



EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GALACTO-
OLIGOSACÁRIDOS (GOS) UTILIZANDO UNA β - GALACTOSIDASA
A PARTIR DE LA LACTOSA DEL LACTOSUERO

DINA LUZ BOHÓRQUEZ NAVARRO

Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Biología

Director:

Ph.D. Jairo Guadalupe Salcedo Mendoza

Co-Director

MSc Euriel Millán Romero

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
SINCELEJO
2016

Notas de aceptación:

Firma de presidente del jurado

Firma del jurado 2

Firma del jurado 3

Sincelejo, (27, Octubre, 2016)

DEDICATORIA

A Dios, por iluminar mi vida con su presencia, guiarme en todo instante; darme entendimiento, sabiduría y fortaleza en los momentos que sentí desfallecer y permitirme lograr una meta más de mi proyecto de vida.

A mis padres quienes con su gran amor, esfuerzo, consejos y apoyo incondicional han contribuido en la realización de mis sueños, respaldándome con sus oraciones y por darme todo lo que soy como persona, mis valores, principios, empeño y perseverancia.

A mis hermanos Days, Delys y Luis José por su apoyo incondicional; por ser mis compañeros y motivo de lucha y superación.

A mi abuela, por sus sabios consejos y por llevarme siempre en sus oraciones y de más familiares quienes en todo momento me brindaron su confianza, comprensión y respaldo.

Dina Bohórquez Navarro

AGRADECIMIENTOS

Al Ph.D. Jairo Salcedo Mendoza, Director de mi trabajo de grado y Director científico del grupo “PADES” por sus conocimientos, apoyo incondicional, orientación y dedicación, que han sido pilares en el desarrollo de este trabajo y en mi formación como investigadora.

Al Magister, Euriel Millán Romero, Co-Director de mi trabajo de grado por su disposición y apoyo.

A la universidad de Sucre y docentes que contribuyeron en mi formación de postgrado.

A mis compañeros del grupo PADES, en especial a los Ingenieros Agroindustriales: Rober Betín, Jorge Pérez, Carlos Restrepo, Karen Contreras, Maria Camila y Maria V por su amistad, colaboración y aportes en el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeros de Maestría por sus aportes y amistad.

A los laboratorios de Microbiología, Ciencias Biomédicas y Planta Piloto; y auxiliares (Arturo Doncel, José Gregorio y Libardo) por su atención y servicios.

A la empresa COLQUESOS, por su contribución para con el desarrollo de este trabajo.

Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en este trabajo. Artículo 12 Resolución 02 – 03.

TABLA DE CONTENIDO

págs.

RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN	14
1.1 ESTADO DEL ARTE.....	16
1.2 MARCO TEÓRICO.....	22
1.2.1 GENERALIDADES SOBRE LACTOSUERO	22
1.2.1.1 Composición	22
1.2.1.2 Clases de lactosuero	23
1.2.1.3 Usos y aplicaciones.....	24
1.2.2 Galactooligosacáridos (GOS)	26
1.2.2.1 β - Galactosidasa.....	27
1.2.2.2 Transgalactosilación	29
1.2.2.3 Los GOS y los alimentos funcionales.....	30
1.2.2.4 Producción de Galactooligosacáridos (GOS)	32
1.2.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)	34
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3.1 caracterización fisicoquímica del lactosuero	38
3.1.1 Densidad	38
3.1.2 Acidez	38
3.1.3 pH.....	39
3.1.4 Sólidos totales	39
3.1.5 Lactosa	39

3.1.6 Proteína	39
3.1.7 Grasa	40
3.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLOGÍA DEL LACTOSUERO	40
3.2.1 Recuentos de aerobios mesófilos	41
3.2.2 Recuento de coliformes totales y fecales	41
3.2.3 Recuento de mohos y levaduras.....	41
3.3 CARACTERIZACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES PRESENTES EN EL LACTOSUERO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)	41
3.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR).....	42
3.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SOLUCIÓN	42
3.5 PRODUCCIÓN DE GALACTOOLIGOSACARIDOS (GOS)	43
3.6 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GALACTOOLIGOSACARIDOS (GOS)	44
3.7 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL COMPORTAMIENTO DE LA SÍNTESIS DE GOS EN LACTOSUERO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT- IR)	44
4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL LACTOSUERO	45
4.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL LACTOSUERO PASTEURIZADO	46
4.2.1 Recuentos de aerobios mesófilos	46
4.2.2 Recuento de coliformes totales y fecales	47
4.2.3 Recuento de mohos y levaduras.....	47
4.3 CARACTERIZACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES PRESENTES EN EL LACTOSUERO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)	47
4.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SOLUCIÓN	48
4.5 PRODUCCIÓN DE GALACTOOLIGOSACARIDOS (GOS)	49

4.6 EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE GALACTOOLISACARIDOS (GOS).....	55
4.7 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL COMPORTAMIENTO DE LA SÍNTESIS DE GOS EN LACTOSUERO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT- IR)	58
4.7.1 Espectros Base	59
4.7.1.1 Glucosa	59
4.7.1.2 Galactosa.....	60
4.7.1.3 Lactosa	61
4.7.1.4 Lactosuero.....	62
4.7.2 Análisis de espectros base.....	62
4.7.3 Comparación entre el espectro FT- IR del lactosuero nativo con los espectros FT- IR de los lactosueros hidrolizados.....	63
4.7.4 Análisis estructural de la acción de la β -galactosidasa en la hidrólisis del lactosuero.	64
6. RECOMENDACIONES.....	72
7. REFERENCIAS.....	73

LISTA DE TABLAS

	pags
Tabla 1. Composición de lactosuero dulce y ácido.....	23
Tabla 2. Lista de oligosacáridos identificados durante la obtención de GOS (Gal: Galactosa, Glu: Glucosa).	26
Tabla 3. Regiones del espectro infrarrojo	35
Tabla 4. Características de la β -galactosidasa proveniente de la levadura <i>Kluyveromyces lactis</i> (Lactozym Pure 6500L).....	42
Tabla 5. Diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial.....	44
Tabla 6. Caracterización fisicoquímica del lactosuero entero y pasterizado	45
Tabla 7. Concentraciones de lactosa después de la hidrólisis.....	49
Tabla 8. Formación de GOS a 5 horas de reacción.....	54
Tabla 9. Análisis de varianza para la formación de GOS - Suma de Cuadrados Tipo III	55
Tabla 10. Análisis de Varianza para la formación de GOS para el modelo	56
Tabla 11. Longitud de onda (cm^{-1}) y grupo funcional (enlaces) de las bandas de absorción infrarroja de la glucosa en la región 800 - 1400 cm^{-1} en el espectro FTIR.	59
Tabla 12. Longitud de onda (cm^{-1}) y grupo funcional (enlaces) de las bandas de absorción infrarroja de la galactosa en la 800 - 1400 cm^{-1} en el espectro FTIR.	60
Tabla 13. Longitud de onda (cm^{-1}) y grupo funcional (enlaces) de las bandas de absorción infrarroja de la lactosa en la 800 - 1400 cm^{-1} en el espectro FTIR.	61
Tabla 14. Análisis de espectros bases y señales (cm^{-1}) que coinciden en la región 800 – 1400 cm^{-1}	63
Tabla 15. Altura de picos tomados de una línea base de 932 – 840 cm^{-1} que indican la formación de anillos de carbohidratos.	66
Tabla 16. Altura de picos tomados de una línea base de 1190 - 1107 cm^{-1} que indican las vibraciones del enlace C-O-C.....	68

LISTA DE FIGURAS

	págs.
Figura 1. Estructura química de la lactosa. Wattiaux, 2008.-----	25
Figura 2. Fórmula estructural de los galactooligosacáridos. (Gal: galactosa, Glu: Glucosa, p: grado de oligomerización > 1). Adaptado de Martínez-Villaluenga et al., 2008).-----	27
Figura 3. Mecanismo de acción de la β - galactosidasa en la síntesis de GOS. Fuente: Rodríguez, 2015. Estudio de la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i> . Extraído de Colinas, 2013.-----	29
Figura 4. Mecanismo de reacción para la transgalactosilación e hidrólisis de lactosa por β – galactosidasa. Fuente: Villarreal, 2014. Evaluación de la producción de galactooligosacáridos a partir de materias primas lácteas con β -galactosidasa inmovilizada. Adaptado de Zhou, Q.Z, 2001. -----	30
Figura 5. Proceso de producción industrial de GOS. Fuente: Guerrero & Vera, 2010. Síntesis de Galactooligosacáridos con β -galactosidasa de <i>Aspergillus oryzae</i> . Matsumoto <i>et al.</i> , 1990.-----	33
Figura 6. Asignación de las observadas en un espectro IR a las vibraciones moleculares. Fuente: Hernández, 2013.-----	36
Figura 7. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR) del lactosuero nativo. -----	48
Figura 8. Producción de azúcares reductores del preparado enzimático de β -galactosidasa. (E/S) _{1,2y3} : relación enzima - sustrato -----	50
Figura 9. Producción de glucosa durante las 5 horas de reacción. -----	52
Figura 10. Diferencias entre el comportamiento de los azúcares totales y la glucosa durante la reacción. -----	53
Figura 11. Diagrama de Pareto para la velocidad de formación de GOS -----	57
Figura 12. Diagrama de superficie de respuesta para la formación de GOS-----	58
Figura 13. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) de la glucosa -----	59

Figura 14. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) de la galactosa -----	60
Figura 15. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) de la lactosa -----	61
Figura 16. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) del lactosuero nativo -----	62
Figura 17. Análisis entre los espectros FT-IR bases de los monosacáridos (glucosa y galactosa), disacárido (lactosa) con el lactosuero nativo en la región 800 – 1400 cm ⁻¹ -----	63
Figura 18. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) del Lactosuero nativo y lactosueros hidrolizados -----	64
Figura 19. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) del Lactosuero hidrolizado (45C – E_S 0.00592)-----	65
Figura 20. Espectro de FT – IR de los lactosueros hidrolizados para la formación de anillos de carbohidratos -----	66
Figura 21. Varios oligómeros de distinta longitud de cadena, obtenidos por transgalactosilación de la lactosa con β -galactosidasa. Fuente: Zeus Química, S.A -----	67
Figura 22. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) de las vibraciones del enlace C-O-C -----	68

LISTA DE ANEXOS

	Págs.
ANEXO A	88
Protocolo para la determinación de la actividad enzimática de la enzima comercial de tipo β -galactosidasa proveniente de la levadura <i>Kluyveromyces lactis</i> (Lactozym Pure 6500L).	
ANEXO B	90
Determinación de glucosa (método de la glucosa oxidasa peroxidasa. GOD-PAD)	
ANEXO C	92
Método para determinar lactosa por DNS (MILLER, 1959)	

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la producción de galactooligosacáridos (GOS) a partir de la lactosa del lactosuero, usando una enzima β -galactosidasa comercial. Se caracterizó fisicoquímica, microbiológica y estructuralmente el lactosuero por espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR). Se determinó la actividad enzimática del preparado enzimático comercial (*Kluyveromyces lactis*). La síntesis de los GOS se realizó en un reactor por lotes a diferentes temperaturas (40, 45 y 50 °C) y relaciones enzima – sustrato (E/S) (0,0103, 0,0154 y 0,00592 ml de preparado enzimático/g de lactosa) en un tiempo de reacción de 5 horas; obteniéndose la mejor velocidad de formación de GOS a 45 °C y a la más baja relación enzima – sustrato equivalente a 43,39 gr de GOS/h. El efecto de la temperatura de reacción, la relación enzima- sustrato (E/S) y la interacción entre ellas tienen un efecto significativo sobre la producción de GOS. Las mejores condiciones de operación con la enzima comercial β -galactosidasa, se encontraron en la región comprendida entre las temperaturas de 43°C - 47°C y relaciones (E/S) de 0,00592 – 0,0103 ml de preparado enzimático / g de lactosa. Mediante espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) se analizó el comportamiento de la síntesis de GOS a partir del lactosuero, evidenciándose la aparición de nuevas señales en las muestras hidrolizadas de lactosuero asociadas a la formación de enlaces C-O, C-C y C-O-C.

Palabras Claves: lactosuero, β -galactosidasa, enzima - sustrato producción de galactooligosacáridos (GOS)

ABSTRACT

In this research the production of galactooligosaccharides (GOS) from lactose whey, using a commercial enzyme β -galactosidase, was assessed. The properties Physico-chemical, microbiological and structurally by spectroscopy Infrared Fourier Transform (FT- IR) were characterized. The enzymatic activity of commercial enzyme preparation (*Kluyveromyces lactis*) was determined. Synthesis of GOS in a batch reactor at different temperatures (40, 45 and 50 °C) and enzyme – substrate ratio (0.0103, 0.0154 and 0.00592 ml enzyme prepared/ g lactose) in a reaction time of 5 hours was performed; the best formation of GOS to 45 °C and the lowest enzyme-substrate ratio (E/S) was equivalent to 43,39 g GOS/h. The effect of the reaction temperature, the enzyme- substrate ratio (E/S) and the interaction between them have a significant effect on the production of GOS. The best operating conditions with commercial enzyme β -galactosidase were found in the defined region between temperatures of 43 °C - 47 °C and ratios (E/S) of 0,00592 and 0,0103 ml of enzyme/ g of lactose. By infrared spectroscopy with Fourier Transform (FTIR) behavior synthesis GOS from whey was analyzed, showing the appearance of new signals in the hydrolyzed samples whey associated with the formation of C-O, C-C and C-O-C.

Key words: whey, β -galactosidase, enzyme-substrate, production of galactooligosaccharides (GOS)

INTRODUCCIÓN

La industria de alimentos es uno de los sectores productivos que se ha caracterizado por generar mayor impacto sobre el medio ambiente; dentro de este sector están los lácteos, los cuales han contribuido en la problemática ambiental por generar una gran variedad de residuos orgánicos e inorgánicos con características contaminantes, como es el lactosuero, que es descartado en grandes proporciones como efluente (Restrepo, 2006). Esta industria está enfrentada a las regulaciones ambientales encaminadas a prohibir el vertimiento del lactosuero en fuentes naturales, por su carácter corrosivo y alta carga de materia orgánica (Aider *et al.*, 2009).

