equilibrio varía de  $\frac{1}{2}$  a 1 hora según el tipo. Son precisos y rápidos pero tienen inconvenientes como su alto costo y los problemas relacionados con el sensor debido a enveje-



cimiento o contaminación con glicoles, alcoholes y otros volátiles orgánicos provenientes de las muestras.

La medición del descenso crioscópico se realiza en un crioscopio y los valores del punto de congelación leídos pueden ser transformados en  $a_w$  mediante la siguiente relación:

$$- \ln a_w = 9,6934 \cdot 10^{-3} \theta_F + 4,761 \cdot 10^{-6} \theta_F^2 \quad (22)$$

donde:

$\theta_F$  = depresión del punto de congelación.

Para la mayoría de los solutos de interés en el área de alimentos, los valores de  $a_w$  calculados de esta forma no difieren en más de 0,01 unidades de  $a_w$  con respecto a los valores medidos a 25°C, y es aplicable para valores de  $a_w$  superiores a 0,85 (Ferro Fontán et al., 1981 b).

### 2.3. Efectos de la actividad de agua en el crecimiento microbiano

En un alimento los microorganismos deben afrontar una serie de factores que influyen su crecimiento, esporulación,

germinación, morfología, movilidad y producción de metabolitos. La actividad de agua es uno de los factores más importantes (Troller, 1980), pero es importante tener en cuenta que ésta interactúa con otros factores tales como temperatura (Wodzinski y Frazier, 1960), pH (Troller, 1973), presencia o ausencia de aire (Christian et al., 1973), concentración de hidrógeno, concentración de oxígeno y dióxido de carbono, tipos de solutos utilizados y presencia de sustancias inhibitorias. Cuando algunos de estos factores no está en su valor óptimo para el microorganismo en cuestión, el efecto inhibitorio de la reducción de la  $a_w$  tiende a aumentar. Esto es muy importante ya que permite obtener un producto microbiológicamente estable con una combinación de condiciones relativamente suaves. En los párrafos siguientes se analizarán algunos de estos factores y la interacción entre ellos.

### 2.3.1. Factores que afectan la estabilidad microbiológica

#### a- Actividad de agua

El desarrollo de microorganismos presenta algunas diferencias entre bacterias, hongos y levaduras, pero, en forma gene-

ral, se puede decir que ya sea por fisión binaria, gemación o extensión de hifas, las fases de crecimiento que se observan en cada caso son similares (Troller et al., 1978). Existe un primer período de adaptación, conocido como fase lag, seguido por un crecimiento acelerado (fase exponencial), luego la velocidad de crecimiento disminuye, alcanzando un balance entre ésta y la velocidad de muerte (fase estacionaria). Eventualmente, la velocidad de muerte puede superar la de crecimiento, y en este caso se entra en una fase declinante, disminuyendo la población microbiana. Es bien conocido, que en forma general, una disminución de  $a_w$  inhibe el desarrollo de los microorganismos. Esto se ve reflejado en el aumento de la fase lag, disminución de la fase logarítmica y fase estacionaria (Troller, 1980) (figura 6). Este comportamiento es válido para bacterias, hongos y levaduras. La tabla 12, recopilada por Troller (1979), nos da los valores de  $a_w$  mínimo de crecimiento de algunos microorganismos comunes en alimentos, en el caso de que los demás factores de stress estén en sus valores óptimos para el desarrollo de cada microorganismo en particular.

### Bacterias

La mayoría de las bacterias no halofílicas crecen a  $a_w$

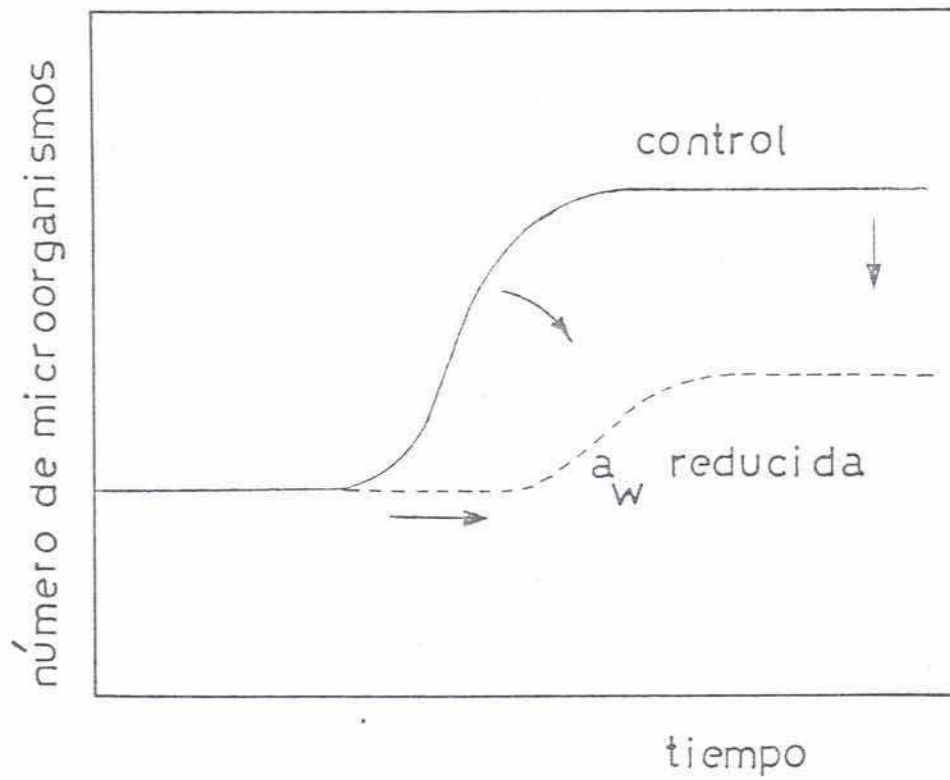


Figura 6: Efecto de la reducción de la  $a_w$  en el crecimiento de bacterias (a)

(a) Troller (1980)

Tabla 12: Mínima  $a_w$  para el crecimiento de microorganismos (b)

$a_w$	Bacterias	Levaduras	Hongos
0,98	<u>Clostridium botulinum</u> tipo E, <u>Pseudomonas</u> (a)		
0,97	<u>Clostridium</u> (a) <u>botulinum</u> tipos A, B y C		
0,96	<u>Flavobacterium</u> , <u>Klebsiella</u> , <u>Lactobacillus</u> (a), <u>Proteus</u> (a) <u>Pseudomonas</u> , <u>Shigella</u>		
0,95	<u>Alcaligenes</u> , <u>Bacillus</u> , <u>Citro-</u> <u>bacter</u> , <u>Clostridium</u> , <u>Entero-</u> <u>bacter</u> , <u>Escherichia</u> , <u>Proteus</u> , <u>Pseudomonas</u> , <u>Salmonella</u> , <u>Vibrio</u> , <u>Serratia</u> , <u>Lactobacillus</u> (a)		
0,94	<u>Lactobacillus</u> , <u>Microbacterium</u> , <u>Pediococcus</u> , <u>Streptococcus</u> (a), <u>Vibrio</u> , <u>Aerobacter</u> (a)		<u>Stachybotrys</u> <u>ata</u>
0,93	<u>Lactobacillus</u> (a) <u>Streptococcus</u>		<u>Rhizopus</u> , <u>Mucor</u> , <u>Botrytis</u>
0,92		<u>Rhodotorula</u> , <u>Pichia</u>	

Tabla 12 (continuación)

0,91	<u>Corynebacterium</u> , <u>Staphylococcus</u> (anaeróbico), <u>Streptococcus</u> (a)		
0,90	<u>Lactobacillus</u> (a), <u>Micrococcus</u> , <u>Pediococcus</u> , <u>Vibrio</u> (a), <u>Bacillus</u> (a)	<u>Hansenula</u> , <u>Saccharomyces</u>	
0,88		<u>Candida</u> , <u>Debaryomyces</u> , <u>Torulopsis</u> <u>Hanseniaspora</u>	<u>Cladosporium</u>
0,87		<u>Debaryomyces</u>	
0,86	<u>Staphylococcus</u> (aeróbico), <u>Vibrio</u> (a)		<u>Paecilomyces</u>
0,80		<u>Saccharomyces</u> <u>baillii</u>	<u>Aspergillus</u> , <u>Penicillium</u> , <u>Emericella</u> , <u>Eremascus</u>
0,75	<u>Halobacterium</u> , <u>Halococcus</u>		<u>Aspergillus</u> , <u>Wallemia</u>
0,70			<u>Cryosporium</u>

Tabla 12 (continuación)

0,62

Saccharomyces Monascus  
rouxii

0,605

Xeromyces  
bisporus

(a) una especie

---

(b) Troller (1979)

en el rango 0,997-0,980 (Troller y Christian, 1978). A valores de  $a_w$  por debajo del óptimo, la velocidad de crecimiento disminuye generalmente en forma lineal, y esta disminución será mayor para microorganismos que requieran altas  $a_w$ . En líneas generales, dentro de las bacterias no halofílicas, los bacilos gram-negativos, son más sensibles a la reducción de  $a_w$ , teniendo un  $a_w$  mínimo de crecimiento en un medio de laboratorio en el rango 0,96-0,94. Para Clostridium sp. el valor mínimo de  $a_w$  es 0,95-0,94 y para Bacillus sp 0,93-0,90.

En el caso de cocos gram-positivos el rango de variación de  $a_w$  mínima es muy amplio siendo éste 0,95-0,83.

Un comportamiento distinto que el aquí descrito se presenta para bacterias halofílicas. Generalmente, toleran altas concentraciones de sal y por lo tanto crecen en sistemas de baja  $a_w$ , pero no pueden crecer en ambientes de alta  $a_w$ . Esta condición de baja  $a_w$  se puede lograr por el agregado de sales inorgánicas, usándose comúnmente NaCl.

El efecto de la  $a_w$  sobre la esporulación y la germinación de esporas fue estudiado por Jacobson y Murrell (1977), quienes encontraron que tanto la  $a_w$  como el soluto empleado para el ajuste de esta  $a_w$ , tiene influencia en la formación de esporas es una cepa de Bacillus cereus. Solutos como glucosa, sorbitol y NaCl



limitan la esporulación a una  $a_w$  de 0,95, mientras la esporulación en presencia de glicerol ocurre a una  $a_w$  tan baja como 0,91. En general se encontró que la  $a_w$  mínima para la esporulación está por arriba de la necesaria para el crecimiento y los valores de  $a_w$  para la germinación de esporas son apreciablemente menores que los de crecimiento.

Otro punto importante es conocer la relación existente entre la  $a_w$  y la producción de toxinas. Ohye y Christian (1967) han encontrado que la  $a_w$  mínima necesaria para el crecimiento y producción de toxina de C. botulinum es 0,94, observándose algunas diferencias dependiendo del tipo estudiado.

Varios investigadores han estudiado la influencia de la  $a_w$  sobre la síntesis de enterotoxina de S. aureus (Troller, 1971; Lotter y Leistner, 1978). En líneas generales, estos datos muestran que la  $a_w$  requerida para la síntesis de enterotoxina varía con el tipo de enterotoxina, siendo por ejemplo, la enterotoxina B más sensible que la enterotoxina A. Es importante destacar, desde el punto de vista de la seguridad de un alimento, que la mínima  $a_w$  para la producción de toxina es mayor que la requerida para el crecimiento del microorganismo.

Otro aspecto interesante son los cambios morfológicos producidos por una disminución de  $a_w$  en el medio. La  $a_w$  intracelular

está un poco por debajo de la  $a_w$  del medio exterior; si ésta es reducida por el agregado de solutos, la célula sufre un shock osmótico y rápidamente pierde agua. Por ejemplo en el caso de S. aureus pierde alrededor del 50% de su agua intracelular si se lo cambia de un medio de  $a_w = 0,995$  a otro de  $a_w = 0,950$  (Koujima et al., 1978). Durante este proceso la célula muere o permanece en estado de latencia. Para poder crecer debe reducir su  $a_w$ , pudiéndolo hacer por distintos caminos; o bien la célula admite el soluto que redujo la  $a_w$  externa, en cuyo caso éste debe ser compatible con el funcionamiento enzimático, o de lo contrario la célula acumula o produce un soluto distinto que también disminuye su  $a_w$ , y como en el caso anterior también es compatible con el funcionamiento enzimático. La segunda hipótesis parece ser la más aceptada (Sperber, 1983) y los "solutos compatibles" más comunes son el ión potasio en bacterias halofílicas, prolina en bacterias osmotolerantes, ácido  $\gamma$ -amino butírico en bacterias moderadamente tolerantes y ácido glutámico en bacterias poco tolerantes. Este mecanismo puede esquematizarse como se muestra en la figura 7 (Sperber, 1983). La célula de la parte izquierda de la figura crece a alta velocidad con una elevada  $a_w$  (0,995), y posee una concentración intracelular normal de componentes tales como iones potasio e iones glutamato. Si la célula se expone a

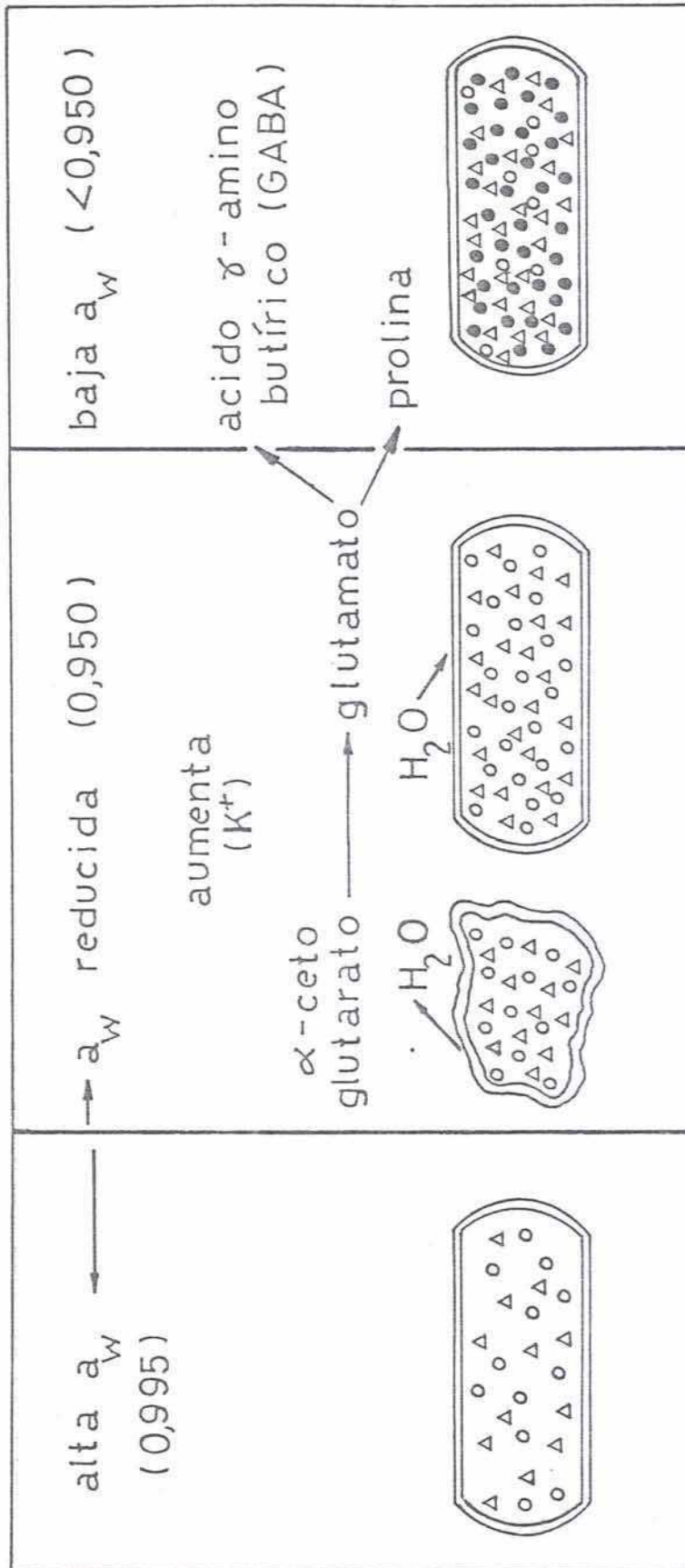


Figura 7: Adaptación intracelular a un medio de baja actividad de agua (a)  
(a) Sperber (1983)

un medio de  $a_w$  menor, por ejemplo 0,950, ésta pierde agua y deja de crecer. La disminución interna de agua hace que aumente la concentración interna de iones potasio. Este aumento de iones potasio activa la glutamato dehidrogenasa la cual produce la transformación de  $\alpha$ -ceto glutarato a glutamato, el cual comienza a acumularse en la célula. A medida que el glutamato se acumula, el agua entra nuevamente en la célula. Todas las bacterias estudiadas muestran una acumulación intracelular de un aminoácido cuando son sometidas a un stress osmótico. Aquellas que acumulan sólo glutamato, generalmente, no pueden crecer a niveles de  $a_w$  inferiores a 0,95. El glutamato, está cargado negativamente al pH que tiene la célula y requiere la presencia de un catión, que usualmente es  $[K^+]$ . Cuando la concentración de glutamato es suficientemente alta para reducir la  $a_w$  intracelular a 0,95, la concentración intracelular de  $K^+$  resultante es también tan alta que es tóxica para algunos de los funcionamientos celulares y por lo tanto la célula deja de crecer. Sin embargo, algunas bacterias pueden decarboxilar el glutamato a ácido  $\alpha$ -amino butírico (GABA) o lo pueden reducir a prolina. Estos son aminoácidos relativamente neutros, que no requieren la presencia de cations y por lo tanto la célula que acumula estos aminoácidos es capaz de crecer a  $a_w$  más bajas que aquellos que sólo acumulan glutamato.

Las bacterias halofílicas tales como Halobacterium sp., pueden crecer a una  $a_w$  de 0,75, pero emplean un mecanismo distinto al aquí desarrollado. Schobert (1979) propuso una hipótesis distinta sobre la acción de ciertos solutos. De acuerdo a la misma los polioles, por medio de su grupo hidroxilo, pueden participar en la estructura del agua intracelular, preservando de esta forma la hidratación de los biopolímeros celulares; la prolina cambia áreas hidrofóbicas de biopolímeros por residuos hidrofílicos por medio de una asociación hidrofóbica entre una parte nopolar de la molécula de prolina y áreas superficiales hidrofóbicas de biopolímeros. Los solutos como la prolina son denominados "solutos compatibles" debido a que reducen la  $a_w$  intracelular sin ser tóxicos para la actividad enzimática de la célula. El glicerol es otro ejemplo de soluto compatible. A pesar de no ser producido por las bacterias, si está presente en el medio, puede entrar a la célula y actuar en la misma forma que lo hace la prolina, y por lo tanto la mayoría de las bacterias pueden crecer a valores de  $a_w$  menores cuando el soluto utilizado para reducir la  $a_w$  es glicerol en lugar de NaCl. Sperber (1983) realizó una recopilación de datos sobre la influencia de varios solutos presentes en el medio sobre la mínima  $a_w$  para el crecimiento (Tabla 14). Los valores de  $a_w$  mínima en presencia de NaCl y

Tabla 14: Influencia del soluto sobre la  $a_w$  mínima de crecimiento de bacterias (a)

Microorganismo	Mínima $a_w$ para el crecimiento en		
	NaCl	Glucosa	Glicerol
<u>Clostridium perfringens</u>	0,97	0,96	0,95
<u>C. botulinum tipo E</u>	0,97	----	0,94
<u>C. sporogenes</u>	0,945	0,965	0,935
<u>Lactobacillus helveticus</u>	0,963	0,966	0,928
<u>Streptococcus thermophilus</u>	0,985	0,986	0,947
<u>S. lactis</u>	0,965	0,949	0,924
<u>Pseudomonas fluorescens</u>	0,957	-----	0,940
<u>Vibrio parahaemolyticus</u>	0,948	0,984	0,937

(a) Sperber (1983)

glucosa son marcadamente más altos que para glicerol tal como se mencionó anteriormente. En general el NaCl, KCl, glucosa y sacarosa muestran un tipo similar de comportamiento, mientras que el glicerol permite el crecimiento a valores menores de  $a_w$ . El Cl. sporagenes y el Vibrio parahaemoliticus muestran un alto valor de  $a_w$  para glucosa. Estos resultados podrían atribuirse al hecho de que la glucosa no fue esterilizada separadamente del medio y por lo tanto tenga lugar una inhibición del crecimiento por productos del pardeamiento no enzimático.

#### Hongos y levaduras

En la naturaleza se ha encontrado, que generalmente los hongos y las levaduras crecen en condiciones más ácidas, más secas y en medios de mayor concentración de solutos que las bacterias, por lo tanto los niveles de  $a_w$  necesarios para inhibir el crecimiento de la mayoría de los hongos y levaduras es menor que la necesaria para la inhibición de las bacterias (Troller y Christian, 1978).

La mayor parte de las levaduras tienen valores de  $a_w$  límites entre 0,80 y 0,90 (Corry, 1971). La mayoría de los datos existentes de la relación de la  $a_w$  con el crecimiento de levadu-

ras se refiere a las especies osmofílicas. La levadura más osmofílica que se ha aislado es la Saccharomyces rouxii (Von Schelhorn, 1950), que crece a una  $a_w$  mínima de 0,62 en jarabe de fructosa y en concentrado de peras. Algunas especies de S. rouxii también se encuentran entre las levaduras más tolerantes a la sal, desarrollándose a niveles de  $a_w$  cercanos a 0,81.

Los hongos son los microorganismos más osmotolerantes y crecen a  $a_w$  muy bajas. Pitt y Christian (1968) encontraron que Monascus bisporus (Xeromces bisporus) pueden crecer a un valor de  $a_w$  tan bajo como 0,61. La mayoría de los hongos presentan un valor de  $a_w$  limitante en el rango 0,80-0,95. En la tabla 13 se muestran los valores de  $a_w$  mínimos requeridos para el desarrollo y formación de toxinas de algunos hongos comunes en alimentos. Aquí se observa que los valores requeridos para la producción de toxina son superiores que los requeridos para el crecimiento, lo que representa (como ya se mencionó anteriormente para bacterias), una ventaja desde el punto de vista de la seguridad del alimento. Pitt (1975) denominó xerofílicos a aquellos hongos capaces de crecer por debajo de  $a_w$  0,85. Este autor estudió los requerimientos de agua de más de 40 especies consideradas xerofílicas entre las cuales figuran varias capaces de crecer a valores de  $a_w$  de 0,70 y aún menores.



Tabla 13: Efecto de la  $a_w$  sobre el crecimiento y producción de toxinas en hongos (a)

Hongo	Toxina	$a_w$ mínima	
		Crecimiento	Produccion de toxina
<u>Aspergillus flavus</u>	Aflatoxina	0,78-0,80	0,83
<u>Penicillium patulum</u>	Patulin	0,81	0,85
<u>A. ochraceus</u>	Ochratoxin	0,77	0,85
<u>A. ochraceus</u>	Penicillic acid	0,76	0,81
<u>Stachybotrys atra</u>	Stachybotryn	0,94	0,94

(a) Troller (1980)

b- Temperatura

En general, los microorganismos muestran una mayor tolerancia a la  $a_w$  reducida a temperaturas cercanas a sus óptimas de crecimiento. Un ejemplo de esto pueden ser los resultados obtenidos por Ohye y Christian (1967) para Clostridium botulinum tipo B. La temperatura óptima de crecimiento para este microorganismo a altas  $a_w$  es de 37-40°C pero si ésta se reduce a 30°C y 20°C, la mínima  $a_w$  que permite el crecimiento aumenta considerablemente.

Resultados similares fueron obtenidos para Pseudomonas fluorescens en un rango de temperatura de 15-30°C y para Aerobacter aerógenes y Lactobacillus viridescens a 15-37°C (Wodzinski y Frazier, 1960, 1961 a, 1961 b).

Este efecto no está muy claro para el caso de bacterias extremadamente halofílicas, donde el aumento de temperatura de incubación es acompañado de un importante aumento de la concentración de sal óptima para su crecimiento, es decir una reducción de su nivel óptimo de  $a_w$  de crecimiento.

Para levaduras osmofílicas (Von Schelhorn, 1950) la  $a_w$  mínima para fermentar es 0,66 a 30°C, 0,70 a 20°C y 0,78 a 10°C.

Los estudios realizados por Ayerst (1966, 1969) confirman que los hongos son más tolerantes a las bajas  $a_w$  a temperaturas cer-

canas a la óptima de crecimiento. Por ejemplo para Aspergillus ruber, existe crecimiento a  $a_w = 0,85 - T = 5^\circ\text{C}$ ,  $a_w = 0,80 - T = 10^\circ\text{C}$ ,  $a_w = 0,725 - T = 35^\circ\text{C}$  y  $a_w = 0,80 - T = 37^\circ\text{C}$ .

c- pH

El pH es un importante factor selectivo para el desarrollo de microorganismos en los alimentos. En la naturaleza, la acidez inherente de algunas frutas, representa un método natural de protección de los tejidos de la planta frente al deterioro microbiano (Jay, 1978). La  $a_w$  influye sobre el pH mínimo de crecimiento. En general se puede decir que el tipo de microorganismo que puede crecer en un alimento está determinado (a una dada temperatura) prácticamente por el pH y la  $a_w$ . En un alimento con pH 4,5 o menor, combinado con  $a_w$  reducida, sólo crecerán hongos y/o levaduras. Sin embargo, si la  $a_w$  es alta, las bacterias ácido-lácticas son los microorganismos principales involucrados en la contaminación. La tabla 15 muestra los valores de pH (máximo y mínimo) para el crecimiento de microorganismos comunes en alimentos en medios de laboratorio. La relación de la  $a_w$  y pH sobre el crecimiento de microorganismos fue extensamente estudiado para bacterias formadoras de esporas. En la tabla 16 se resume el

Tabla 15: Valores límites de pH que permiten el crecimiento microbiano

Microorganismos	pH mínimo	pH máximo	Referencias
Bacterias			
<u>Salmonella sp.</u>	4,0	8,0-9,6	Corlett y Brown (1980) Troller y Christian (1978)
<u>S. aureus</u>	4,0	9,8	Corlett y Brown (1980) Troller y Christian (1978)
<u>C. perfringens</u>	---	---	Troller y Christian (1978)
<u>C. botulinum</u>	4,6	8,5	Corlett y Brown (1980)
<u>C. botulinum</u> tipo A	---	---	Troller y Christian (1978)
<u>C. botulinum</u> tipo E	---	---	Troller y Christian (1978)
<u>Campylobacter jejuni</u>	4,7	9,5	Doyle y Roman (1981)
<u>Escherichia coli</u>	4,4	9,0	Corlett y Brown (1980) Troller y Christian (1978)
<u>Vibrio parahaemolyticus</u>	4,8	11,0	Corlett y Brown (1980) Troller y Christian (1978) Beuchat (1975)

Tabla 15 (continuación)

<u>Bacillus cereus</u>	4,9	9,3	Corlett y Brown (1981) Troller y Christian (1978)
<u>Yersinia enterocolitica</u>	4,6	9,6	Stern et al. (1980)
<u>Pseudomonas fluorescens</u>	---	---	Troller y Christian (1978)
<u>Lactobacillus sp.</u>	3,8-4,4	7,2	Corlett y Brown (1980)
Levaduras			
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	2,35	8,6	Corlett y Brown (1980) Troller y Christian (1978)
<u>Saccharomyces rouxii</u>	2.0	8,5	Troller y Christian (1978) Tilbury (1980)
<u>Saccharomyces bailii</u>	---	---	Troller y Christian (1978)
Hongos			
<u>Aspergillus flavus</u>	1,6	9,3	Corlett y Brown (1980) Troller (1980)
<u>Aspergillus ochraceus</u>	---	---	Troller (1980)
<u>Penicillium citrinum</u>	---	---	Troller y Christian (1978)

Tabla 15 (continuación)

<u>Penicillium italicum</u>	1,9	9,3	Corlett y Brown (1980)
<u>Penicillium patulum</u>	---	---	Troller (1980)

---

Tabla 16: Efecto de los solutos sobre el valor de pH mínimo de crecimiento para bacterias formadoras de esporas

Organismo	pH mínimo	a <sub>w</sub>	%NaCl	Sacarosa	Medio	Referencia
<u>C. botulinum</u> , Tipo A	5,3	0,97	b	b	Medio para clostridio roforzado + glicerol	Baird-Parker y Freame (1967)
Tipo B	7,0	0,92				
Tipo E	5,3	0,96				
	7,0	0,94				
<u>C. bolulinum</u> , Tipo A	6,0	0,96	a	b	Caldo + NaCl	Ohye y Christian (1967)
Tipo B	7,0	0,95	8,0			
	6,0	0,96	a			
	7,0	0,94	9,4			

///

Tabla 16 (continuación)

	Tipo E	6,0	0,98	a		
		7,0	0,97	5,1		
<u>C. botulinum</u> ,	Tipo E	6,5	a	4,3-4,8	b	Caldo
		7,2	a	4,6-4,8		Emodi y Lechowich (1969)
<u>C. botulinum</u> ,	Tipo A	5,6	0,978	3,95	b	Caviar
		>5,8	0,974	4,67		+ NaCl
	Tipo B	5,4	0,978	3,95		Hauschild y
		>5,8	0,974	4,67		Hilsheimer (1979)
	Tipo E	5,8	0,986	2,27		
		>5,8	0,974	4,67		
	Tipo A+B	5,2	0,978	3,95		
		5,6	0,974	4,67		



Tabla 16 (continuación)

<u>C. butyricum</u>	4,9	a	b	b	Bergere y Hermier (1970)
<u>C. saccharobutyricum</u>	7,3	a	0,5-2		Townsend (1939)
<u>C. pasterianum</u>	3,55	a	b	10°Brix	Inóculo de jugo de pera
	3,70	a		22°Brix	Inóculo de jugo de du-razno
<u>C. pasteurianum</u>	5,1	a	b	32-36%	Caldo Spielgelberg (1944)
	7,0	a	b	42-44%	
	5,5	a	1,2-2,9	b	
	6,5	a	3,5-4,7	b	

Tabla 16 (continuación)

<u>C. pasteurianum</u>	3,8	0,985	b	a	Inóculo de Jakobsen y Jensen
	4,75	0,975	b	a	jugo de pera (1975) + azúcar
<u>C. perfringens</u>	6,0	0,985	a	b	Caldo + NaCl Bartsch y Walker (1982)
	7,0	0,975	a	b	
<u>C. tyrobutyricum</u>	4,9	a	0,5-1,5	b	Bergere y Hermier (1970)
	7,3	a	1,5-2	b	
<u>C. tyrobutyricum</u>	4,9	a	1	b	Kleter et al. (1982)
	6,0	a	6	b	

a - Sin definir

b - No agregado

efecto de la reducción de  $a_w$  sobre pH mínimo de crecimiento. El aumento de la concentración de soluto (lo que implica disminución de  $a_w$ ), aumenta el valor de pH mínimo de crecimiento para todas las especies de bacterias evaluadas en esta tabla.

Otros factores que tienen influencia sobre el pH mínimo de crecimiento incluyen el tipo de soluto y la especie estudiada. Baird-Parker y Freame (1967) demostraron que el NaCl era más inhibitorio que el glicerol a la misma  $a_w$ . El pH mínimo de crecimiento, con  $a_w$  0,97 para esporas de Cl. botulinum tipo A, fue de 5,3 en un medio con glicerol y de 5,5 en un medio con NaCl. El efecto fue mucho más marcado para esporas de Cl. botulinum tipo B, puesto que el pH mínimo de crecimiento ( $a_w = 0,96$ ) en un medio con glicerol fue 5,3 y en otro conteniendo NaCl fue 7,0. El uso de diferentes azúcares (glucosa, sacarosa o fructosa) para reducir la  $a_w$  no presenta un efecto significativo sobre el pH mínimo de crecimiento de Cl. pasteurianum a la misma  $a_w$  (Jakobsen y Jensen, 1975). Comportamiento similares se observaron en hongos y levaduras. Por ejemplo, Saccharomyces cerevisiae en medio 0 y 0,1M de NaCl crece en un amplio rango de pH (3,0 a 7,0), pero en 3M de NaCl ( $a_w = 0,82$ ) sólo lo hace en pH 4,0-5,0.

La temperatura de incubación influye significativamente sobre el pH mínimo de crecimiento de microorganismos a una dada  $a_w$ .

Por ejemplo, el cambio de temperatura de incubación de 20° a 30°C disminuye el pH mínimo ( $a_w = 0,97$ ) de 6,0 a 5,5 para Cl. botulinum tipo A (Baird-Parker y Freame, 1967).