Aproximadamente el 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero. Se estima que el volumen de este residuo es aproximadamente de 7 a 10 veces mayor que el queso producido, dependiendo del tipo de queso (Londoño, 2006). En Colombia, Según DANE-ENA, los departamentos con mayor producción de leche son Antioquia (18,5%), Cundinamarca (16,3%), Boyacá (11,7%) y Nariño (6,0%) y para el año 2012, se registró para estos departamentos un total de 10 millones de kg de queso comercializado, donde se obtuvieron aproximadamente 90.000.000 L de lactosuero (Martínez, 2012).

En la Región Caribe un 70% del total de la producción lechera se destina a la elaboración de queso; destacándose, los departamentos de Sucre y Córdoba con un alto desarrollo en la producción de quesos frescos de manera artesanal e industrial. En Sucre, el sector lácteo constituye uno de los pilares de su economía, con un aporte en el mercado nacional de 472.374 litros diarios aproximadamente, en donde el 85% es destinado a la transformación principalmente a la elaboración de queso costeño (Olivero *et al.*, 2011; Gobernación de Sucre, 2010).

El lactosuero generado en estos procesos es uno de los residuos más contaminantes de la industria alimentaria. Cada 1.000 litros de lactosuero generan cerca de 35 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y cerca de 68 kg de demanda química de oxígeno (DQO) (Jelen, 1979; Liu *et al.*, 2005). Esta fuerza contaminante es equivalente a la de las aguas negras producidas en un día por 450 personas (Recinos & Saz, 2006). La lactosa, constituye la mayor parte del potencial contaminante del lactosuero, siendo el componente que aporta la mayoría de la carga orgánica, de

ahí que resulten de interés las diversas posibilidades para la utilización de dichos azúcares (Sánchez *et al.*, 2004).

Debido a los altos volúmenes generados de lactosuero en la industria quesera y su potencial contaminante, es importante el desarrollo de tecnologías para la conservación y aprovechamiento de este residuo como base de alimentos, preferentemente para el consumo humano que permitan darle un valor agregado (Londoño, 2006).

Aunque existen muchas investigaciones sobre la utilización de lactosa presente en el lactosuero, la industria lechera todavía tiene la necesidad de nuevas tecnologías para convertir la lactosa en productos alimentarios de alto valor, como son los ingredientes prebióticos (Yang & Silva, 1995). En el desarrollo de esta investigación se evaluó la producción de galacto-oligosacáridos (GOS), utilizando una enzima β -galactosidasa comercial a partir de la lactosa del lactosuero; estos productos tienen actividad prebiótica que poseen múltiples beneficios para la salud (Sako *et al.*, 1999).

1. MARCO REFERENCIAL

1.1 ESTADO DEL ARTE

Existen diversas investigaciones acerca de la producción de GOS a partir de la hidrólisis de lactosa por acción de la enzima β -galactosidasa donde han trabajado con diferentes sustratos como lactosa, lactosuero en polvo y deshidratado a diferentes temperaturas, concentraciones de lactosa y dosis de enzima. Cada estudio pretendía buscar las condiciones óptimas para obtener el mayor rendimiento en la formación de GOS.

Reuter & Rusborg (1999) desarrollaron la síntesis de GOS con la β -galactosidasa de *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergillus oryzae* y *Escherichia coli* a diferentes temperaturas y concentraciones de lactosa, mediante reacción de transgalactosilación donde la enzima *solfataricus* dió los rendimientos más altos (48%), seguido por el *A. oryzae* (36%) y la *E.coli* β -galactosidasas (32%). Los principales productos obtenidos con *solfataricus* fueron Gal-[1-6]-D-GlcNAc, D-Gal-[1-4]-D-GlcNAc y varios oligosacáridos, la enzima *A. oryzae* dio un patrón de productos similares pero en menores rendimientos, el principal disacárido Gal-[1-6]-D-GlcNAc que se formó con la *E.coli* β -galactosidasa y otros productos que fueron detectados en pequeñas cantidades.

Gaur *et al.*, (2005) reportaron la síntesis de GOS utilizando la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* inmovilizada por tres métodos diferentes, adsorción, enlace covalente de quitosano y la agregación de enlaces cruzados; las cuales fueron comparadas en términos del rendimiento del preparado inmovilizado, características enzimática, estabilidad y eficiencia en la síntesis de oligosacáridos del 20 % (p/v) de lactosa utilizada, la inmovilización con quitosano dió el rendimiento máximo en la síntesis de oligosacáridos (17,3 del total de azúcar) en comparación con la enzima libre (10%) en 2 h a 40°C y en la agregación de enlaces cruzados encontraron la efectiva hidrólisis de lactosa en 12 h produciendo el 78% de monosacáridos.

Martínez *et al.*, (2007) en su estudio sobre la optimización de las condiciones para la formación de GOS durante la hidrólisis de lactosa a partir de la β -galactosidasa *Kluyveromyces*

lactis (Lactozym 3000 L HPG) realizaron la síntesis durante 300 minutos a temperaturas de 40, 50 y 60 °C, pH de 5,5 , 6,5 y 7,5 y concentraciones de lactosa 150, 250 y 350 mg/ml, donde la mezcla de los productos fueron analizados por cromatografía de intercambio aniónico con detección amperométrica (HPAEC-PAD) durante la hidrólisis de lactosa; además de la glucosa y galactosa se formaron como resultado de transgalactosilación catalizada por la enzima la galactobiosa, alolactosa y 6' galactosil- lactosa; donde los efectos de las condiciones de la reacción fueron diferentes en la formación de di y trisacáridos; por lo tanto, las condiciones óptimas para la síntesis de galactobiosa y alolactosa. fueron a 50°C, pH de 6,5 y 250 mg/ml, mientras que las mejores condiciones de reacción para la producción 6' galactosil - lactosa fueron a 40°C, pH 7,5 y 250 mg/ml.

Sanz (2009) evaluó la factibilidad de usar diversas lactasas microbianas inmovilizadas sobre tela de algodón, para la producción de GOS a partir de lactosa y posterior purificación por técnica cromatográfica, usando una resina comercial de intercambio catiónico Dowex 50W. Estudió primeramente la producción de GOS a partir de la lactosa con lactasas de *Aspergillus oryzae*, *Bacillus circulans* y *Kluveromyces lactis*. La cantidad total, tipos y tamaños de GOS producidos se vieron afectados por el tipo de enzima y la concentración inicial de lactosa en el medio de reacción. En general, se logró más producción de GOS a la mayor concentración inicial de la lactosa. Con 400 g / L de solución de lactosa, se logró un contenido máximo de GOS del 40 % (p / p) con la lactasa *B. circulans* seguido de *K. lactis* con 31 % de GOS y la *A. oryzae* con el 27 % GOS. La adición de galactosa inhibe la enzima, reduciendo tanto el rendimiento de GOS y la velocidad de reacción.

Guerrero & Vera (2010) en su estudio de la síntesis por lotes de galacto-oligosacáridos utilizando un preparado enzimático de β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, la enzima produce GOS-2, GOS-3, GOS-4 y GOS-5 siendo caracterizados mediante cromatografía de masa y en la síntesis por lotes obtuvieron un porcentaje máximo de GOS de 25,11 %, con un rendimiento de 0,54 g GOS/ g lactosa, una conversión del 46,37 % y una productividad volumétrica y específica de 4,53 g GOS/min/L y 9,9 g GOS/min/g enzima, respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo reportados por Albayrak & Yang (2002) quienes utilizando el mismo preparado enzimático inmovilizado en tela de algodón encontró que la β -galactosidasa

de *A. oryzae* produce trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos y hexasacáridos. Sin embargo, otros autores como Prenosil *et al.*, (1987) han encontrado que la β -galactosidasa de *A. oryzae* produce principalmente trisacáridos y tetrasacáridos, además de monosacáridos, Cheng *et al.*, (2006) utilizando β -galactosidasa de *A. oryzae* reporta sólo la producción de trisacáridos.

Huerta *et al.*, (2011) en la síntesis de GOS a concentraciones muy altas de lactosa con la β -galactosidasa *Aspergillus oryzae* inmovilizada, la enzima fue inmovilizada en glicoxil-agarosa. La síntesis fue optimizada con respecto a la concentración de lactosa y la relación enzima-sustrato, usando lactosa para la conversión de GOS como objetivo. Los valores óptimos fueron del 54,6% (p/v) lactosa y 33 UI g⁻¹ de lactosa y en tales condiciones la conversión fue cercana al 30% similar a la obtenida con la β -galactosidasa soluble y comparada con los mejores valores reportados para la β -galactosidasa inmovilizada. En la producción de lotes secuenciales de GOS la eficiencia del biocatalizador se incrementó en un 190% con respecto a la enzima libre en solución y 8500g de GOS por gramo de enzima preparada se produjeron después de 10 lotes.

Sosa-Ancona *et al.*, (2011) estudiaron la síntesis de GOS utilizando β -glicosidasa hipertermofílica en altas concentraciones de lactosa para favorecer la reacción de transgalactosilación. La síntesis de GOS la llevaron a cabo en reactores de 20 mL a una temperatura de reacción de 90°C; a diferentes concentraciones de lactosa: 5, 10, 20 y 30%; tomaron muestras a los 30, 60, 90 y 120 min. Para la determinaron de carbohidratos presentes en la muestras utilizaron HPLC con una columna Rezex. Durante la reacción enzimática identificaron la síntesis de trisacáridos (GOS3) y tetrasacáridos (GOS4) en las diferentes concentraciones de lactosa. En el caso del GOS3 el incremento en su concentración fue constante incluso hasta una concentración de 30% de lactosa inicial; sin embargo, en el caso del GOS4 no fue así pues a esta concentración de lactosa hubo un decremento en la formación del GOS4. Así como aumenta la concentración de lactosa inicial (de 5% a 20%), la formación de GOS, también aumenta; sin embargo, al llegar a la concentración de 30% de lactosa disminuye la formación de GOS.

Vera *et al.*, (2012) estudiaron el efecto de la relación enzima – sustrato, concentración inicial de lactosa y la temperatura, en el control cinético de la reacción de transgalactosilación de la

lactosa con β - galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, para producir GOS prebóticos. La relación enzima- sustrato no tuvo efecto significativo en el rendimiento máximo y productividad específica. Evaluaron la síntesis de GOS a concentraciones altas de lactosa (40, 50 y 60%, p / p, lactosa monohidrato) y a diferentes temperaturas (40, 47,5 y 55 °C). Dentro de estos rangos, la lactosa se pudo conocer como una solución sobresaturada o un sistema heterogéneo con lactosa precipitada; lo que resultó en un efecto significativo en la síntesis de GOS. Un aumento de la concentración inicial de lactosa, produjo un ligero aumento del rendimiento máximo en el tiempo en que la lactosa permaneció disuelta. Un aumento de la temperatura produjo una ligera disminución en el rendimiento máximo y un aumento en la productividad específica, cuando se produjo la sobresaturación de la lactosa durante la reacción. Obtuvieron el mayor rendimiento de 29 g GOS / 100 g a una concentración inicial de lactosa monohidrato del 50% (p / p) a 47,5 °C y obtuvieron la mayor productividad específica de 0,38 g GOS h⁻¹ mg enzima⁻¹ a la concentración inicial de lactosa monohidrato del 40% (p / p) y 55 °C, donde alcanzaron un rendimiento máximo de 27 g GOS / 100 g de lactosa añadida. Esto refleja la compleja interacción entre la temperatura y la concentración inicial de lactosa en la reacción de síntesis. Cuando se produjo la precipitación de lactosa, los valores de los rendimientos y productividades específicas fueron inferiores a 22 g GOS / 100 g de lactosa añadida y 0,03 g GOS h⁻¹ mg de enzima⁻¹ respectivamente.

Beltrán & Acosta (2012) evaluaron los efectos del pH, temperatura y concentración de la enzima sobre lactosuero, empleando una β -galactosidasa comercial de *Kluyveromyces lactis* y determinaron los parámetros cinéticos de la enzima. La hidrólisis de la lactosa la desarrollaron tanto en soluciones tamponadas de lactosa como en lactosuero, evaluaron 5 niveles para el pH (4,5 - 8,5), temperatura (25°C-65°C) y concentración de enzima (0,025 g/L - 0,5 g/L). A un pH de 6,5 y una temperatura de 45°C, alcanzaron las mejores condiciones de hidrólisis del lactosuero. De acuerdo a los resultados cinéticos, la enzima presentó inhibición competitiva por galactosa con un Km igual a 8,01x10⁻²M, Ki de 6,85x10⁻²M y Vmax de 1,86x10⁻²molmg⁻¹min⁻¹.

Barrale (2014) realizó ensayos de incubación de soluciones de distintas concentraciones de lactosa de 5, 10 y 20 %, con la adición de diferentes niveles de 0,16, 0,25 y 0,40 g/L de la enzima β -galactosidasa comercial (GODO YNL-2, Shusei Company Limited, Japón); evaluó la hidrólisis de la lactosa y la producción de GOS (niveles de hidrólisis/transgalactosilación) a diferentes

tiempos. Durante la incubación tomó muestras a los 40, 60, 100 y 180 minutos. Las muestras fueron analizadas en cuanto a su perfil de carbohidratos (lactosa, glucosa, galactosa y GOS) por cromatografía líquida con detector de índice de refracción (Perkin Elmer). En todas las experiencias observó una disminución de la concentración de lactosa, y un incremento de los monosacáridos glucosa y galactosa durante la incubación. Asimismo, observó la aparición de un pico en el inicio de los cromatogramas con un tiempo de retención similar al trisacárido rafinosa, y que se identificó como galactooligosacáridos (GOS).

Guío (2014) evaluó la producción de GOS usando lactosa y lactosuero deshidratado (lactosuero) con la enzima Lactozym 6500 L libre e inmovilizada. La síntesis la realizó a 30, 40 y 50 ° C, pH 5,5, 6,0 y 6,5, concentración de lactosa 300, 400 y 500 g L⁻¹, y relación en peso enzima / lactosa de 1,00, 1,25 y 1,50. La β-galactosidasa se inmovilizó por atrapamiento en alginato de calcio y unión covalente en sílica gel 60. Ambas enzimas inmovilizadas se caracterizaron con o-nitrofenol--D-galactopiranosido (ONPG), antes de la producción de GOS para determinar la retención de la actividad. El rendimiento de producción de GOS obtenidos para la enzima libre fue de 32,7% y 24,5% con lactosa y lactosuero, respectivamente. La inmovilización sobre sílica gel tratada mostró una retención de actividad enzimática del 41,8%, en comparación con la técnica de atrapamiento con sólo el 18,4%.

Castro *et al.*, (2015) compararon la producción de GOS a partir de lactosuero en polvo y lactosa usando *Aspergillus oryzae* y la enzima β- galactosidasa libre; su objetivo fue evaluar la producción de GOS a escala de laboratorio por medio fermentativo aplicando *Aspergillus oryzae* var. *effusus* y por reacción enzimática usando β-galactosidasa comercial, utilizando como sustrato, lactosa y lactosuero en polvo con una concentración inicial de 11% de lactosa en los dos casos. La concentración inicial del hongo en el medio fue de 2.9x10⁷ esporas por mililitro, la duración de la fermentación fue de 24 horas, para la β-galactosidasa la reacción duró 12 horas. La producción de GOS con la enzima fue de 43,91% con lactosa y 44,45% con suero, para el hongo la producción ascendió a 41,36% con lactosa y 43,27% con suero, estos resultados no presentan diferencias significativas de acuerdo al análisis estadístico. Las mayores producciones significativas de acuerdo al análisis estadístico; la alcanzaron a la hora 16 para la fermentación con el hongo y a la hora 10 para el proceso enzimático.

Tokošová *et al.*, (2015) estudiaron tres diferentes β - galactosidasas fungicas, a partir de tres fuentes comerciales, por su capacidad para producir galactooligosacáridos por trans - galactosilación a partir de la lactosa. Para la producción de GOS, emplearon las enzimas en forma soluble y a dos concentraciones de lactosa (10 % y 30 % p / p). La máxima concentración de GOS (70,9 g x L⁻¹) la obtuvieron al 30 % de lactosa inicial (pH 4,5 ,temperatura 30 ° C) en la segunda hora de la reacción enzimática. El rendimiento de GOS (24 % p / p) no se afectó significativamente por el proceso de inmovilización en comparación con el preparado de enzima libre (22 % p / p), pero el tiempo para obtener una concentración máxima GOS fue prolongado. Los GOS fueron producidos efectivamente por β - galactosidasas inmovilizadas en 15 lotes repetidos de 30 % (p / p) de lactosa como sustrato.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 Generalidades Sobre Lactosuero

En la fabricación del queso, la leche es coagulada logrando separar dos fases: la cuajada, que posteriormente es escurrida y prensada dando lugar al queso, y un líquido translúcido amarillento denominado lactosuero; obteniéndose cantidades 7 a 10 veces mayores de lactosuero que de queso producido (Callejas *et al.*, 2012; Monsalve & González, 2005). Se estima que a partir de 10 litros de leche de vaca se puede producir de 1 a 2 kg de queso y un promedio de 8 a 9 kg de lactosuero; el costo asociado con la disposición de este gran volumen de lactosuero es substancial. Ya que representa cerca del 80 - 90% del volumen de la leche durante el proceso de elaboración del queso y contiene la mayor parte de los compuestos hidrosolubles de ésta, el 95% de lactosa (azúcar de la leche), el 25% de las proteínas y el 8% de la materia grasa de la leche (Parra, 2010).

1.2.1.1 Composición

La composición del lactosuero varía considerablemente dependiendo de la calidad de la leche, tipo de queso producido y el proceso de tecnología empleado para la elaboración del queso. A su vez dependiendo del pH al que se separa el lactosuero de la cuajada; es decir en función de su acidez, el lactosuero se divide en ácido ($\text{pH} < 5$), medio ácido ($\text{pH} 5 - 5,8$) y dulce ($\text{pH} > 5,8$); en cualquiera de los dos tipos de lactosuero entre los nutrientes más abundantes están la lactosa, proteínas solubles, minerales como el potasio, calcio, fósforo, sodio, magnesio y las vitaminas del grupo B (Londoño, 2008). Cerca del 70% de la proteína cruda que se encuentra en el lactosuero corresponde a proteínas con un valor nutritivo superior al de la caseína, como son β -lactoglobulina, α -lactoglobulina, inmunoglobulinas, proteosa-peptonas y enzimas nativas; sin embargo, la composición de éstos varía debido a las vías por las cuales se obtienen, esto hace referencia a la vía enzimática y ácida por las cuales se elabora el queso (Almécija, 2007). En la Tabla 1, se presenta la composición nutricional de ambos tipos de lactosuero.

Tabla 1. *Composición de lactosuero dulce y ácido*

Componente	Lactosuero dulce (g/L)	Lactosuero ácido (g/L)
Sólidos totales	63,0 - 70,0	63,0 - 70,0
Lactosa	46,0 - 52,0	44,0 - 46,0
Proteína	6,0 - 10,0	6,0 - 8,0
Calcio	0,4 - 0,6	1,2 - 1,6
Fosfatos	1,0 - 3,0	2,0 - 4,5
Lactato	2,0	6,4
Cloruros	1,1	1,1

Fuente: Callejas *et al.*, 2012. Adaptado de Panesar *et al.*, 2007.

1.2.1.2 Clases de lactosuero

Existen dos clases de lactosuero, los cuales dependen de los métodos empleados para la coagulación de la leche. El lactosuero dulce procedente de la coagulación enzimática por el uso de enzimas proteolíticas o “cuajo”, éstas actúan sobre las caseínas de la leche y las cortan o rompen”, haciendo que estas se desestabilicen y precipiten, todo esto bajo condiciones específicas de temperatura (15-50°C), pH levemente ácido (5,9 – 6,6) producto de la incorporación de cultivos lácteos e iones de calcio. La principal enzima utilizada para realizar este proceso es la quimosina o renina (Parra, 2009). Este lactosuero es el más empleado por la industria y tiene una composición química más estable, lo que permite estimar los valores medios de composición.

El lactosuero ácido se obtiene de la coagulación ácida o láctica de la caseína, presentando un pH próximo a 4,5. Se produce al alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína presente, en este punto, la carga eléctrica neta de la proteína es igual a cero lo cual produce que la micela de caseína se desestabilice y precipite, dejando en solución solamente las proteínas de tipo séricas. Es un suero muy mineralizado pues contiene más del 80% de los minerales de la leche de partida. En éste, el ácido láctico secuestra el calcio del complejo de paracaseinato cálcico, produciendo lactato cálcico (Almécija, 2007; Alvarado *et al.*, 2010; Parra, 2009).

1.2.1.3 Usos y Aplicaciones

A nivel mundial, el lactosuero se ha convertido en un aliado para la innovación y el crecimiento de la industria de alimentos y bebidas con su utilización en la fabricación de productos de alto valor nutricional (contiene alrededor del 50% de los nutrientes de la leche) y funcional que contribuyen a la alimentación de la población. La presencia de nutrientes se refleja en su alta carga orgánica con valores de DBO5 de 40.000 – 50.000 ppm y DQO de 60.000 – 80.000 ppm (Bernadette, 2014).

Actualmente, el 70% se industrializa, especialmente en países desarrollados, y un 30% se emplea en la alimentación animal, como fertilizante o como residuo. La unión Europea, Estados Unidos y Australia son los grandes productores de suero de leche en polvo; el mercado global de lactosuero en polvo con un precio por libra alrededor 0,66 dólares y para Colombia se constituye en una oportunidad de desarrollo industrial y para ampliar la base de consumos lácteos en el país (Poveda, 2013).

El valor nutricional del lactosuero le atribuye múltiples propiedades funcionales adecuadas para ser utilizado no sólo en la alimentación sino también en la medicina y farmacología, constituyéndose en una excelente materia prima para obtener diferentes productos a nivel tecnológico o como medio de formulación en procesos fermentativos. Es un sustrato económico con un gran número de usos comerciales del cual se han obtenido una gama de productos como etanol, ácidos orgánicos, bebidas fermentadas, aislados e hidrolizados de proteína y derivados de la lactosa entre otros (Almeida *et al.*, 2009; Koutinas *et al.*, 2009).

La lactosa (β -D-galactosil-D-glucosa, $C_{12}H_{22}O_{11}$) es un disacárido compuesto por una molécula de glucosa vinculada por enlace glicosídico β -1,4 a una molécula de galactosa. Ésta se encuentra presente en la leche de todos los mamíferos. Su concentración aproximada en la leche de mamíferos se sitúa entre 2,0% y el 10% p/v y en la leche humana representa aproximadamente un 7% p/v (Álvarez, 2013). Entre sus propiedades encontramos: tiene un débil sabor dulce en comparación con otros azúcares, carácter reductor debido a la presencia de un grupo aldehído libre, por acción de enzimas o de ácidos diluidos en caliente se hidroliza en sus dos componentes:

glucosa y galactosa (Figura 1). Una característica distintiva de la lactosa es su existencia en diferentes formas dependiendo de la temperatura e interrelaciones físico-químicas, por ejemplo en soluciones acuosas está presente en una forma α y β (Fox & McSweeney, 1998).

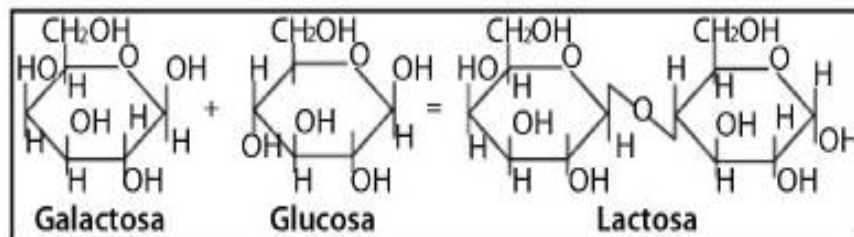


Figura 1. Estructura química de la lactosa. Wattiaux, 2008.

Existen dos usos principales de la lactosa: la alimentaria, con un mínimo de 99% de lactosa y la farmacéutica con un mínimo de 99,8% de lactosa (ODEPA, 2008); paralelamente a ello existe un gran interés en darle un uso no alimenticio, siendo utilizada como excipiente en la formulación de tabletas en la industria farmacéutica, como sustrato para la fermentación de varios productos tales metano, etanol, ácidos orgánicos entre otros; además, puede ser utilizada como materia prima en la síntesis de derivados alimenticios como lactitol, lactosacarosa y galactooligosacáridos (GOS), estos últimos con propiedades prebióticas, lo que sería su aplicación más novedosa y de gran interés porque ofrecen una alternativa de revalorización de la lactosa (Audic & Chaufer, 2003).

En cuanto al contenido de proteínas, éstas tienen un beneficio nutricional por lo que pueden ser usados como ingredientes alimenticios; la alfa- lactoalbumina, segunda proteína del lactosuero más abundante que tiene un alto contenido de triptofano, precursor de la vitamina niacina, la cual funciona como coenzima en la síntesis de lípidos y la utilización de carbohidratos; además funciona mejorando la tonicidad de la piel y la función digestiva (Bernadette, 2014). Las proteínas del lactosuero, β -lactoglobulina y α -lactoalbumina contribuyen a las propiedades funcionales de los ingredientes de proteínas y en las formulaciones de alimentos; dentro de estas propiedades se tienen la solubilidad, hidratación, emulsificación, textura y consistencia, formación de espuma, emulsificación y gelificación de las proteínas de lactosuero (Spellman et al., 2009).

1.2.2 Galactooligosacáridos (GOS)

Los GOS, son oligosacáridos formados por la unión de un número variable de moléculas de galactosa a una molécula de glucosa terminal; presentándose entre las unidades de galactosa-glucosa los enlaces β -(1-3), y β -(1-6) siendo predominante el enlace β -(1-4) (Tabla 2). La Figura 2, muestra la fórmula química general de los GOS como D-Galactosa – D-(Galactosa) p – D-Glucosa, siendo p el grado de oligomerización que varía entre 1 y 3. Se obtienen por transgalactosilación a partir de la lactosa; aunque, también se encuentran presentes de forma natural en la leche y en alimentos comunes como frutas, vegetales y miel (Crittenden *et al.*, 1996; Rastall, 2010).

Tabla 2. Lista de oligosacáridos identificados durante la obtención de GOS (Gal: Galactosa, Glu: Glucosa)

Compuesto GOS	Estructura Química	
Disacáridos	β -D-Gal(1 - 6)-D-Glc	Alolactosa
	β -D-Gal(1 - 6)-D-Gal	Galactobiosa
	β -D-Gal(1 - 3)-D-Glc	
	β -D-Gal(1 - 2)-D-Glc	
	β -D-Gal(1 - 3)-D-Gal	
Trisacáridos	β -D-Gal(1 - 6)- β -D-Gal(1 - 6)-D-Glc	6´dilactosil-glucosa
	β -D-Gal(1 - 6)- β -D-Gal(1 - 4)-D-Glc	6´galactosil-lactosa
	β -D-Gal(1 - 6)- β -D-Gal(1 - 6)-D-Gal	6´galactotriosa
	β -D-Gal(1 - 3)- β -D-Gal(1 - 4)-D-Glc	3´galactosil-lactosa
Tetrasacáridos	β -D-Gal(1 - 4)- β -D-Gal(1 - 4)-D-Glc	4´galactosil-lactosa
	β -D-Gal(1 - 6)- β -D-Gal(1 - 6)- β -D-Gal(1 - 4)-D-Glc	6´digalactosil-lactosa
	β -D-Gal(1 - 3)- β -D-Gal(1 - 6)- β -D-Gal(1 - 4)-D-Glc	
Pentasacáridos	β -D-Gal(1 - 6)- β -D-Gal(1 - 6)- β -D-Gal(1 - 6)- β -D-Gal(1-4)-D-Gln	6´trigalactosil-lactosa

Fuente: Calvacante & Pastore, 2015. Galactooligosacáridos: producción, beneficios para la salud, aplicación en alimentos y perspectiva. Adaptado de Mahoney, 1998.

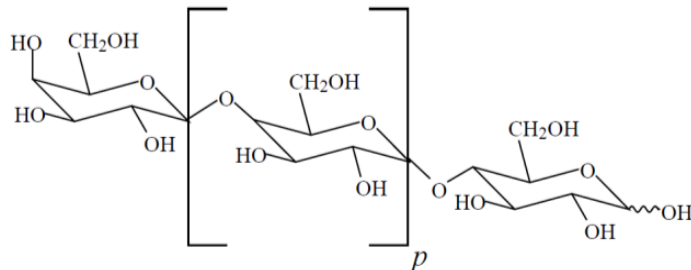


Figura 2. Fórmula estructural de los galactooligosacáridos. (Gal: galactosa, Glu: Glucosa, p: grado de oligomerización > 1). Adaptado de Martínez-Villaluenga et al., 2008).