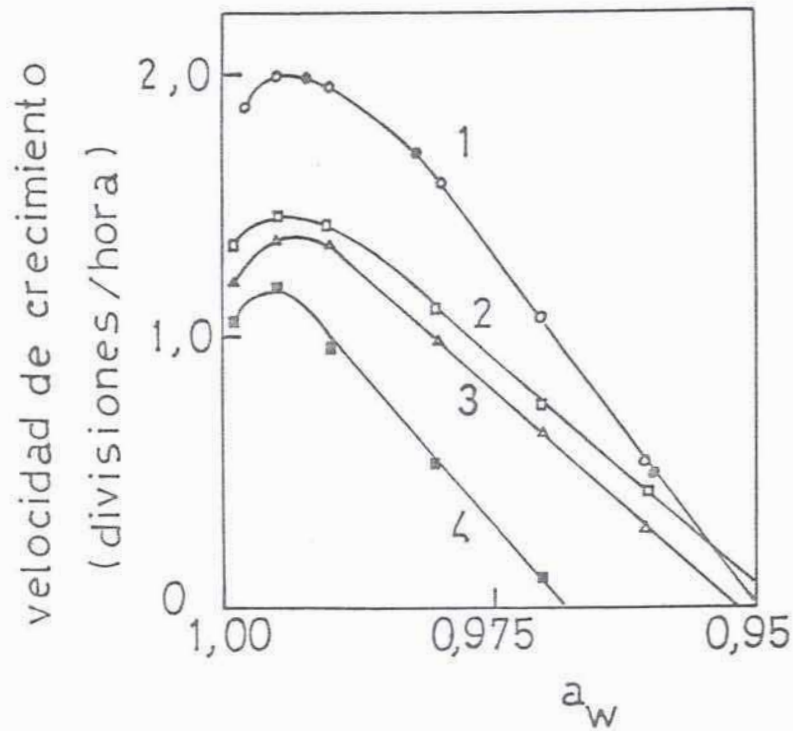
Baird-Parker y Freame (1967) comparan el efecto del pH reducido y  $a_w$  reducida para esporas y células vegetativas de Cl. botulinum. La reducción de  $a_w$ , a pH reducido, tiene sólo un efecto mínimo en la germinación de esporas de los tipos A, B y E. A un dado pH, la  $a_w$  mínima para el crecimiento de células vegetativas está 0,01 unidades sobre el mínimo de  $a_w$  requerido para la germinación de esporas. En el caso de Cl. botulinum, la  $a_w$  reducida en combinación con pH reducido, parece influenciar la formación de nuevas células vegetativas a partir de esporas germinadas y el proceso de células vegetativas pero no la germinación de esporas. Bergere y Harmier (1970) informaron que la germinación de esporas de Cl. tyrobutyricum a pH reducido era más tolerante al NaCl que el crecimiento de células vegetativas. La mayoría de los datos de bibliografía, para estos y otros microorganismos, muestran que el agregado de solutos, a pH reducidos, inhibe el crecimiento de células vegetativas y la formación de nuevas células a partir de esporas germinadas, pero tiene poca influencia sobre la germinación de esporas.

d- Concentración de oxígeno

Para aquellos microorganismos facultativos, la  $a_w$  mínima de crecimiento es menor en condiciones aeróbicas que en condiciones anaeróbicas. Por ejemplo, en el caso de S. aureus, la  $a_w$  mínima de crecimiento en aerobiósis es 0,86 y en anaerobiosis 0,92 (Scott, 1953).

e- Nutrición

La influencia de los nutrientes sobre la  $a_w$  de crecimiento de las bacterias ha sido estudiado con Salmonellae. Se ha comparado la velocidad de crecimiento en un medio simple glucosa-sales inorgánicas, con y sin un suplemento definido y en un medio complejo caldo de infusión cerebro-corazón (Scott, 1957). Esto se puede observar en la figura 8. Los medios complejos aumentan la velocidad máxima de crecimiento, pero no permiten crecimiento a  $a_w$  más bajas que en aquellos medios suplementados sintéticamente. Para el caso de hongos, Snow et al. (1944) observaron que Aspergillus repens produce crecimiento visible sobre fibras de salvado a  $a_w$  0,80 pero no a 0,75. Sin embargo, si se adiciona almidón al medio, crece a  $a_w$  0,72. Si se prepara una mezcla de almidón



Curva 1 : caldo de infusión cerebro-corazón

●  $a_w$  controlada por ajuste del contenido de agua

○  $a_w$  controlada por mezclas de sales

Curva 2 : hidrolizado de caseína-extracto de levadura + mezcla de sales

Curva 3 : medio glucosa-sales + 5 aminoácidos + 8 vitaminas + mezcla de sales

Curva 4 : medio de glucosa-sales + mezcla de sales

Figura 8 : Efecto de los nutrientes sobre la velocidad de crecimiento de Salmonella oranienburg a varias actividades acuosas ( $a_w$ ) (a)

(a) Scott (1957)

y albúmina de huevo, este hongo crece a una  $a_w$  de 0,70 en 5 meses, pero no se observa crecimiento en ninguno de estos dos nutrientes individualmente a los 7 meses de incubación.

#### f- Agentes químicos

Un ejemplo muy conocido del efecto combinado de un agente químico con la  $a_w$  es el caso del nitrito y baja  $a_w$  (por el agregado de NaCl) para preservar carne mediante la inhibición del crecimiento de Clostridium botulinum.

Li et al. (1974) proponen un método para preservar frutas mediante el cual se remueven los gases de los tejidos bajo vacío y se reemplazan con una mezcla conteniendo 30% sacarosa, pequeñas cantidades de  $\text{NaHSO}_3$  y sorbato de potasio. El punto clave del éxito de este método es la alteración apropiada del tejido de modo tal que permita la entrada de la mezcla humectante/preservativo sin alterar su textura.

Una de las formas más efectivas de prevenir el crecimiento microbiano en alimentos de humedad intermedia es mediante la combinación de un humectante como glicerol o NaCl y un agente antimicrobiano (Acott y Labuza, 1975 a). Dentro de los agentes antimicrobianos más utilizados se pueden mencionar:

///

benzoatos- su actividad antimicrobiana es máxima en un rango de pH 2,5-4,0; es efectivo para bacterias, hongos y levaduras pero no es recomendado para bacterias debido a que su actividad decrece drásticamente por encima de pH 4,5 que es justamente donde se encuentran los mayores problemas de contaminación bacteriana.

propionatos- son muy efectivos frente a hongos pero poco efectivos frente a bacterias y levaduras; actúa a pH inferiores a 5,5. Es ampliamente utilizado en pan, tortas, quesos procesados y alimentos para animales.

sorbatos- el ácido sórbico y especialmente el sorbato de potasio son los agentes antimicrobianos más ampliamente utilizados en alimentos. Su principal acción es sobre hongos y levaduras y además ejerce una acción positiva sobre algunas bacterias de importancia alimentaria como Staphylococcus aureus, C. botulinum, E. coli y Salmonella. El sorbato de potasio es más efectivo a valores de pH cercanos a su constante de disociación ( $pK_a$ ) que tiene un valor de 4,5. A este pH, el 50% del ácido se encuentra en su forma efectiva (no disociado) (Tabla 17). Por lo tanto, este agente antimicrobiano es más efectivo en alimentos de bajo pH. El máximo pH para su actividad es 6,0-6,5 y por esta razón, en estos niveles de pH, este es elegido frente al propionato o



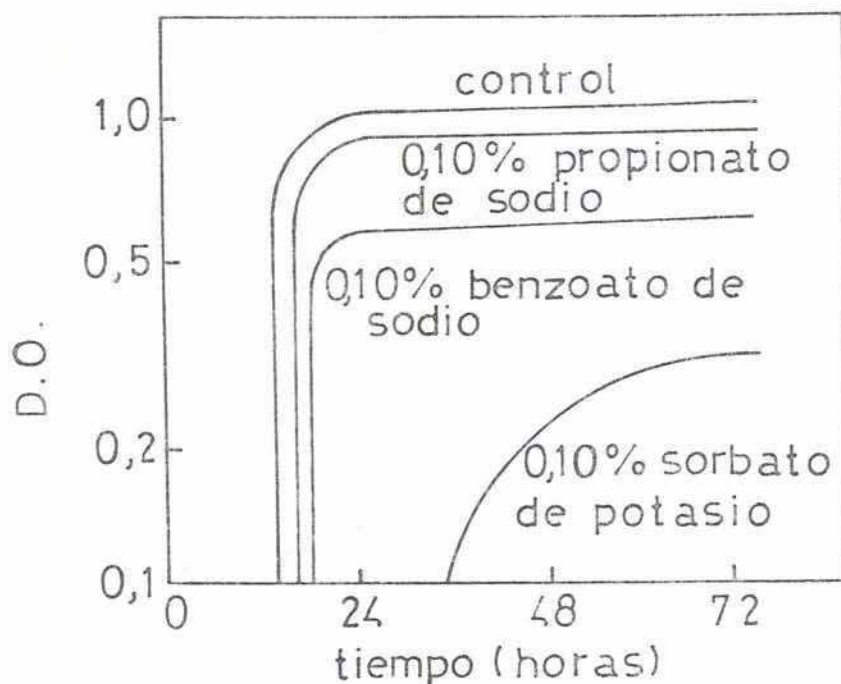
Tabla 17: Efecto del pH sobre la disociación del ácido sórbico (a)

pH	Fraccion no disociada (%)
7,00	0,6
6,00	6,0
5,80	7,0
5,00	37,0
4,75 ( $pK_a$ )	50,0
4,40	70,0
4,00	80,0
3,70	93,0
3,00	98,0

(a) Sofos y Busta (1981)

benzoato cuyos máximos pH de actividad están alrededor de 5,0-5,5 y 4,0-4,5 respectivamente. En la figura 9 se muestra la inhibición relativa ejercida sobre una levadura (Saccharomyces cerevisiae) por la adición de igual concentración de propionato de sodio, benzoato de sodio y sorbato de potasio, a pH 5,5 y 30°C, cuando un caldo es inoculado con  $3 \times 10^4$  UFC/ml. El crecimiento es cuantificado como densidad óptica (D.O.) del caldo. Como se puede observar en esta figura, el sorbato retrasa significativamente el crecimiento de la levadura y el valor máximo al que se llega a las 72 horas es mucho menor que en los otros casos (Informe técnico suministrado por Monsanto Company, Nutrition Chemicals Division, St. Louis).

En las figuras 10, 11, 12 y 13 se ilustra la relación entre el pH del sistema y la eficiencia antimicrobiana del sorbato para S. aureus, Salmonella, E. coli y Saccharomyces cerevisiae. Los ensayos se realizaron a 25°C y el crecimiento fue medido como densidad óptica (D.O.) en un caldo de tripticasa-soja con un inóculo inicial de  $10^6$  UFC/ml. En todos los casos se observa que si bien el sorbato es efectivo hasta valores de pH 6,0-6,5, se requiere una concentración mayor a 0,1% de éste si se pretende lograr una inhibición total del microorganismo en estudio, y, por otro lado, a pH menores como por ejemplo pH 5,0, esta con-



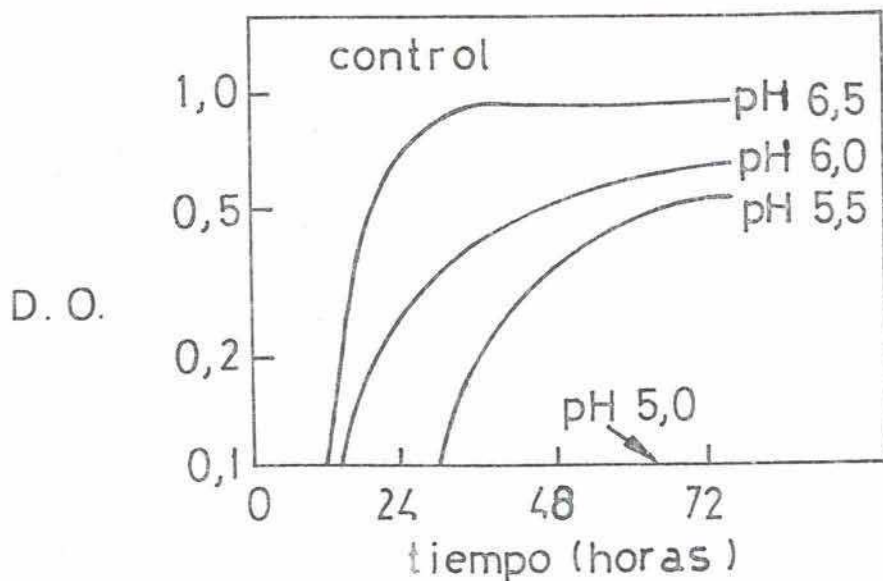
inóculo inicial =  $3,0 \cdot 10^4$  UFC /ml

pH = 5,5

T = 30°C

Figura 9: Efecto comparativo de distintos agentes antimicrobianos sobre el desarrollo de Saccharomyces cerevisiae (a)

(a) Informe técnico, Monsanto Company, Nutrition and Chemicals Division



T = 25°C

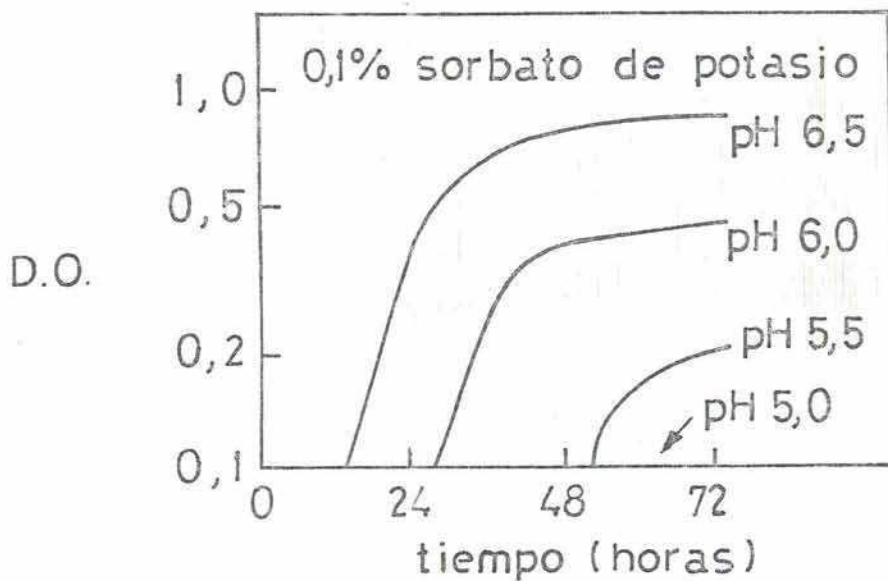


Figura 10: Relación entre el pH y la eficiencia antimicrobiana del sorbato de potasio sobre el desarrollo de Staphylococcus aureus (a)

(a) Informe Técnico, Monsanto Company, Nutrition and Chemicals Division

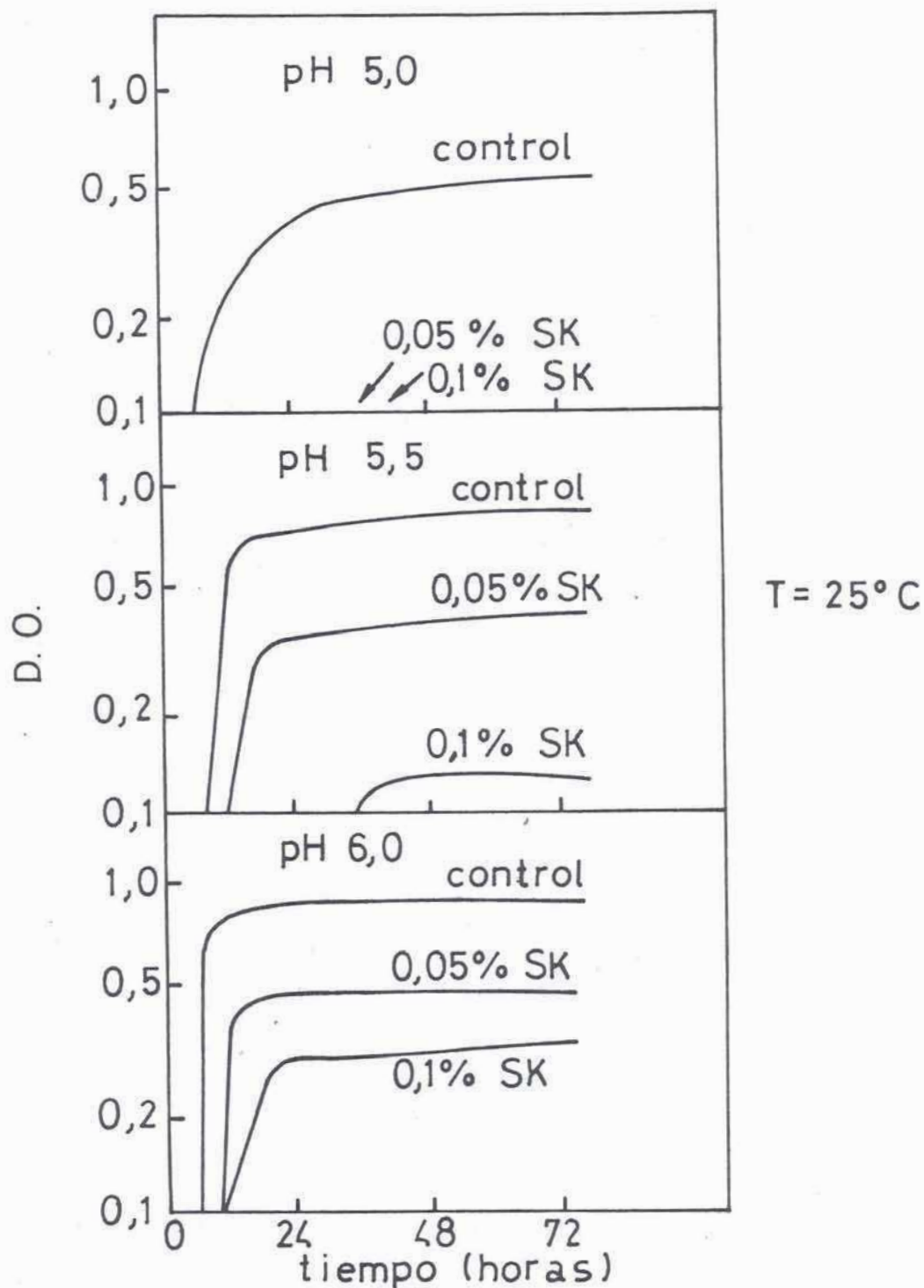


Figura 11: Relación entre el pH y la eficiencia antimicrobiana del sorbato de potasio sobre el desarrollo de Salmonella (a)

SK = sorbato de potasio

(a) Informe técnico, Monsanto, Company Nutrition and Chemicals Division

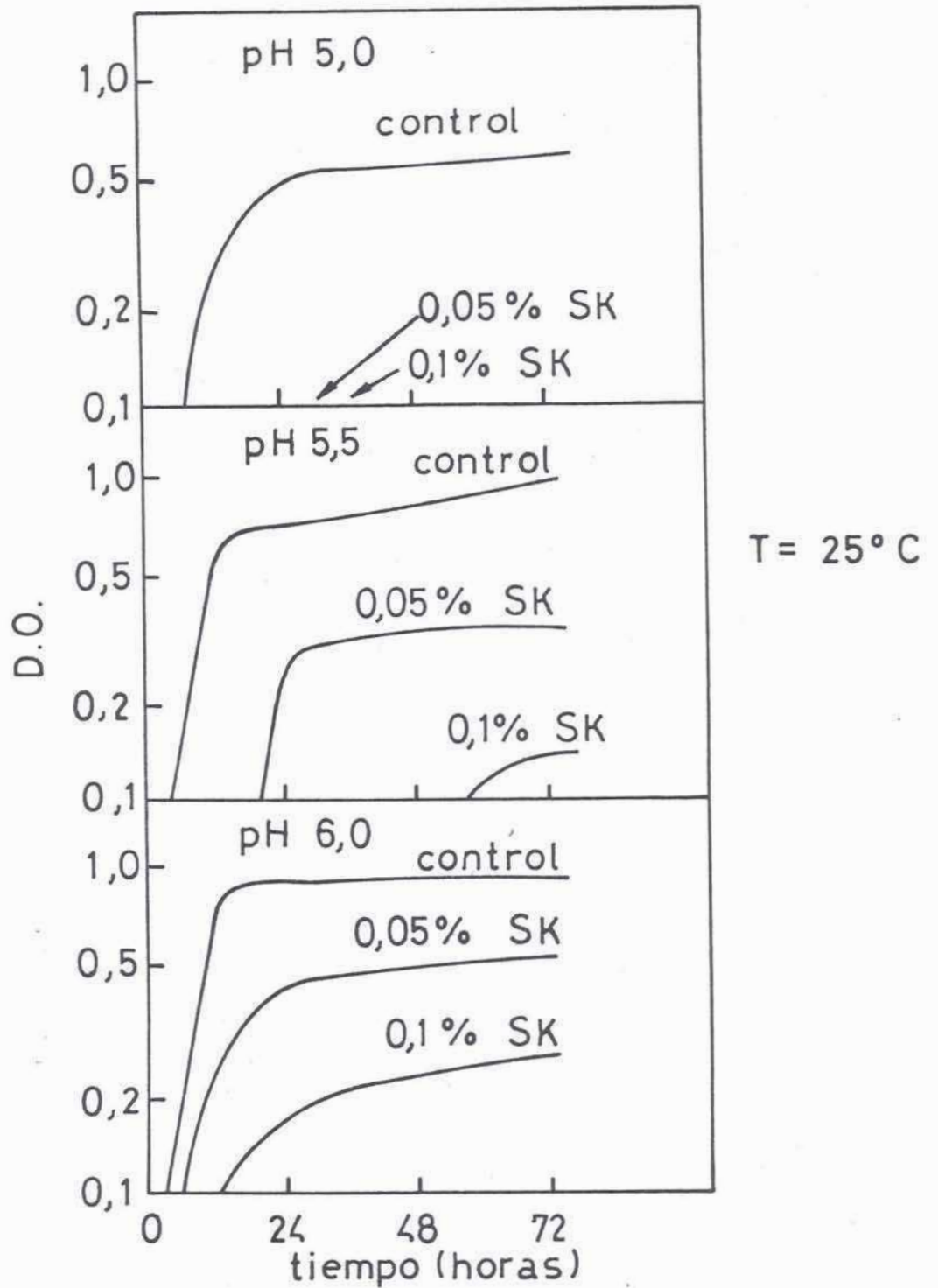


Figura 12: Relación entre el pH y la eficiencia antimicrobiana del sorbato de potasio sobre el desarrollo de E.coli (a)

SK = sorbato de potasio

(a) Informe técnico, Monsanto Company, Nutrition and Chemicals Division

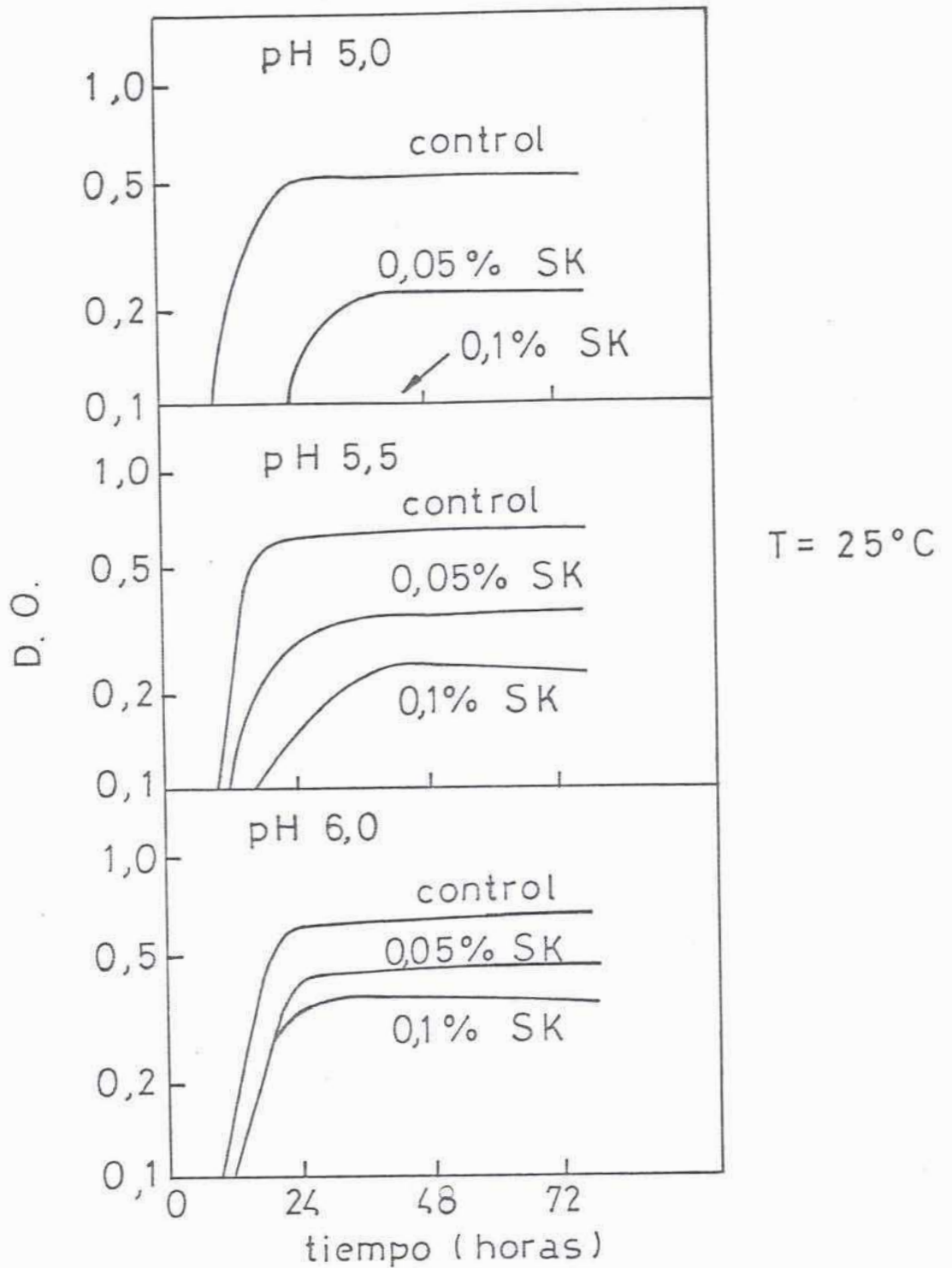


Figura 13: Relación entre el pH y la eficiencia antimicrobiana del sorbato de potasio sobre el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae* (a)

SK = sorbato de potasio

(a) Informe técnico, Monsanto Company, Nutrition and Chemicals Division

centración (0,1%) es suficiente para eliminar totalmente los microorganismos presentes (Informe técnico suministrado por Monsanto Company, Nutrition Division, St., Louis, 1983).

#### 2.4. Reacciones de deterioro en alimentos de $a_w$ reducida

##### 2.4.1. Generalidades

La estabilidad microbiológica de un alimento es fundamental desde el punto de vista de la salud humana. Superada esta forma de deterioro se deben considerar otras reacciones que no sólo alteran la calidad organoléptica del alimento, sino que además pueden producir una importante disminución de su valor nutritivo (por ejemplo por pérdida de valor biológico de proteínas, destrucción de vitaminas, etc.). Dentro de las reacciones de deterioro más importantes en alimentos pueden mencionarse las siguientes:

- Pardeamiento enzimático en frutas y vegetales con producción de color marrón oscuro, acompañado de cambios de sabor, olor y textura.
  
- Pardeamiento no-enzimático con cambios de color, alteración



de flavor y textura, acompañado de una importante pérdida nutricional.

- Oxidación de lípidos con producción de olores y sabores desagradables ("off-flavors"), degradación de ácidos grasos esenciales y destrucción de ciertas vitaminas.
- Reacciones hidrolíticas donde las moléculas de alto peso molecular se degradan a estructuras oligoméricas y finalmente a sus estructuras monoméricas (almidón en dextrinas, oligo y monosacáridos; lípidos en ácidos grasos y glicerol; proteínas en péptidos y aminoácidos y si son conjugadas o complejas se obtiene la separación de sus grupos prostéticos; etc.)

En el caso del suero concentrado microbiológicamente estable, el tratamiento térmico que recibe durante su elaboración minimiza el deterioro que puede sufrir debido a reacciones enzimáticas; las reacciones de oxidación de lípidos tampoco adquieren relevancia como consecuencia del bajo porcentaje de estos compuestos presentes; por el contrario, el alto porcentaje de lactosa (aproximadamente 30%) juntamente con la lisina provenientes de las proteínas del suero, hacen que la reacción de Maillard

sea el factor determinante del deterioro que este material pueda experimentar. Por esta razón, a continuación se desarrollará este tópico en particular.

#### 2.4.2. Características principales del pardeamiento no enzimático

Se reconocen tres caminos principales por el que pueden ocurrir las reacciones de pardeamiento no enzimático, oxidación de ácido ascórbico, caramelización de azúcares y la reacción de Maillard. La reacción predominante está dada por la composición y pH del alimento y la temperatura a que éste es sometido (Braverman, 1963).

El desarrollo de estas reacciones produce en el alimento modificaciones en la calidad y alteraciones en el valor nutritivo que se ven reflejadas en:

- aparición de aromas y sabores agradables y desagradables como consecuencia de la formación de productos de condensación (Hodge et al., 1972).
- cambios de color debidos a la formación de pigmentos parduz-

cos y pérdida y/o destrucción de otros pigmentos presentes en el alimento (Reynolds, 1965).

- pérdida de valor nutritivo producido por la destrucción y/o inactivación biológica de aminoácidos esenciales como la L-lisina (Mauron, 1981).
- producción de metabolitos potencialmente tóxicos (Powrie et al., 1981).
- liberación de CO<sub>2</sub> (Cole, 1967).
- disminución de pH (Resnik, 1981).

En la mayoría de los casos estos efectos resultan perjudiciales, especialmente en el procesamiento y almacenamiento de alimentos concentrados (jugos de fruta), alimentos deshidratados (lácteos, carnes, frutas, vegetales) (Patton, 1955; Stadtman, 1948) y en general en alimentos de humedad intermedia (Loncin et al., 1968).

Cuando se calientan azúcares en forma anhidra o en solución, estos experimentan una serie de transformaciones tales co-

mo hidrólisis, enolización, isomerización, deshidratación, oxidación y fragmentación, formándose compuestos carbonílicos altamente reactivos, que reaccionan entre sí dando polímeros insaturados de color pardo. Esta reacción es catalizada por ácidos y bases. En medio ácido, predomina la deshidratación y en medio alcalino ocurren rápidamente las reacciones de enolización y también se encuentran productos de oxidación y fragmentación (Hodge y Osman, 1976). La reacción de oxidación y deshidratación de ácido ascórbico es producida a altas temperaturas y bajo pH, acelerándose en presencia de oxígeno, formando furfural y productos de polimerización. El efecto principal es la pérdida de valor nutritivo a consecuencia de la destrucción, entre otros componentes, de la vitamina C (Braverman, 1963). En este caso (suero concentrado) el camino principal es la reacción de Maillard y por lo tanto se desarrollará en otro punto.

#### 2.4.3. Reacción de Maillard

La reacción de Maillard es la causa principal del pardeamiento no enzimático en alimentos deshidratados y alimentos proteicos de humedad intermedia.

Se produce por la condensación de un grupo carbonilo reac-

tivo, proveniente generalmente de un azúcar reductor (lactosa en el caso del suero) y un grupo amino proveniente de un aminoácido o una proteína (especialmente el grupo  $\epsilon$ -amino de restos de lisina).

Las reacciones pueden dividirse en 3 etapas (Mauron, 1981):

1- Reacciones iniciales

- a- condensación (grupo carbonilo y grupo amino libre, con formación de la base de Schiff).
- b- reordenamiento de Amadori (formación del compuesto de Amadori).

2- Reacciones avanzadas

- c- fisión de azúcares
- d- deshidratación de azúcares
- e- degradación de aminoácidos

3- Reacciones finales

- f- condensación aldólica

g- polimerización aldehído-amina, con formación de compuestos heterocíclicos conteniendo nitrógeno.

La etapa inicial es una etapa química sin pardeamiento ni producción de olores y sabores en el alimento, pero puede reducir el valor nutricional del mismo (Hurrell y Carpenter, 1974). La segunda etapa se caracteriza por la producción de sustancias volátiles o solubles responsables de los olores y sabores de alimentos cocidos (Hodge, 1953). La tercera y última fase de la reacción produce los pigmentos propiamente dichos o melanoidinas. Algunos de estos pigmentos son solubles en agua, otros pocos solubles y algunos insolubles (Reynolds, 1965). Estos pigmentos son polímeros altamente insaturados y contienen nitrógeno. Su color es pardo rojizo y absorben fuertemente en el ultravioleta.

#### 2.4.3.1. Factores que afectan las reacciones de Maillard

Los factores más importantes que afectan la reacción de Maillard son:

- a- temperatura y tiempo de calentamiento
- b- pH

c- composición del sistema

d- humedad

a- La temperatura es uno de los parámetros más importantes en el desarrollo del pardeamiento no enzimático, y fue por esto el primero en ser estudiado por Maillard (1916), quien informó que la velocidad de la reacción aumenta con la temperatura. Diversos investigadores han confirmado esta información. Lea y Hannan (1949) mostraron que en la reacción caseína-glucosa, la velocidad de desaparición de nitrógeno amínico se multiplica por 40000 cuando la temperatura pasa de 0°C a 80°C. El tiempo de calentamiento es otro factor importante. Por ejemplo, en suero de queso en polvo ( $a_w = 0,44$ ), la fracción remanente de lisina es 90% a los 60 días de almacenamiento a 25°C y 60% a los 220 días de almacenamiento a igual temperatura (Labuza et al. 1981 a).

b- En general, en sistemas con grupos carbonilo y amino reactivos se ha verificado una sensible disminución del pardeamiento no enzimático a pH muy ácidos, y un importante aumento del mismo a partir de pH comprendido entre 5 y 7 (Underwood et al., 1959; Ellis, 1959; Willits et al., 1958).