Los GOS se clasifican dentro del grupo de los oligosacáridos no digeribles (NDOs), son de bajo peso molecular y presentan importantes propiedades fisicoquímicas y fisiológicas; alguno de ellos con características prebióticas (Thammarutwasik *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2010). Son compuestos que resisten las enzimas digestivas gastrointestinales de los humanos por lo que son solubles y alcanzan intacto el intestino, actuando de esta manera como fibra dietaria soluble (SDF) (Panesar *et al.*, 2010; Sako *et al.*, 1999). Varios estudios demuestran que estos oligosacáridos pueden mejorar la absorción de minerales tales como calcio y magnesio y retardar el desarrollo del cáncer de colón (Cardelles, 2009; Meyer, 2002).

Los países donde se han realizado los mayores avances de éstos compuestos han sido en la Comunidad Europea, Corea del Sur y Japón, sitios donde el uso de endulzantes artificiales es prohibido en alimentos; encontrándose, en estos oligosacáridos nuevos compuestos con estas características y una alternativa prometedora; también por las propiedades que presentan los GOS han tenido un desarrollo comercial importante en países como Japón, Holanda y recientemente en Australia, para ser empleados en las industrias de alimentos y farmacéutica (Crittenden *et al.*, 1996; Gosling *et al.*, 2010; Yang, S-T & Bednarcik, 2001). Durante el 2005 fueron producidas únicamente en Japón seis mil toneladas de GOS (Taniguchi, 2005).

1.2.2.1 β - Galactosidasa

Los GOS pueden ser sintetizados por los métodos clásicos de síntesis química a partir de simples azúcares y por la acción catalítica de la β -galactosidasa sobre lactosa.

La β -galactosidasa (β -D-galactosido galacto hidrolasa) es una hidrolasa que cataliza la hidrólisis de β - galactosidos en sus monosacáridos correspondientes; es muy importante en la industria alimentaria, farmacéutica y clínica. Esta enzima fue una de las primeras en ser aisladas y purificadas a partir de diversas fuentes naturales como plantas, órganos de animales y microorganismos (Rastall, 2010; Richmond *et al.*, 1981; Yang, S-T & Bednarcik, 2001).

Una de las funciones de la β -galactosidasa es hidrolizar enlaces o-glucosídicos de residuos β -D- galactosa terminales y no reductores, mediante reacciones de transgalactosilación, la cual origina la formación de cadenas 4' o 6'-galactosil-lactosa, entre cadenas más largas de oligosacáridos y algunos disacáridos transgalactosilados. Sin embargo, no todas la β -galactosidasas muestran actividad frente a lactosa. Esto ocurre con la β -galactosidasas de células vegetales y de los órganos animales distintos al intestino, siendo su función biológica la hidrólisis de residuos galactosilados presentes en glucolípidos, glicoproteínas y mucopolisacáridos (Macfarlane *et al.*, 2007).

Las β -galactosidasas de origen microbiano son las más relevantes a nivel de aplicabilidad industrial e importante debido a su potencial biotecnológico. Muchas fuentes de microorganismos productores de β -galactosidasa son conocidos, pero sólo un número limitado de microorganismos ha sido usado en la industria. La mayoría de estas enzimas provienen de levaduras como *Kluyveromyces lactis*; la cual es una β -galactosidasa muy importante en sectores como el alimentario o farmacéutico, la *Kluyveromyces fragilis* y la β -galactosidasa proveniente de hongos como *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* (Pereira *et al.*, 2012). La elección de las enzimas de levadura y fúngicas principalmente se debe a que son baratas y están generalmente reconocidas como seguras (GRAS) para su uso en alimentos (Nakayama & Amachi, 1999).

El origen de la enzima β -galactosidasa permitirá que ella produzca diferentes tamaños o tipos de GOS; la enzima de *B. circulans* producirá GOS-2 y GOS-3 y en menor cantidad GOS-4 y GOS-5; la *Kluyveromyces spp.* Mayor GOS-2 y algunos GOS-3, mientras que la enzima *A. oryzae* mayor cantidad de GOS-3 y una pequeña cantidad de GOS-4, siendo esta última muy utilizada en alimentos y de bajo costo (Boon & Janssen, 2000; Cheng *et al.*, 2006). También existen otras fuentes enzimáticas las cuales no han sido aprobadas aún para uso alimenticio, son muy

costosas o no existen en cantidades suficiente (Albayrak & Yang, 2002; Hansson & Adlercreutz, 2001; Onishi & Tanaka, 1996). Otros factores como la temperatura de reacción, cantidad de enzima a utilizar, valor de pH, son parámetros que determinan la cantidad de GOS que se podrá producir y la velocidad de reacción de conversión de lactosa en menor tiempo posible a GOS (Cardelle *et al.*, 2008).

1.2.2.2 Transgalactosilación

Los GOS pueden ser obtenidos por reacciones de transgalactosilación catalizadas por β -galactosidasas durante la hidrólisis de la lactosa. Aunque a lo largo de los años han sido varios los mecanismos propuestos para la acción de esta enzima se ha demostrado que muchas β -galactosidasas de diferentes orígenes microbianos poseen dos residuos de ácido glutámico Glu482 y Glu551 que actúan; respectivamente, como donador de protones y como nucleófilo, de manera simultánea en la reacción enzimática (Goulas *et al.*, 2007; Ladero *et al.*, 2002).

La β galactosidasa cataliza la transferencia de una unidad de galactosa presente en un β -galactósido como la lactosa, a un aceptor que contiene un grupo hidroxilo (Zhou & Chen, 2001). Esto se da a través de un mecanismo general de reacción propuesto en tres pasos: En el primer paso se forma el complejo enzima-galactosa y la liberación simultánea de la glucosa. Posteriormente, el complejo enzima-galactosa sufre un ataque nucleofílico transfiriéndose a otro aceptor con un grupo hidróxilo. Cuando la transferencia se realiza al agua produce galactosa y si la transferencia es a otro carbohidrato como la lactosa, se producen di- tri- y/o GOS de mayor grado de oligomerización (Figura 3) (Rodríguez, 2015).

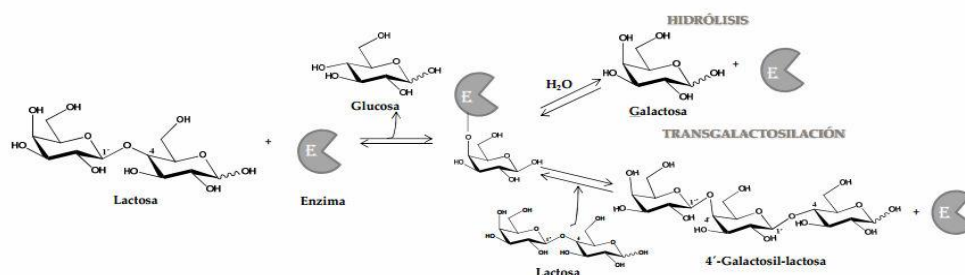


Figura 3. Mecanismo de acción de la β - galactosidasa en la síntesis de GOS. Fuente: Rodríguez, 2015. Estudio de la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*. Extraído de Colinas, 2013.

La formación de GOS viene determinada por un balance entre las reacciones: hidrólisis y transgalactosilación y por la concentración inicial de lactosa. Cuando se tienen soluciones con baja concentración de lactosa y aumenta la concentración de agua en el sistema, se favorece la hidrólisis dándose la formación de galactosa. Mientras que la reacción de transgalactosilación aumenta a concentraciones elevadas de lactosa y con una disminución de la concentración de agua, la molécula de lactosa actúa de nuevo como aceptor formándose una serie de GOS con diferentes grado de polimerización (reacción de hidrólisis y transgalactosilación) (Figura 4) (Michelon *et al.*, 2014; Neri *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2010; Villarreal, 2014; Zhou & Chen, 2001).

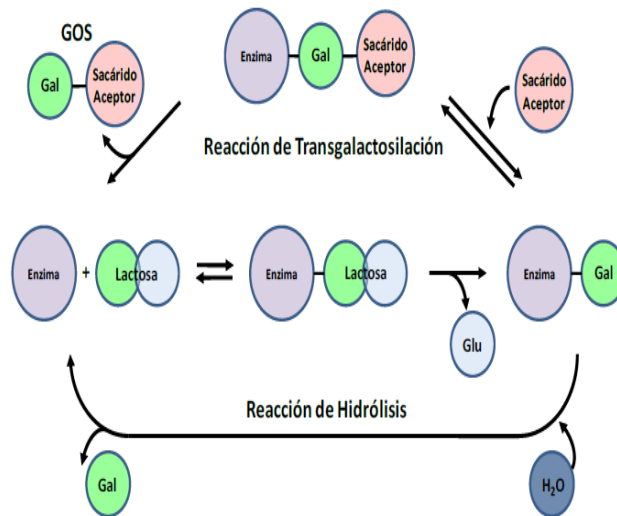


Figura 4. Mecanismo de reacción para la transgalactosilación e hidrólisis de lactosa por β – galactosidasa. Fuente: Villarreal, 2014. Evaluación de la producción de galactooligosacáridos a partir de materias primas lácteas con β -galactosidasa inmovilizada. Adaptado de Zhou & Chen, 2001.

1.2.2.3 Los GOS y los alimentos funcionales

Un alimento funcional se define como un ingrediente alimenticio que, además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas del organismo que lo consume, le proporciona beneficios para la salud; por lo que, se les denomina también alimentos saludables. Este concepto nació en Japón, en los años 80, debido a la necesidad de garantizar una mejor calidad de vida, a la vista de

las elevadas inversiones sanitarias originadas por el aumento de la longevidad de la población (Cardelle-Cobas, 2009; Villareal, 2014). Este tipo de alimentos tiene una larga tradición en países orientales donde muchos alimentos tradicionales han sido reconocidos como promotores de la salud. Intentando una mayor precisión, favorecen una o más funciones fisiológicas en el cuerpo humano, mejorando la condición física general y/o reduciendo el riesgo de enfermedad (Macfarlane *et al.*, 2007; Illanes, 2015).

Los alimentos funcionales pueden ser alimentos naturales, alimentos a los que se les ha adicionado, removido o modificado algún componente o a los que se les ha modificado la biodisponibilidad de alguno de ellos (Illanes, 2015). Actualmente, existe una gran variedad de compuestos que tienen una determinada actividad funcional y que podrían utilizarse como ingredientes alimentarios o suplementos dietéticos (Corzo *et al.*, 2015). Dentro de esta clasificación se encuentran los alimentos simbióticos los cuales se componen de una mezcla de probióticos y prebióticos (Meléndez *et al.*, 2011). De todos ellos, uno de los grupos de gran interés en los últimos años y de mayor relevancia en la industria alimentaria; es el de los prebióticos, ya que apuntan a promover la salud intestinal y un gran sector de la población está afectado por problemas relacionados con la misma (Cardelle- Cobas, 2009; Saarela *et al.*, 2002; Illanes, 2015).

Los prebióticos según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), son componentes no vivos de los alimentos que confieren un beneficio saludable al huésped, asociado con la modulación de la microbiota (Meléndez *et al.*, 2011). De todos los ingredientes alimentarios (NDOs), éstos son los más relevantes; debido a su estructura química, son resistentes a la absorción gastrointestinal y a la hidrólisis por las enzimas digestivas, siendo considerados como ingredientes del colon (Gibson *et al.*, 2004). Dentro del grupo de los oligosacáridos con efecto prebiótico que ya existen; se distribuyen de manera comercial y han sido lo más estudiados hasta el momento, son los fructooligosacáridos (FOS) y los GOS (Piñeiro *et al.*, 2007; Roberfroid *et al.*, 2007).

Los GOS están incluidos dentro del grupo de oligosacáridos (NDOs); de acuerdo con sus propiedades fisiológicas; su principal efecto es el estímulo sobre el crecimiento de las bifidobacterias y lactobacilos. Como consecuencia de su proliferación, se producen una serie de

efectos beneficiosos para el hospedero: promoción del crecimiento de la microbiota saludable del colon, estimulación del sistema inmunológico, prevención de la diarrea, alivio de los síntomas de la intolerancia a la lactosa, retardo del desarrollo de cáncer de colon, incremento en la absorción de minerales, alivio del estreñimiento, modulación de la ansiedad y la depresión y estimulación de la síntesis de antibióticos (Macfarlane *et al.*, 2007; Roberfroid *et al.*, 2007).

Otras de las propiedades características de los GOS, son su solubilidad en agua y su sabor dulce, por lo general entre 0,3 y 0,6 veces el sabor dulce de la sacarosa. Esta propiedad de los GOS y demás oligosacáridos, depende de la estructura y peso molecular, así como el nivel de mono y disacáridos presentes en la mezcla (Morales & Vélez, 2013). Por su característica respecto al sabor, son bastante usados en la producción de alimentos si se desea tener un compuesto que reduzca el sabor dulce y se puedan resaltar otros sabores en el producto final (Crittenden *et al.*, 1996; Mussatto & Mancilha, 2007; Panesar *et al.*, 2010; Sako *et al.*, 1999).

En Comparación con los mono- y disacáridos, el alto peso molecular de los GOS incrementa la viscosidad de los sistemas a los que son incorporados; otra característica que tiene en los alimentos a los que se adicionan, es su alta capacidad de retención de humedad, previniendo excesiva sequedad y una baja actividad del agua, que es conveniente en un control adecuado de la contaminación microbiana (Crittenden *et al.*, 1996; Macfarlane *et al.*, 2007).

Los GOS tienen especial aplicación como componente funcional en productos lácteos; destacando su uso en leches especiales para lactantes alimentados con fórmulas en base a leche bovina, donde representan un componente esencial como inmunoestimulantes; dado que, su contenido en leche humana es elevado y cumple dicho rol esencial, mientras en leche bovina es muy bajo; también, en cereales y productos de panificación (pan, galletas y snacks) y en las bebidas energéticas (Illanes, 2015; Zeus Química, S.A).

1.2.2.4 Producción de Galactooligosacáridos (GOS)

Los GOS son producidos industrialmente por la acción de β -galactosidasas que tienen alta actividad de transgalactosilación; empleándose enzimas en discontinuo o continuo y soluciones concentradas de lactosa (normalmente obtenidas de suero de leche); originándose mezclas

complejas de GOS con enlaces $\beta(1-6)$, $\beta(1-3)$ y $\beta(1-4)$ (Matsumoto *et al.*, 1990) y un grado de polimerización de 2 y 6, dependiendo de la fuente de la enzima y de las condiciones de reacción empleadas (Cardelles-Cobas, 2009). También se obtienen uniones glicosídicas entre dos unidades de galactosa, como las uniones $\beta(1-4)$ (4'-GOS) cuando la β -galactosidasa proviene de *Bacillus circulans* o *Cryptococcus laurentii* y se obtienen uniones $\beta(1-6)$ (6'-GOS) cuando las enzimas provienen de *Aspergillus oryzae* y *Streptococcus thermophilus* (Sako *et al.*, 1999; Guerrero & Vera, 2010).

La Figura 5, muestra un esquema general de la producción de GOS donde una solución de lactosa altamente concentrada, usualmente purificada desde el suero de leche de vaca, es usada como sustrato de la reacción (Guerrero & Vera, 2010). En estas mezclas, se obtienen como productos principales los trisacáridos 4'-galactosil-lactosa o 6'-galactosil-lactosa y en mayores concentraciones disacáridos como la alolactosa (6-O- β -D-galactopiranosil-D-glucosa) (Cheng *et al.*, 2003; Mahoney, 1998; Cardelles, 2009).

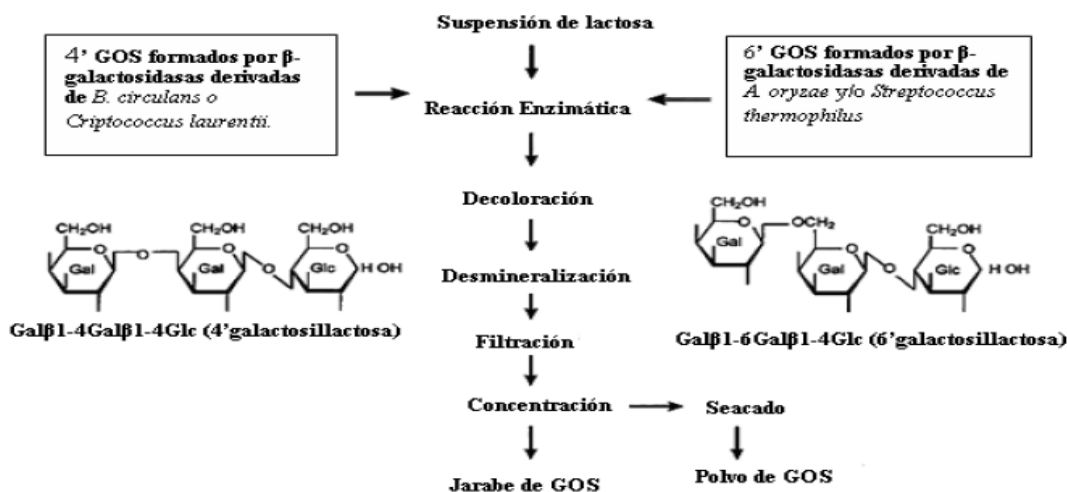


Figura 5. Proceso de producción industrial de GOS. Fuente: Guerrero & Vera, 2010. Síntesis de Galactooligosacáridos con β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*. Citado por Matsumoto *et al.*, 1990.

Guerrero & Vera (2010) indican que “La producción de GOS a escala industrial se realiza a partir de soluciones concentradas de lactosa (entre 40- 90% p/v) obtenida a partir de suero de leche. Para obtener estas altas concentraciones del sustrato se precisa trabajar a temperaturas altas debido a la baja solubilidad de la lactosa. En estas condiciones la reacción se ve limitada por la

inestabilidad de las enzimas a temperaturas de reacción en el rango de 50 – 60 °C y la inhibición enzimática por los productos de la reacción (glucosa y galactosa). El porcentaje máximo de GOS obtenido utilizando soluciones concentradas de lactosa (40 – 90 % p/V) como sustrato se sitúan entre 25 – 35 % p/p”).

En la actualidad existen productos comerciales disponibles en forma líquida o en polvo que contienen GOS en su formulación; son producidos en gran mayoría en países como Japón y Holanda, a partir de lactosa como sustrato. Estos productos tienen alta pureza en cuanto a su contenido, siendo los diversos tipos de GOS presentes un promedio entre el 55 al 60%, lactosa 20%, glucosa 20% y galactosa entre el 1 al 5% (Huerta, 2010). Dentro de estos productos se encuentran en el mercado: Oligomate, derivados lácteos producidos por Yakult Honsa (Tokio, Japón); Cup-Oligo, producido por Nissin sugar Manufacturing Company (Tokio, Japón) y P7L producido por Show Brand Milk Products (Tokio, Japón) y en Europa se encuentran disponibles Elix´or, Vivinal, TOS-Syrup, sólidos y bebidas producidas por Borculo Whey Products de Holanda y el producto Bismuno producido por Clasado (Inglaterra)(Corral, 2005; Huerta, 2010; Grizard & Barthomeuf, 1999; Guerrero & Vera, 2010).

1.2.3 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia FTIR es una técnica analítica que proporciona información cualitativa y cuantitativa de muestras sólidas, líquidas y gaseosas y tiene un elevado potencial para la elucidación de estructuras moleculares (Rios, 2010). Es una de las técnicas más utilizadas en la industria alimentaria, por lo que puede ser aplicada en situ, además de ser rápida y eficiente.

Se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. La absorción de radiación es el resultado de los cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales a otros (Curia, 2010; López, 2011). Como consecuencia, cada molécula presenta un espectro IR característico (huella dactilar), debido a que todas las moléculas tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo. De esta forma, analizando cuales son las longitudes de onda que absorbe una sustancia en esta zona del espectro, podemos obtener información acerca de las moléculas que componen

dicha sustancia. Además, la intensidad de los picos en el espectro es proporcional a la concentración del material presente (Hernández, 2013).

La FTIR obtiene espectros infrarrojos con mayor rigidez. En lugar de registrar los datos variando la frecuencia de luz infrarroja monocromática, se guía la luz IR (con todas las longitudes de onda de pista utilizada); empleando, un interferómetro que mide todas las frecuencias infrarrojas simultáneamente (Benavides, 2013). Posteriormente esta información es trasladada a un espectro (emisión, absorción, transmisión, etc.), a través de un algoritmo rápido de transformada de Fourier (Hernández, 2013).

La región del espectro infrarrojo abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12.800 y 10 cm^{-1} , que corresponden a longitudes de onda de 0,78 a 1000 μm . El espectro infrarrojo se divide en tres regiones: infrarrojo cercano, medio y lejano (Tabla 3) (Curia, 2010).

Tabla 3. *Regiones del espectro infrarrojo*

Región	Intervalo de longitud de onda (λ), μm	Intervalo de números de onda (ν), cm^{-1}	Intervalo de frecuencias de onda (ν), Hz
Cercano	0,78 a 2,5	12800 a 4000	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Medio	2,5 a 50	4000 a 200	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Lejano	50 a 1000	200 a 10	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$
La más utilizada	2,5 a 670	4000 a 670	$1,2 \times 10^{14}$ a $2,0 \times 10^{13}$

Fuente: Curia, 2010.

En la Región del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo medio (4000-1300 cm^{-1}) se suelen observar una serie de bandas de absorción provocadas por las vibraciones entre dos átomos de la molécula únicamente. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrógeno o de grupos con dobles o triples enlaces aislados. En la zona del infrarrojo lejano (1300-400 cm^{-1}), la asignación de las bandas de absorción a vibraciones moleculares es más difícil de realizar, debido a que cada una de ellas está generada por absorciones individuales sumadas. Esta última zona es la denominada huella dactilar (flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, etc), en esta región

espectral, pequeñas diferencias en la estructura y constitución de las moléculas dan lugar a variaciones importantes en los máximos de absorción. La Figura 6, muestra un ejemplo de las zonas características mencionadas y la asignación de bandas asociadas (Hernández, 2013).

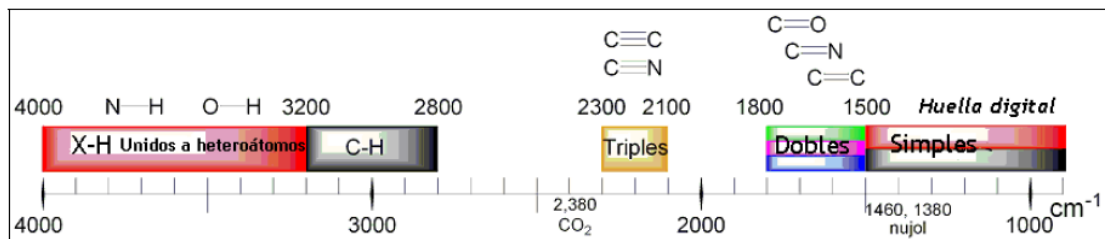


Figura 6. Asignación de las observadas en un espectro IR a las vibraciones moleculares. Fuente: Hernández, 2013.

La espectroscopia FTIR, es ampliamente usada en la investigación y en la industria como un simple y confiable método para obtener espectros característicos que se consideran la huella digital de los compuestos químicos. Las aplicaciones de esta técnica son por tanto innumerables. Algunas de las más importantes son: identificar el componente más importante en mezclas de sustancias, caracterización nutricional de alimentos para animales, caracterización estructural de grasas y aceites comestibles, caracterización e identificación de materiales como polímeros, seguimientos de procesos químicos y polimerizaciones o reacciones catalíticas y en la industria alimentaria en el análisis de los diversos constituyentes de muestra de leche, análisis de hidrolizados de caseína, proteínas del suero en relación con sus propiedades funcionales entre otras (Benavides, 2013; Etzion *et al.*, 2004; Jung, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de GOS utilizando una enzima β -galactosidasa comercial a partir de la lactosa del lactosuero procedente de la elaboración del queso costeño.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fisicoquímica, microbiológica y estructuralmente el lactosuero por espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR).
- Determinar la producción de GOS en la hidrólisis de lactosuero por acción de la enzima comercial β -galactosidasa.
- Evaluar el comportamiento de la síntesis de GOS, a partir de la caracterización de los grupos funcionales presentes en el lactosuero por espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR).

3. METODOLOGÍA

La investigación fue ejecutada en las instalaciones de la Planta Piloto de Operaciones Unitarias de la Universidad de Sucre (“Granja Los Pericos”, Sampués, Sucre) y se dividió en cuatro etapas: caracterización del lactosuero, producción de GOS, evaluación de la producción de los GOS y caracterización de los GOS. El lactosuero empleado en esta investigación fue suministrado por la empresa COLQUESOS, ubicada en el municipio de Sincelejo.

3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL LACTOSUERO

En esta etapa se caracterizaron dos tipos de lactosuero; el lactosuero entero recién salido del proceso de producción del queso costeño y el lactosuero sometido al proceso de pasteurización a una temperatura de 60°C por un tiempo de 30 minutos.

Para determinar las propiedades fisicoquímicas de los lactosueros se utilizaron las siguientes técnicas:

3.1.1 Densidad

La densidad del lactosuero se determinó empleando el método del lactodensímetro. La muestra de lactosuero a una temperatura de 20°C fue homogenizada y posteriormente vertida en una probeta, evitando la formación de espuma. Luego el lactodensímetro fue introducido en la misma, provocando un ligero movimiento de rotación. Se esperó a que se estabilizara, realizándose finalmente la lectura de la densidad (AOAC 925.22/90).

3.1.2 Acidez

Para la realización de esta prueba se utilizó una bureta de 10 ml, pipeta volumétrica, erlenmeyer de 100 ml, lactosuero, fenolftaleína al 1% e hidróxido de sodio 0,1N. Se colocó en el Erlenmeyer 9 ml de la muestra, agregando tres gotas de fenolftaleína, titulándose con la solución

de hidróxido de sodio hasta que se observó un cambio de color. Los resultados obtenidos fueron representados en “grados Dornic” °D, que expresan el % de ácido láctico; utilizando las ecuaciones (1) y (2) (AOAC 947.05/09).

$$\% \text{ácido láctico} = \frac{V_{\text{NaOH gastado}} * 10^{-3} * N * M * 100}{V_{\text{lactosuero}}} \quad (1)$$

$$1^{\circ}D = 0,01\% \text{ ácido láctico} \quad (2)$$

3.1.3 pH

El pH del lactosuero se midió con un pH- metro 827 pH lab de marca Metrohm (AOAC 981.12/90).

3.1.4 Sólidos totales

En una balanza de humedad marca Mb 200x Citizen se pesaron aproximadamente 10 g de lactosuero determinando los sólidos totales presentes en cada una de las muestras (AOAC 925.105/90).

3.1.5 Lactosa

Para la determinación del contenido de lactosa presente en el lactosuero se empleó el método de azúcares reductores DNS descrito por Miller, 1959 (ver anexo A3).

3.1.6 Proteína

Para la determinación de este análisis, se utilizó el método Kjeldahl, descrito por Kjeldahl, 1883. Para el cálculo del % de proteína se usó la ecuación (4). El factor proteico para lácteos y sus derivados es igual a 6,38 (AOAC 920.05/90).

$$MgN = N * V * 14 \quad (3)$$

Dónde:

MgN: miligramos de Nitrógeno

N: concentración del ácido para titulación.

V: volumen de ácido gastado en la titulación (ml)

$$\% \textit{proteina} = \left(\frac{MgN}{Po} \right) * 100 * F \quad (4)$$

Dónde:

Po: peso de la muestra (mg)

F: factor proteico

3.1.7 Grasa

Se empleó el método Gerber para determinar la grasa en el lactosuero; basado en la utilización de ácido sulfúrico y la fuerza centrífuga con calefacción para separar la grasa de la leche. La cantidad de grasa se midió volumétricamente por la escala del vástago graduado del butirómetro (AOAC 989.04/90).

3.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLOGÍA DEL LACTOSUERO

Se caracterizó microbiológicamente el lactosuero pasteurizado; debido a que fue empleado en el desarrollo de las corridas experimentales para la producción de GOS.