///

c- La reacción de Maillard es más dependiente del contenido de aminoácidos que del contenido de azúcares (Spark, 1969). Las aldopentosas (xilosa) son más reactivas que las aldohexosas (manosa, galactosa, glucosa), y los disacáridos reductores son aún menos reactivos. En el caso de los disacáridos como la sacarosa, debe producirse previamente la hidrólisis para poder participar de la reacción. Debido a que bajos valores de pH y relativamente altos valores de contenido de humedad favorecen la hidrólisis de los disacáridos, estos factores también aceleran la velocidad de reacción en sistemas como el de pteína-sacarosa (Hurrell y Carpenter, 1977).

La L-lisina es el aminoácido más reactivo (dentro de los más comúnmente presentes en alimentos), siendo el grupo amino situado en posición  $\epsilon$  más reactivo que el situado en posición  $\alpha$  (Taufel et al., 1956).

Los metales pesados pueden formar complejos con los aminoácidos y de esta forma influir en la velocidad de reacción (Ellis, 1959). Otro factor importante tratado en bibliografía por varios autores es la presencia de oxígeno (Ellis, 1959).

El  $\text{SO}_2$  y los sulfitos son aditivos químicos usados en la industria alimenticia para controlar el deterioro microbiano,



el pardeamiento enzimático y en casos como los jugos de fruta y vinos para controlar la reacción de Maillard (Scholey y Rowlinson, 1974).

d- El agua desempeña un rol primordial en la mayoría de las reacciones de deterioro que puede experimentar un alimento, ya sea como reactivo, producto o medio de la reacción. El efecto del agua depende de la disponibilidad de ésta en el alimento, que a su vez será función de su estado físico-químico. Por lo tanto la velocidad de reacción de deterioro depende de la  $a_w$  del alimento en estudio (Labuza, 1980). Esta dependencia varía para cada tipo de reacción de deterioro y para cada alimento o sistema estudiado. En un alimento sólido, de baja  $a_w$ , los reactivos no pueden interaccionar y por lo tanto no ocurre la reacción. Un aumento de  $a_w$  por arriba del valor de monocalpa, provoca un aumento gradual de movilidad de los reactivos y de su velocidad de difusión a la fase acuosa, aumentando de esta forma la velocidad de reacción. Si se sigue aumentando la cantidad de agua presente, la fase acuosa se satura, y este aumento no altera la concentración de reactivos sino hasta el momento que cesa la disponibilidad de los mismos para disolverse, y un posterior aumento del contenido de agua

provoca su dilución. Este efecto, sumado al efecto inhibitorio que tiene el agua por ser producto de la reacción, producen una disminución de la velocidad que no es compensada por la disminución de la viscosidad. Como resultado de este mecanismo se obtiene una dependencia de la velocidad de pardeamiento no enzimático con la  $a_w$  como la mostrada en la figura 14, donde hay un máximo de pardeamiento (en el caso de alimento o sistemas sólidos) para valores de  $a_w$  entre 0,60 y 0,80 (Labuza y Saltmarch, 1981 a; Eichner y Karel, 1972). En alimentos y sistemas modelos líquidos hay una gradual disminución de la velocidad de pardeamiento al aumentar la  $a_w$  (figura 14). Esto es debido a que el agua al ser producto de reacción, disminuye la velocidad neta por ley de acción de masas, y no se observa un máximo de pardeamiento en la zona de humedad intermedia (Loncin et al., 1965; Eichner y Karel, 1972).

#### 2.4.4. Cambios de color producidos por el pardeamiento no enzimático

El cambio de color producido por el pardeamiento no enzimático es una de las modificaciones de calidad más indeseables producidas por esta reacción de deterioro, teniendo en cuenta

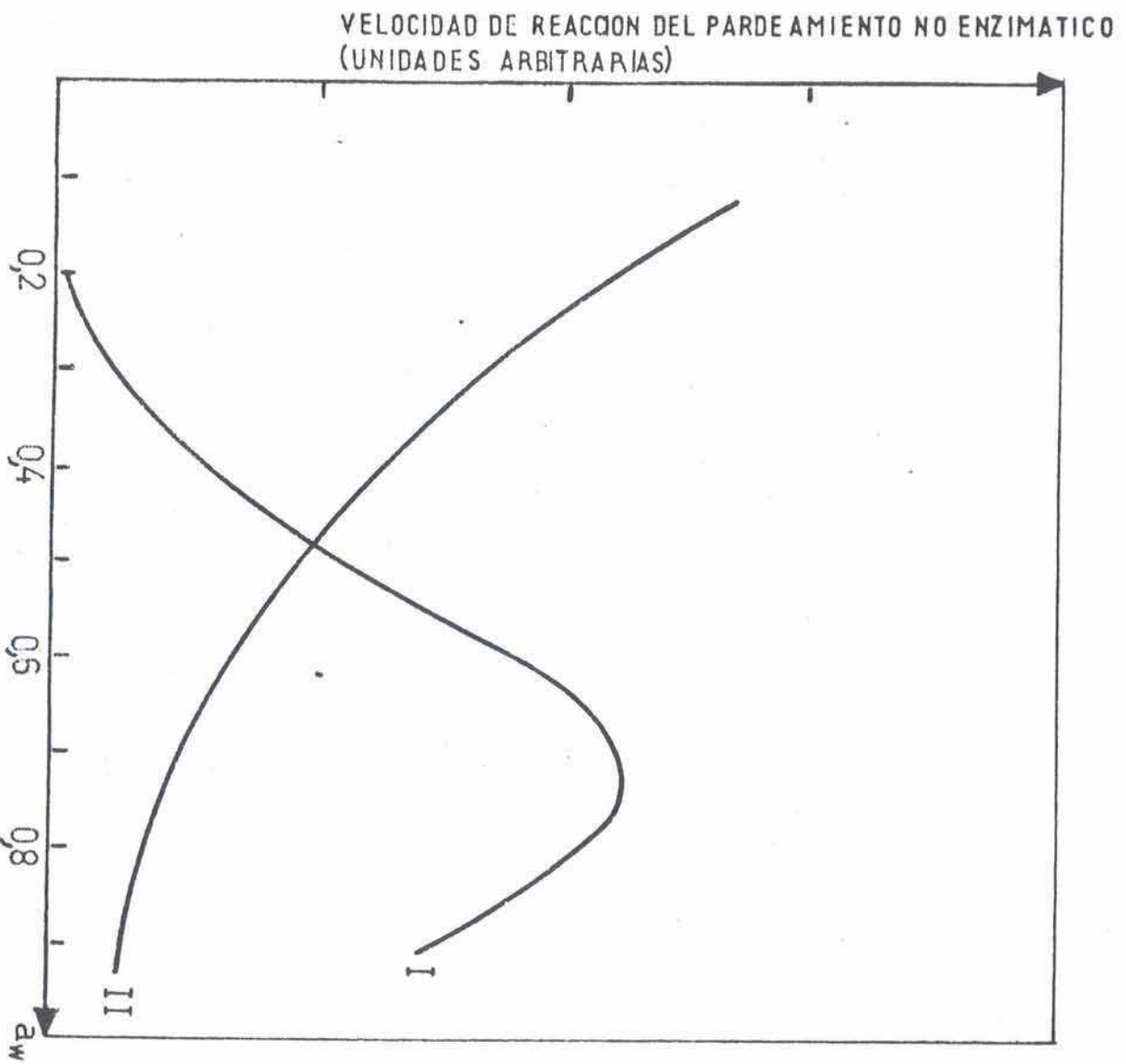


Figura 14: Dependencia de la velocidad de pardeamiento no enzimático en función de la  $a_w$ .

- I - Alimentos y sistemas sólidos (Labuza y Saltmarch, 1981 a)
- II - Alimentos y Sistemas líquidos (Loncin, 1965)

que dentro de los atributos de los alimentos, el color ocupa un lugar preferencial debido a que su percepción suele ser definitoria en la evaluación de calidad de los alimentos por el consumidor (Durán, 1971). Es importante aclarar que quedan fuera de estas consideraciones aquellos alimentos donde se busca el desarrollo de esta reacción para obtener el color característico del mismo, como por ejemplo el dulce de leche.

La observación visual tiene graves inconvenientes para ser aplicada en la evaluación de calidad de un alimento. No es reproducible, la nomenclatura es poco concreta y puede ser confusa; factores tales como características geométricas y superficiales del alimento, iluminación y color de fondo, determinan la sensación que sobre el observador produce el color analizado. Por estos motivos se hace necesario reemplazar la observación visual por una medida instrumental y objetiva. Inicialmente se intentó mejorar la evaluación subjetiva mediante la utilización de patrones de comparación y la normalización de las condiciones de observación. Se utilizó el atlas Munsell (Mackinney y Little, 1962). Posteriormente se aplicó la colorimetría triestímulo, principalmente mediante el uso de colorímetros triestímulo.

En el caso de alimentos, donde el color es uno de los factores más importantes en la evaluación de la calidad del mismo,

se ha buscado correlacionar la apreciación visual que realiza el observador con la medida instrumental. Hunter y Yeatman (1961) hallaron una relación entre el índice de calidad del jugo (TCI = tomato color index) y los valores instrumentales

$$TCI = \frac{216}{(Y)^{\frac{1}{2}}} - \frac{30}{(Y)^{\frac{1}{2}}} \left[ \frac{Y - Z}{X - Y} \right] \quad (23)$$

La dificultad para hallar este tipo de correlación es que el colorímetro no llega a alcanzar la capacidad integradora y analizadora del cerebro humano. Como inconveniente adicional la heterogeneidad del color en la mayoría de los alimentos, apreciable por un observador en forma instantánea y completa, difícilmente se puede representar por una medida instrumental. En el caso particular del estudio del cambio de color en un alimento, producido por el pardeamiento no enzimático, se busca correlacionar el color con la aceptabilidad, durabilidad y calidad del alimento. Usualmente el pardeamiento va acompañado de la degradación de otros pigmentos como clorofila o carotenoides. En este caso, la medición exclusiva del color debido al pardeamiento debe involucrar una etapa de separación de los pigmentos formados en este proceso. Posteriormente se mide la absorbancia a una longitud de

onda determinada, usualmente 390 y 500 nm (Ellis, 1959; Lee et al., 1979; Reyes et al., 1982). Si se trabaja en un rango de dilución que cumpla la ley de Beer, se puede considerar lineal la relación entre la absorbancia y la cantidad de pigmento (Maier y Schiller, 1959). Este método presenta varias fuentes de error. Este análisis supone que el pigmento formado a lo largo de toda la reacción tiene las mismas características espectrales, lo cual no es necesariamente cierto debido a que el pigmento se forma a través de múltiples reacciones de adición, eliminación y deshidratación que son altamente dependientes de las condiciones de reacción. Otro error importante está dado por la extracción insuficiente del pigmento o la extracción de otros pigmentos. Si se intenta correlacionar esta medición con la observación visual nos encontramos con otro inconveniente; muestras con la misma absorbancia a 450 nm tienen diferente grado visual de pardeamiento, tal como se observa en la comparación de sistemas sulfitados con respecto a los no inhibidos, debido a que el  $\text{SO}_2$  produce una modificación del espectro no detectable a 450 nm (Spark, 1969). De la discusión anterior se puede observar que la medición de la absorbancia de un extracto a una única longitud de onda, en muchos casos, no es la forma adecuada de estudiar las reacciones de pardeamiento no enzimático. El análisis de una parte mayor del espec-

tro visible o de todo el espectro de reflexión (o de transmisión, en el caso menos frecuente de alimentos transparentes), como se realiza en la medición de color, proporciona una idea más acertada de la impresión luminosa que recibe el ojo. Cornwell y Wrolstad (1981) estudiaron el pardeamiento no enzimático que experimenta el jugo de pera durante su almacenamiento mediante la medición de color y describieron el avance de la reacción utilizando la relación entre el valor L (Hunter) y el grado de pigmento pardo.

Un enfoque distinto fue utilizado por Petriella et al. (1985) en la cinética de reacciones de pardeamiento no enzimático en sistemas modelos de alta  $a_w$ , donde se describe la cinética de dicha reacción mediante funciones de color. Cabe destacar que el reemplazo de la medida de la absorbancia (con su correspondiente procedimiento extractivo) por variables del color del sistema como índice de pardeamiento, puede representar una apreciable simplificación del trabajo experimental.

El ojo humano es sensible a la radiación electromagnética en el ámbito de 380 a 770 nm de longitud de onda. Asimismo, tiene capacidad de discriminar el color a través de un complejo mecanismo trivariante.

El color puede considerarse como una propiedad de los objetos que la ostentan, como un fenómeno físico-óptico o como una

sensación de naturaleza físico-psicológica experimentada por el individuo cuando la energía en forma de radiación, dentro del espectro visible, impresiona la retina. Existen distintos factores que afectan la percepción del color de un objeto (Francis y Clydesdale, 1975):

- 1- la distribución de la energía espectral del iluminante.
- 2- las condiciones bajo las cuales el color es visto, como nivel de iluminación, color del contorno y ángulo de visión.
- 3- las características espectrales de los objetos con respecto a la absorción, reflexión y transmisión de la luz.
- 4- la sensibilidad del observador.

Cuando la luz interactúa con la superficie de un objeto, parte de la luz incidente se refleja, parte se absorbe y parte se transmite. La importancia relativa de estos tres fenómenos determina la apariencia del objeto. En función de esta interacción, los objetos se clasifican en:



- a- opacos
- b- transparentes
- c- translúcidos

Son opacos aquellos objetos que absorben o reflejan toda la luz. Si toda la luz visible es absorbida, el objeto aparece como negro y si absorbe selectivamente el objeto será coloreado. En oposición, un objeto transparente es aquel en el que la luz pasa a través de él con un mínimo de reflexión o absorción. Entre estos dos extremos están los materiales translúcidos, en los que parte de la luz incidente es reflejada y parte transmitida. En el caso de alimentos la reflexión puede ser especular o difusa. Será especular cuando el ángulo de la luz incidente es igual al de la luz reflejada y será difusa cuando la reflexión es en otras direcciones distintas de la especular. La reflexión difusa es la que produce la sensación de color de los objetos, y la especular es la responsable del brillo, que sólo depende de la superficie externa del objeto. Por todo lo anteriormente expuesto se puede apreciar la dificultad de lograr una medida cuantitativa de color que involucre todos los factores que contribuyen al efecto final y que reemplace a la observación visual.

La descripción cualitativa del color puede estar dada

mediante la caracterización de los atributos del color. Estos son la luminosidad y la cromaticidad (Lozano, 1978). La luminosidad de un color es el atributo psicológico de la claridad, es decir cuanta luz refleja una superficie dada e independiente de su cromaticidad; se puede evaluar este factor comparando el color con una escala de grises, cuánto más claro, tanto más luz reflejará. Este atributo es el que permite clasificar a una superficie de color como equivalente a la sensación producida por un elemento gris en la escala del blanco al negro. La cromaticidad involucra dos características, la longitud de onda predominante y la pureza; la primera corresponde al matiz o tono y la última a la saturación.

El matiz es el atributo que permite identificar al rojo, naranja, amarillo, verde, azul, púrpura o cualquier combinación de ellos. La saturación es una propiedad de la superficie coloreada que da la diferencia de color respecto al gris de igual luminosidad.

La colorimetría basa su estructura teórica en tres principios fundamentales conocidos como las leyes de Grasman. El primero de estos establece que cualquier color puede ser igualado por la suma de tres colores primarios, entendiéndose por primarios aquellos colores que son independientes entre si (rojo-azul-

amarillo). El segundo principio expresa que la igualdad de color permanece constante, independientemente de la magnitud física de los estímulos, y por último, el tercer principio es el conocido como principio de la aditividad, y se expresa diciendo que, si existen dos colores diferentes, son igualados por proporciones diferentes de los mismos primarios, y la suma de ambos colores será equivalente a la suma de los componentes de cada uno de los primarios. Este principio constituye la base fundamental de toda la colorimetría, ya que permite descomponer el espectro de la luz en fracciones simples de longitud de onda y sumar las contribuciones de cada una de ellas integrando el resultado final.

#### 2.4.4.1. Medida cuantitativa de color

La forma más sencilla de obtener una medida objetiva de color es mediante el análisis del espectro de reflexión o transmisión obtenido con un espectrofotómetro. Estos representan fielmente la calidad y la cantidad de luz que reflejan o transmiten los cuerpos, y por lo tanto constituyen la medida más completa de un determinado color. De él se puede obtener la información necesaria para especificar el color, compararlo con otros y expresarlo en otros sistemas de unidades. Por el contrario, estos

espectros carecen de valor práctico para utilizarlos en el control rutinario de alimentos a nivel industrial.

De los sistemas conocidos para la evaluación del color, el más difundido es el propuesto por la C.I.E. (Commission Internationale de l'Eclairage). Para normalizar este método de medida se define el observador patrón, como representativo de un observador de visión normal, y se asigna a cada color un conjunto de tres valores, índice de la contribución de cada uno de los primarios. La C.I.E. llama valores triestímulo a la expresión numérica de la contribución de los tres primarios imaginarios (X, Y, Z), en reemplazo de los primarios reales (rojo, verde y azul). Estos tres primarios fueron elegidos de tal forma que sólo uno de ellos es el portador de toda la información concerniente a la luminosidad del color. Para definir un color por sus valores triestímulo o valores C.I.E. es necesario establecer el iluminante empleado. Esta elección se realiza de acuerdo con las condiciones de exposición a que estará sometida la superficie de color. La más utilizada es la fuente C, cuya distribución energética es similar a la de la luz blanca solar y cuya energía corresponde a la de un cuerpo negro a una temperatura de 6740°K.

La intensidad luminosa reflejada por un objeto coloreado a cada longitud de onda, se obtiene multiplicando la intensidad

de la luz procedente del foco luminoso ( $E_\lambda$ ), por el factor de reflectancia espectral. Este valor es multiplicado por la contribución de cada primario (obtenida de la curva de distribución del primario ideal), para finalmente integrar y obtener los valores triestímulos X, Y, Z. Este cálculo se esquematiza en la figura 15. Actualmente existen sistemas de computación acoplados a los espectrofotómetros que realizan este cálculo en forma automática. De esta manera, la representación gráfica de los colores, dado por sus valores triestímulo, supone un diagrama de tres dimensiones. Para simplificar su interpretación, los valores triestímulo se transforman en los llamados "coeficientes tricromáticos", convirtiendo la representación gráfica en plana.

Estos se definen como:

$$x = \frac{X}{X + Y + Z}, \quad y = \frac{Y}{X + Y + Z}, \quad z = \frac{Z}{X + Y + Z}$$

y se puede reducir a dos variables ya que,

$$x + y + z = 1$$

Comúnmente, el color se indica en el plano "x-y" y even-

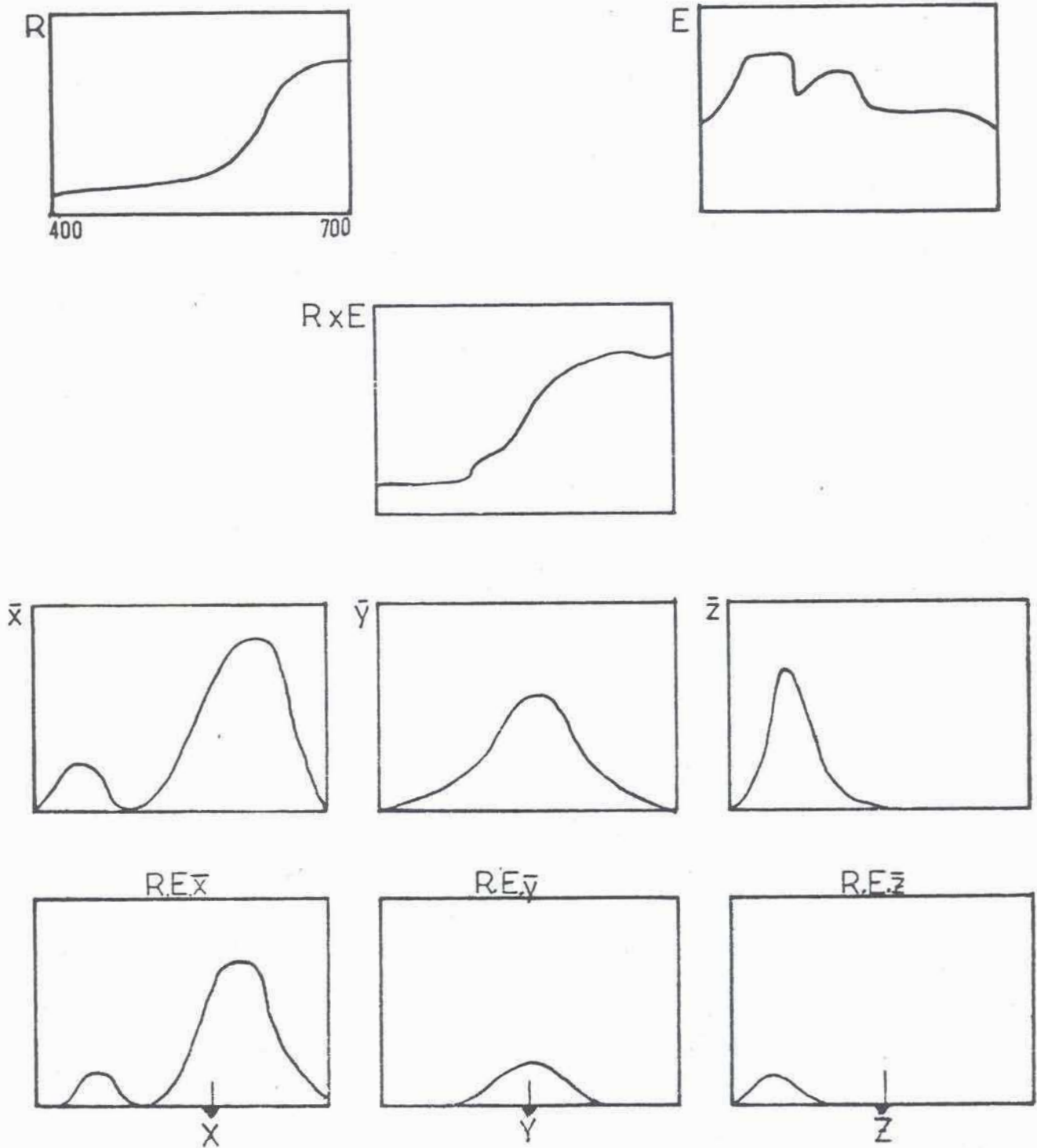


Figura 15: Representación esquemática del cálculo de los valores triestímulo a partir del espectro de transmisión o reflexión.

R : Factor de transmitancia o reflectancia espectral

E : Distribución energética del iluminante

$\bar{x}$ ,  $\bar{y}$ ,  $\bar{z}$  : Funciones de distribución de los tres primarios

tualmente la luminosidad Y se utiliza como tercera coordenada.

La diferencia entre dos colores ( $\Delta E$ ) viene dada por la ecuación de la distancia entre dos puntos en el espacio

$$\Delta E = [(\Delta X)^2 + (\Delta Y)^2 + (\Delta Z)^2]^{\frac{1}{2}} \quad (24)$$

Este valor no es una buena medida de la diferencia entre dos colores debido a que el espacio C.I.E. no es homogéneo. Es decir, distancias iguales no suelen representar diferencias de color iguales en la percepción por el ojo humano. Para superar este inconveniente se han propuesto algunas transformaciones del espacio C.I.E., que permiten obtener mejores resultados en la evaluación de la diferencia de color (Lozano, 1979). De esta forma surgen las transformaciones CIELUV y CIELAB. La CIELUV es una transformación lineal del diagrama cromático del C.I.E. y la CIELAB es una transformación no lineal. En ambos casos las diferencias se evalúan según la clásica ecuación de distancia entre dos puntos, donde se agrega la diferencia de luminosidad. Dentro de estos nuevos espacios es posible definir nuevas funciones, que pueden ser indicativas de determinados atributos del color como el tono y la saturación (Hunt, 1977).

En la industria alimenticia, el sistema C.I.E. y sus trans-

formaciones no es muy utilizado. Mucho más difundido es el colorímetro de tipo Hunter o similares (Francis y Clydesdale, 1975). El colorímetro Hunter posee un sistema de tres filtros que reproducen en forma bastante aproximada un sistema de visión tris-tímulo. Luego, mediante un dispositivo electrónico se convierten las mediciones al espacio L, a, b (figura 16). En este sistema la cromaticidad se representa en coordenadas rectangulares, con los valores de a en abcisas, los de b en ordenadas y la luminosidad L en un eje vertical. Estos tres ejes representan las variaciones de las funciones rojo-verde (-a, +a), amarillo-azul (+b, -b) y blanco-negro (L). Los colores acromáticos están situados en la intersección de los ejes a y b, y el resto de los colores se especifican por sus valores a, b y L. Estos pueden transformarse matemáticamente en X, Y, Z mediante las ecuaciones:

$$L = 10 \sqrt{Y} \quad (25)$$

$$a = \frac{17,5(1,02 X - Y)}{\sqrt{Y}} \quad (26)$$

$$b = \frac{7,0(Y - 0,847 Z)}{\sqrt{Y}} \quad (27)$$

///



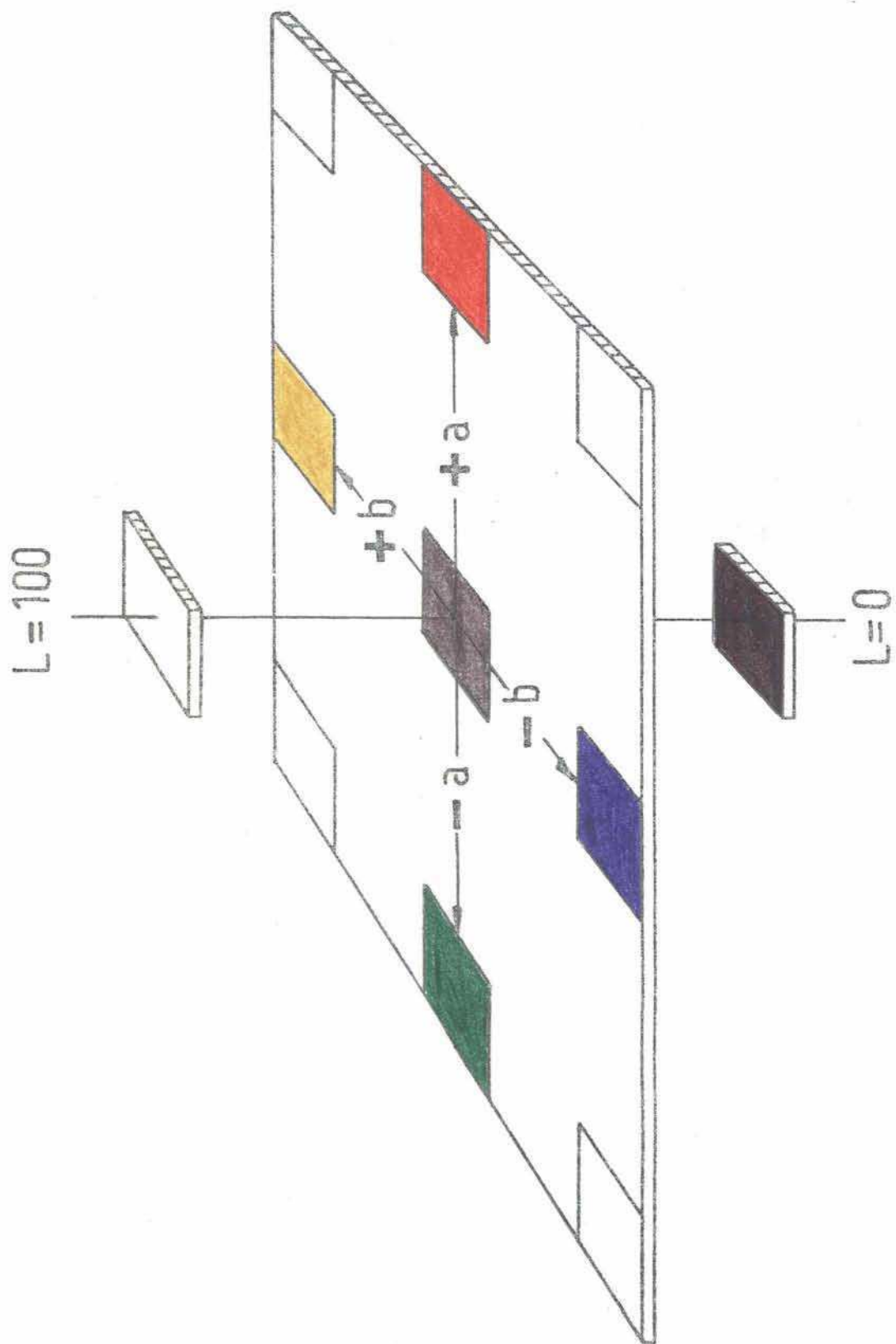


Figura 16: Espacio Hunter de color.

Estas transformaciones poseen un cierto error y por lo tanto en este trabajo se utilizaron los valores X, Y, Z obtenidos directamente de un espectrofotómetro, permitiéndonos obtener una descripción más exacta del color.

El sistema Hunter está muy difundido en el campo de los alimentos, en donde el interés principal no es la especificación del color sino la comparación de colores y el establecimiento de tolerancias para lo que este sistema resulta adecuado.

#### 2.4.5. Pérdida de valor nutritivo

En alimentos ricos en proteínas y azúcares reductores como el suero concentrado, en los que la reacción de Maillard está favorecida, la pérdida de lisina es un buen índice de la pérdida de valor nutricional ya que es el aminoácido más susceptible a este modo de deterioro. La reacción de Maillard ocurre como resultado de la interacción de un compuesto carbonilo, especialmente azúcares reductores y un grupo amino libre, especialmente el grupo  $\epsilon$ -amino de restos de lisina, provenientes de la fracción proteica del alimento. La consecuencia más negativa de esta reacción en alimentos es junto con el cambio de color, la pérdida del valor nutritivo de las proteínas. En términos generales esta

pérdida puede ser atribuida a la pérdida de digestibilidad o a la destrucción y/o inactivación biológica (blocking) de aminoácidos. En la mayoría de los casos, la pérdida de valor nutritivo puede atribuirse a la pérdida de valor biológico debido a pérdida de lisina (productos lácteos, cereales) o destrucción de aminoácidos sulfurados (carne y pescados). La pérdida de digestibilidad juega sólo un papel secundario en condiciones de calentamiento normales (no extremas) (Mauron, 1981).

De los aminoácidos esenciales, la lisina es la más sensible al daño producido por la reacción de Maillard. La lisina es frecuentemente el factor limitante de la calidad proteica de las dietas mixtas humanas y animales. Los cereales, que son frecuentemente la fuente más importante de energía, también representan una alta proporción del aporte proteico a la dieta, siendo esta proteína deficiente en lisina. Es por lo tanto de suma importancia que el procesamiento de alimentos de alto valor proteico sea controlado para minimizar el daño de lisina. Se han desarrollado numerosos análisis químicos para la determinación de lisina reactiva, que son aquellas unidades de lisina que poseen un grupo  $\epsilon$  amino libre. Inicialmente se pensaba que una molécula de lisina con su grupo  $\epsilon$  amino libre era biológicamente disponible para la síntesis de proteínas y que aquella en la que el grupo  $\epsilon$  amino

estaba unido a otro componente del alimento era biológicamente no disponible. Se comprobó que esta teoría no es válida en todos los casos. Después de las reacciones iniciales de Maillard, es cierto que la lisina bloqueada no es biológicamente disponible, pero, por lo menos una forma de la lisina bloqueada, glutamil lisina, formada durante el calentamiento severo en ausencia de carbohidratos, puede ser utilizada por las ratas como una fuente de lisina, si se libera de la cadena proteica (Waibel y Carpenter, 1972; Hurrell et al., 1976). Por otra parte, después de las reacciones avanzadas de Maillard u otro tratamiento severo, las unidades de lisina con grupo  $\epsilon$  amino libres pueden ser no disponibles, ya que no son absorbidas y pasan a las heces de animales de experimentación contenidos en péptidos indigeribles (Hurrell et al., 1976). Es por estas razones que se prefiere el término lisina "reactiva" y no "disponible" cuando se hace referencia a la estimación química de lisina.