Previamente se preparó una solución de peptona universal (0,1% p/v); se tomaron 10 mL de lactosuero y se diluyeron en 90 mL de agua peptonada 0,1% p/v), para realizar las diluciones sucesivas de las muestras inoculadas hasta 10^7 UFC ml⁻¹ en proporción 1:9. Posteriormente, se realizaron siembras por duplicado en cada agar y se utilizó un medio control para cada agar. Para la caracterización microbiológica se emplearon las siguientes pruebas:

3.2.1 Recuentos de Aerobios Mesófilos

El recuento de aerobios mesófilos se realizó en placa profunda en agar Plate Count. Se transfirieron por duplicado 1ml de cada una de las diluciones preparadas (10^{-1}) (10^{-2}) (10^{-3})... (10^{-7}) en las cajas de Petri estéril; se vertieron los 15 ml del agar PCA, se homogenizaron y solidificaron las placas; luego se invirtieron e incubaron a 35°C durante 24 - 48 horas (BAM, 2001; citado por Análisis microbiológico de los alimentos, 2014).

3.2.2 Recuento de Coliformes Totales y Fecales

Los coliformes totales se determinaron por la técnica del número más probables (NMP). Primero se realizó la prueba presuntiva; inoculando por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones (10^{-1}) (10^{-2}) (10^{-3}) ... (10^{-7}) en tubos de fermentación con el caldo Bilis – Verde Brillante Lactosa (Brilla) y la campana de Durham; posteriormente, se trasladaron a autoclave para esterilizar el medio; incubándose a 37 °C durante 48 horas y luego evidenciar resultados (FIL 73: A 1985; citado por Microbiología de los alimentos módulo II, 2013).

3.2.3 Recuento de Mohos y Levaduras

Se determinaron mediante El Agar Dextrosa Sabouraud en siembra en superficie; incubándose las placas entre 25-30°C sin invertirse y el conteo se realizó a los 5 días de incubación (Bacteriological Analytical Manual, 1998, actualizado 2001; citado por Microbiología de los alimentos módulo II, 2013).

3.3 CARACTERIZACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES PRESENTES EN EL LACTOSUERO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Previo a la caracterización de los grupos funcionales presentes en el lactosuero, éste fue sometido a un proceso de liofilización; empleándose un Liofilizador Labconco FreeZone® con el

objetivo de separar el agua u otro solvente presente en el lactosuero mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida.

3.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

El espectro de infrarrojo del lactosuero se obtuvo utilizando un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (Thermo scientific referencia Nicolet iS5 Transmisión iD1) en la región de 4000 a 500 cm^{-1} . La formación de los cristales se hizo mediante la mezcla de 20 mg de lactosuero con KBr en una proporción de 1:5 (lactosuero: KBr). Se recogieron treinta y dos lecturas a una resolución de 4 cm^{-1} . Los grupos funcionales del lactosuero fueron determinados mediante el procesamiento de las espectroscopias con el programa Omnic 9.

3.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SOLUCIÓN

Para la síntesis de los GOS se empleó una enzima comercial de tipo β -galactosidasa proveniente de la levadura *Kluyveromyces lactis* (Lactozym Pure 6500L). Las características que posee el preparado enzimático se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Características de la β -galactosidasa proveniente de la levadura *Kluyveromyces lactis* (Lactozym Pure 6500L)

Enzima declarada:	β-galactosidasa
Actividad declarada:	6500 LAU/g
Color:	Amarillo claro
Forma física:	Líquida
Densidad aproximada:	1,15 gr/ml
Organismo de producción:	<i>Kluyveromyces lactis</i>

La actividad enzimática del preparado enzimático (Lactozym Pure 6500L), se expresa en unidades de lactosa (LAU/ml), la cual se define como la cantidad de enzima que hidroliza un μmol de lactosa por minuto.

La determinación de la actividad enzimática se realizó a partir de una solución de 50 ml de lactosa anhidra al 1% a una temperatura de 45°C y pH entre 6,2 – 6,4 (según ficha técnica, ver anexo A1). Las muestras para análisis se tomaron al inicio y a los 5 minutos de reacción.

Se calculó la actividad enzimática teniendo en cuenta el concepto de LAU/ml según lo definido por Guerrero & Vera, 2010; por medio de la siguiente ecuación (5)

$$\frac{\text{LAU}}{\text{ml}} = \frac{\text{L}}{\text{T} * \text{E}} \quad (5)$$

Dónde:

L: lactosa degradada en micromoles (μmol)

T: tiempo de reacción en minutos

E: cantidad de enzima en mililitros (ml)

3.5 PRODUCCIÓN DE GALACTOOLIGOSACARIDOS (GOS)

La producción de los GOS se llevó a cabo en un reactor por lotes que consistió en un balón aforado 3 bocas, en el cual se depositaron 800 ml de lactosuero previamente pasteurizado y estabilizado a pH entre de 6,2 a 6,4 con una solución Na_2HPO_4 . La síntesis enzimática de los GOS se realizó variando la temperatura (40 , 45 y 50°C) y usando diferentes relaciones enzima - sustrato (E/S) (0.0103, 0.0154 y 0.00592 mL/g) en un tiempo de reacción de 5 horas. Las muestras para análisis se tomaron cada hora, determinándoles la glucosa libre por el método GOD-PAD (ver anexo A2) y azúcares reductores mediante método DNS descrito por Miller, 1959.

3.6 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS (GOS)

Para la evaluación de la producción de GOS se empleó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, que se compone de dos factores. El primer factor corresponde a la temperatura de reacción y el segundo factor a la relación enzima – sustrato; ambos en tres niveles (Tabla 5). El análisis estadístico de los resultados del diseño experimental se realizó por medio del programa estadístico R.

Tabla 5. *Diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial*

(E/S)	T ₁	T ₂	T ₃
(E/S) ₁	T ₁ (E/S) ₁	T ₂ (E/S) ₁	T ₃ (E/S) ₁
(E/S) ₂	T ₁ (E/S) ₂	T ₂ (E/S) ₂	T ₃ (E/S) ₂
(E/S) ₃	T ₁ (E/S) ₃	T ₂ (E/S) ₃	T ₃ (E/S) ₃

En donde:

T_{1, 2 y 3}: 40, 45 y 50 °C respectivamente.

(E/S)_{1, 2 y 3}: 0.0103, 0.0154 y 0.00592 ml/g respectivamente.

3.7 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL COMPORTAMIENTO DE LA SÍNTESIS DE GOS EN LACTOSUERO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT- IR)

Para la caracterización de los GOS, primeramente se obtuvo el espectro de infrarrojo de cada uno de los lactosueros sintetizados enzimáticamente por la acción de la β -galactosidasa y los espectros base (glucosa, galactosa y lactosa) por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (Thermo scientific referencia Nicolet iS5 Transmisión iD1) en la región de 4000 a 500 cm^{-1} . La formación de los cristales se hizo mediante la mezcla de 20 mg de lactosuero con KBr en una proporción de 1:5 (lactosuero: KBr). Se recogieron treinta y dos lecturas a una resolución de 4 cm^{-1} . El análisis de Los grupos funcionales presentes en los lactosueros fueron determinados mediante el procesamiento de las espectroscopias con el programa Omnic 9.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL LACTOSUERO

La Tabla 6, muestra los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos del lactosuero entero y pasteurizado.

Tabla 6. Caracterización fisicoquímica del lactosuero entero y pasteurizado

Característica	Lactosuero entero	Lactosuero pasteurizado
Densidad (gr/ml)	1,048 ± 0,002	1,049 ± 0,0005
Acidez (°D)	34,6 ± 1,15	25,73 ± 0,25
pH	5,39 ± 0,011	5,37 ± 0,04
Lactosa (gr/L)	54,17 ± 1,92	56,6 ± 0,2
Sólidos totales (%)	5 ± 0,14	4,14 ± 0,29
Proteína (%)	8,896 ± 0,005	8,079 ± 0,08
Grasa (%)	0,4 ± 0,002	0,3 ± 0,005

Los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica del lactosuero coinciden con los obtenidos por Rodríguez & Madrid (2012) en su estudio de la elaboración de una bebida fermentada a partir de lactosuero.

El valor de pH tanto para el lactosuero entero y pasteurizado se encuentran en el rango de 5,0 – 5,8 reportados por Gutiérrez (2006); considerándolos como medianamente ácidos. Este resultado se puede constatar con lo publicado por Callejas *et al.*, (2012), el cual menciona que según las propiedades fisicoquímicas los lactosueros también pueden ser clasificados como ácidos o dulces; el lactosuero ácido es el que proviene de la fabricación de quesos frescos de pasta blanda, obtenidos a partir de leche de vaca y/o de cabra y el pH es < 4,5 y los Grados Dornic son < 20 °; en cambio, el lactosuero dulce proviene de la fabricación de quesos de pasta cocida y prensada (vaca) y el pH es > 6,0 y presentan > 50 ° grados Dornic (°D).

Los valores de acidez (°D) son similares a los reportados por Cury *et al.*, (2014). Se observó una disminución en los °D del lactosuero entero (34,6 ± 1,15 °D) con respecto al lactosuero

pasteurizado ($25,73 \pm 0,25$ °D); esta disminución pudo presentarse, debido a que las micelas de caseína (formadas por la asociación de moléculas de caseína junto con fosfato cálcico; el componente “mineral” representa alrededor del 7% del peso de la caseína) que están presentes en el lactosuero tienden a desestabilizarse porque el fosfato cálcico presentes en ellas es un componente termosensible a las altas temperaturas; por lo que, se van rompiendo los enlaces entre los grupos fosfato y el ion calcio; por lo tanto, al reducirse la ionización de los fosfatos se afecta la acidez (Calvo, M).

Con respecto a la proteína también se pudo observar una variación en los porcentajes de ésta en el lactosuero entero ($8,896 \pm 0,005$) y pasteurizado ($8,079 \pm 0,08$) respectivamente; esto se debe, al proceso de pasteurización el cual conlleva a la desnaturalización de las mismas.

4.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL LACTOSUERO PASTEURIZADO

En esta fase se caracterizó microbiológicamente el lactosuero pasteurizado, sometido a una temperatura de 60°C por 30 minutos; con el fin de reducir los agentes patógenos que pueda contener como bacterias, protozoos, mohos y levaduras; sin lograr la desproteinización del mismo.

4.2.1 Recuentos de Aerobios Mesófilos

En el recuento de aerobios mesófilos para cada una de las diluciones sucesivas de las muestras inoculadas hasta 10^7 UFC ml⁻¹ sembradas en el medio PCA, no se evidenciaron ufc/g aerobios mesófilos. Estos resultados coinciden con los reportados por Andrade (1999), el cual reporta un suero pasteurizado con ceros conteos de ufc/g en el medio PCA.

4.2.2 Recuento de Coliformes Totales y Fecales

En este ensayo sólo se realizó la prueba presuntiva; obteniéndose resultados negativos por la inexistencia de coliformes totales; en los tubos no se presentó formación de gas en la campana de Durham; por lo tanto, no se evaluaron los coliformes fecales. Estos resultados se encuentran en el rango de coliformes totales (0 – 2) reportados por Torres (2001).

4.2.3 Recuento de Mohos y Levadura

En esta prueba no hubo crecimiento de mohos y levaduras; es decir, no se evidenció formación de colonias de estos microorganismos.

Los resultados obtenidos en cada una de las pruebas empleadas para la caracterización microbiológica del lactosuero pasteurizado fueron negativos; por lo tanto, en ninguna de ellas se evidenció crecimiento de microorganismos; ésto se debe a que se trabajó en condiciones adecuadas y finalmente la pasteurización del lactosuero fue eficiente. La pasteurización es un proceso térmico que elimina los microorganismos patógenos para la salud humana y las enzimas que pueden causar descomposición química de los productos, sin modificar las características de los mismo (Recinos *et al.*, 2006; Álvarez, 2013); evitándose así contaminación. Esto permitió que el lactosuero fuera apto y cumpliera con las condiciones óptimas para ser utilizado en el proceso de hidrólisis enzimática.

4.3 CARACTERIZACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES PRESENTES EN EL LACTOSUERO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

En la Figura 7 se muestra las señales características del espectro FT- IR del lactosuero obtenido de las muestras utilizadas para el desarrollo de la hidrólisis, en el cual se evidencia la señal 1651 cm^{-1} y una señal que aparece entre $1200 - 1280\text{ cm}^{-1}$ que se asocian a los grupos funcionales de las amidas II y III de las proteínas Jung (2000). Las señales que están entre $930 - 1190\text{ cm}^{-1}$ corresponden al contenido de lactosa, la señal de 1745 cm^{-1} que concierne al grupo

carbonilo de las grasas y la región ancha y extensa entre 3000 – 3800 cm^{-1} que indica la presencia de agua. Estos valores concuerdan con los reportados por Callejas *et al.* (2012). Las señales 2855 y 2925 cm^{-1} corresponden al grupo metileno (CH_2), las cuales coinciden con las reportadas por Yu Lei *et al.* (2010).

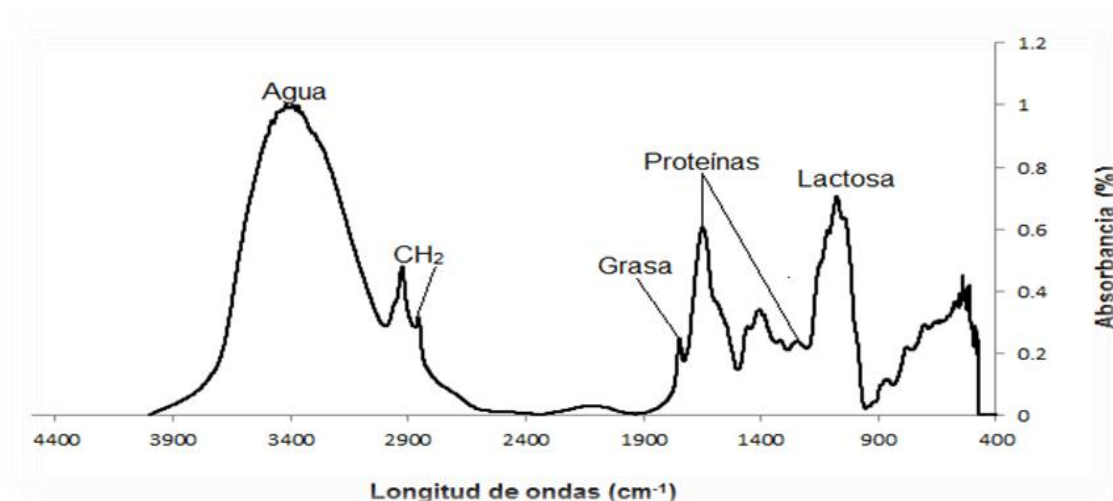


Figura 7. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR) del lactosuero nativo.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SOLUCIÓN

La lactosa degradada se calculó por medio del método DNS descrito por Miller, 1959, realizando una lectura en el tiempo cero y otra a las cinco minutos y en el menor tiempo posible para descartar algún tipo de inhibición por productos.

En la Tabla 7, se observan los resultados de absorbancia de las dos muestras por triplicado y los valores de las concentraciones iniciales y finales calculadas con la curva patrón de lactosa.

Tabla 7. Concentraciones de lactosa después de la hidrólisis

Tiempo(min)	[] lacto 1 (gr/l)	[] lacto 2 (gr/l)	[] lacto 3 (gr/l)
0	6,39	6,34	6,39
5	5,90	5,85	5,93

La actividad enzimática se determinó mediante la ecuación (5), siendo igual a $940,221 \pm 1,3$ LAU/ml; la conversión se realizó teniendo en cuenta la fracción proteica del preparado enzimático. La actividad enzimática es equivalente a 6245 LAU/g este valor se acerca a lo reportado en la ficha técnica de la Tabla 4.

4.5 PRODUCCIÓN DE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS (GOS)

La Figura 8, muestra la producción de azúcares obtenidos para cada una de las temperaturas y relación enzima- sustrato planteados en el diseño experimental. Se observa el comportamiento de los azúcares reductores en un tiempo de reacción de 5 horas; notándose de manera general, un aumento de éstos en la primeras hora de reacción. Este comportamiento se puede expresar como resultado al mecanismo de acción de la enzima β - galactosidasa en la hidrólisis de la lactosa; ya que, en las primeras horas de reacción, se tiene una solución una alta proporción de este componente lo que favorece el proceso de hidrólisis en sus monosacáridos correspondientes glucosa y galactosa y en las siguientes horas de reacción, no se evidencia un aumento en la formación de azúcares reductores.

Luego de la hidrólisis se activa la reacción de la transgalactosilación de la enzima β -galactosidasa, que se traduce en una reorganización de la cadena hidrolizada conformando cadenas poliméricas entre las que se encuentra el GOS; los cuales se componen de 1 molécula de galactosa unida a una molécula de glucosa, pudiendo llegar a 7 moléculas de galactosa unidas entre sí con una terminación de una molécula de glucosa. Por lo tanto, el aumento de azúcares totales favorece el proceso de hidrólisis de lactosa y una disminución de los mismos, favorece la formación de GOS (Torres *et al.*, 2010; Villarreal, 2014).

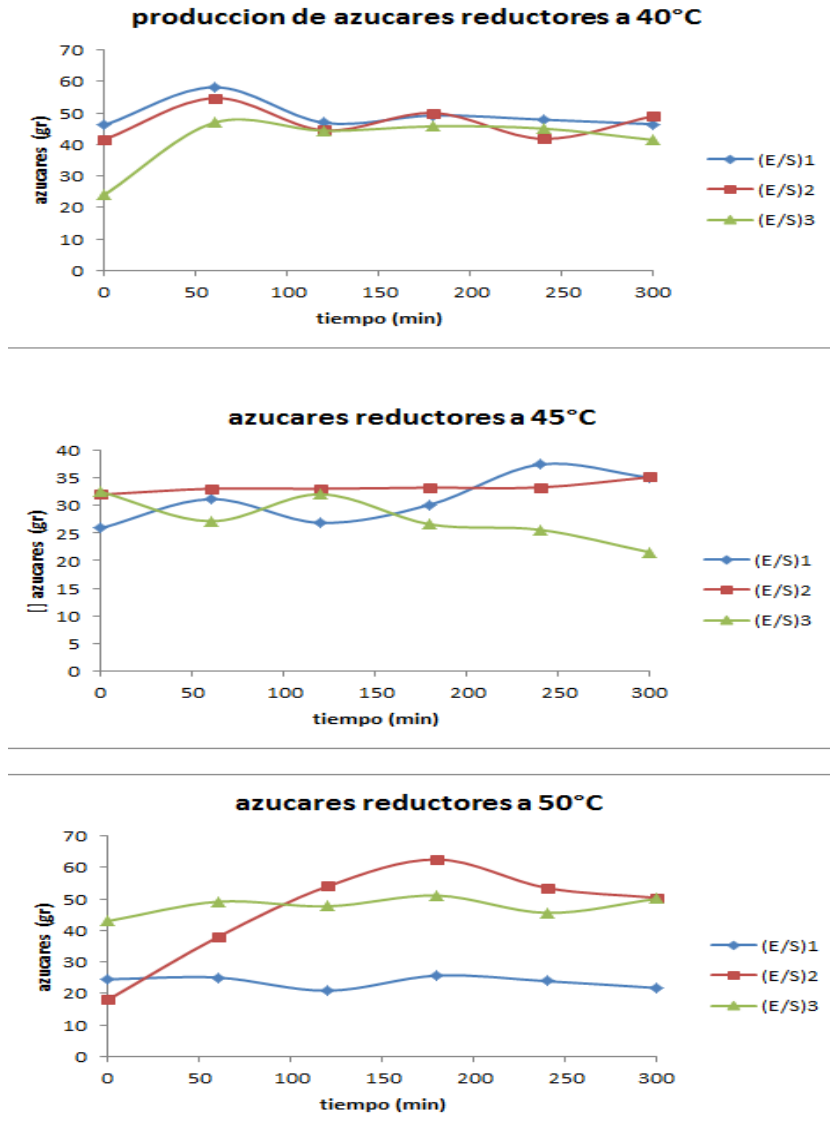


Figura 8. Producción de azúcares reductores del preparado enzimático de β -galactosidasa a las relación enzima - sustrato (E/S)_{1,2,3} y temperaturas T_(1,2,3) °C.

Las mejores condiciones para producir GOS, son aquellas en las que sólo se evidencien bajas sustanciales entre el valor de lactosa inicial o de azúcares y el valor final de los azúcares reductores. Este comportamiento sólo se observa a una temperatura de 45°C y a la más baja relación enzima-sustrato, como se aprecia en la Figura 8. En estas condiciones de operación podemos concluir que existe mayor velocidad de formación de GOS en la primera hora de reacción.

Para una mejor interpretación de lo que ocurre en la reacción de transgalactosidación se hace un análisis de la producción de glucosa libre durante las 5 horas de reacción a las relación enzima - sustrato (E/S) $(_{1,2,y3})$ y temperaturas T $(_{1,2,3})$ °C (Figura 9). Inicialmente se evidencia un aumento en la producción de glucosa, como consecuencia del mecanismo de hidrolisis de la enzima; la cual libera la glucosa al medio y forma el complejo enzima – galactosa. También, se observa una disminución en las curvas de producción de glucosa libre, producto de la unión de la molécula glucosa a una molécula de galactosa para la formación del GOS.

Al realizar una comparación entre las curvas de azúcares totales y la producción de glucosa; en la mayor parte de los casos, cuando se evidencia un aumento en la glucosa también concuerda con aumentos en los azúcares totales. Aunque este comportamiento no se puede generalizar; ya que parte de la galactosa se unió a la enzima para formar el complejo enzima - sustrato y esta unión no hace disponible los terminales de C1 de la galactosa para la reacción con DNS. En la Figura 10, se muestra la diferencia entre los azúcares totales y la glucosa.

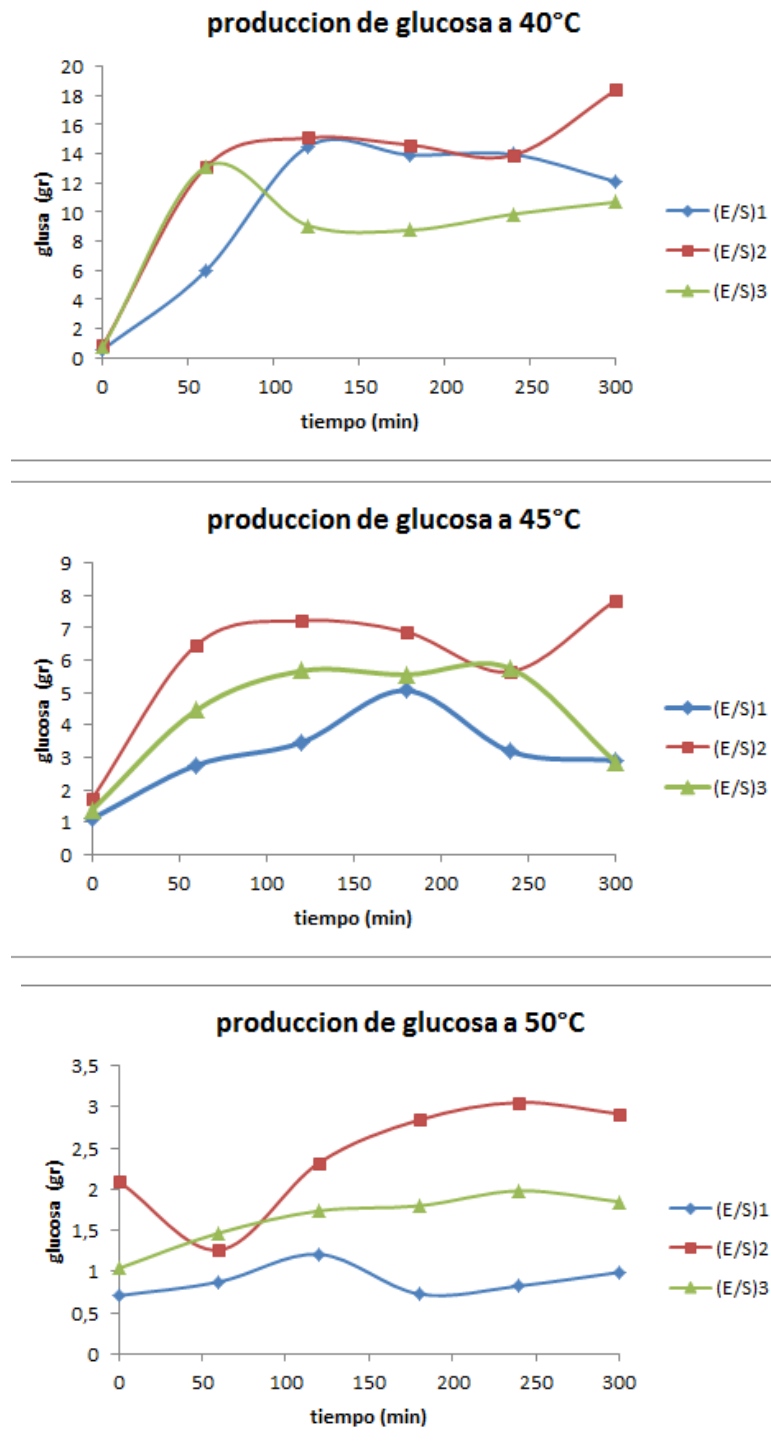


Figura 9. Producción de glucosa durante las 5 horas de reacción a las relación enzima - sustrato (E/S)_{1,2,3} y temperaturas T_(1, 2,3) °C.

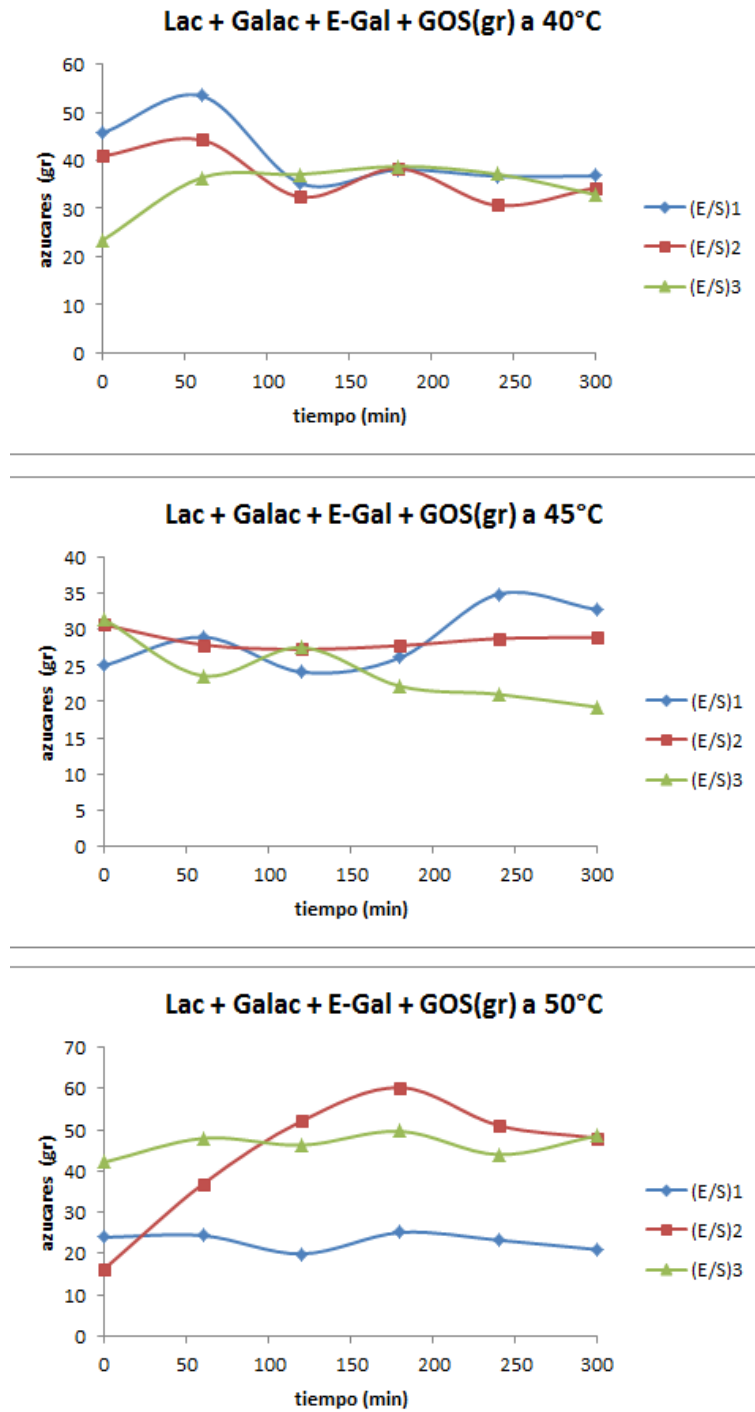


Figura 10. Diferencias entre el comportamiento de los azúcares totales y la glucosa durante la reacción a las relación enzima - sustrato (E/S)_{1,2,3} y temperaturas T_(1,2,3) °C.