El tema de lisina reactiva fue discutido por varios autores (Carpenter y Booth, 1973; Bodwell, 1976; Friedman, 1977) y aunque hay excepciones para la generalización de que lisina "disponible" = lisina "reactiva", la aproximación ha sido de considerable valor práctico en el entendimiento y control de procesos de daño en alimentos. El primer reactivo utilizado pa-

ra medir lisina reactiva fue 1 fluor 2,4 dinitrobenceno (FDNB) (Carpenter y Ellinger, 1955; Conkerton y Frampton, 1959; Carpenter, 1960). Este reactivo reacciona con los grupos ε amino libres de la lisina en la cadena proteica y luego de una hidrólisis ácida, el compuesto amarillo producido, es medido colorimétricamente. El método de Carpenter (1960) es ampliamente utilizado para alimentos a base de cereales y produce una indicación útil para el control de calidad, pero tiene ciertas limitaciones que se deben considerar. Un método que supera algunas de estas limitaciones es el método de determinación de lisina por diferencia (TLMI) (Rao et al., 1963). Este método incluye lisina N-terminal y lisina libre. Los hidratos de carbono no afectan el resultado, pero se necesitan equipos complejos; las columnas cromatográficas son difíciles de mantener y además requiere una atención continua durante su ejecución. Sumado a esto, como se debe medir lisina total, lisina inaccesible y un standard, el número de ensayos realizados en un determinado período es tres veces mayor que el realizado con el método de Carpenter. Por lo tanto, si bien el método TLMI es utilizado con fines de investigación, el método de Carpenter es más simple y económico para aplicarlo en forma rutinaria. En este método, el FDNB reacciona con los grupos ε amino terminales de la cadena proteica. Cada

grupo se bloquea con un grupo dinitrofenil (DNP), que resiste la subsecuente digestión bajo reflujo en 5,8M de HCl. El producto amarillo producido, mono- $\epsilon$ -dinitrofenillisina (DNP-L), es medido colorimétricamente. Parte de este DNP-L es perdido durante la digestión ácida. Esto ocurre también en otros métodos que utilizan FDNB (2,4 dinitrofluorbenceno). Esta pérdida es medida mediante el agregado de DNP-L a un duplicado, después del agregado del ácido, y seguida a través de todo el procedimiento. La recuperación de este DNP-L agregado es utilizada para proveer un factor de corrección (que se multiplica por el resultado) por la pérdida durante la digestión. Con materiales animales la recuperación ha sido del 90% o mayor (Carpenter, 1960). Cuando se intentó aplicar esto a alimentos vegetales que contenían carbohidratos, la recuperación del DNP-L agregado disminuyó considerablemente (60-85%) y se vio que el cálculo de los resultados dependía dramáticamente del factor de recuperación. Cuando el DNP-L y los carbohidratos son calentados a reflujo en 5,8M de HCl (como durante la digestión), los grupos  $-\text{NO}_2$  que están en algunas moléculas de DNP-L, son reducidos a  $-\text{NH}_2$ . Como el compuesto amino es menos amarillo que el compuesto dinitro, la mezcla no es adecuada para colorimetría.

Los carbohidratos, especialmente las pentosas, cuando son

calentadas con HCl, producen furfural, que es posiblemente el agente reductor responsable de la pérdida de DNP-L. La corrección mencionada se basa en la suposición que el DNP-L que viene de la hidrólisis de la proteína es destruido con la misma intensidad que el DNP-L agregado. Booth (1971) mostró que esta suposición es incorrecta ya que el DNP-L en la proteína es destruido con menor intensidad que el DNP-L agregado y propuso un procedimiento corregido que es el que actualmente se utiliza para alimentos con alto contenido de carbohidratos como la leche en polvo y suero deshidratado y por lo tanto fue el método elegido para analizar la pérdida de lisina en esta investigación.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Material utilizado

Para el desarrollo de esta investigación se utilizó suero dulce de quesería concentrado, que se denominará como suero. Este material fue provisto por Sancor Cooperativas Unidas Ltda., Buenos Aires, y proviene esencialmente de la elaboración de quesos de pasta blanda. El suero líquido, cuya composición tipo se muestra en la tabla 18, es evaporado en un evaporador de múltiple efecto hasta que la solución contiene aproximadamente 50% de sólidos totales. La actividad de agua de este suero concentrado es de 0,940-0,950 y el pH se encuentra en el rango 5,8-6,3; este concentrado se mantuvo refrigerado a 4°C hasta el momento de su utilización.

##### 3.1.1. Determinación de la actividad de agua

Para la determinación de la actividad de agua se prepararon soluciones de suero de queso con distintas concentraciones entre 5 y 50% de sólidos. Estas soluciones fueron preparadas a partir de diferentes partidas de suero concentrado comercial y



Tabla 18: Composición tipo de suero dulce de quesería líquido (a)

Componente	Contenido (%)
sólidos totales	6-7
lactosa	4,6-4,8
proteínas	0,8-0,9
grasa	0,03
cenizas	0,5
acidez (como ácido láctico)	0,15

(a) Análisis proporcionado por SANCOR COOP. UNIDAD LTda.  
(Buenos Aires)

suero en polvo, por dilución con agua destilada.

La determinación de actividad de agua se llevó a cabo mediante dos métodos:

- 1- Higrómetro de fibra
- 2- Descenso crioscópico

1- Se utilizó este método para la medición en soluciones de suero de queso con valores de  $a_w$  inferiores a 0,975. El instrumento empleado fue un higrómetro fabricado por la firma Lufft Stuttgart, West Germany. Este consta de un caja metálica de acero inoxidable, con una tapa que contiene el elemento sensor para medir la  $a_w$  y posee además un capilar termométrico de compensación de temperatura. La propiedad que utiliza el instrumento es el cambio de dimensión longitudinal de una fibra sintética que absorbe humedad, y el valor de  $a_w$  medido es leído directamente en un dial ubicado en la parte superior de la tapa. Con el fin de aumentar la confiabilidad de las mediciones, el instrumento fue operado siguiendo el procedimiento sugerido por Chirife y Ferro Fontán (a) (1980). El instrumento fue contrastado con tres soluciones salinas saturadas en el rango de interés, y se obtuvieron curvas de calibración

con un coeficiente de correlación no inferior a 0,9990 en todos los casos. Las muestras medidas fueron termostatzadas durante 24 horas y la curva de calibración fue controlada cada 48 horas.

Los valores de  $a_w$  utilizados para las soluciones salinas saturadas fueron los propuestos por Chirife et al. (1983): cloruro de bario 0,902, nitrato de potasio 0,926 y sulfato de potasio 0,974, evaluados en todos los casos a 25°C.

Todas las mediciones y la calibración se realizaron a 25°C $\pm$  0,2°C en una estufa de circulación forzada y las determinaciones se realizaron por duplicado, informándose su promedio.

- 2- Este método se utilizó para la medición de actividad de agua en soluciones con un valor superior a 0,975. Las mediciones se realizaron en un crióscopo para leche (Advanced Instrument Milk Cryoscope 4D II) que fue calibrado con soluciones standard de cloruro de sodio. Todas las mediciones se realizaron por duplicado informándose el promedio.

Recientemente varios investigadores (Miracco et al., 1981; Chirife et al., 1981) han demostrado que las mediciones del descenso crioscópico constituyen una forma conveniente de medir la  $a_w$  en soluciones con alta  $a_w$ .

La relación entre el punto de congelación de una solución acuosa y su actividad de agua está dada por la ecuación (Robinson y Stokes, 1965)

$$- \ln a_w = \frac{1}{R} (L_o - \bar{J} T_o) \left( \frac{1}{T_F} - \frac{1}{T_o} \right) + \frac{\bar{J}}{R} \ln \frac{T_o}{T_F} \quad (28)$$

donde:

$L_o$  = calor latente de fusión al punto de congelación del agua pura ( $T_o$ )

$\bar{J}$  = diferencia de capacidad calorífica molal entre el agua líquida y el hielo

$T_F$  = punto de congelación de la solución

Esta ecuación fue obtenida considerando que  $\bar{J}$  es independiente de la temperatura en el rango  $T_o - T_F$ . Esto no afecta la precisión del cálculo de la  $a_w$  (Ferro Fontán y Chirife, 1981 b).

Si se reemplaza el descenso crioscópico,  $\theta_F = T_o - T_F$ , en la ecuación 28, ésta se puede escribir de la forma

$$- \ln a_w = \frac{L_o \theta_F}{R T_o^2} + \left[ \frac{L_o}{R T_o} - \frac{\bar{J}}{2 R} \right] \frac{\theta_F^2}{T_o^2} \quad (29)$$

A 0°C, el calor latente de fusión del hielo es 1435,5 cal/mol y la diferencia de capacidad calorífica molal de agua líquida e hielo es 9,0990 cal/°C mol (Robinson y Stokes, 1965), por lo tanto la ecuación se puede aproximar numéricamente a:

$$-\ln a_w = 9,6934 \times 10^{-3} \theta_F + 4,761 \times 10^{-6} \theta_F^2 \quad (30)$$

El error en la determinación del punto de congelación fue estudiado recientemente por Alzamora y Chirife (1984). Ellos midieron por cuadruplicado 5 soluciones diferentes de 1,3-butilen-glicol en un equipo igual al utilizado en esta investigación. Los puntos de congelación medidos se encontraban en el rango -0,536 y -1,968°C. El valor de la desviación standard (SD) del valor medio a cada nivel fue de 0,0041 y 0,0015 respectivamente. Con estos valores se pudo estimar el error cometido en la determinación del punto de congelación de estas soluciones, cuyo valor no supera 0,006°C (P = 0,95). Estos resultados concuerdan con los informados por Miracco et al. (1981) para la determinación de punto de congelación de soluciones de NaCl dentro del mismo rango de punto de congelación. Zee y van Luin (1983) informaron que la repetibilidad en la determinación del punto de congelación de la leche ( $\theta_F = -0,50$ ), utilizando el mismo equipo fue de 0,0052°C

( $P = 0,95$ ). Por lo tanto, de la ecuación 30 se calculó que  $\Delta a_w \cong 6 \times 10^{-5}$ , lo que significa que el valor de  $a_w$  derivado del punto de congelación se puede expresar con 4 cifras decimales.

### 3.1.2. Determinación de humedad

La determinación del contenido de humedad del suero se realizó en forma gravimétrica por secado en una estufa de circulación forzada a  $100^\circ\text{C}$  durante 5 horas.

### 3.1.3. Determinación de pH

La medición del pH del suero concentrado se realizó con un electrodo de vidrio en un equipo Metrohm E 632.

## 3.2. Estudio microbiológico

### 3.2.1. Reactivos

Se utilizó NaCl de la firma Merck (Darmstadt, West Germany), calidad analítica; glicerol y ácido cítrico de la firma Mallinkrodt Chemical Works (St. Louis, U.S.A.) y sorbato de

potasio de grado alimentario.

### 3.2.2. Preparación de las muestras

La estabilidad microbiológica de suero concentrado comercial se estudió en una serie de sistemas preparados con una combinación de  $a_w$  (0,94-0,92-0,90), pH (5,0, 5,2, 5,4, 5,6) y sorbato de potasio (0%, 0,1%, 0,2%).

Los humectantes utilizados para obtener la  $a_w$  deseada en cada caso fueron NaCl o glicerina y la cantidad requerida fue calculada usando la ecuación de Ross (Ross, 1975)

$$(a_w)_{S.E.} = (a_w^{\circ})_S \cdot (a_w^{\circ})_H \quad (31)$$

donde  $(a_w^{\circ})_S$  es la actividad de agua del suero concentrado comercial y  $(a_w^{\circ})_H$  es la actividad de agua de la solución simple del humectante utilizado, en este caso NaCl o glicerina, medidos a la misma concentración que tienen en la mezcla. Los valores de  $(a_w^{\circ})_H$  fueron obtenidos de literatura (Benmergui et al., 1979; Chirife et al., 1980).

El pH fue ajustado por el agregado de una solución de ácido cítrico 50%.

Las muestras así preparadas fueron fraccionadas y almacenadas en frascos de vidrio estériles, herméticamente cerrados, o bolsas impermeables de Super Cryovac, selladas con calor. En el caso particular del estudio de microorganismos anaerobios, las muestras fueron almacenadas en tubos de 18 ml de capacidad herméticamente cerrados. Todas las muestras fueron incubadas en una estufa de temperatura constante a 30°C.

### 3.2.3. Microorganismos

Staphylococcus aureus INM 82 fue provisto por el Instituto Nacional de Microbiología "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires.

Los hongos y levaduras utilizados fueron aislados de suero concentrado comercial contaminado ( $a_w = 0,940$ , pH = 6,0). Estos incluyen Geotrichum sp., Aspergillus flavus y una levadura denominada W-84.

### 3.2.4. Medios y enumeración de microorganismos

Las diluciones de las muestras analizadas se realizaron con triptona sal. El recuento de mesófilas aerobias se realizó en Standard Plate Count Agar (triptona 5 g, extracto de levadu-



ra 2,5 g, glucosa 1,0 g, agar 15 g, NaCl 0,5 g, agua destilada 1,000 lt). Micrococaceas en Chapman (D-manitol 10 g, agar 15 g, NaCl 70 g, caldo nutritivo 1000 ml, rojo de fenol 0,025 g); Staphylococcus aureus en Baird-Parker (E. Merck, Darmstadt, Germany); Enterobacterias en V.R.B.G. (Violet Red Bile Glucose Agar, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England).

El recuento de coliformes y de Estreptococos fecales se realizó utilizando la técnica de número más probable (MPN). Los medios utilizados fueron Caldo Mac Conkey (peptona 20 g, lactosa 10 g, NaCl 5 g, taurocolato de sodio 5 g, agua destilada 1000 ml, rojo neutro 1% 10 ml) para coliformes y Rothe Broth (bacto triptosa 20 g, glucosa 5 g, NaCl 5 g,  $K_2HPO_4$  2,7 g,  $KH_2PO_4$  2,7 g, azida sódica 0,20 g, agua destilada 1000 ml) y Litsky Broth (Difco Lab., Detroit 1, Michigan, U.S.A.) para Estreptococos fecales.

Para el recuento de esporulados facultativos y anaerobios, las muestras y sus diluciones fueron calentadas a 70-75°C por 10 minutos y luego colocados en agua fría. Un mililitro de cada dilución se sembró en tubos conteniendo Brewer Anaerobic Agar (Difco Lab., Detroit, Michigan, U.S.A.) a una temperatura de 55°C, se homogeneizó y se colocó nuevamente en agua fría. Placas y tubos fueron incubados a 37°C por 48 horas.

El recuento de hongos y levaduras se realizó en placas

conteniendo Agar Sabouraud (glúcica 40 g, peptona 10 g, agar 20 g, agua destilada 1000 ml) u O.G.A. (glucosa 20 g, extracto de levadura 5 g, agar 20 g, agua destilada 1000 ml). Las placas fueron incubadas a 25°C por 3 a 5 días.

### 3.2.5. Preparación de inóculos e inoculación

Para obtener el inóculo de S. aureus, se preparó una suspensión de la cepa en caldo nutritivo y se incubó 24 horas a 37°C. 500 ml de suero de cada una de las condiciones seleccionadas, fueron colocados en un recipiente de vidrio esterilizable provisto de un agitador (Sorvall Omni-Mixer) e inoculados con 1 ml de suspensión de la dilución adecuada para obtener una concentración inicial en el rango  $10^4$ - $10^6$  U.F.C./ml. Las muestras inoculadas fueron homogeneizadas y fraccionadas en frascos estériles, herméticamente cerrados, y almacenados en una estufa de temperatura constante a 30°C.

El inóculo de levaduras se obtuvo preparando una suspensión de células que fueron luego incubadas a 25°C durante 24 horas. Como en el caso anterior, se inoculó 1 ml de suspensión de la dilución adecuada en 500 ml de suero para obtener un recuento inicial del orden de  $10^4$  U.F.C./ml. Las muestras inoculadas fue-

ron homogeneizadas y fraccionadas en frascos de vidrio estériles, herméticamente cerrados, y almacenados en una estufa de temperatura constante a 25°C.

Para obtener la suspensión de esporas de hongos a ser inoculados, se preparó un agar inclinado con medio Sabouraud para cada cepa. Se almacenó 7-10 días a 25°C y luego se lavó con 5 ml de agua destilada estéril y cuatro gotas de Tween 80 (Horner y Anagnostopoulos, 1973). Con esta suspensión inicial se prepararon diluciones para obtener inóculos en el rango  $10^3$ - $10^5$  esporas/ml. Las placas inoculadas contenían suero dulce concentrado comercial sin modificar, suero concentrado comercial modificado y medio Sabouraud para control. Cada placa fue inoculada en el centro con 10  $\mu$ l de suspensión para obtener un inóculo inicial de 3 mm de diámetro. Las placas inoculadas fueron almacenadas en una estufa de temperatura constante a 25°C. La contaminación de las placas fue definida como la formación de una colonia superficial suficientemente grande como para ser visible a simple vista. Se tomó arbitrariamente el valor de 2 mm para el diámetro de dicha colonia y el tiempo necesario para su formación se definió como "tiempo de rechazo". Las placas fueron inoculadas por triplicado y los resultados se calcularon como un promedio entre ellos.

### 3.3. MEDICION DE COLOR

#### 3.3.1. Preparación de muestras

La preparación de muestras se realizó simultáneamente para todos los estudios y en la forma indicada en el punto 3.2.2.

#### 3.3.2. Equipo

El equipo utilizado para la medición de color fue un espectrofotómetro ZEISS DMC 25 de doble haz. Este posee una esfera integradora con diferentes salidas laterales que permiten la ubicación de la muestra, el patrón de referencia y el fototubo detector. La fuente luminosa para mediciones en el espectro visible es una lámpara de tungsteno y el monocromador está compuesto por un sistema doble de prismas. El equipo puede adaptarse para la medición de distintos tipos de muestra y permite realizar mediciones por transmisión o reflexión, con o sin componente especular. La iluminación puede ser monocromática o policromática, con ajuste automático de ancho de banda (2,5; 5 y 10 nm).

En el presente estudio se midió el factor de reflectancia espectral de las distintas muestras de suero concentrado modifi-

cado, en el rango visible, utilizándose iluminación monocromática. A partir del espectro obtenido un sistema de integración triestímulo (Davidson and Hemmendinger Electronic, Tatomy, U.S.A.) acoplado al instrumento, calculó los valores triestímulo X, Y, Z por el método de las ordenadas seleccionadas (Lozano, 1978).

### 3.3.3. Técnica de la medición colorimétrica

Las muestras fueron colocadas en una cubeta de acrílico como la mostrada en la figura 17. Sobre la superficie de la muestra se colocó un vidrio con el fin de eliminar burbujas u otras imperfecciones de la superficie que pueden modificar el resultado de la medición. Se utilizó como patrón standard una placa calibrada de  $\text{BaSO}_4$ . La calibración se realizó en todo el rango del espectro visible (380-730 nm) mediante el ajuste de 30 potenciómetros. El monocromador se ajustó en un ancho de banda de 10nm y el espectro fue registrado en papel en la escala 10 nm/cm a una velocidad de banda de 3,5 nm/seg. Posteriormente los valores X, Y, Z, iluminante C (C.I.E.), fueron leídos en la pantalla digital del integrador triestímulo.

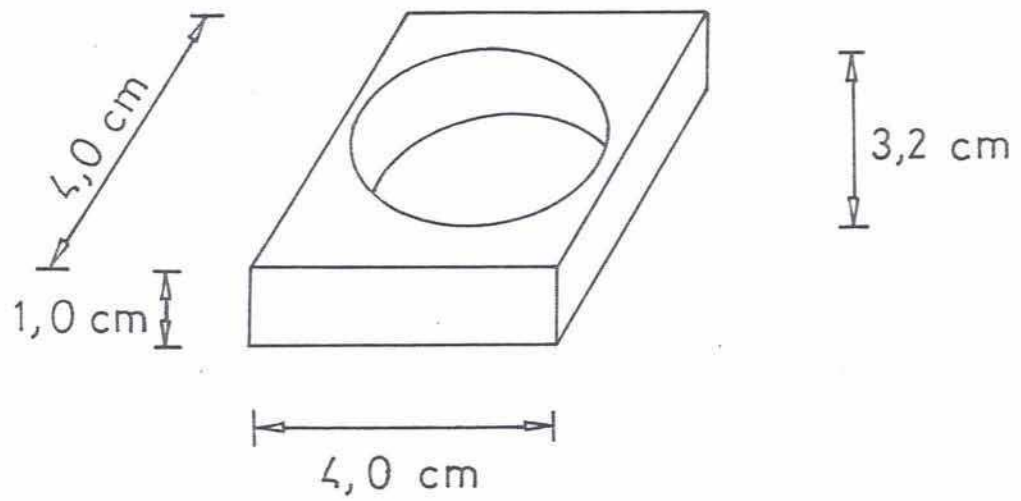


Figura 17: Cubeta empleada en la medición de la reflectancia de muestras de suero de queso

#### 3.3.4. Error en la medición

La repetibilidad del instrumento para mediciones sucesivas de una misma muestra es muy buena, teniendo ésta una precisión de 0,1%. En el caso de repetibilidad de mediciones luego de calibraciones sucesivas, se han observado errores de hasta el 1% de los valores triestímulo, por lo cual la exactitud de los valores triestímulo obtenidos para cada muestra está determinado por este factor.

#### 3.4. Pérdida de lisina disponible

El método más utilizado (como ya se explicó anteriormente) es el propuesto por Carpenter (1960), pero presenta algunos inconvenientes para ser utilizado en ciertos alimentos como leche en polvo y suero debido al alto contenido de carbohidratos que estos poseen.

Los carbohidratos interfieren en el dosaje de lisina disponible según el método de Carpenter (1960) dando como resultado un valor inferior al real. En 1971, Booth introdujo ciertas modificaciones en el método de Carpenter para adecuarlo a alimentos con alto contenido de carbohidratos.

Debido al alto contenido de lactosa del suero concentrado se adoptó el método de Booth para la determinación de lisina disponible.

#### 3.4.1. Preparación de muestras

Las muestras utilizadas para este estudio fueron preparadas simultáneamente con las utilizadas para el estudio microbiológico y de cambio de color y el procedimiento fue el detallado en el punto 3.2.2.

#### 3.4.2. Equipos

La absorbancia a 435 nm fue medida en un espectrofotómetro Spectronic 21.

#### 3.4.3. Reactivos

- Cloruro monohidrato de  $\epsilon$ -dinitrofenillisina (DNP-L), tiene un peso molecular de 366,77, y contiene el equivalente a 39-85% de lisina. 314 mg de este reactivo fueron disueltos en 250 cm<sup>3</sup> de HCl 8,1M. Esto se realizó 24 horas antes de ser utilizado.



Posteriormente se diluyeron  $10 \text{ cm}^3$  con agua a  $100 \text{ cm}^3$ , y la solución diluída se utilizó como standard. Una alícuota de  $2 \text{ cm}^3$  contine el equivalente de  $0,1 \text{ mg}$  de lisina y cuando se diluye a  $10 \text{ cm}^3$  tiene una absorbancia neta de aproximadamente  $0,4$  a  $435 \text{ nm}$  en una cubeta de  $1 \text{ cm}$ .

- 1-fluor-2,4-dinitrobenceno (FDNB), (E. Merck, Darmstadt). Se utilizaron aproximadamente  $0,4 \text{ cm}^3$  de este reactivo en  $15 \text{ cm}^3$  de etanol por muestra.
- Metil cloroformato (MCC) (Merck, Darmstadt).
- Solución de  $\text{NaHCO}_3$ , correspondiente a  $80 \text{ g}$  en  $1$  litro de agua destilada.
- Dietil eter (Merck, Darmstadt); este reactivo debe ser libre de peróxidos.
- Solución de fenoftaleína,  $400 \text{ mg/l}$  en  $60\%$  de etanol.
- Solución de  $\text{NaOH}$ ,  $120 \text{ g/l}$

- Buffer de pH 8,5. Para su preparación se disuelven 19,5 g de  $\text{NaHCO}_3$  y 1 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en  $250 \text{ cm}^3$  de agua y se ajusta el pH si es necesario.

#### 3.4.4. Técnica de medición de lisina disponible

Las muestras utilizadas fueron de aproximadamente 3 g. Estas fueron pesadas en balones de  $150 \text{ cm}^3$ , conteniendo bolitas de vidrio. Se agregó  $10 \text{ cm}^3$  de solución de  $\text{NaHCO}_3$  y se agitó el balón, dejándolo luego reposar hasta que la muestra se humedeció. Luego se adicionaron  $15 \text{ cm}^3$  de solución de FDNB a cada balón, se tapó y se agitó por 2 horas en un shaker. Después de la agitación se evaporó el etanol colocando los balones en un baño de agua hirviente hasta la eliminación completa de la efervescencia, perdiéndose en este proceso aproximadamente 12,5 g. Cuando la mezcla se enfrió, se adicionaron  $30 \text{ cm}^3$  de HCl 8,1 M que neutralizan el  $\text{NaHCO}_3$  y hacen un total de  $40 \text{ cm}^3$  6M. La mezcla fue reflujaada 16 horas. A continuación se lavó el condensado con agua y se desconectaron los balones. El contenido de éstos se filtró en caliente con papel Whatman N° 541 a balones volumétricos de  $250 \text{ cm}^3$ . Los balones de digestión y los residuos fueron lavados hasta que el filtrado totalizó un volumen cercano a  $250 \text{ cm}^3$ . Se dejó en-

friar y se llevó a volumen. Los balones se dejaron reposar hasta que decantó el precipitado de dinitrofenol formado. De cada filtrado se pipetearon  $2 \text{ cm}^3$  para cada uno de los tubos de ensayo (A y B). El contenido del tubo B se extrajo con aproximadamente  $5 \text{ cm}^3$  de dietil eter (libre de peróxidos). Se colocó el tubo en agua a  $80^\circ\text{C}$  hasta que la efervescencia del eter residual desapareció. Se dejó enfriar y se agregó una gota de fenoftaleína y la solución de NaOH hasta la aparición del primer color rosado. Luego se adicionó  $2 \text{ cm}^3$  de buffer carbonato ( $\text{pH} = 8,5$ ) y a continuación 5 gotas ( $0,01 \text{ cm}^3$  aproximadamente) de MCC; se taparon los tubos y se agitaron vigorosamente, liberando la presión con precaución. Después de aproximadamente 8 minutos, se agregó  $0,75 \text{ cm}^3$  de HCl, gota a gota y agitando cuidadosamente. Por último, la solución se extrajo 4 veces con dietil eter, se enfrió y se llevó a  $10 \text{ cm}^3$  con agua. El tubo A se extrajo 3 veces con dietil eter libre de peróxidos y se llevó a  $10 \text{ cm}^3$  de volumen con HCl 1M. La absorbancia de ambos tubos fue medida a  $435 \text{ nm}$  contra agua. La lectura A menos la lectura B (el blanco) es la absorbancia neta atribuible a la DNP-L.

El valor de lisina fue calculado de la forma que a continuación se detalla:

$$c = \frac{\text{lisina}}{16 \text{ g N}} = \frac{w_s \cdot A_u \cdot v \cdot 100 \cdot 100}{w_u \cdot A_s \cdot a \cdot [c_p]}$$

donde:

$w_s$  = peso del standard, expresado como mg de lisina en  
2 cm<sup>3</sup>, es decir 0,1 mg

$w_u$  = peso de la muestra en mg

$A_s$  = absorbancia neta de DNP-L standard

$A_u$  = absorbancia neta de la muestra (A-B)

$v$  = volumen del filtrado (250 cm<sup>3</sup>)

$a$  = alícuota del filtrado (2 cm<sup>3</sup>)

$[c_p]$  = proteína cruda, 6,25 g N/100 g material

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSION

##### 4.1. Actividad de agua de las soluciones de suero

El descenso crioscópico de las soluciones de suero es una función de la concentración y la naturaleza química de los sólidos disueltos, y está termodinámicamente relacionado con la actividad de las mismas. En la figura 18 se muestra una comparación de la actividad de agua de soluciones de suero concentrado con valores calculados a partir de la medición del descenso crioscópico de soluciones de suero en polvo reconstituído (Bakshi y Johnson, 1983) y soluciones de leche en polvo descremada reconstituída (Radewonuk et al., 1983). Las muestras de suero utilizado contenían un 73-75% de lactosa en base seca, mientras que en la leche el contenido era de 51,8%. Se puede observar que si se grafica la actividad de agua en función de la relación lactosa/agua para diferentes soluciones de suero y leche, todos los puntos caen aproximadamente en la misma correlación. Si bien la lactosa juega un papel importante en el descenso de  $a_w$ , en las soluciones de suero o leche existen otros componentes que en menor proporción también contribuyen. En el caso particular del suero en polvo, los minerales como calcio, magnesio, fósforo, sodio y potasio

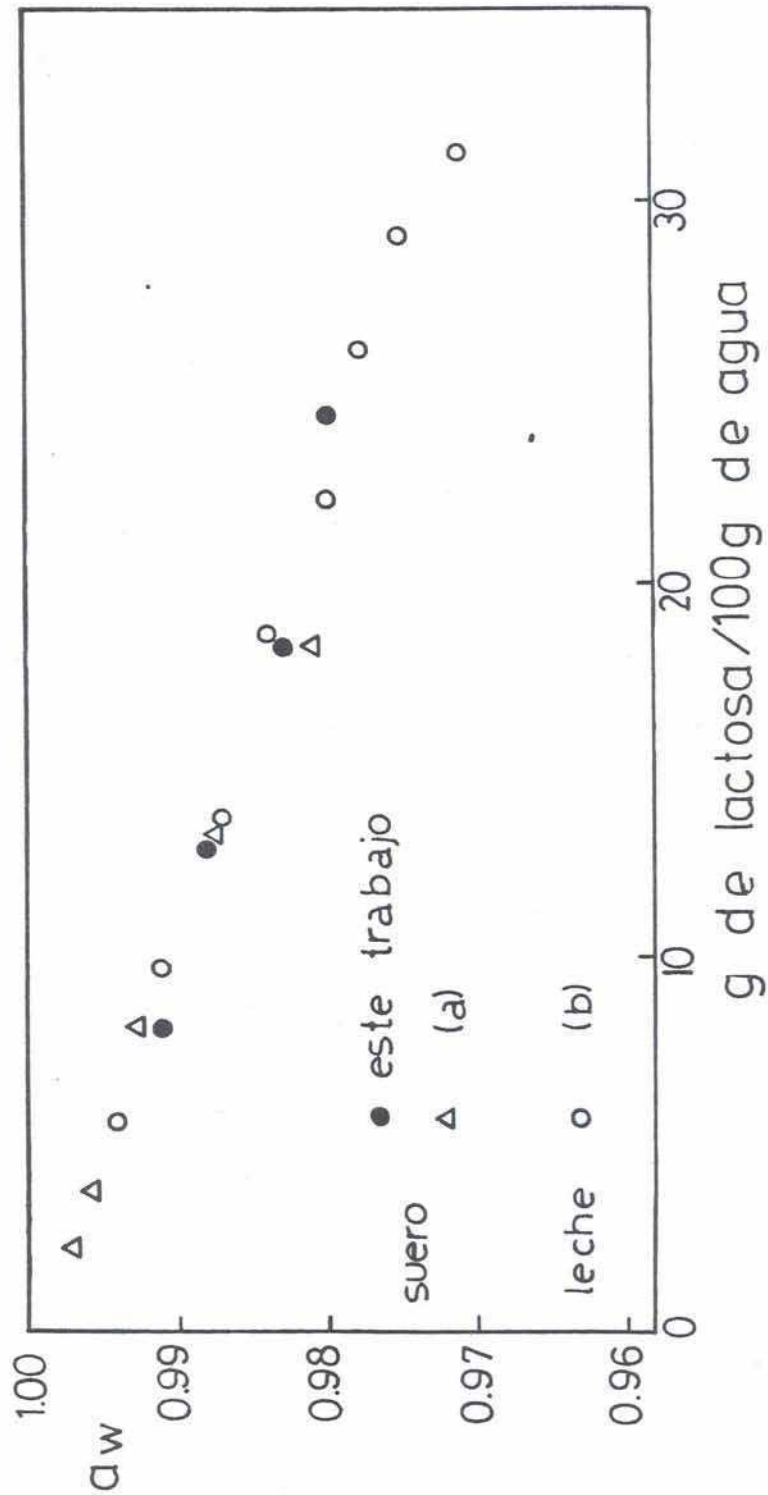


Figura 18: Comparación de valores de actividad de agua (derivados de mediciones de descenso crioscópico) correspondientes a soluciones de suero dulce y leche descremada.

(a) Bakshi y Johnson (1983)

(b) Radewonuk et al. (1983)

presentes en las cenizas (Bakshi y Johnson, 1983), y que tienen un peso molecular relativamente bajo respecto de la lactosa, son los que aportan para el descenso de la  $a_w$ . Esto se puede comprobar si se compara los valores de  $a_w$  de soluciones de suero de hasta 50% (p/p) de sólidos, medidos experimentalmente, con los valores predichos para soluciones de lactosa conteniendo la misma relación lactosa/agua que en la correspondiente solución de suero (figura 19). Los valores de  $a_w$  de las soluciones de lactosa fueron obtenidos mediante la siguiente ecuación (Miracco et al. , 1981),

$$a_w = X_1 \exp(- K X_2^2) \quad (32)$$

donde  $X_1$  y  $X_2$  son las fracciones molares de agua y lactosa respectivamente y  $K$  es la constante de correlación que depende de la naturaleza química del soluto y para el caso de la lactosa es igual a 10,2. Esta ecuación se aplica, en general, a soluciones de relativamente alta molalidad, debido a que el error en la evaluación de  $K$  aumenta con la disminución de la fracción molar del soluto. También puede ser aplicada a soluciones con bajas molalidades de solutos, pero en este caso es necesaria una mayor exactitud en la determinación de la actividad de agua. Se puede observar

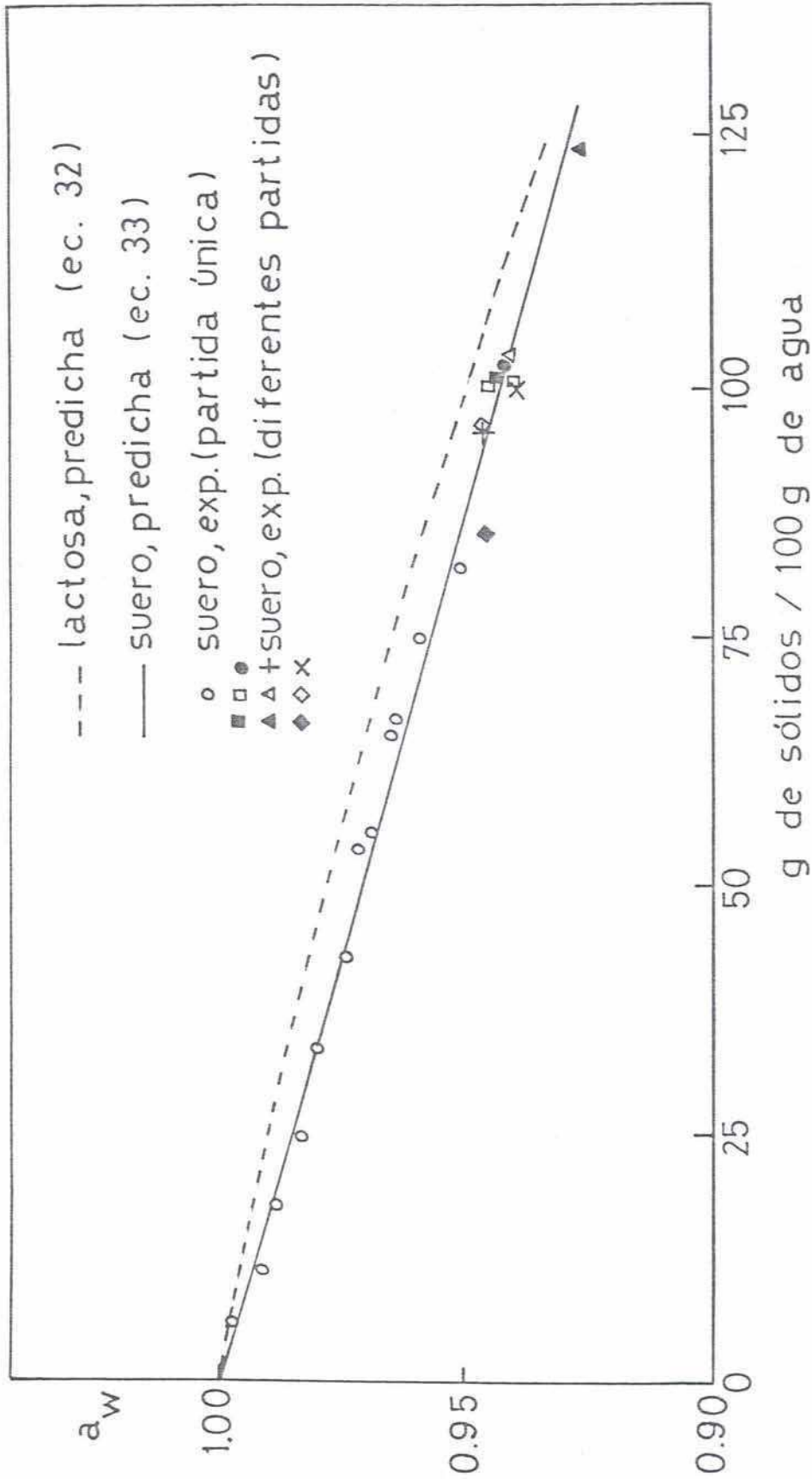


Figura 19: Actividad de agua de soluciones de suero de queso dulce. Los valores de  $a_w > 0,974$  fueron derivados de mediciones de descenso crioscópico y los valores  $< 0,974$  fueron medidos con higrómetro.



que la curva correspondiente a las soluciones de suero está siempre por debajo que la correspondiente a la lactosa, lo cual demuestra la presencia de otros solutos que contribuyen al descenso de la  $a_w$ . La figura 19 también muestra que existe una buena correlación lineal entre la  $a_w$  y el contenido de sólidos del suero (expresado como g de sólidos/100 g agua). La línea corresponde a la ecuación

$$(a_w)_{\text{suero}} = 0,999 - 0,000558 M \quad (33)$$

donde M es el contenido de sólidos en g sólidos/100 g agua y el coeficiente de correlación es 0,9940. Esta correlación lineal tiene su fundamento teórico en la termodinámica de soluciones; en efecto, en base a la definición del coeficiente osmótico,  $\phi$ , se puede escribir

$$a_w = \exp(-\phi m_1 m \nu) \quad (34)$$

donde:

$\phi$  = coeficiente osmótico

$\nu$  = número de moles de todas las especies que dan un mol de soluto en solución ( $\nu = 1$  para no-electrolitos)

m = molalidad

$m_1$  = número de Kg por mol de agua (0,018)

Lupin et al. (1981) mostraron que si esta ecuación se expande en series,

$$a_w = 1 - (\phi m_1 v)m + \frac{(\phi m_1 v)^2 m^2}{2!} - \frac{(\phi m_1 v)^3 m^3}{3!} + \dots \quad (35)$$

y dentro de ciertos rangos, donde  $(\phi m_1 v) \ll 1$ , la ecuación 35 puede escribirse

$$a_w \approx 1 - K m \quad (36)$$

la cual es idéntica a la ecuación 33.

Por todo lo anteriormente expuesto, quede demostrado que la lactosa es una de las principales responsables del descenso de la  $a_w$  en soluciones de suero concentrado. La concentración de lactosa en la fase acuosa en una solución de suero que contiene 125 g sólidos/100 g agua, es de alrededor de 91 g lactosa/100 g agua. Sin embargo, se sabe que la solubilidad de la lactosa a 25°C es sólo 20,5-21,7 g lactosa/100 g agua (Nickerson y Moore,

///

1972; Jelen y Coulter, 1973), por lo tanto la lactosa debería estar cristalizada en las soluciones de suero estudiadas. Sin embargo no se ha observado cristalización de lactosa en ningún caso ni tampoco se han detectado cambios en la  $a_w$  (debido a la cristalización) en soluciones de suero concentrado ( $a_w = 0,94 - 0,90$ ) almacenadas hasta 3 meses a  $30^\circ\text{C}$  y  $37^\circ\text{C}$ . La estabilidad de la lactosa en estas soluciones se puede atribuir, en parte, a la presencia de proteínas en el suero que producen una viscosidad tal que interfiere en la cristalización de la lactosa (Nickerson, 1977).

Goldsack y Franchetto (1977) han desarrollado la siguiente ecuación general para la viscosidad relativa ( $\eta_r$ ) de soluciones de electrolitos simples:

$$\eta_r = \exp(X E) (1 + X V) \quad (37)$$

donde:

X = fracción molar apropiada

E = energía libre promedio

V = parámetro relacionado con el volumen

Para soluciones de electrolitos 1: 1, los parámetros E y

///

v se definen como

$$E = (\Delta G_c^* + \Delta G_a^* - 2\Delta G_1^*)/RT \quad (38)$$

$$v = \left( \frac{V_c + V_a}{V_1} \right) - 2 \quad (39)$$

donde:

$V_c$  = volumen molar del catión

$V_a$  = volumen molar del anión

$V_1$  = volumen molar del solvente

$\Delta G_c^*$  = energía libre molar de activación para flujo viscoso del catión

$\Delta G_a^*$  = energía libre molar de activación para flujo viscoso del anión

$X$  =  $m/(55,51 + 2m)$

$m$  = molalidad de la sal

Estos autores verificaron la ecuación propuesta con datos de viscosidades existentes en la bibliografía para electrolitos 1:1 inorgánicos y comprobaron con esto que la ecuación a 2 parámetros puede reproducir las viscosidades observadas dentro del error experimental hasta concentraciones muy altas (aproximada-

mente 3 a 5 molal). Chirife et al. (1984) aplicaron esta ecuación a soluciones de electrolitos 1:1 y a soluciones de no electrolitos (polioles, L-prolina). Para el caso de no electrolitos la fracción X fue calculada como  $X = m(55,51 + m)$ . Los valores de E y V (en todos los casos), fueron calculados por un programa de computación para un rango de temperaturas entre 25 y 40°C. En el caso de no electrolitos, se observó que el parámetro V era tan pequeño que la ecuación 37 se reduce a

$$\eta_r = \exp (X E) \quad (40)$$

Siguiendo con el procedimiento empleado por Goldsack y Franchetto (1977), se puede demostrar para el caso de no electrolitos, que el parámetro E se puede definir como:

$$E = (\Delta G_s^* - \Delta G_l^*)/RT \quad (41)$$

donde:

$\Delta G_s^*$  = energía libre de activación para un flujo viscoso  
por mol de soluto

La figura 20 muestra que existe una buena correlación li-

///

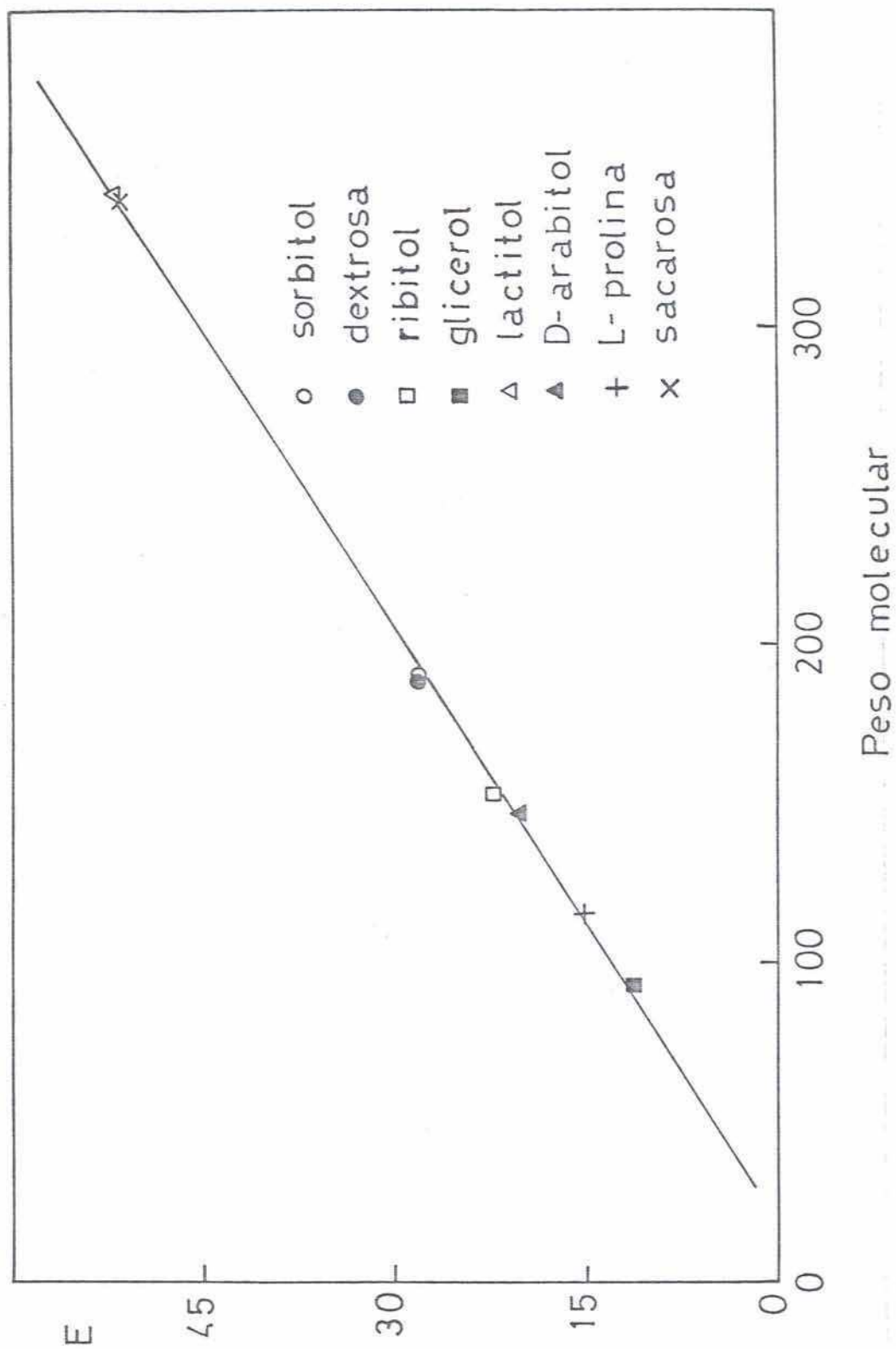


Figura 20: Efecto del peso molecular sobre el parámetro E para distintos no electrolitos

(a)

(a) Chirife et al. (1984)

neal entre los valores experimentales del parámetro E (a 25°C) y el peso molecular de los no electrolitos estudiados (Chirife et al., 1984). Por lo tanto el peso molecular de los no electrolitos es el factor principal en la determinación del parámetro E, y de acuerdo a la ecuación 41 está directamente relacionado con  $\Delta G_S^*$ .

En la figura 21 se compara la viscosidad relativa de soluciones de suero y de lactosa; los datos experimentales son los informados por Buma (1980). El comportamiento de la lactosa se puede describir perfectamente con la ecuación propuesta por Chirife et al. (1984) (ecuación 40) y con un valor de  $E = 53$ . Por el contrario, las soluciones de suero aumentan drásticamente con el aumento de concentración y no siguen dicha ecuación. Esto se puede atribuir en parte al comportamiento reológico de sus constituyentes poliméricos como las proteínas.

Se puede concluir que la viscosidad de las soluciones de suero es mucho mayor que aquella de lactosa con igual concentración de sólidos. Por ejemplo la viscosidad de una solución de suero que tiene una  $a_w \approx 0,94$  (100 g sólidos/100 g agua aproximadamente), se espera que sea varias veces superior que la de una solución de lactosa equivalente. Todo esto puede explicar, al menos parcialmente, la ausencia de cristalización de lactoas en las soluciones de suero concentrado.

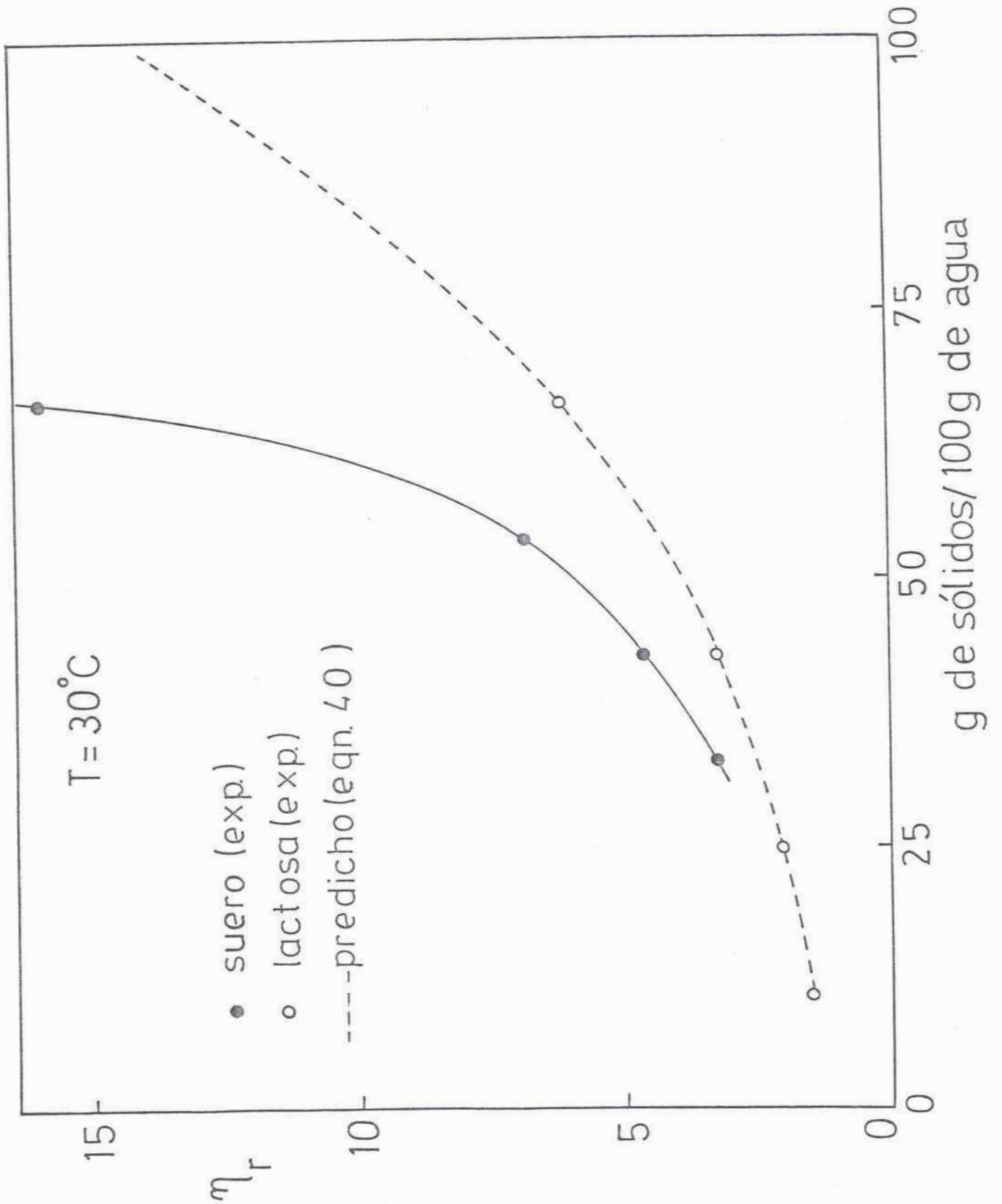


Figura 21: Viscosidades de soluciones de suero dulce y lactosa a  $30^\circ\text{C}$ ; los datos experimentales fueron obtenidos de Buma (1980)



#### 4.2. Estabilidad microbiológica del suero concentrado

El suero concentrado es un producto intermedio y por lo tanto no es posible encontrar en bibliografía datos microbiológicos. Por esta razón, inicialmente se analizó la carga microbiana de 15 partidas distintas de suero, con una  $a_w \approx 0,94$  y pH en el rango 5,8-6,3. La tabla 19 muestra un promedio de los resultados obtenidos con estas partidas. Esta baja contaminación inicial es atribuible al tratamiento térmico que el suero recibe durante su concentración. Con el fin de observar que desarrollo tenían los microorganismos presentes inicialmente, se estudió la evolución de los mismos en suero concentrado comercial y en suero modificado con distintas combinaciones de  $a_w$ , pH y sorbato de potasio, haciendo incapié en el desarrollo de mesófilas aerobias y con menor énfasis en los esporulados anaerobios. La figura 22 muestra los cambios producidos en el recuento de mesófilas aerobias en distintas partidas de suero dulce concentrado comercial sin modificar ( $a_w = 0,942 - \text{pH} = 5,80$  y  $a_w = 0,940 - \text{pH} = 6,15$ ) y en un suero dulce concentrado modificado por una combinación de  $a_w$ , pH y agregado de sorbato de potasio. En el primer caso el número de microorganismos aumentó rápidamente durante el almacenamiento, observándose paralelamente cambios organolépticos que

Tabla 19: Carga microbiana inicial de suero concentrado comercial

Microorganismo	UFC/ml
Mesófilas aeróbias	$10^4$
<u>Micrococaceae</u>	10
<u>Staphylococcus aureus</u>	10
<u>Enterobacteriaceae</u>	10
Coliformes	25
Estreptococos fecales	25
Esporulados aerobios	25
Esporulados anaerobios	$10^2$
Hongos	---
Levaduras	---

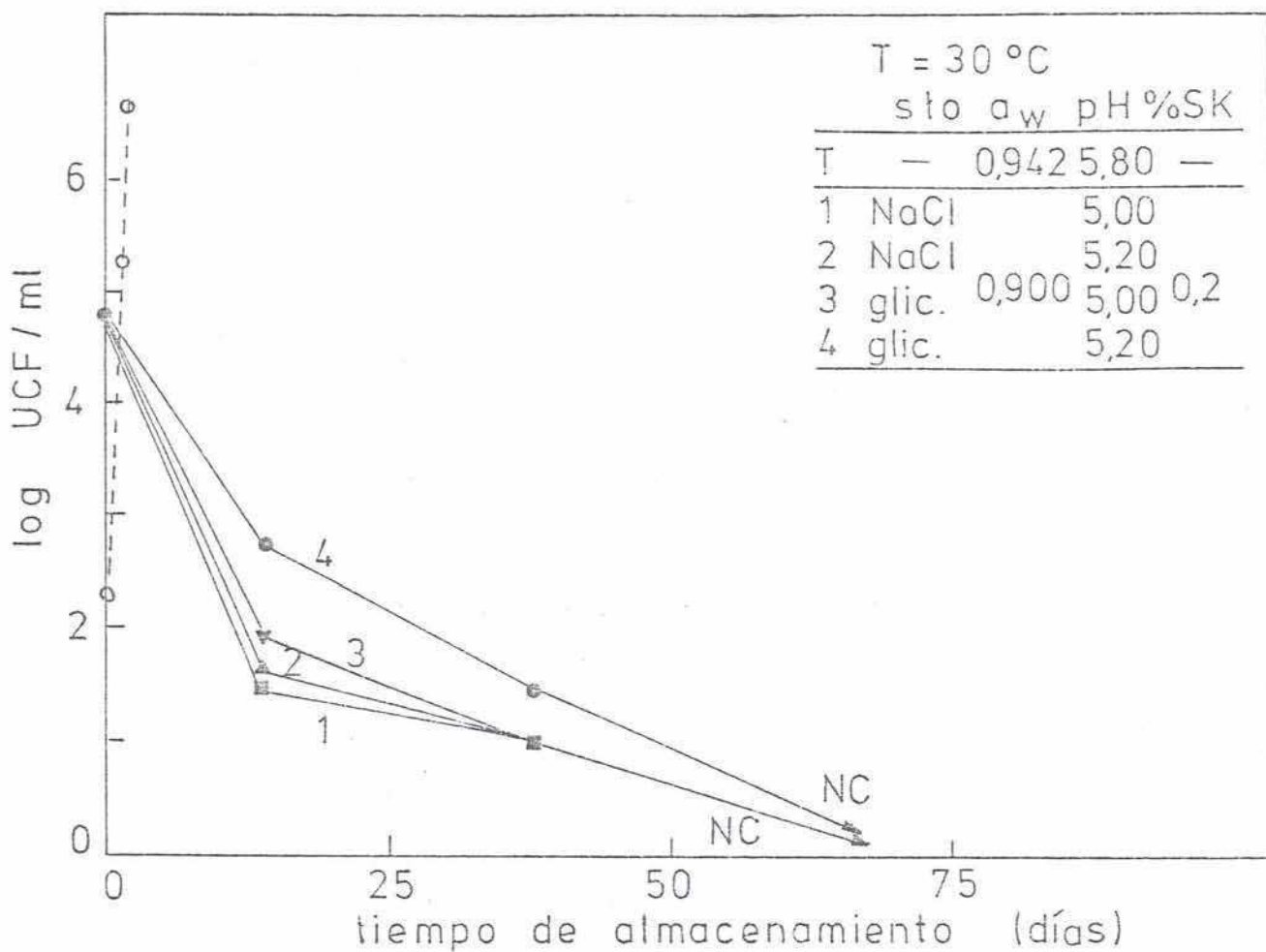


Figura 22: Cambios en el recuento de mesófilas aerobias en suero concentrado comercial y en suero concentrado modificado, almacenado a 30°C.

SK = sorbato de potasio

NC = recuento nulo a los 69 días

hacían evidente el deterioro microbiano. Sin embargo, las muestras de suero modificado disminuyeron su recuento de mesófilas aerobias en forma drástica, llegando a los 69 días de almacenamiento a la pérdida total de viabilidad de estos microorganismos. La población de microorganismos esporulados anaerobios también disminuyó para el caso de suero modificado, llegando a un nivel inferior a 10 UFC/ml a los 38 días de almacenamiento y manteniendo este valor por 3 meses. Los recuentos de Micrococaceae, Staphylococcus aureus, Enterobacteriaceae, coliformes, estreptococos fecales, esporulados aerobios, hongos y levaduras fueron nulos a los 14 días de almacenamiento en todas las condiciones estudiadas de suero modificado. En vista de estos resultados, se estudió la evolución de las mesófilas aerobias en suero concentrado almacenado a 30°C, con modificaciones de  $a_w$ , pH y agregado de sorbato de potasio, menos drásticas que en el caso anterior. Se utilizó NaCl para obtener los valores deseados de  $a_w$ . Los resultados se muestran en las figuras 23 y 24.

Se puede observar que tanto la combinación de  $a_w = 0,92$ , pH = 5,4, 0,2% sorbato de potasio, como  $a_w = 0,94$ , pH = 5,2 y 0,2% sorbato de potasio, son igualmente efectivas en cuanto a la inhibición del crecimiento de las bacterias mesófilas aerobias en suero concentrado almacenado a 30°C.

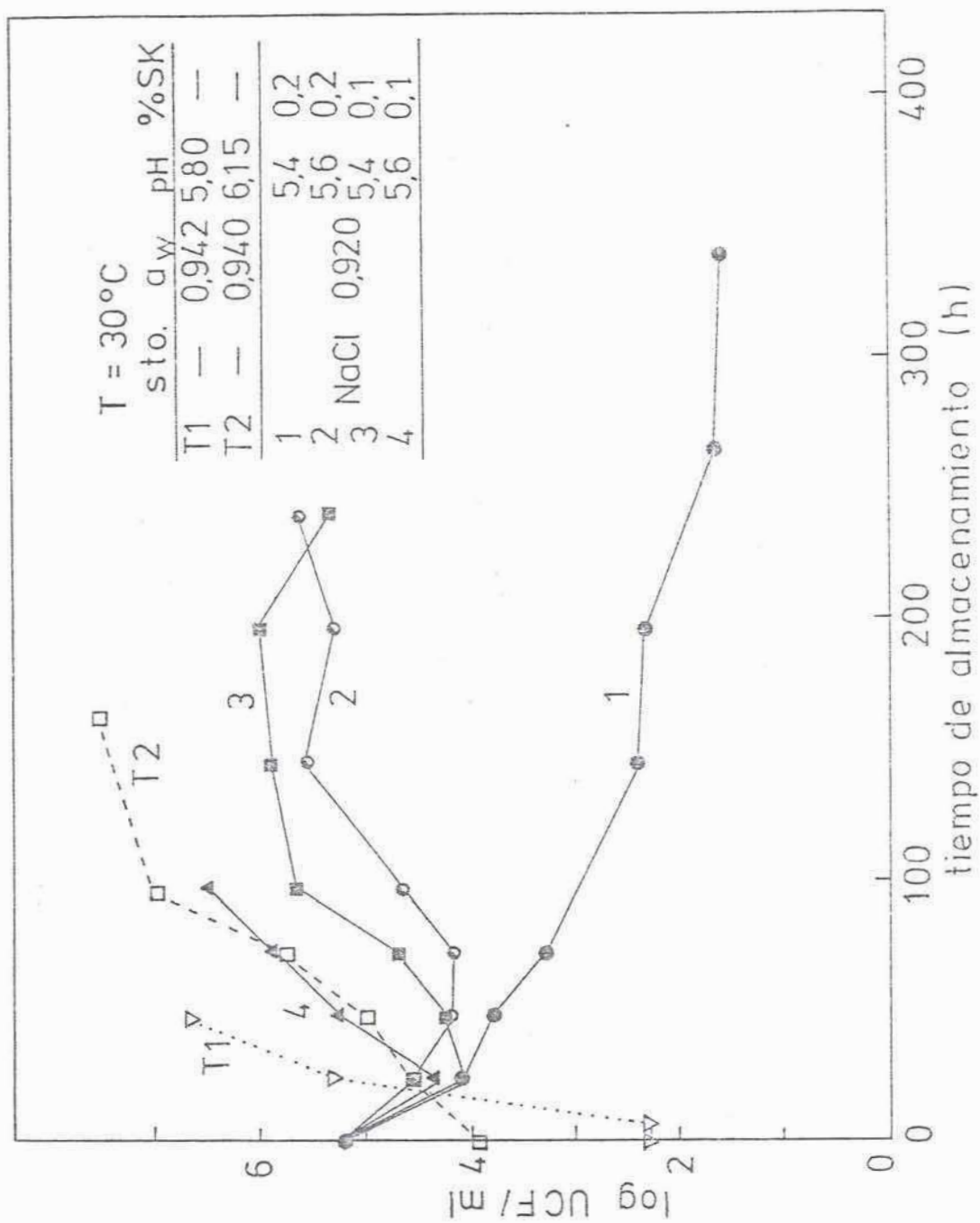


Figura 23: Cambios en el recuento de mesófilas aerobias en suero concentrado comercial (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>) y suero concentrado modificado, almacenado a 30°C.

SK = sorbato de potasio

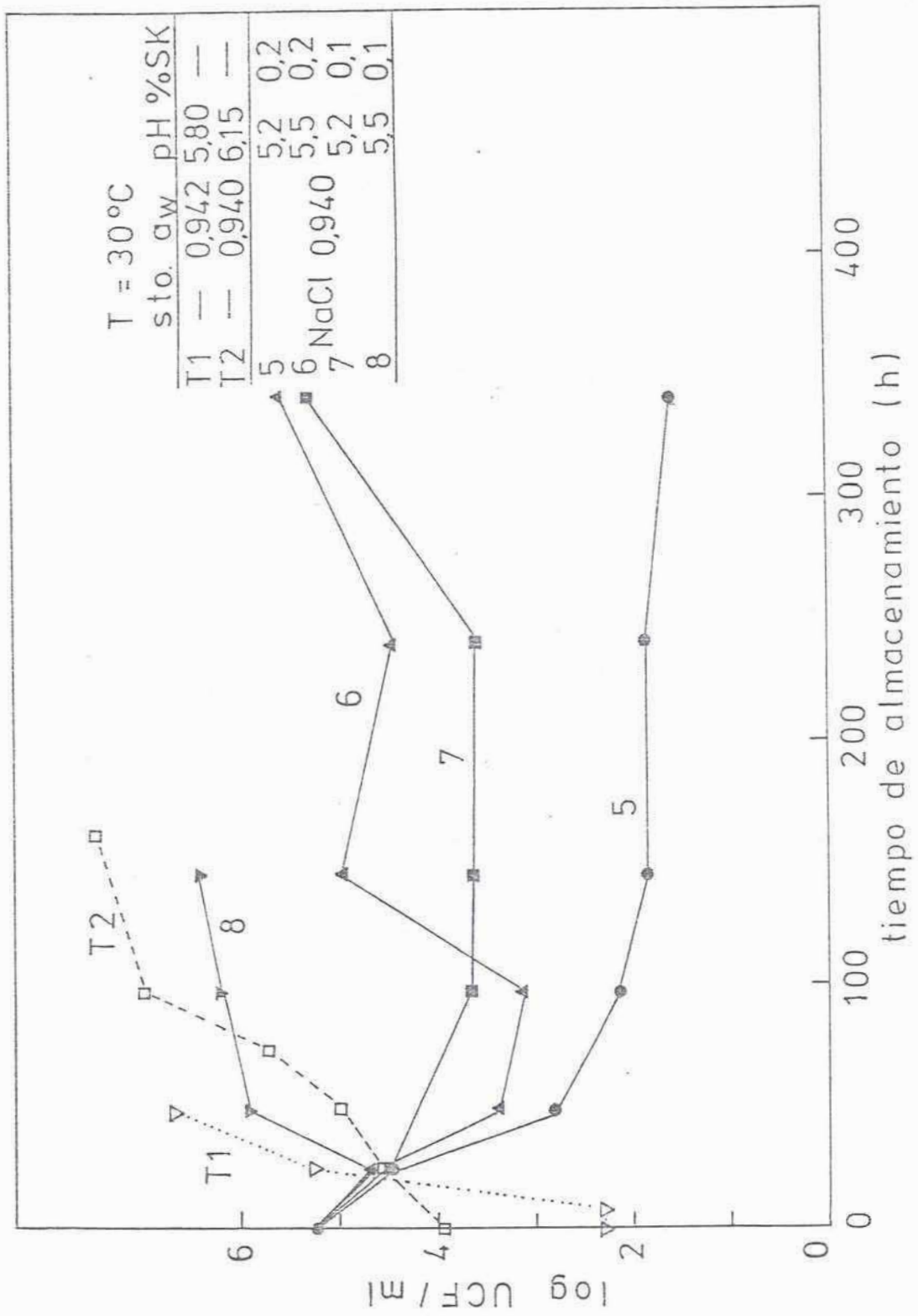


Figura 24: Cambios en el recuento de mesófilas aerobias en suero concentrado comercial (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>) y en suero concentrado modificado almacenado a 30°C.

SK = sorbato de potasio

Dado que el manejo industrial del suero no se realiza en forma estéril, resulta de suma importancia investigar cuál es el comportamiento de este material frente a posibles contaminaciones durante su elaboración, transporte y almacenamiento.

El Staphylococcus aureus puede crecer y producir enterotoxina en distintos sustratos y en un amplio rango de condiciones ambientales, tales como  $a_w$ , pH y temperatura (Tatini, 1973). Está bien documentado que este microorganismo puede crecer en forma aeróbica con una  $a_w$  tan baja como 0,86 si las otras condiciones son las óptimas (Vaamonde et al., 1982; Lotter y Leistner, 1978). Es por esta razón que se lo utilizó como organismo test para los estudios de contaminación en suero concentrado. En las figuras 25 y 26 se muestra el comportamiento del S. aureus INM 82 inoculado en suero concentrado con una  $a_w = 0,92$  y  $0,94$ , combinado con distintos niveles de pH y sorbato de potasio agregado; los inóculos iniciales fueron de  $10^4$  y  $10^6$  UFC/ml. Se puede observar que mientras el microorganismo test se desarrolla sin problemas en el suero concentrado sin modificar ( $a_w = 0,94$ , pH = 6,15) existen varias combinaciones de  $a_w$  - pH - %SK que inhiben o resultan letales para el S. aureus INM 82. Por ejemplo, en el caso de suero con  $a_w = 0,92$ , pH = 5,4 y 0,2%SK, el número de microorganismos disminuye rápidamente llegando casi a la pérdida total de via-

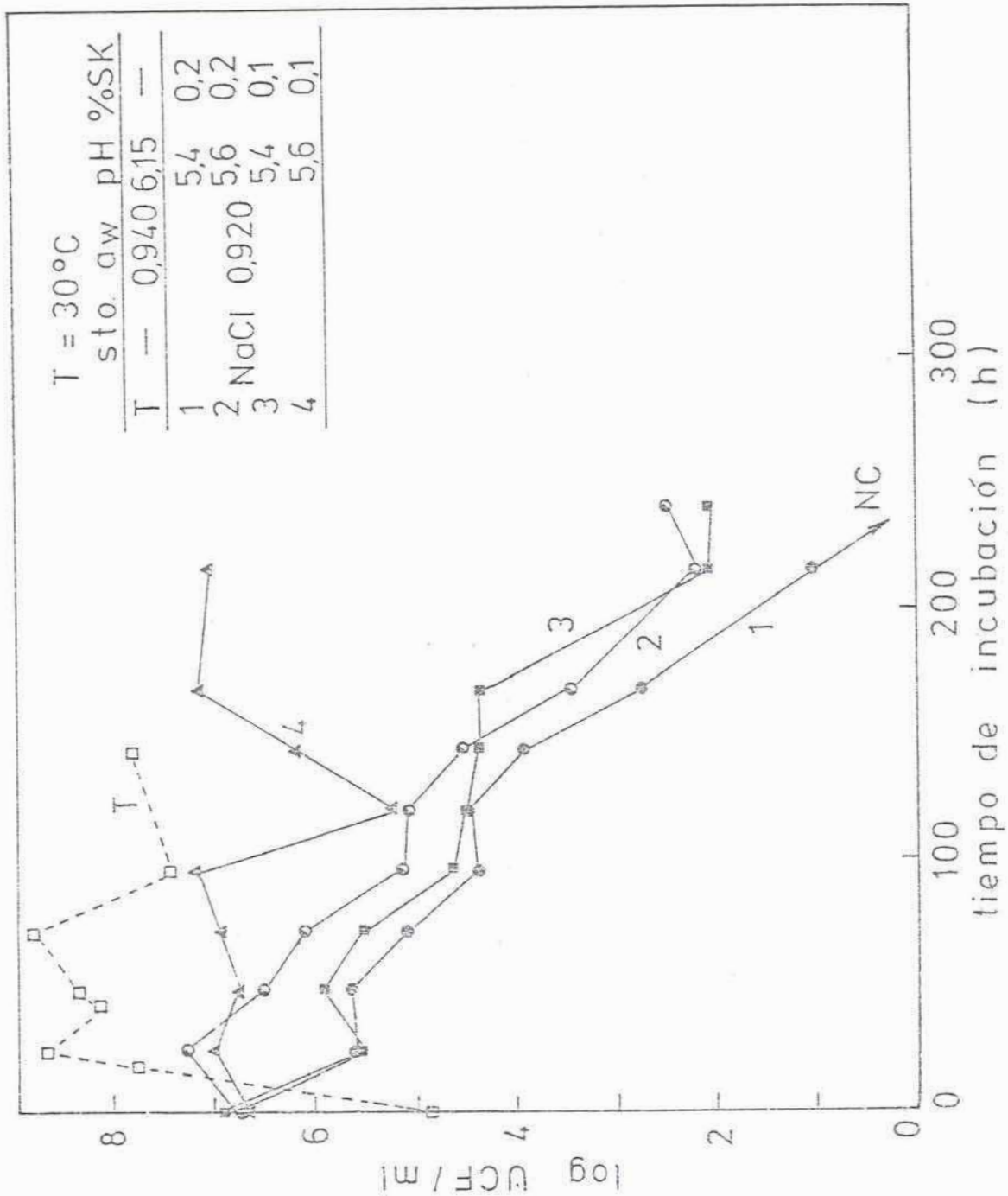


Figura 25: Desarrollo e inhibición de *S. aureus* INM-82 durante el almacenamiento a 30°C, en suero dulce concentrado ajustado a distintos niveles de  $a_w$ , pH y sorbato de potasio.  
 SK = sorbato de potasio  
 NC = recuento < 10 UFC/ml a las 171 horas



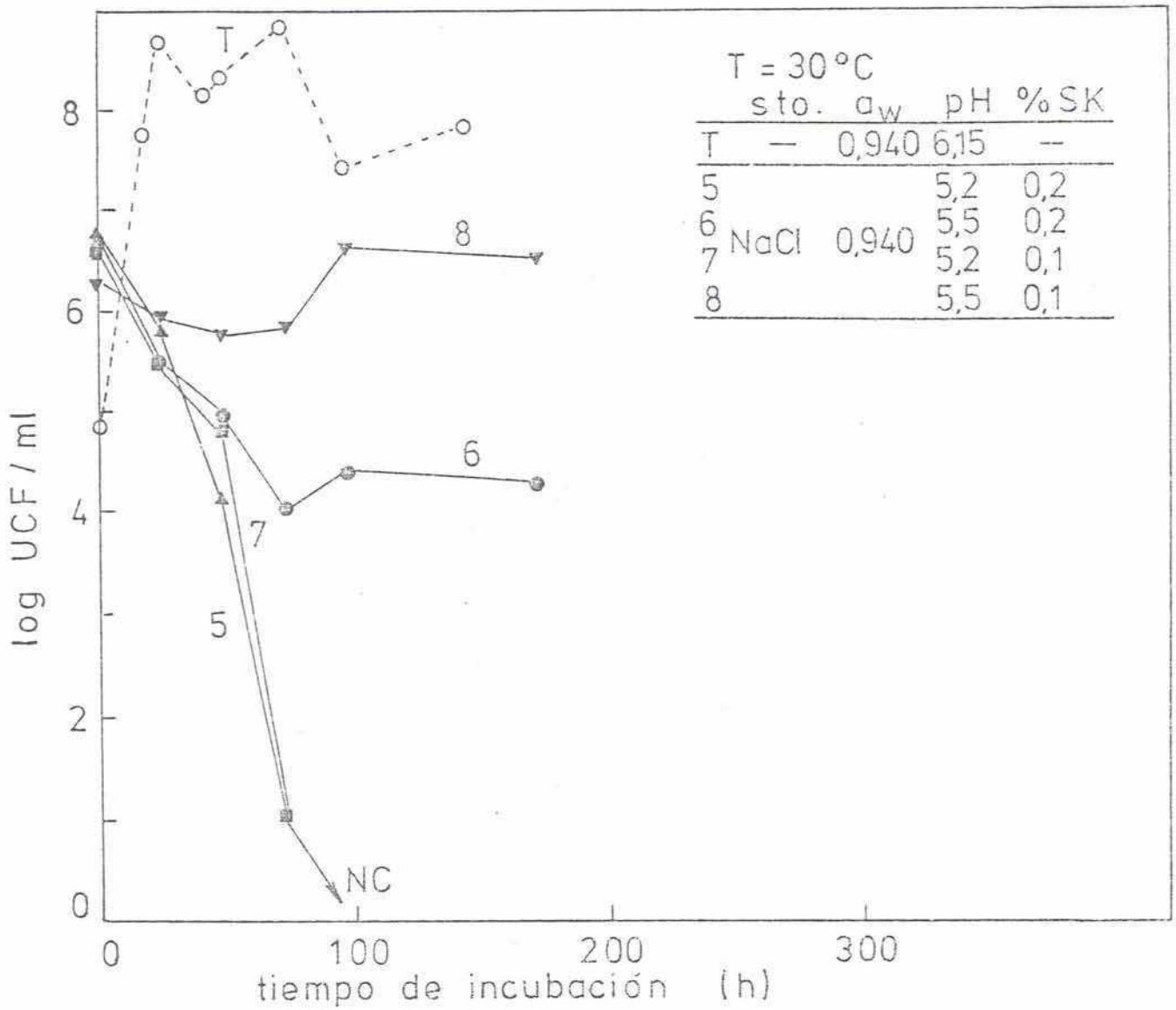


Figura 26: Desarrollo e inhibición de *S. aureus* INM-82 durante el almacenamiento a 30°C, en suero dulce concentrado ajustado a distintos niveles de pH y sorbato de potasio.

SK = sorbato de potasio

NC = recuento < 10 UFC/ml a las 241 horas

bilidad a las 271 horas de almacenamiento. Un comportamiento similar se observó en el caso de suero de  $a_w = 0,94$ , pH = 5,2 y 0,2%SK. Cabe destacar que en muestras con igual porcentaje de sorbato de potasio agregado, una pequeña disminución en el nivel de pH (pH = 5,6 a pH = 5,4 por ejemplo) afecta drásticamente el comportamiento del microorganismo estudiado. Esto es razonable considerando que, no solamente el efecto intrínseco de la disminución de pH afecta el crecimiento del S. aureus, sino que además se sabe que la efectividad del sorbato de potasio es función del pH y que ésta aumenta a medida que se acerca al valor de su constante de disociación ( $pK_a$ ) que es 4,75 (Parada et al., 1982; Davidson et al., 1981). Los resultados obtenidos nos indican que si bien el S. aureus crece a una  $a_w = 0,86$  cuando las otras condiciones son las óptimas, se puede lograr un producto organolépticamente aceptable, donde el microorganismo en estudio se encuentra totalmente inhibido, con una pequeña modificación de  $a_w$  y pH y con el agregado de sorbato de potasio.

Por lo anteriormente expuesto se puede concluir que el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias en suero concentrado almacenado a 30°C, se puede prevenir con una combinación de factores tales como:  $a_w = 0,94$  - pH = 5,2 - 0,2% SK o  $a_w = 0,92$  - pH = 5,4 - 0,2% SK. Este fue el motivo que llevó a estudiar la

posibilidad de otras contaminaciones, como hongos y levaduras, sólo en estas dos combinaciones de factores.

La figura 27 muestra la evolución experimentada por la levadura INM - 84, inoculada en suero dulce concentrado sin modificar y en las dos alternativas de modificaciones propuestas. Los inóculos iniciales fueron superiores a  $10^4$  UFC/ml. En el primer caso la levadura encuentra un medio favorable para su desarrollo, llegando a valores de  $10^8$  UFC/ml al cabo de 28 días de almacenamiento. Por el contrario, en los sistemas propuestos, la levadura INM-84 pierde viabilidad durante el almacenamiento.

Por último se estudió el comportamiento de los sistemas propuestos frente a una contaminación con Geotrichum sp. (hongo que se encuentra comúnmente en las queserías) y Aspergillus flavus (aislado de un suero concentrado comercial contaminado). La figura 28 muestra el desarrollo del hongo Aspergillus flavus en medio Sabouraud y la ausencia de desarrollo en suero modificado, y la figura 29 compara el desarrollo en un suero concentrado comercial y la ausencia de desarrollo en un suero modificado. En este caso se observa que el inóculo colocado en el centro de la placa ha difundido ya que el suero no es sólido como en el caso del Sabouraud, y se observan por lo tanto crecimiento en varias zonas de la placa, y además han desarrollado otros hongos que el

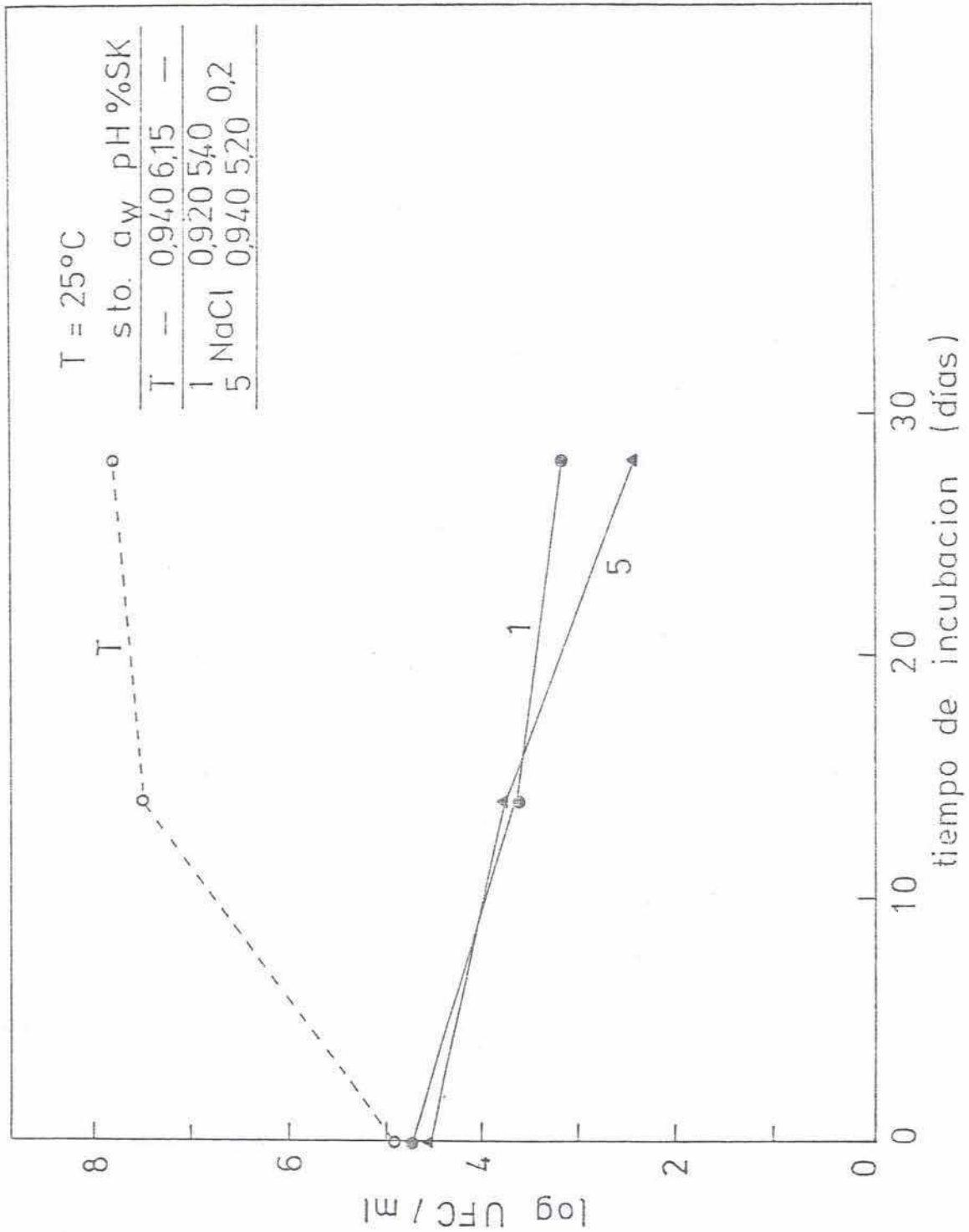


Figura 27: Desarrollo e inhibición de la levadura INM-84 inoculada en suero concentrado comercial y en suero concentrado modificado ajustado a distintos valores de  $a_w$ , pH y sorbato de potasio, durante su almacenamiento a 25°C  
SK = sorbato de potasio



Suero modificado

Medio Sabouraud

Figura 28: Desarrollo de Aspergillus flavus inoculado en suero modificado y en medio Sabouraud, incubado a 25°C durante 90 días.



Suero modificado

Suero concentrado  
comercial

Figura 29: Desarrollo de Aspergillus flavus inoculado en suero modificado y en suero concentrado comercial, incubado a 25°C durante 90 días.

suero contenía como contaminantes. En todos los casos las fotos fueron tomadas a los 90 días de incubación. Cabe mencionar que en todos los casos la cepa inoculada fue la misma y las diferencias de tonalidades que se observan no son reales y son atribuibles a problemas fotográficos.

La tabla 20 muestra el comportamiento de los sistemas propuestos frente a una contaminación fúngica y su comparación con un suero concentrado sin modificar y un medio patrón, en este caso Sabouraud. El "tiempo de rechazo" en el medio patrón y en el suero concentrado sin modificar fue de valores de 24 a 120 horas, sin embargo no se observaron colonias superficiales de los hongos inoculados en ninguno de los dos sistemas propuestos después de 3 meses de incubación a 25°C, lo cual indica que las modificaciones propuestas permiten obtener un suero que no se verá alterado por contaminaciones de hongos.

Se puede concluir que la estabilidad microbiológica del suero concentrado producido en la industria láctea (100 g sólidos/100 g agua), se puede alcanzar con una combinación de un pequeño ajuste de  $a_w$ , leve disminución de pH y agregado de 0,2% de sorbato de potasio. En estas condiciones el producto puede ser almacenado durante 3 meses, como mínimo, a 30°C sin sufrir alteraciones microbiológicas.

Tabla 20: "Tiempo de rechazo" para Geotrichum sp. y Aspergillus flavus inoculados en medio Sabouraud y en suero concentrado comercial y suero modificado incubado a 25°C

Microorganismo	Medio	Inóculo (esporas/ml)	Tiempo de rechazo (horas)
	Sabouraud	$10^5$	48
	Suero (1)	$10^3$	120
		$10^4$	120
		$10^5$	96
<u>Geotrichum sp.</u>	Suero (2)	$10^3$	(-) (a)
		$10^4$	(-)
		$10^5$	(-)
	Suero (3)	$10^3$	(-)
		$10^4$	(-)
		$10^5$	(-)



Tabla 20 (continuación)

	Sabouraud	$10^5$	24
	Suero (1)	$10^3$	96
		$10^4$	96
		$10^5$	72
<u>Aspergillus</u>	Suero (2)	$10^3$	(-) (a)
<u>flavus</u>		$10^4$	(-)
		$10^5$	(-)
	Suero (3)	$10^3$	(-)
		$10^4$	(-)
		$10^5$	(-)

(a) después de tres meses de incubación.

(1) suero concentrado comercial;  $a_w = 0,94$ ; pH = 6,1.

(2) suero concentrado modificado;  $a_w = 0,94$ ; pH = 5,2; 0,2% sorbato.

(3) suero concentrado modificado;  $a_w = 0,92$ ; pH = 5,4; 0,2% sorbato.

#### 4.3. Valor nutricional: pérdida de lisina disponible

La pérdida de lisina disponible en suero microbiológicamente estable fue estudiada a 30°C y los resultados se muestran en la tabla 21. Se puede observar que la pérdida de lisina se encuentra entre el 20 y el 30% del valor inicial después de 3 meses de almacenamiento a 30°C. La retención fue un poco mejor en el caso de suero con  $a_w$  0,94 - pH 5,2. En la tabla 21 también se muestra la retención de lisina en suero en polvo de  $a_w$  0,33, almacenado a 25°C y 35°C (Labuza y Saltmarch, 1981 a). Se puede apreciar que la retención en los sistemas aquí estudiados (suero microbiológicamente estable con  $a_w$  0,94 y 0,92) es similar (y en algunos casos mayor) a la obtenida por estos investigadores para suero en polvo de  $a_w$  0,33. Esto es razonable considerando el efecto que la  $a_w$  ejerce sobre la reacción de Maillard. La mayoría de los estudios sobre esta reacción de deterioro indican que ésta posee un máximo de velocidad alrededor de valores de  $a_w$  0,6-0,8 (Labuza y Saltmarch, 1981 b). Por ejemplo para el caso de leche en polvo, Loncin et al. (1968) informaron un máximo de pérdida de lisina en el rango de  $a_w$  0,6-0,7. Si la  $a_w$  se aumenta por encima de estos valores, disminuye la velocidad de reacción como resultado de la dilución. El suero concentrado, por la actividad acuosa

Tabla 21: Retención de lisina disponible en suero microbiológicamente estable almacenado a 30°C y en suero en polvo

Retención (%)				
Tiempo de almacenamiento (días)	Suero concentrado (a) 30°C	Suero concentrado (b) 30°C	Suero en polvo (c) 25°C	Suero en polvo (c) 35°C
0	100	100	100	100
31	92,1	99,3	96,5	80,7
60	91,4	93,5	93,3	66,1
91	70,9	83,0	90,1	53,3

(a)  $a_w$  0,92, pH 5,4

(b)  $a_w$  0,94, pH 5,2

(c) calculado de los datos obtenidos de Labuza y Saltmarch (1981 a) para suero en polvo de  $a_w = 0,33$ .

que posee, se ubica en la parte descendente de la curva (figura 14) donde por efecto del alto contenido de agua la velocidad de la reacción de Maillard se ve disminuída.

Labuza y Saltmarch (1981 a) hallaron para pérdida de lisina en suero en polvo, la siguiente expresión cinética:

$$A = A_0 \exp(- k_f t) \quad (42)$$

donde:

A =  $\epsilon$ -DNP-lisina remanente

A<sub>0</sub> =  $\epsilon$ -DNP-lisina a tiempo cero

k<sub>f</sub> = constante de velocidad de orden uno

t = tiempo

Las variaciones de lisina obtenidas para las dos alternativas de suero concentrado microbiológicamente estable fueron muy bajas, es decir se observó una alta retención, por lo tanto no fue posible correlacionar estos valores con un modelo cinético, y los resultados se informan únicamente como porcentaje de retención de lisina.

Varios investigadores han estudiado el desarrollo y las consecuencias que la reacción de Maillard produce durante el al-

macenamiento de leche en polvo, especialmente a altas temperaturas. Dado que el daño producido por la temperatura y tiempo de almacenamiento en leche en polvo se refleja casi exclusivamente en el desarrollo de la reacción de Maillard, la medida de retención de lisina representa una herramienta útil para evaluar la calidad nutricional final (en el momento de su utilización) de este alimento.

Hurrel y Finot (1983) estudiaron la influencia de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la retención de lisina en leche en polvo (25 g agua/Kg). Las temperaturas estudiadas fueron 60° y 70°C. A 60°C la retención fue de 95,7% después de una semana de almacenamiento y ésta bajó a 78,7% al totalizar un almacenamiento de seis semanas, pero al elevar la temperatura en 10°C (de 60° a 70°C), se obtuvo una retención de 70,3% a la primer semana de almacenamiento y se llegó a una pérdida total de lisina a las cinco semanas. Con estos datos queda demostrada la marcada influencia que tienen tanto la temperatura como el tiempo de almacenamiento sobre el desarrollo de la reacción de Maillard y como consecuencia sobre la pérdida del valor nutricional de la leche en polvo.

Otra variable importante de destacar es el pH. Petriella et al. (1985) mostraron que el pH posee una gran influencia sobre

la velocidad de reacción de Maillard en sistemas modelos de glucosa-lisina con  $a_w$  en el rango 0,900-0,950 y pH 5; 6 y 7. En este caso la extensión de la reacción fue medida a través del cambio de color de los sistemas modelos. En todos los niveles de actividad acuosa estudiados (0,900, 0,925 y 0,950), la velocidad de reacción aumentó aproximadamente en un orden de magnitud al elevar el pH de 5 a 7. En el caso de suero concentrado microbiológicamente estable, el pH reducido que posee es uno de los factores responsables de la estabilidad que la lisina presenta en este sistema.

#### 4.4. Cambio de color

##### 4.4.1. Representación del color

Los valores triestímulo X, Y, Z, obtenidos de las mediciones de color se pueden representar en forma gráfica en un espacio tridimensional de coordenadas X, Y, Z. La representación tridimensional y el hecho que no incluya una coordenada para la variable tiempo, hace muy difícil la interpretación de los resultados. Existen varias formas de superar esta dificultad. Una de ellas consisten en considerar la diferencia de color ( $\Delta E$ ) entre dos

muestras, tomando como referencia la muestra inicial sin tratamiento térmico. Otra forma es utilizar las transformaciones CIELAB y CIELUV del espacio CIE y calcular las funciones de color, o sus variaciones definidas en estos sistemas. Este método permite obtener la interpretación psicofísica asociada a las funciones de color (Hunt, 1977).

Las variables X, Y, Z, iluminante c, fueron utilizadas para calcular las coordenadas en los espacios CIELUV y CIELAB, mediante las siguientes ecuaciones de transformación (CIE, 1976):

Para el espacio CIELUV

$$L^* = 116(Y/Y_n)^{1/3} - 16 \quad (43)$$

$$u^* = 13 L^*(u' - u_0) \quad (44)$$

$$v^* = 13 L^*(v' - v_0) \quad (45)$$

donde:

$$u' = \frac{4X}{X + 15Y + 3Z} \quad (46)$$

///

$$v' = \frac{9Y}{X + 15Y + 3Z} \quad (47)$$

$$Y/Y_n > 0,01$$

Para el espacio CIELAB

$$L^* = 116 (Y/Y_n)^{1/3} - 16 \quad (48)$$

$$a^* = 500 [(X/X_n)^{1/3} - (Y/Y_n)^{1/3}] \quad (49)$$

$$b^* = 200 [(Y/Y_n)^{1/3} - (Z/Z_n)^{1/3}] \quad (50)$$

donde:

$$X/X_n; Y/Y_n; Z/Z_n > 0,01$$

Los valores de referencia utilizados fueron los correspondientes al iluminante c (CIE):

$$u_o = 0,2009$$

$$X_n = 98,041$$

$$v_o = 0,4610$$

$$Y_n = 100,00$$

$$Z_n = 118,103$$



Posteriormente se calcularon varias funciones de color definidas en estos espacios, con el objeto de investigar si alguna de ellas podía representar una medida cuantitativa del color de los sistemas estudiados y si su variación con el tiempo de almacenamiento a distintas temperaturas permite realizar un estudio cinético del cambio de color.

Las funciones correspondientes al espacio CIELUV son  $S_{uv}$  (saturación),  $H_{uv}$  (ángulo de tono) y  $C_{uv}$  (croma), definidas como:

$$S_{uv} = 13[(u' - u_0)^2 + (v' - v_0)^2]^{1/2} \quad (51)$$

$$H_{uv} = \tan^{-1} (v^*/u^*) \quad (52)$$

$$C_{uv} = S_{uv} L^* = (u^{*2} + v^{*2})^{1/2} \quad (53)$$

y los correspondientes al espacio CIELAB son  $C_{ab}$  (croma) y  $H_{ab}$  (ángulo de tono):

$$C_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (54)$$

$$H_{ab} = \tan^{-1} (b^*/a^*) \quad (55)$$

///

#### 4.4.2. Cinética del cambio de color

Una vez calculadas las funciones, se estudió el comportamiento cinético de las más adecuadas para representar el comportamiento del suero modificado. Los datos de valores triestímulo utilizados para estos cálculos se muestran en el punto 7 de este trabajo (Tablas de datos). La representación gráfica en función del tiempo de almacenamiento de la función  $\Delta E$ , a 45°C se muestra en la figura 30.

La variación del parámetro  $L^*$  y las funciones  $S_{uv}$  y  $C_{ab}^*$  en suero modificado ( $a_w = 0,94$ ,  $pH = 5,2$ ) almacenado a 45°C se muestran en la figura 31. Estrictamente, lo que se graficó es la diferencia de las funciones, es decir,  $(S - S_0)_{uv}$ ,  $(C^* - C_0)_{ab}$  y  $(L_0 - L^*)$ , siendo los valores iniciales los correspondientes al suero sin almacenamiento ( $t = 0$ ). En el caso particular de la luminosidad, ésta disminuye con el aumento de color y para visualizar mejor este efecto se graficó la variación negativa, es decir  $(L_0 - L^*)$ .

Todas las funciones ( $\Delta S$ ,  $\Delta C^*$  y  $\Delta L^*$ ) muestran un comportamiento similar, ya que varían linealmente con el tiempo, (coeficientes de correlación de 0,9969, 0,9863 y 0,9928 respectivamente).

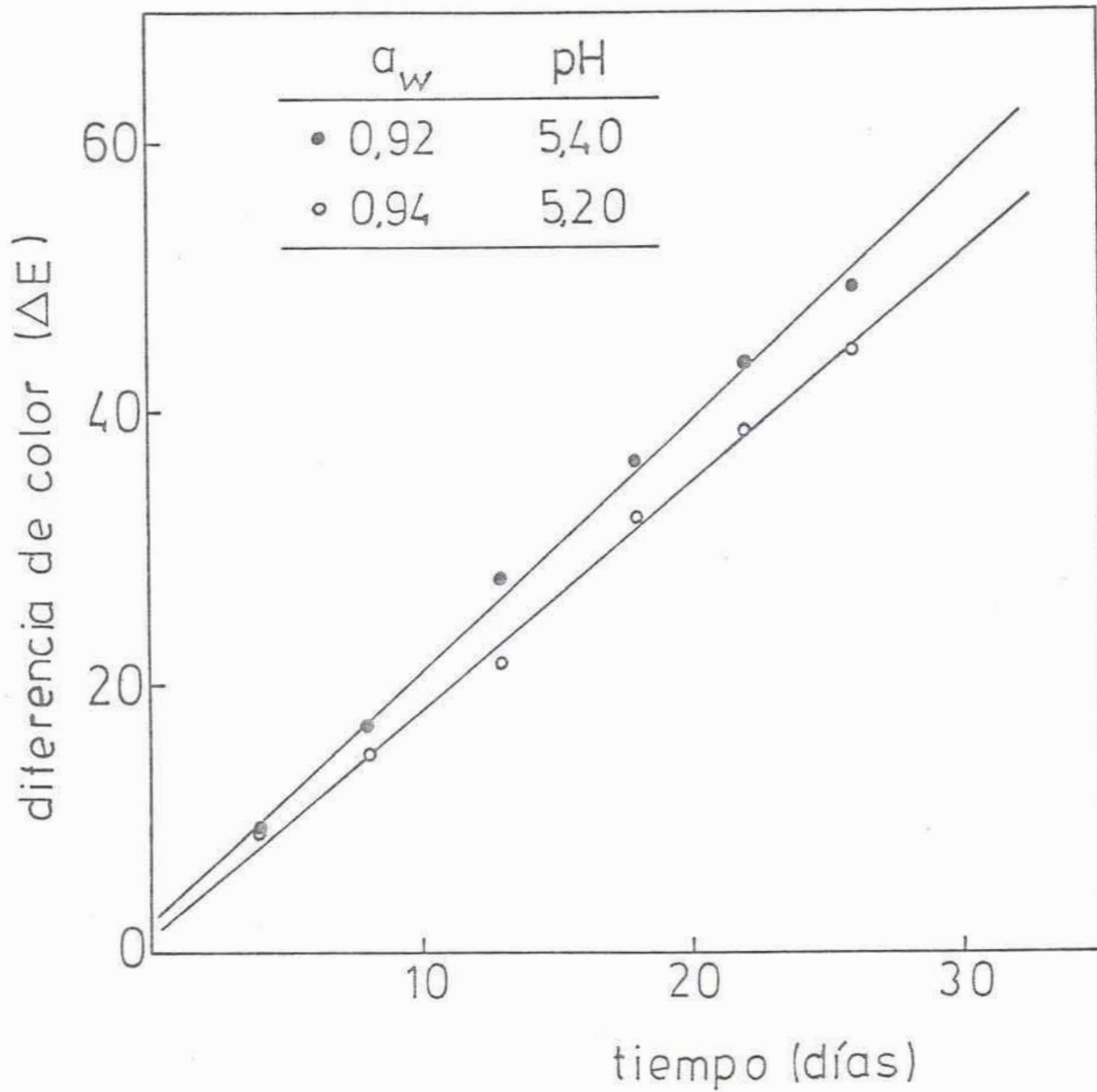


Figura 30: Diferencia de color ( $\Delta E$ ) en función del tiempo para suero concentrado modificado, almacenado a 45°C.

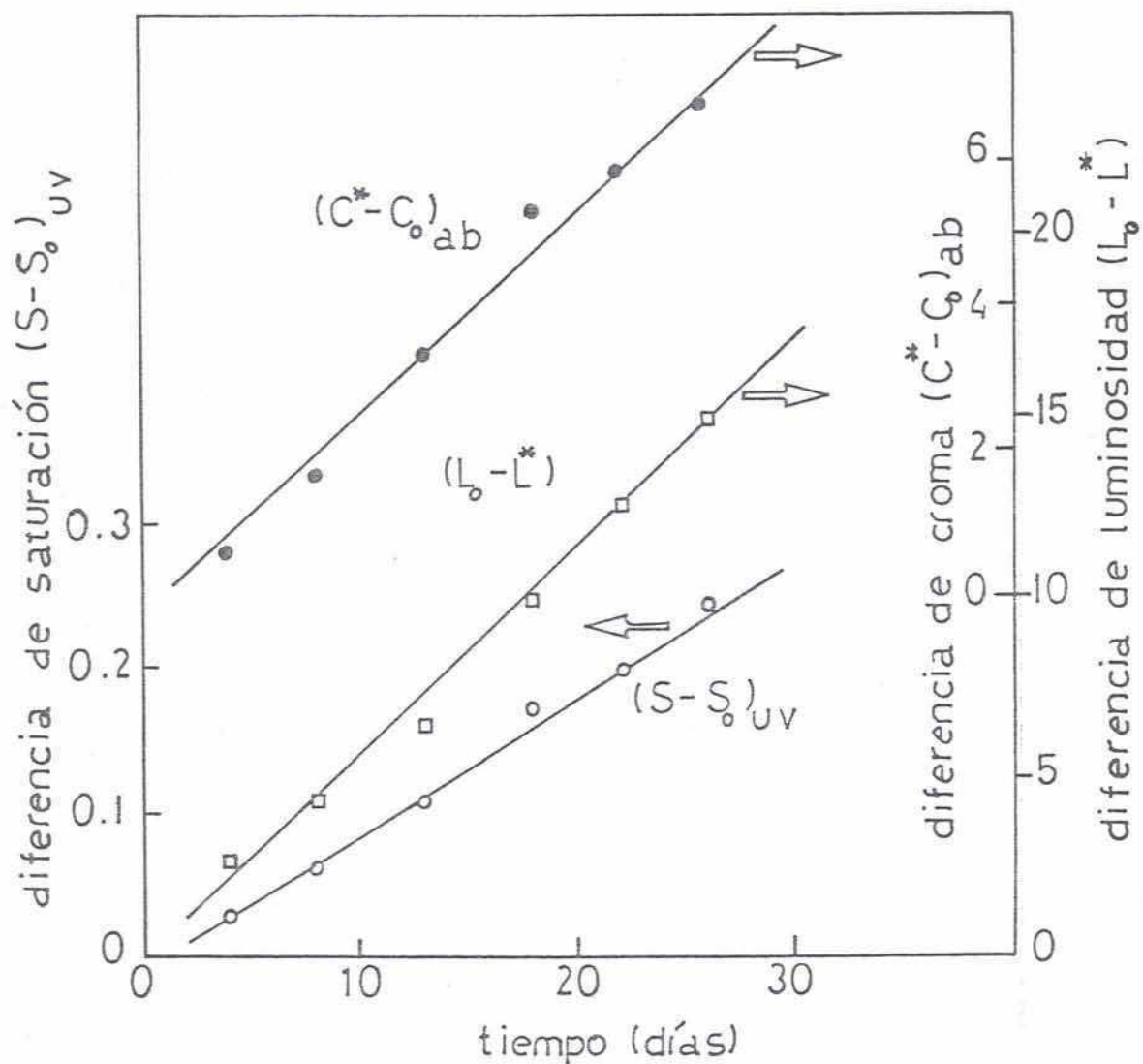


Figura 31: Variación de luminosidad, saturación (CIELUV) y croma (CIELAB) en función del tiempo, para suero concentrado modificado de  $a_w = 0,940$  y  $pH = 5,20$ , almacenado a  $45^\circ C$

En la fotografía (figura 32) se ven muestras de suero modificado ( $a_w = 0,94$  -  $pH = 5,2$ ) almacenadas 0, 30, 60 y 90 días a  $30^\circ C$ . A los 90 días de almacenamiento a  $30^\circ C$ , el cambio de color producido, correspondiente a una variación de luminosidad ( $L_0 - L^*$ ) inferior a 7 unidades en los dos casos estudiados, representa una variación aceptable desde el punto de vista comercial. Simultáneamente, y a pesar de no haberse realizado ensayos sensoriales, las características organolépticas del producto antes y después de dicho almacenamiento son similares, conservando una textura suave y un "flavor" agradable. Para el estudio cinético se seleccionó el parámetro  $L^*$  y la función  $S_{uv}$ . La función  $S_{uv}$  está vinculada con el contenido de color espectral puro, y el parámetro  $L^*$  está directamente relacionado con la impresión que el observador recibe de los objetos coloreados. A medida que aumenta el pardeamiento, se incrementa el contenido de color y disminuye la transmitancia luminosa, los sistemas se ven más coloreados, la saturación aumenta y simultáneamente se ven más oscuros debido a la pérdida de luminosidad.

Dado que la variación del color en función del tiempo es lineal, el modelo más sencillo para predecir el pardeamiento no enzimático del suero, es una reacción de orden cero, es decir:

$$\frac{dB}{d\theta} = k_B = \text{velocidad de pardeamiento} \quad (56)$$

$a_w = 0,940$

pH = 5,20

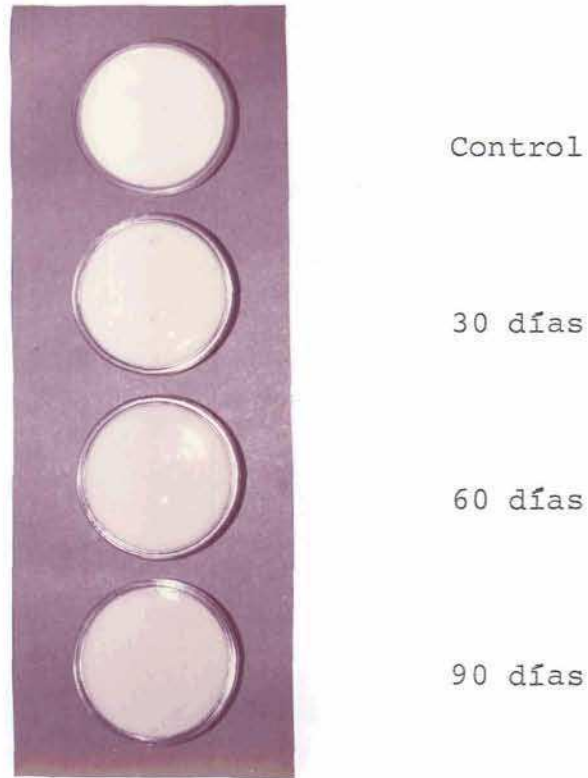


Figura 32: Cambio de color experimentado por el suero concentra-  
do modificado almacenado a 30°C

donde B es el color, que puede expresarse como variación de cualquiera de las funciones de color ( $S_{uv}$  o  $L^*$ ),  $\theta$  es el tiempo de tratamiento térmico y k la constante de reacción de orden cero. Recientemente, Petriella et al. (1985), estudiaron el pardeamiento no enzimático en un sistema modelo de glucosa-lisina con  $a_w$  y pH similares a los del suero, y encontraron una cinética de orden cero para esta reacción. Labuza y Saltmarch (1981 a) también hallaron que la formación de pigmentos (obtenidos de mediciones de absorbancia a una longitud de onda determinada) en suero en polvo almacenado con una  $a_w$  en el rango 0,33-0,65, sigue una cinética de orden cero. Las figuras 33 y 34 muestran el desarrollo de color medido como variación de luminosidad, y las figuras 35 y 36 como variación de saturación, en suero modificado, a 30°C, 38°C y 45°C.

La constante de velocidad k, es función de la composición y demás factores que caracterizan al sistema. En particular, muestra una dependencia importante con la temperatura. Los valores de  $k_{(S - S_o)_{uv}}$  y  $k_{(L_o - L^*)}$  para el desarrollo de color en suero modificado se muestran en la tabla 22. Esta gran influencia sobre la velocidad de pardeamiento se puede ilustrar considerando que las constantes de velocidad ( $k_{L_o - L^*}$  y  $k_{(S - S_o)_{uv}}$ ) aumentan cinco veces al aumentar la temperatura de 30°C a 38°C y nueve

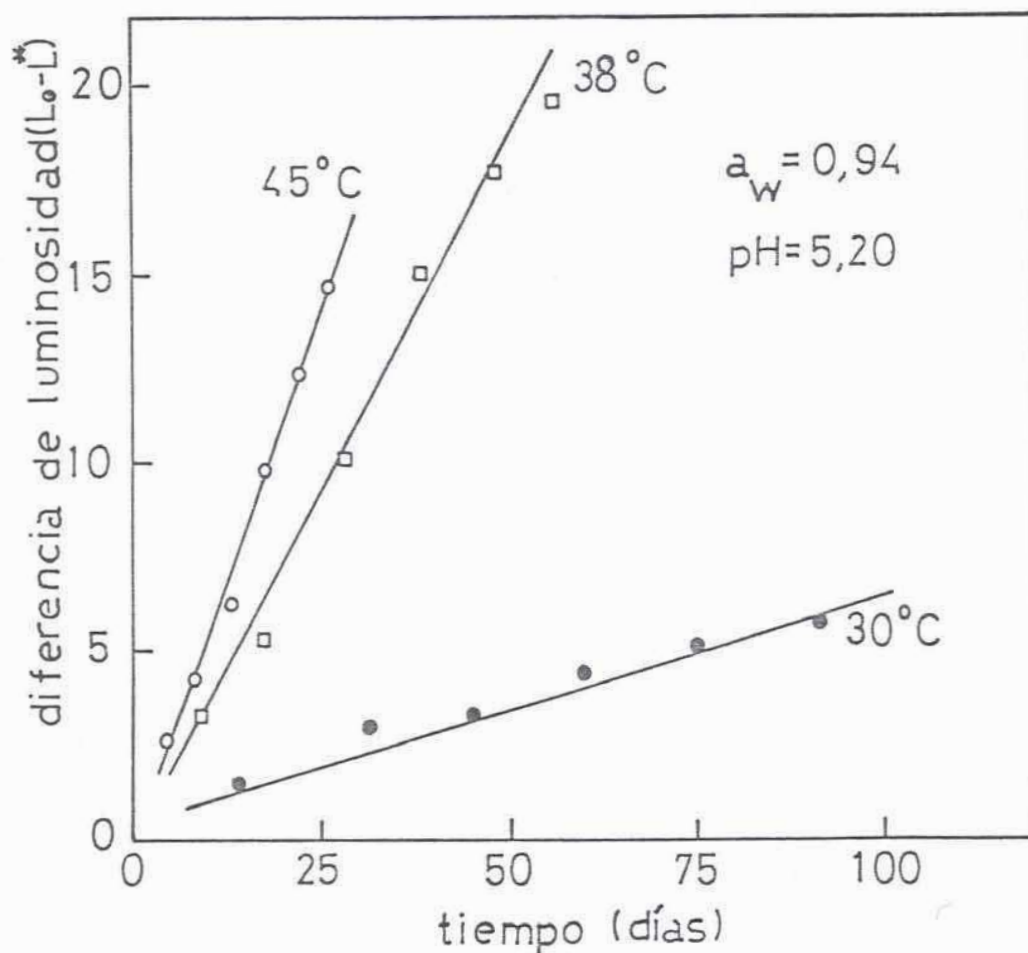


Figura 33: Variación de luminosidad en función del tiempo para suero concentrado modificado, almacenado a distintas temperaturas



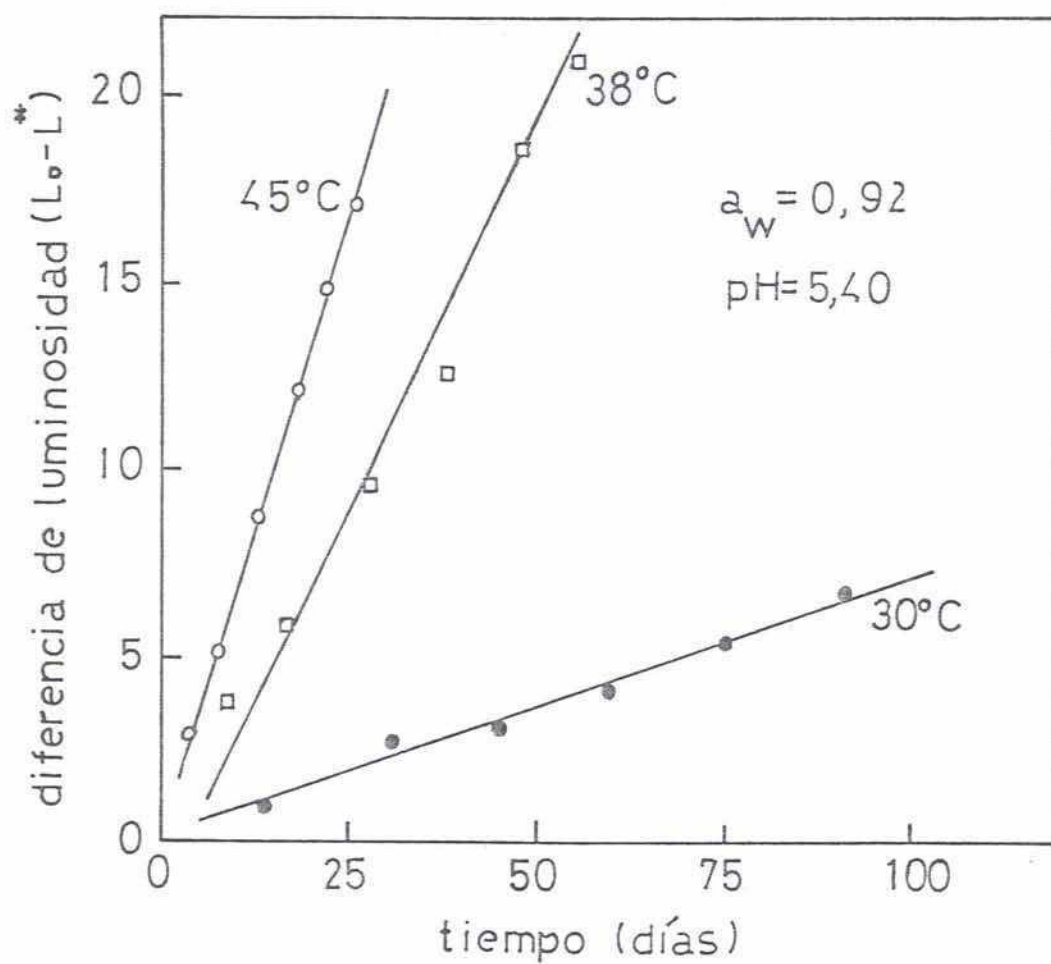


Figura 34: Variación de luminosidad en función del tiempo para suero concentrado modificado, almacenado a distintas temperaturas

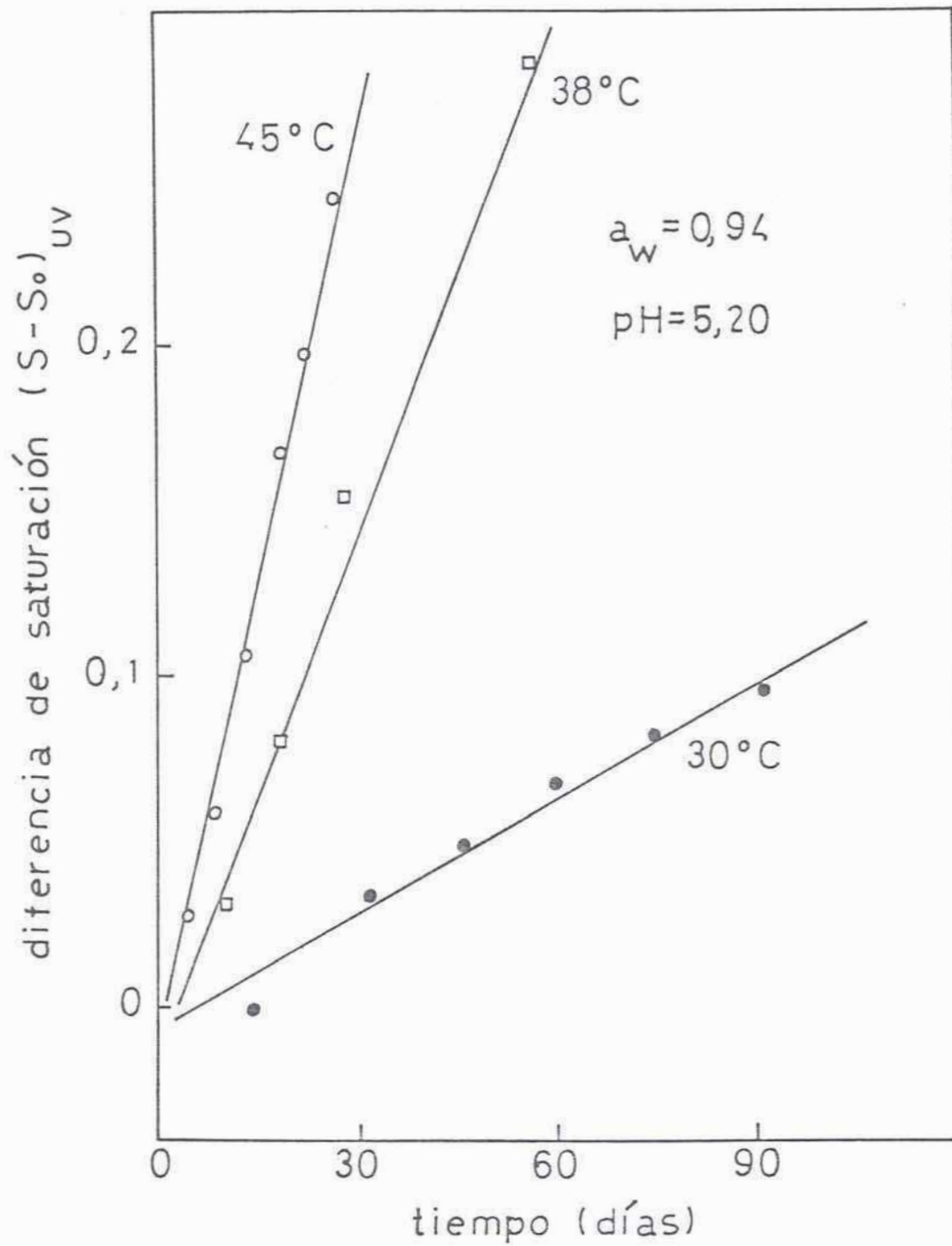


Figura 35: Variación de saturación en función del tiempo para suero concentrado modificado, almacenado a distintas temperaturas

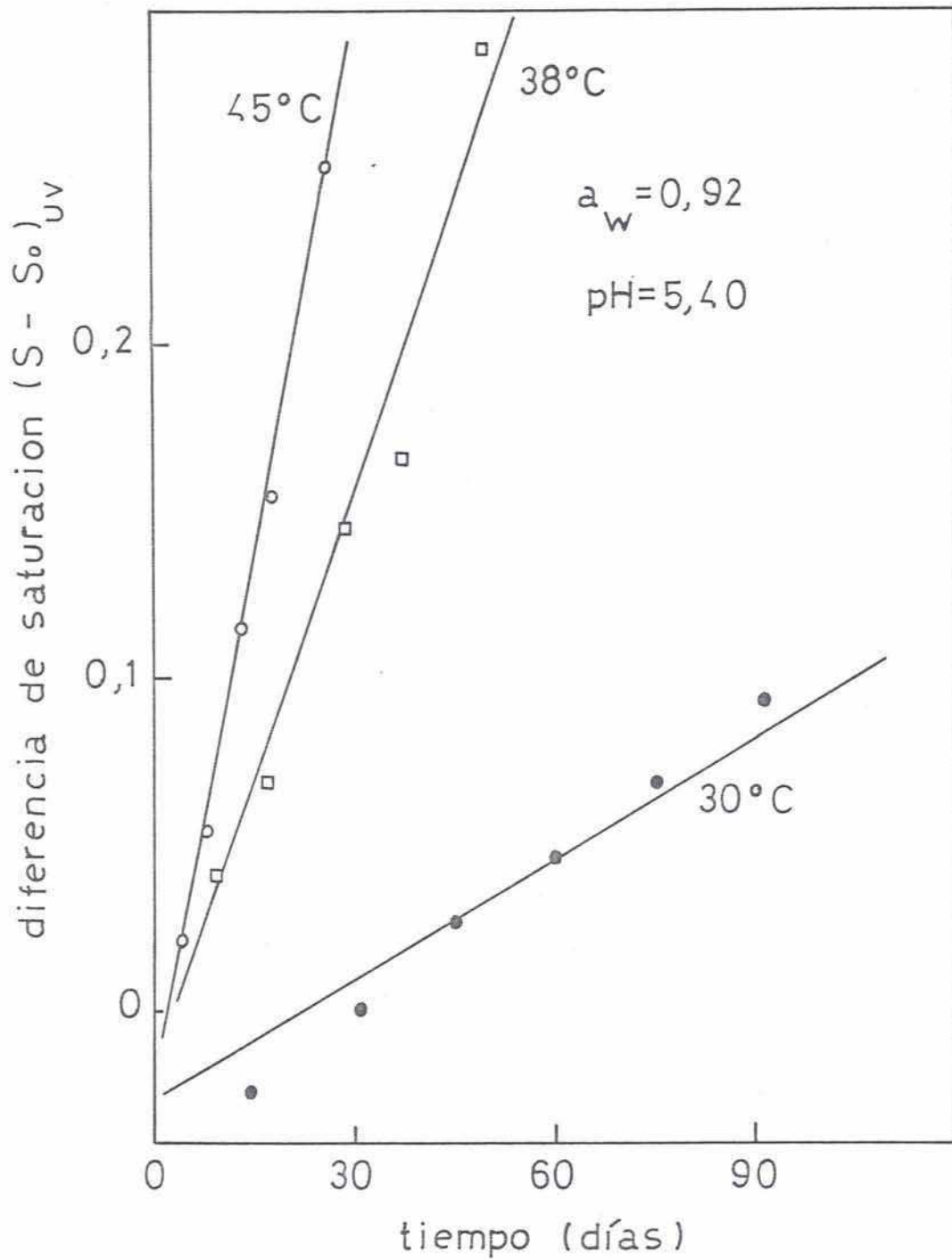


Figura 36: Variación de saturación en función del tiempo para suero concentrado modificado, almacenado a distintas temperaturas

Tabla 22: Constantes de velocidad para el desarrollo de color en suero modificado micro-biológicamente estable

$a_w$	pH	30°C		38°C		45°C	
		$k_{(S-S)_O,uv}$	$k_{(L_O-L^*)}$	$k_{(S-S)_O,uv}$	$k_{(L_O-L^*)}$	$k_{(S-S)_O,uv}$	$k_{(L_O-L^*)}$
0,92	5,4	0,12	7,2	0,61	37,1	1,1	66,4
0,94	5,2	0,11	6,0	0,56	37,0	0,95	55,9

veces si ésta se eleva de 30°C a 45°C. También se puede observar que el efecto relativo de esta variable de proceso es similar para ambas funciones ( $\Delta S_{uv}$  y  $\Delta L^*$ ).

Los valores de las constantes fueron obtenidos por regresión lineal de los gráficos lineales de las funciones de color en función del tiempo de almacenamiento para cada temperatura. La velocidad de desarrollo de color en ambas condiciones estudiadas ( $a_w$  0,94 - pH 5,2 y  $a_w$  0,92 - pH 5,4) es muy similar, sin embargo, en todos los casos analizados ésta es levemente menor para la combinación mayor  $a_w$  - menor pH. En este caso no se puede discriminar el efecto de la  $a_w$  y el pH, y el efecto combinado de ambos da como resultado una respuesta similar, con una leve diferencia que indica una mayor influencia de la variable pH (menor velocidad de reacción a menor pH). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Petriella et al. (1985), donde se estudiaron los efectos de la temperatura,  $a_w$  y pH por separado en sistemas modelos de glucosa-lisina. En estos sistemas, se demostró que la  $a_w$ , (en un rango 0,90-0,95), tiene poca influencia sobre la velocidad de desarrollo de color, por el contrario la temperatura y el pH ejercen una gran influencia. En uno de estos sistemas modelos de  $a_w$  0,925 y pH 5, la constante de velocidad,  $k_{S_{uv}}$ , aumentó seis veces al elevar el pH en una unidad y once veces cuando és-

te se elevó en dos unidades.

En todos los casos estudiados en suero de queso el valor de  $r$  para la constante de velocidad fue mayor que 0,98 y para la mayoría de las corridas, el error, para el 95% de confianza, se encuentra entre  $\pm 8\%$  y  $\pm 20\%$  del valor (el cálculo del error se detalla en el punto 4.4.3.). Estos errores son aceptables si se considera la variabilidad de un alimento real como el suero concentrado aquí estudiado. Como ya se mencionó anteriormente, las reacciones de pardeamiento no enzimático son influenciadas por variaciones de temperatura, por lo tanto la velocidad de pardeamiento es mayor a medida que aumenta la temperatura. El mismo efecto se encontró en este estudio. Si además la constante de velocidad cumple la ley de Arrhenius, esta dependencia puede expresarse como:

$$k = k_0 e^{-E_a/RT} \quad (57)$$

donde:

$k$  = constante de velocidad de reacción, (hora<sup>-1</sup>)

$E_a$  = energía de activación, (Kcal/mol)

$T$  = temperatura absoluta, (°K)

$k_0$  = factor de frecuencia, (hora<sup>-1</sup>)

$R$  = constante de los gases ideales, (1,986x10<sup>3</sup> Kcal/mol °K)

Los valores de energía de activación,  $E_a$ , obtenidos de la pendiente del gráfico de Arrhenius ( $\ln k$  vs.  $1/T$ ), son similares para los dos sistemas propuestos de suero microbiológicamente estable ( $a_w$  0,94 - pH 5,2 y  $a_w$  0,92 - pH 5,4). Por esta razón todos los valores, correspondientes a distintas partidas y con estas dos condiciones, fueron promediados y los valores resultantes con sus respectivos errores se muestran en la tabla 23. Como se puede apreciar, la  $E_a$  calculada con las distintas funciones de color son casi idénticas, lo cual indica su equivalencia como indicadores de desarrollo de pardeamiento no enzimático en suero concentrado. Petriella et al. (1985) encontraron valores de  $E_a$  entre 35 y 26 Kcal/mol para el desarrollo de color en muestras almacenadas de glucosa-lisina, con  $a_w$  en el rango 0,90-0,95 y pH 5 y 6. Estos valores, están por encima de los hallados para suero. Esto puede explicarse como consecuencia de la distinta naturaleza de los reactantes que intervienen en las reacciones de Maillard en cada caso (lisina-lactosa para el suero concentrado y lisina-glucosa para los sistemas modelos).

Los valores hallados en este trabajo son comparables a los reportados por Labuza y Saltmarch (1981 a) para suero en polvo almacenado con una  $a_w = 0,65$  (29-30 Kcal/mol).

Otra forma de considerar el aumento de velocidad de reac-

Tabla 23: Energía de activación,  $(E_a)^{(1)}$ , para el desarrollo de color en suero microbiológicamente estable

función	$E_a$ (2) (Kcal/mol)	$Q_{10}$ (20 - 30°C)	$Q_{10}$ (30 - 40°C)
$(S - S_o)_{uv}$	$26,1 \pm 2,5$	4,4	4,0
$(L_o - L)$	$26,1 \pm 2,9$	4,4	4,0

(1) Valor promedio para muestras con  $a_w$  0,94 - pH 5,2 y  $a_w$  0,92 - pH 5,4

(2) Error calculado para el 95% de confianza



ción con la temperatura es a través del término  $Q_{10}$ . Este se define como el aumento de velocidad ( $v$ ) que se produce al incrementarse en  $10^{\circ}\text{C}$  la temperatura de reacción,

$$Q_{10} = \frac{v(T + 10)}{v_T} = \text{antilog} \frac{2,189 E_a}{T(T + 10)} \quad (58)$$

El valor de  $Q_{10}$  es dependiente de la temperatura y disminuye con el aumento de ésta. Proporciona una forma más rápida de visualizar el efecto de la temperatura, al mismo tiempo que permite efectuar comparaciones con respecto a la influencia de este parámetro en las reacciones de deterioro. Los altos valores de  $Q_{10}$  hallados (4,0-4,4) (tabla 23), confirman que el pardeamiento no enzimático está fuertemente afectado por la variación de temperatura.

#### 4.4.3. Intervalo de confianza de las constantes de velocidad y energía de activación

El intervalo de confianza (para 95% de probabilidad) de las constantes de velocidad y las energías de activación, fue calculado de la siguiente manera (Chatfield, 1978):

///

$$b \pm t_{\alpha/2, n-2} S_b \quad (59)$$

siendo:

b = pendiente de la regresión lineal

n = tamaño de la muestra

(n-2) = grados de libertad

$\alpha/2$  = probabilidad

t = parámetro t de Student

$S_b$  = desviación standard

donde:

$$S_b = \frac{S_{yx}}{S_x \sqrt{n-1}} \quad (60)$$

$$S_x^2 = \frac{1}{n(n-1)} [n \sum x^2 - (\sum x)^2] \quad (61)$$

$$S_{yx}^2 = \frac{n-1}{n-2} (S_y^2 - b^2 S_x^2) \quad (62)$$

En la tabla 24 se muestran los valores obtenidos de las constantes de velocidad y sus correspondientes intervalos de confianza. Estos resultados son aceptables considerando la variación

///

Tabla 24: Constante de velocidad de luminosidad y de saturación

Corrida	$k_{(S - S_o)_{uv}}$	$k_{(L_o - L^*)}$	$t_{( / 2, n-2) S_b}$
1	0,0012	-----	$2,52 \times 10^{-4}$
1	-----	0,0716	$8,36 \times 10^{-3}$
2	0,0011	-----	$1,42 \times 10^{-4}$
2	-----	0,0603	$1,34 \times 10^{-2}$
3	0,0061	-----	$1,22 \times 10^{-4}$
3	-----	0,3711	$4,31 \times 10^{-2}$
4	0,0056	-----	$1,40 \times 10^{-3}$
4	-----	0,3699	$4,65 \times 10^{-2}$
5	0,0106	-----	$2,00 \times 10^{-3}$
5	-----	0,6641	$1,88 \times 10^{-2}$
6	0,0095	-----	$7,92 \times 10^{-4}$
6	-----	0,5585	$5,34 \times 10^{-2}$
7	0,0013	-----	$3,30 \times 10^{-4}$
7	-----	0,1030	$3,03 \times 10^{-2}$
8	0,0012	-----	$9,92 \times 10^{-5}$
8	-----	0,0937	$2,40 \times 10^{-3}$

Tabla 24 (continuación)

9	0,0018	-----	$2,92 \times 10^{-4}$
9	-----	0,0710	$1,36 \times 10^{-2}$
10	0,0082	-----	$1,42 \times 10^{-3}$
10	-----	0,4803	$8,29 \times 10^{-2}$

---

inherente a un sistema o alimento real como el aquí estudiado.

La energía de activación obtenida de la ecuación de Arrhenius es muy similar en todos los sistemas estudiados de suero concentrado estabilizado ( $a_w$  0,900-0,940; pH 5,2 y 5,4). Por esta razón todos los valores fueron promediados, obteniéndose los valores mostrados en la tabla 24. Se puede observar que la energía de activación para ambas funciones de color (diferencia de saturación y de luminosidad) son muy similares, lo cual indica la equivalencia de las mismas para ser utilizadas como indicadores de color en suero concentrado.

## 5. CONCLUSIONES GENERALES

En esta investigación se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- 1) Se hallaron datos experimentales de actividad de agua ( $a_w$ ) de soluciones de suero de queso con distintas concentraciones de sólidos que se verificaron teóricamente. Se observó que existe una correlación lineal entre la  $a_w$  y el contenido de sólidos de estas soluciones. En todos los casos, los valores de  $a_w$  de las soluciones de suero, a pesar de ser similares, se ubicaron por debajo del valor correspondiente a una solución de lactosa con la misma relación lactosa/agua. Esto indica que la lactosa juega un papel importante en el descenso de la actividad acuosa de las soluciones de suero pero simultáneamente existen otros constituyentes, como los minerales, que contribuyen en menor proporción.
- 2) Se determinaron las combinación de  $a_w$ , pH y SK que permiten obtener un producto que almacenado a 30°C durante 3 meses, inhiba el crecimiento de las bacterias inicialmente presentes en la materia prima y además permanezca estable frente a po-

sibles contaminaciones de S. aureus, hongos y levaduras, que puedan producirse durante su elaboración y almacenamiento.

- 3) Se estudió la cinética del cambio de color en muestras de suero microbiológicamente estable, almacenado durante 3 meses a 30°C y paralelamente se analizó la pérdida del valor nutricional (indicado por la pérdida de lisina disponible). Finalizado este período se comprobó que en las condiciones en que el suero es estable microbiológicamente, estas importantes características de calidad no se ven alteradas apreciablemente.
  
- 4) Estos estudios permitieron hallar un proceso sencillo y de bajo costo para transformar un valioso efluente de la industria quesera, el suero de queso, en un producto fisico-químico y microbiológicamente estable y organolépticamente aceptable. Esto se logró por una combinación de tratamiento térmico moderado, control y ajuste de la actividad acuosa, disminución del pH y agregado de sorbato de potasio. El suero de estas características puede ser almacenado a 30°C durante 3 meses como mínimo sin sufrir alteraciones microbiológicas. Al concluir este almacenamiento, el suero conserva adecuadamente sus características organolépticas y retiene entre el 70 y

80% de la lisina disponible inicialmente presente. Por lo tanto, este producto estable a temperatura ambiente y de considerable valor nutritivo, representa no sólo una solución económica al problema de contaminación, sino un importante aporte como fuente adicional de proteínas para la elaboración de alimentos para consumo humano y animal.





6. REFERENCIAS

Acker, L. (1962). Enzymic reactions in food of low moisture content. Adv. Food Res., 11: 263.

Acott, K.A. and Labuza, T.P. (1975 a). Inhibition of Aspergillus niger in an intermediate moisture food system. J. Food Sci., 40: 137.

Alais, C. Ciencia de la leche. Compañía Editorial Continental, S.A., Barcelona, 1971.

Alzamora, S.M. and Chirife, J. (1984). The water activity of 1,3 and 2,3 butylene glycol solutions. Lebensm. Wiss. u. Technol., 17: 268.

Ayerest, G. (1969). The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. J. Stored. Prod. Res., 5: 127.

Baird-Parker, A.C. and Freame, B. (1967). Combined effect of water activity, pH and temperature on the growth of Clostridium

botulinum from spore and cell inocula. J. Appl. Bacteriol., 30: 420.

Bakshi, A.S. and Johnson, R.M. (1983). Calorimetric studies on whey freeze concentration. J. Food Sci., 48: 1279.

Bartsch, A.G. and Walker, H.W. (1982). Effect of temperature, solute and pH on the tolerance of Clostridium perfringens to reduced water activities. J. Food Sci., 47: 1754.

Bates, R.P., Wu, L.C., and Murphy, B. (1974). Use of animal blood and cheese whey in bread: nutritive value and acceptance. J. Food Sci., 39: 585.

Benmergui, E.A., Ferro Fontán, C. and Chirife, J. (1979). The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. I.  $a_w$  prediction in aqueous single electrolyte solutions. J. Food Technology, 14: 625.

Bergere, J.L. and Hermier, J. (1970). Spore properties of Clostridia occurring in cheese. J. Appl. Bacteriol., 33: 167.

Beuchat, L.R. (1975). Environment factors affecting survival and growth of Vibrio parahaemolyticus. A review. J. Milk Food Technol., 38: 476.

Bodwell, C.E. (1976). Status of chemical methods to determine biologically available lysine in wheat proteins. Proc. 9 th. Natn. Conf. on wheat Utilization, Scatle, 181.

Booth, V.H. (1971). Problems in the determination of FDNB-available lysine. J. Sci. Fd. Agric., 22: 658.

Braverman, J.B.S. (1963). Introduction to the biochemistry of food. Elsevier Publishing Co.

Bromley, L.A. (1973). Thermodynamic properties of strong electrolytes in aqueous solutions. AIChE J., 19: 313.

Buma, T.J. (1980). Viscosity and density of concentrated lactose solutions and of concentrate cheese whey. Neth.Milk Dairy J., 34: 65.

Carpenter, K.J. (1960). The estimation of the available lysine in animal protein foods. Biochem. J., 77: 604.

Carpenter, K.J. and Booth, V.H. (1973). The estimation of the available lysine in animal protein foods. *Biochem. J.*, 77: 604.

Carpenter, K.J. and Ellinger, G.M. (1955). The estimation of available lysine in protein concentrates. *Biochem. J.*, XI: 61.

Chatfield, C. (1978). *Statistics for technology*. J.W. Arrowsmith Ltd., Bristol.

Chirife, J., Favetto, G., and Ferro Fontán, C. (1984). Microbial growth at reduced water activities: Some physicochemical properties of compatible solutes. *J. Applied Bacteriology*, 56: 259.

Chirife, J., Favetto, G., Ferro Fontán, C. and Resnik, S.L. (1983). The water activity of standard saturated salt solutions in the range of intermediate moisture foods. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 16: 36.

Chirife, J. and Ferro Fontán, C. (a) (1980). Prediction of water

activity of aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods: Experimental investigation of the  $a_w$  lowering behavior of sodium lactate and some related compounds. *J. Food Science*, 45: 802.

Chirife, J. and Ferro Fontán, C. (b) (1980). A study of the water activity lowering behavior of polyethylene glycols in the intermediate moisture range. *J. Food Sci.*, 45: 1717.

Chirife, J. and Ferro Fontán, C. (1982). The water activity of fresh foods. *J. Food Sci.*, 47: 661.

Chirife, J., Ferro Fontán, C. and Benmergui, E.A. (1980). The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods IV.  $a_w$  prediction in aqueous non-electrolyte solutions. *J. Food Technol.*, 15: 59.

Chirife, J., Ferro Fontán, C., and Vigo, S. (1981). A study of water activity prediction for molasses solutions. *J. Agricultural and Food Chemistry*, 29: 1085.

Chirife, J., Scorza, O.C., Vigo, M.S., Bertoni, M.H. and Cattaneo,

P. (1978). Preliminary studies on the storage stability of intermediate moisture beef formulated with various water binding agents. J. Food Technol., 14: 421.

Christian, J.H.B. and Stewart, B.J. (1973). Survival of Staphylococcus aureus on Salmonella newport in dried foods, as influenced by water activity and oxygen. In: The Microbiological Safety of Food, ed. B.C. Hobbs and J.H.B. Christian, Academic Press, New York.

CIE (1976). Official recommendations on uniform color spaces, color difference equations and metric color terms. Suppl. N° 2 to CIE Publication N° 15, Colorimetry, Commission Internationale de l'Eclairage, Paris.

Clegg, K.M. (1964). Non enzymic browning of lemon juice. J. Sci. Fd. Agric., 15: 878.

Cole, S.J. (1967). The Maillard reaction in food products. Carbon dioxide production. J. Fd. Sc., 32: 245.

Conkerton, E. and Frampton, N. (1959). Reaction of gossypol with

amino groups of lysine in proteins. Arch. Biochem. Biophys.,  
81: 135.

Corlett, D.A. and Brown, M.H. (1980). pH and acidity in "Microbial Ecology of Foods" Vol. 1pp. 92-111. Academic Press. New York, New York.

Cornwell, C.J. and Wrolstad, R.E. (1981). Causes of browning in pear juice concentrate during storage. J. Food Sci., 46: 515.

Corry, J.E.L. (1978). Relationships of water activity to fungal growth. In Food Beverage Mycology. L.R. Beuchat ed. Avi Publ. Co., West Port.

Coton, G. (1981). Utilization of lactose and modified lactose products in the food industry. Presented at seminar on Dairy Ingredients in Food Industry, Luxemburgo, May. 19-21.

Davidson, P.M., Brekke, C.J., and Branen, A.L. (1981). Antimicrobial activity of butylated hydroxyanisole, tertiary butylhydroquinone, and potassium sorbate in combination. J. Food Sci., 46: 314.

- Davies, R., Birch, G.G. and Parker, K.J. (1976). Intermediate moisture foods. Applied Science Publishers, London.
- Doyle, M.P. and Roman, D.J. (1981). Growth and survival of Campylobacter fetus subsp. jejuni as a function of temperature and pH. J. Food Prot., 44: 596.
- Durán, L. (1971). Medida del color de los alimentos. I. Introducción. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., 11: 168.
- Eichner, K. and Karel, M. (1972). The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions. J. Agr. Food Chem., 20: 218.
- Ellis, G.P. (1959). The Maillard reaction. Adv. Carbohyd. Chem., 14: 63.
- Emodi, A.S. and Lechowich, R.V. (1969). Low temperature growth of type E Clostridium botulinum spores: 1. Effects of sodium chloride, sodium nitrite and pH. J. Food Sci. 34: 78.
- Favetto, G., Resnik, S., Chirife, J., and Ferro Fontán, C. (1983).



Statistical evaluation of water activity measurements obtained with the Vaisala Humicap Humidity Meter. *J. Food Sci.*, 48: 534.

Ferro Fontán, C. and Chirife, J. (1981 b). The evaluation of water activity in aqueous solutions from freezing point depression. *J. Food Technol.*, 16: 21.

Flink, J.M. (1978). Intermediate moisture food product. In the American market-place. *J. of Food Process and Preserv.*, 2: 324.

Fox, M. and Loncin, M. (1982). Investigation into the microbiological stability of water rich foods processed by a combination of methods. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 15:321.

Francis, F.J. and Clydesdale, F.M. (1975). *Food Colorimetry : Theory and applications*. The Avi Publication Company, Inc.

Franks, F. (1982). Water activity as a measure of biological riability and quality control. *Cereal Foods World*, p. 403.

Friedman, M. (1977). Effects of lysine modification on chemical,

physical, nutritive and functional properties of proteins.  
Food Proteins, Avi Co., West Port, Conn., p. 446.

Goldsack, D.E. and Franchetto, R. (1977). The viscosity of concentrated electrolyte solutions. 7. Concentration dependence at fixed temperature. Canadian Journal of Chemistry, 55: 1062.

Hargrove, R.E., Mc Donough, F.E., La Croix, D.E. and Alford, J.A. (1975). Production and properties of deproteinized whey powders. J. of Dairy Science, 59: 25.

Hauschild, A.H.W. and Hilsheimer, R. (1979). Effect of salt content and pH on toxigenesis by Clostridium botulinum in caviar. J. Food Protect., 42: 245.

Hayes, J.F., Dunkerley, J.A., Muller, LL. and Griffin, A.T. (1974). Studies on whey processing by ultrafiltration. Australian J. Dairy Technol., 29: 132.

Heidelbough, N. and Karel, M. (1975). Intermediate moisture food technology. In Freeze drying and advanced food

technology. Edited by S.A. Golblith, L. Rey and W. W. Rothmayr, Academic Press.

Hodge, J.E. (1953). Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Fd. Chem.*, 1: 928.

Hodge, J.E., Mills, F.D. and Fisher, B.E. (1972). Compound of browned flavor derived from sugar-amine reactions. *Cereal Sci. Today*, 17: 34.

Hodge, J.E. and Osman, E.M. (1976). Carbohydrates. In *Principles of Food Science. Part I. Food Chemistry*, pp. 41 (O.R. Fennema, ed.) Marcel Dekker Inc., New York.

Horner, K.J. and Anagnostopoulos, G.D. (1973). Combined effects of water activity, pH and temperature on the growth and spoilage potential of fungi. *J. Appl. Bact.*, 36: 427.

Hunt, R.W.G. (1977). The specification of colour appearance. I. Concepts and terms. *Colour Research and Application*, 2:55.

Hunter, R.S. and Yeatman, J.N. (1961) Direct reading tomato

colorimeter. J. Optical Soc. Am., 51: 552.

Hurrell, R.F and Carpenter, K.J. (1974). Mechanisms of heat damage of proteins. 4. The reactive lysine content of heat-damaged material as measured in different ways. Br. J. Nutr., 32: 589.

Hurrell, R.F and Carpenter, K.J. (1977). Mechanisms of heat damage of proteins. 8. The role of sucrose in the susceptibility of protein foods to heat damage. Br. J. Nutr., 35: 285.

Hurrell, R.F. and Carpenter, K.J. (1981). The estimation of available lysine in foodstuffs after Maillard reactions. Prog. Fd. Nutr. Sci., 5: 159.

Hurrell, R.F., Carpenter, K.J., Sinclair, W.J., Otterburn, M.S. and Asquith, R.S. (1976). Mechanisms of heat damage of proteins. 7. The significance of isopeptides and lanthionine in heated proteins. Br. J. Nutr., 35: 383.

Hurrell, R.F. and Finot, P.A. (1983). Storage of milk powders

under adverse conditions. 1. Losses of lysine and of other essential amino acids as determined by chemical and microbiological methods. Br. J. Nutr., 49: 343.

Informe técnico, Monsanto Company, Nutrition Chemicals Division, St. Louis, 1983.

Jakobsen, M. and Jensen, H.C. (1975). Combined effect of water activity and pH on the growth of butyric anaerobes in canned pears. Lebensm. Wiss. u Technol., 8: 158.

Jakobsen, M. and Murrell, W.G. (1977). The effect of water activity and water activity-controlling solute and sporulation of Bacillus cereus. J. Appl. Bacteriol., 43:239.

Jay, J.M. (1978). "Modern Food Microbiology", 2nd. ed. Von Nostrand Co. New York.

Jelen, P. (1983). Reprocessing of whey and other dairy wastes for use as food ingredients. Food Technology, 37: 81.

Jelen, P. and Coulter, S.T. (1973). Effects of supersaturation

and temperature on the growth of lactose crystals. J. Food Science, 38: 1182.

Josephson, R.V. and Harper, W.J. (1974). Cheese whey-A pollutant or a food resource. Ohio Report, Nov-Dec., pp. 111.

Kaplow, M. (1970). Commercial development of intermediate moisture foods. Food Technology, 24: 889.

Karel, M. and Nickerson, J.T.R. (1964). Effect of relative humidity, air and vacuum on browning of dehydrated orange juice. Food Technol., 18: 1214.

Kleter, G., Lammers, W.L., and Vos, E.A. (1982). The influence of pH and concentration of lactic acid and NaCl on the growth of Clostridium tyrobutyricum in whey and cheese: 1. Experiments in whey. Neth. Milk Dairy J., 36: 79.

Koukima, I., Hayashi, H., Tomochika, K., Aklase, A. and Kanemosa, Y. (1978). Adoptional change in proline and water content of Staphylococcus aureus after alteration of environmental salt concentration. Appl. Environ. Microb., 35: 467.

Labuza, T.P. (1975). Water relations of food. Ed. by R.B. Duckworth, Academic Press, London.

Labuza, T.P. (1980). The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Fd. Technology*, 34: 36.

Labuza, T.P., Acott, K., Tatini, S.R., Lee, R.Y., Flink, J., and McCall, W. (1976). Water activity determination: a collaborative study of different methods. *J. Food Sci.*, 41: 910.

Labuza, T.P. and Saltmarch, M. (1981 a). Kinetics of browning and protein quality loss in whey powders during steady state and nonsteady state storage conditions. *J. Food Sci.*, 47: 92.

Labuza, T.P. and Saltmarch, M. (1981 b). The non-enzymatic browning reaction as affected by water in foods. In "Water Activity Influences on Food Quality", ed. L.B. Rockland, Academic Press, New York.

Labuza, T.P., Tannenbaum, S.R. and Karel, M. (1970). Water

content and stability of low moisture and intermediate moisture foods. *Food Technology*, 24: 543.

Lea, C.H. and Hannan, R.S. (1949). The effect of activity of water, pH and of temperature of the primary reaction between casein and glucose. *Biochem. biophys. Acta*, 3:313.

Lee, C.M., Lee, T.C. and Chichester, C.O. (1979). Kinetics of the production of bilidically active Maillard browned products in apricot and glucose-L-tryptophan. *J. Agric. Food Chem.*, 27: 478.

Li, K.C., Heaton, E.K., Boggess, T.S.Yr., and Shewfelt, A.L. (1974). Improving fruit quality with intermediate moisture process. *Food Prod. Dev.*, 8: 52.

Loncin, M., Bimbenet, J.J. and Lenges, J. (1968). Influence of the activity of water in the spoilage of foodstuffs. *J. Food Technology*, 1: 131.

Loncin, M., Jacqmain, D., Tutundjian-Provost, A.M., Lenges, J.P. and Bimbenet, J.J. (1965). Influence de l'eau sus les



- réactions de Maillard. C.R. Acad. Sc. (Paris), 260: 3208.
- Lotter, L.P. and Leistner, L. (1978). Minimal water activity for enterotoxin A production and growth of Staphylococcus aureus. Appl. Environ. Microb., 36: 377.
- Lozano, R.D. (1978). El color y su medición. Editorial América Lee, Buenos Aires.
- Lozano, R.D. (1979). Diferencias de color. Investigación y Ciencia, 39: 8.
- Lupín, H.M., Boeri, R.L., and Moschiar, S.M. (1981). Water activity and salt content relationship in moist salted fish products. J. Food Technology, 16: 31.
- Mac Bean, R.D. (1979). Lactose crystallization and lactose hydrolysis. New Zealand J. Dairy Sci. Technol., 14: 113.
- Mackinney, G. and Little, A.C. (1962). Color of foods. The Avi Publ. Co. Inc., Westpoint, Conn.
- Maier, V.P. and Schiller, F.H. (1959). Studies on domestic dates.

- I. Methods for evaluating darkening. *Fd. Technol.*, 14: 139.
- Maillard, L.C. (1916). Synthèses des matières humiques par action des acides aminés sur les sucres réducteurs. *Ann. Chem.*, 6: 258.
- Mattews, M. (1979). Advances in whey processing - UF and RO. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, 14: 86.
- Mauron, J. (1981). The Maillard reaction in food; a critical review from the nutritional standpoint. *Prog. Fd. Nutr. Sci.*, 5: 5.
- Miracco, J.L., Alzamora, S.M., Chirife, J. and Ferro Fontán, C. (1981). On the water activity of lactose solutions. *J. Food Science*, 46: 1612.
- Morr, C.V. (1984). Production and use of milk proteins in food, 47: 39.
- Nickerson, T.A. (1977). Lactose sources and recovery; in: *Developments in Food Carbohydrate*, edited by G.G. Birch

and R.S. Shallenberger, pp. 77, Applied Science Pub., London.

Nickerson, T.A. and Moore, E.E. (1972). Solubility interrelations of lactose and sucrose. J. Food Science, 37: 60.

Norrish, R.S. (1966). An equation for the activity coefficient and equilibrium relative humidities of water in confectionary syrups. J. Food Technol., 1: 25.

Ohye, D.F. and Christian, J.H.B. (1967). Combined effects of temperature, pH and water activity on growth and toxin production by Cl. botulinum types A, B and E. In "Botulism. 1966". M. Ingram and T.A. Roberts, eds. p. 217. Chapman and Hall, Ltd., London.

Parada, J.L., Chirife, J., and Magrini, R.C. (1982). Effect of BHA, BTA, and potassium sorbate on growth of Staphylococcus aureus in a model system and process cheese. J. Food Technol., 13: 715.

Patton, S. (1955). Browning and associated changes in milk and

its products. A review. *J. Dairy Sci.*, 38: 457.

Petriella, C., Resnik, S.L., Lozano, R.D., and Chirife, J. (1985). Kinetics of deteriorative reactions in model systems of high water activity: 1. Color changes due to non-enzymatic browning. *J. Food Sci.*, in press.

Pitt, J.I. (1975). Xerophilic fungi and the spoilage of food of plant origin. In R.B. Dukworth ed. *Water relations of foods*. Ac. Press Inc. London.

Pitt, J.I. and Christian, J.H.B. (1968). Water relations of xerophilic fungi isolated from prunes. *Appl. Microb.*, 16: 1853.

Pitzer, K.S. (1973). Thermodynamics of electrolytes I. Theoretical basis and general equations. *J. of Physical Chem.*, 77:268.

Pitzer, K.S. and Mayorga, G. (1973). Thermodynamics of electrolytes II. Activity and osmotic coefficient for strong electrolytes with one or both ions univalent. *The J. of Phys. Chem.*, 77: 2300.

- Powrie, W.D., Wu, C.H., Rosin, M.P. and Stich, H.F. (1981).  
Clastogenic and mutagenic activities of Maillard reaction  
model systems. J. Fd. Sci., 46: 1433.
- Radewonuk, E.R., Strolle, E.O. and Craig, Jr., J.C. (1983).  
Freezing points of skim milk concentrates. J. Dairy  
Science, 66: 2061.
- Rao, S.R., Carter, F.L. and Frampton, V.L. (1963). Determination  
of available lysine in oilseed meal proteins. Anal. Chem.,  
35: 1927.
- Resnik, S.L., Peltt, E.A. und Loncin, M. (1981). Untersuchungen  
zur nicht-enzymatischen Bräunungsreaktion in flüssigen  
Modellsystemen, ZFL 32: 213.
- Reyes, F.G.R., Poocharoln, B. and Wrolstad, R.E. (1982). Maillard  
browning reaction of sugar-glycine model systems: Changes  
in sugar concentration, color and appearance. J. Food  
Sci., 47: 1376.
- Reynolds, T.M. (1965). Chemistry of nonenzymatic browning II.

Adv. Fd. Res., 14: 167.

Robinson, R.A. and Stokes, R.M. (1965). Electrolyte solutions, 2nd edn., revised Butterworths, London.

Rockland, L.B. and Stewart, G.F. (1981). Water activity: Influences of Food Quality. Ac. Press. New York.

Ross, K.D. (1975). Estimation of water activity in intermediate moisture foods. Food Technology, 13: 715.

Rowlin, J.S. (1969). Liquids and Liquids Mixtures, 2nd. ed. Butterworths, London.

Schingoethe, D.J. (1975). Whey utilization in animal feeding: A summary and evaluation. Journal of Dairy Science, 59: 3.

Schobert, B. (1979). Die akkumulierung Von prolin in phaedactylum tricornutum und die Funktion der "compolible solutes" in pflanzenzellen unter wasserstres Berichte der Deutschen Botanischen Gesell Schaft, 92: 23.

Scholey, J. and Rowlinson, P. (1974). The role of sulphur dioxide

in food processing. Chemistry and Industry, 716.

Scott, W.J. (1953). Water relations of Staphylococcus aureus at 30°C. Aust. J. Biol. Sci., 6: 549.

Scott, W.J. (1957). Water relations of food spoilage microorganisms. Adv. Food Rev., 7: 83.

Snow, D., Crichton, M.H.G., and Wright, N.C. (1944). Mold deterioration of feeding stuffs in relation to humidity of storage. Ann Appl. Biol., 32: 102.

Sofos, J.N. and Busta, F.F. (1981). Antimicrobial activity of sorbate. J. of Food Protection, 44: 614.

Spark, A.A. (1969). Role of aminoacids in non-enzymatic browning. J. Sci. Fd. Agric., 20: 308.

Sperber, W.H. (1983). Influence of water activity on food borne bacteria- A review. J. Food Protection, 46: 142.

Spielgerberg, C.H. (1944). Sugar and salt tolerance of Clostridium

pasteurianum and some related anaerobes. J. Bacteriol., 48: 13.

Spreer, E., (1973). Lactologia industrial. Ed. Acribia.

Stadtman, E.R. (1948). Non enzymatic browning in fruit products. Adv. Food. Res., 1: 325.

Stern, N.J., Pierson, M.D. and Kotula, A.W. (1980). Effects of pH and sodium chloride on Yersina enterocolitica growth at room and refrigeration temperatures. J. Food Sci., 45: 64.

Tatini, S.R. (1973). Influence of food environments on growth of S. aureus and production of various toxins. J. Milk Food Technology, 36: 559.

Taufel, K., Iwainsky, H. and Bergner, H. (1956). Analytische und chromatographische Studien zur Millard Reaktion. IV. Ernahrungs forschung, 1: 719.

Tilbury, P.H. (1980). Xerotolerant (osmophilic) yeast. In "Biology and Activities of Yeast". ed. F.A. Skinner, S.M. Passmore,



and R.P. Davenport. Academic Press, New York.

Townsend, C.T. (1939). Spore-forming anaerobes causing spoilage in acid canned foods. Food Res., 4: 231.

Troller, J.A. (1971). Effects of water activity on enterotoxin B production and growth of Staphylococcus aureus. Appl. Microb. 21: 435.

Troller, J.A. (1973). Effect of water activity and pH on Staphylococcal enterotoxin B production. Acta Aliment., 2: 351.

Troller, J.A. (1979). Food spoilage by microorganisms tolerating low water activity environments. Food Technology, 72.

Troller, J.A. (1980). Influence of water activity on microorganisms in food. Food Technol., 34(5): 76.

Troller, J.A. and Christian, J.H.B. (1978). Water Activity and Food. Academic Press, Inc., New York, New York.

Troller, J.A. and Stinson, J.V. (1975). Influence of water

activity and temperature on Staphylococcus aureus growth and thermonuclease production in smoked snock. J. Food Prot., 43: 370.

Underwood, J.C., Lento, H.G. and Willits, C.O. (1959). Browning of sugar solutions. Fd. Res., 24: 181.

Vaamonde, G., Chirife, J., and Scorza, O.C. (1982). An examination of the minimal water activity for Staphylococcus aureus ATCC 6538 P growth in laboratory media adjusted with less conventional solutes. J. Food Sci., 47: 1259.

Van der Berg, C. and Bruin, S. (1978). Water activity and its estimation in food systems: Theoretical aspects. Sec. Int. Symp. on Prop. of water in Relation to Food Quality and Stability, Japan.

Vigo, M.S., Chirife, J., Scorza, O.C., Cattaneo, P., Bertoni, M.H. y Sarrailh, P. (1979). Estudios sobre alimentos tradicionales de humedad intermedia elaborados en la Argentina. Determinación de la actividad acuosa, pH, humedad y sólidos solubles. Rev. Agroq. Tecnol. Aliment., 21: 91.

- Von Schelhorn, M. (1950). Untersuchungen über den Verberb wasserwarmer Lebensmittel durch osmophile Mikroorganismen. I. Verberb von Lebensmittel durch osmophile Hefen. 2. Lebensm.-Unters Forsch., 21: 117.
- Vos, P.T. and Labuza, T.P. (1974). Technique for measurement of water activity in the high  $a_w$  range. J. Agric. Food Chem., 22: 326.
- Waibel, P.E. and Carpenter, K.T. (1972). Mechanisms of heated damage in proteins. 3. Studies with glutamic L lysine. Br. J.Nutr., 27: 29.
- Wesberg, S.M. (1976). New Protein Foods, 2, B, 52, Academic Press, New York.
- Wesley, P. (1981). Automated UF system yields 80 percent whey protein. Food Rev., 15: 38.
- Willits, C.O., Underwood, J.C., Lento, H.G. and Ricciuti, C. (1958). Browning of sugar solutions. I. Effect of pH and type of amino acid in dilute sugar solutions. Food

Research, 23: 61.

Wingerd, W.H. (1970). Lactoalbumin as a food ingredient. J. of Dairy Sci., 54: 234.

Wodzinski, R.J. and Frazier, W.C. (1960). Moisture requirements of bacteria. I. Influence of temperature and pH on requirements of Pseudomonas fluorescens. J. Bacteriol., 79: 572.

Wodzinski, R.J. and Frazier, W.C. (1961, a). II. Influence of temperature, pH and malate concentration on requirements of Aerobacter aerógenes. J. Bacteriol., 81: 353.

Wodzinski, R.J. and Frazier, W.C. (1961, b). Influence of temperature, pH, malate and thiamine concentration on requirements of Lactobacillus viridescens. J. Bacteriol., 81: 359.

Wolf, W., Spiess, W.E.L. and Jung, G. (1973). Die Wassedampfsorptionisothermen einiger in der Literatur bislang Weningberücksichtigten. Lebensmittel. Lebensm. Wiss u

Technol., 6: 94.

Zall, R.R. (1983). Trends in whey fractionation and utilization.  
A global perspective. In proc. of 1983. Am. Dairy Sci.  
Assoc. Meetings, Madison, WI.

Zee, B. and Von Luin, F.J.P. (1983). Neth. Milk Dairy J., 37: 51.

7. TABLAS DE DATOS

Corrida N° 1:  $a_w = 0,92$ ,  $pH = 5,4$ ,  $T = 30^\circ C$

Tiempo (días)	X	Y	Z
0	64,85	68,83	50,83
14	63,76	67,02	51,20
31	61,00	63,61	47,21
45	60,21	62,67	45,17
60	58,92	61,06	43,11
75	56,95	58,71	40,53
91	54,72	56,14	37,58

Corrida N° 2:  $a_w = 0,94$ ,  $pH = 5,2$ ,  $T = 30^\circ C$

Tiempo (días)	X	Y	Z
0	67,63	71,40	56,42
14	65,15	68,40	54,08
31	62,82	65,64	50,15
45	62,31	64,92	48,80
60	60,58	62,94	46,31
75	59,34	61,46	44,56
91	58,36	60,31	43,08

Corrida N° 3:  $a_w = 0,92$ ,  $pH = 5,4$ ,  $T = 38^\circ C$

Tiempo (días)	X	Y	Z
0	65,74	69,90	52,86
9	59,73	69,22	45,31
17	56,49	58,30	41,31
28	50,91	51,81	33,77
38	46,74	47,12	30,28
48	38,78	38,25	21,30
56	36,78	35,18	19,08

Corrida N° 4:  $a_w = 0,94$ ,  $pH = 5,2$ ,  $T = 38^\circ C$

Tiempo (días)	X	Y	Z
0	67,70	71,48	56,72
9	62,18	64,86	49,93
17	58,93	61,11	44,57
28	51,51	52,51	35,44
48	39,59	39,28	23,28
56	38,45	38,05	22,40

Corrida N° 5:  $a_w = 0,92$ ,  $pH = 5,4$ ,  $T = 45^\circ C$

Tiempo (días)	X	Y	Z
0	66,50	70,36	54,28
4	61,88	64,75	48,93
8	58,30	60,33	44,08
13	52,67	53,77	36,92
18	48,02	48,47	32,03
22	44,18	44,21	27,16
26	41,07	40,79	24,15

Corrida N° 6:  $a_w = 0,94$ ,  $pH = 5,2$ ,  $T = 45^\circ C$

Tiempo (días)	X	Y	Z
0	67,20	71,03	56,80
4	62,90	65,81	51,18
8	60,36	62,77	47,25
13	57,41	58,98	42,30
18	51,88	52,60	35,36
22	48,20	48,50	31,66
26	44,90	44,88	28,22



Corrida N° 7:  $a_w = 0,900$ ,  $pH = 5,2$ ,  $T = 30^\circ C$

Tiempo (días)	X	Y	Z
0	64,94	68,78	52,40
15	60,55	63,05	48,03
30	57,94	60,27	43,82
59	54,62	56,18	40,38
76	51,58	52,79	36,25
90	49,83	50,65	34,41

Corrida N° 8:  $a_w = 0,925$ ,  $pH = 5,2$ ,  $T = 30^\circ C$

Tiempo (días)	X	Y	Z
0	65,81	69,58	53,63
15	61,42	64,07	48,21
30	59,08	61,37	45,54
45	57,03	58,93	42,93
59	54,92	56,54	40,62
76	53,39	54,74	38,20
90	52,20	53,07	36,57

Corrida N° 9:  $a_w = 0,900$ , pH = 5,2, T = 30°C

Tiempo (días)	X	Y	Z
0	56,25	59,43	38,25
17	56,91	59,99	38,31
31	55,92	58,79	36,76
45	53,10	55,39	33,60
60	51,11	53,03	30,25
75	49,52	51,06	28,28
104	47,00	48,06	24,69

Corrida N° 10:  $a_w = 0,900$ , pH = 5,2, T = 45°C

Tiempo (días)	X	Y	Z
0	55,71	58,90	37,64
4	53,40	56,00	34,69
8	51,62	53,55	32,39
12	49,67	50,95	29,86
16	45,98	46,67	25,69
20	42,85	42,89	22,93

PRESERVACION DE SUERO DE QUESO POR METODOS COMBINADOS

FE DE ERRATAS

Página 18, tabla 8, debe decir : (kg . 10<sup>6</sup>)

Página 21, Tabla 9, debe decir : Composición del concentrado de proteínas de suero (CPS) y leche en polvo descremada (LPD) (a)

Página 28, ecuación 3, debe decir :  $\mu_1 - \mu_1^0 = \Delta\mu_1 = R T \ln( f_1/ f_1^0)$

Página 43, línea 12, debe decir :  $p_i = x_i p_i^0$

Página 46, línea 9, debe decir :  $A = 0,392$  a 25<sup>o</sup>C (coeficiente de Debye-Hückel)

Página 49, línea 2, debe decir :  $m_1 =$  peso molecular del solvente/ 1000

Página 52, ecuación 18, debe decir :

$$d\ln(a_w) = - \frac{1}{55,5} \sum_{i=1}^n m_i d\ln(m_i \gamma_i')$$

Página 53, ecuación 20, debe decir :

$$d\ln(a_w) = - \frac{1}{55,5} \left[ m_1 d\ln(m_1 \gamma_1^0) + m_2 d\ln(m_2 \gamma_2^0) + m_3 d\ln(m_3 \gamma_3^0) + \dots \right]$$

Página 152, figura 9, debe decir : Actividad de agua de soluciones de suero de queso dulce. Los valores de  $a_w \geq 0,975$  fueron derivados de mediciones de descenso crioscópico y los valores de  $a_w < 0,975$  fueron medidos con higrómetro.

Página 161, línea 14, debe decir : La figura 22 muestra los cambios producidos en el recuento de mesófilas aeróbicas en suero dulce concentrado comercial ( $a_w = 0,942$  - pH = 5,80) y en suero dulce concentrado modificado por una combinación de  $a_w$ , pH y agregado de sorbato de potasio.