Para determinar la velocidad de formación de GOS, se parte de que, el aumento de los azúcares reductores contribuye a la hidrólisis de la lactosa y su disminución a la formación de GOS, por medio de esto se establece la siguiente relación de velocidad de producción de GOS:

$$-\left(\frac{d\Delta Z1}{dt}\right) = k * ([GOS] + [E - Gal]) = \frac{d}{dt}(\text{vel formacion GOS}) \quad (6)$$

Dónde:

$\Delta Z1$: diferencial de azúcares de la figura 12 (g)

t: tiempo (horas)

E-Gal: complejo enzima - galactosa

K: constante de proporcionalidad

Para determinar la producción de GOS, se calculó la sumatoria de las pendientes punto a punto de la figura 8 (g/h) y multiplicando por -1 la ecuación. La producción es resultante del producto de la velocidad y tiempo de reacción, en este caso de 5 horas.

Tabla 8. *Formación de GOS a 5 horas de reacción*

Temperatura(°C)	(E/S) ₁	(E/S) ₂	(E/S) ₃
40	8,93	6,58	-9,43
45	-7,72	1,76	12,12
50	2,97	-31,67	-6,40

La Tabla 8, muestra la formación de GOS resultante de la sumatoria de las pendientes punto a punto. La mayor velocidad de formación de GOS se evidencia a 45°C y a la más baja relación enzima - sustrato (0,00592 ml/g) con una formación de GOS de 12,12 g. Los valores negativos que se contemplan en la tabla corresponden a los tratamientos donde la enzima concentró la mayor parte de la actividad a la hidrólisis y no a la activación de la reacción de transgalactosilación; la cual se requería para una mayor de formación de GOS. Por lo anterior se puede concluir que la mejor condición para la formación de GOS es a 45°C y una relación enzima – sustrato de 0,00592 ml de preparado enzimático /gr de lactosa.

Los resultados obtenidos en este estudio son comparables con los reportados por Martínez *et al.*, (2007) que realizaron la síntesis durante 300 minutos a temperaturas de 40, 50 y 60 °C, pH de 5,5, 6,5 y 7,5 y a concentraciones de lactosa 150, 250 y 350 mg/ml; donde los efectos de las condiciones de la reacción fueron diferentes en la formación de di y trisacáridos; sus condiciones óptimas para la síntesis de galactobiosa y alolactosa, fueron a 50°C, pH de 6,5 y 250 mg/ml y las mejores condiciones de reacción para la producción de galactosil - lactosa fueron a 40°C, pH 7,5 y 250 mg/ml. Por lo tanto, nuestros resultados difieren con respecto a ellos porque no se trabajó bajo las mismas condiciones de reacción; pero si coinciden con los reportados por Beltrán & Acosta (2012), los cuales a un pH de 6,5 y a una temperatura de 45°C, alcanzaron las mejores condiciones de reacción y con Rodríguez (2015), quién reporta que alcanzó la máxima producción de GOS al disminuir la concentración de enzima y aumentar la concentración de lactosa inicial y la temperatura. Esto refleja el efecto que tiene la interacción entre la temperatura y la concentración inicial de lactosa en la reacción de síntesis.

4.6 EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE GALACTOOLISACÁRIDOS (GOS)

Los resultados obtenidos en el análisis de la matriz del diseño experimental se resumen a continuación:

Tabla 9. Análisis de varianza para la formación de GOS - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS					
PRINCIPALES					
A:relacion E_S	401,097	2	200,548	41,59	0,0000
B:temperatura	1132,82	2	566,411	117,48	0,0000
INTERACCIONES					
AB	2715,08	4	678,771	140,78	0,0000
RESIDUOS	86,7868	18	4,82149		
TOTAL	4335,79	26			
(CORREGIDO)					

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La Tabla 9, muestra el análisis de varianza correspondiente al diseño experimental y el efecto de los factores con su interacción sobre la producción de GOS, observándose que el valor – p es menor a 0,05 en los efectos y la interacción entre ellos; por lo que se puede concluir que la temperatura, la relación enzima sustrato con su respectiva interacción tienen efectos estadísticamente significativos sobre la producción de GOS a un nivel de confianza de 95%.

Tabla 10. *Análisis de Varianza para la formación de GOS para el modelo*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:temperatura	847,622	1	847,622	10,65	0,0041
B:relacion E_S	192,276	1	192,276	2,42	0,1367
AA	285,2	1	285,2	3,58	0,0737
AB	1278,44	1	1278,44	16,06	0,0008
BB	208,821	1	208,821	2,62	0,1218
Bloques	10,8742	2	5,43708	0,07	0,9342
Error total	1512,55	19	79,6081		
Total (corr.)	4335,79	26			

R-cuadrada = 65,11 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l) = 56,80 por ciento

Error estándar del est. = 8,92

Error absoluto medio = 6,15

Estadístico Durbin-Watson = 1,84 (P=0,2070)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,037

$$\begin{aligned}
 GOS = & -722,103 + 28,0901 * T + 24506,7 * \frac{E}{S} - 0,2755778 * T^2 - 435,513 * T * \frac{E}{S} \\
 & - 262576 * \frac{E^2}{S} \quad (7)
 \end{aligned}$$

La tabla 10, muestra el anova correspondiente al mejor modelo matemático de predicción para la producción de GOS, contemplando todas las posibles interacciones. El modelo matemático representado en la ecuación 7 solamente explica un 65,11% de la producción de GOS. Claramente se puede evidenciar que para el modelo matemático planteado en la ecuación 7; la temperatura y la interacción de ella con la relación enzima – sustrato, ejercen un efecto significativo en la producción de GOS; por lo que, se puede concluir que los datos presentados de la producción son estadísticamente diferentes y se puede tipificar el mejor valor de producción dentro de los desarrollados en la presente investigación.

La Figura 11, representa el diagrama de Pareto; en el cual se evidencia que la temperatura y la interacción entre ella y la relación- enzima sustrato tienen efecto significativo sobre el modelo matemático y que la producción de GOS se ve mayormente influenciada por el aumento de la temperatura con respecto a la relación enzima sustrato.

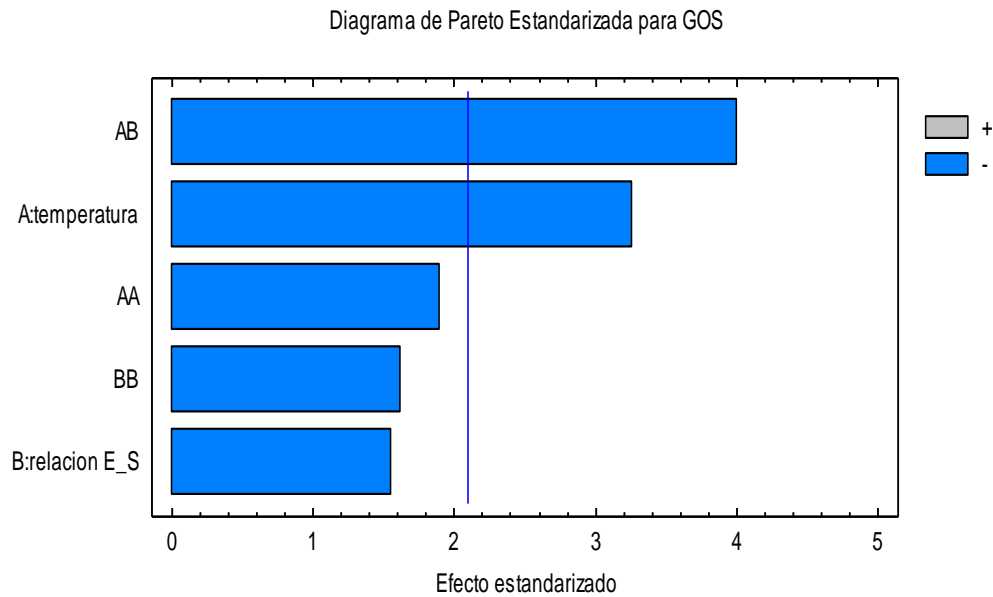


Figura 11. Diagrama de Pareto para la velocidad de formación de GOS.

En la figura 12 se observa que a valores medios de temperaturas y relaciones enzima – sustrato se produce la mayor formación de GOS; como se muestra en las áreas contorneadas correspondiente al rango de 5 a 10 g; evidenciándose, que las mejores condiciones de operación

para la formación de GOS en esta caso sería a temperaturas comprendidas entre los 44 - 48°C y a los valores medios en las relaciones enzima – sustrato planteadas en el diseño experimental.

Las regiones que están representadas con valores negativos, son un indicativo de que la formación de GOS es nula; es decir, en ese caso la enzima β - galactosidasa presentó solo actividad para la hidrólisis de la lactosa contenida en el lactosuero y no realizó la transgalactosilación de las moléculas de galactosa libre.

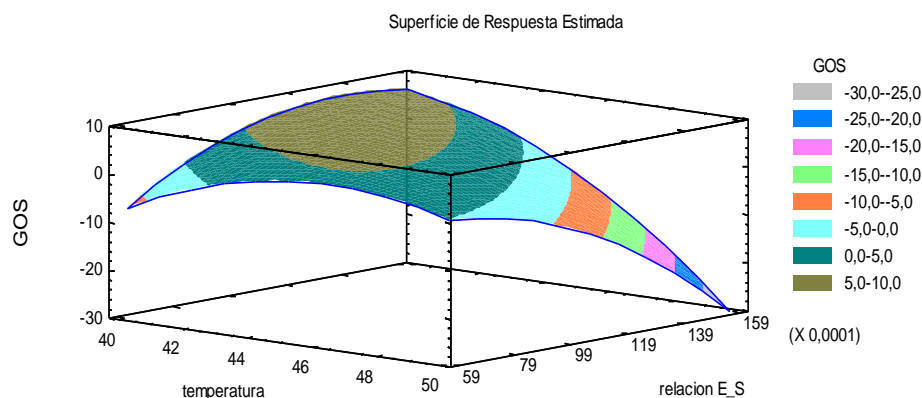


Figura 12. Diagrama de superficie de respuesta para la formación de GOS.

4.7 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL COMPORTAMIENTO DE LA SÍNTESIS DE GOS EN LACTOSUERO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT- IR)

Las Figuras 13, 14, 15 y 16, muestran los espectros FT-IR obtenidos de los monosacáridos glucosa y galactosa, disacárido lactosa y del lactosuero nativo respectivamente; los cuales se analizaron, tomándose como interés de estudio la región comprendida entre 800 – 1400 cm^{-1} ; región donde cada banda de absorción involucra una vibración o movimiento que no puede ser asignada fácilmente a un grupo funcional específico y puede corresponder a señales generadas por la presencia de hidratos de carbono (Cáceres, 2011). En esta región se encuentran las señales que nos permiten distinguir la presencia o huella digital de éstos azúcares.

4.7.1 Espectros Base

4.7.1.1 Glucosa

La Figura 13, muestra el espectro FT-IR obtenido del monosacárido glucosa; observándose diferentes bandas de absorción en la región comprendida entre 3300 – 3600 y 1500 - 1800 cm^{-1} donde se encuentran las señales asociadas a la presencia de agua (Tewari *et al.*, 2004) y en la región 800 - 1400 cm^{-1} los picos de absorción de los azúcares que representan una banda de absorción característica las cuales se detallan en la Tabla 11 (Zapico, 2013).

Tabla 11. Longitud de onda (cm^{-1}) y grupo funcional (enlaces) de las bandas de absorción infrarroja de la glucosa en la región 800 - 1400 cm^{-1} en el espectro FTIR

Longitud de onda (cm^{-1})	Grupo funcional
837	C-O y C-H
915, 1020, 1112	C-O
997, 1050, 1077 y 1147	C-O y C-C
1203, 1225, 1295	CH - OH
1340 y 1380	O-C-H, C-C-H y C-O-H

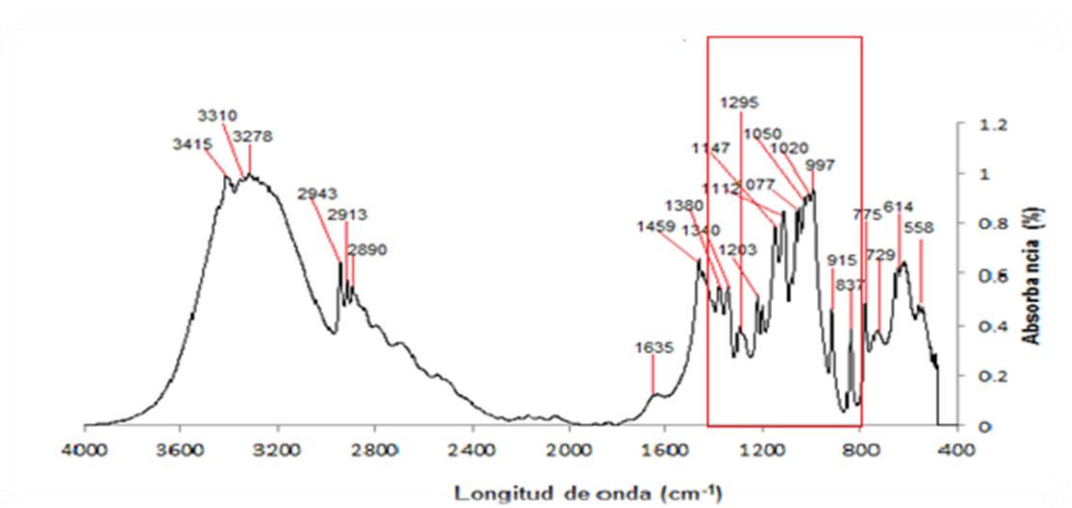


Figura 13. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) de la glucosa.

4.7.1.2 Galactosa

El espectro FT-IR del monosacárido galactosa muestra diferentes bandas de absorción (Figura 14); destacándose, la región 2900 – 3450 cm^{-1} que presenta las señales de los grupos CH y OH y la región entre 800 – 1400 cm^{-1} asociada a los grupos funcionales presentes en los carbohidratos (Ibrahím *et al.*, 2006). La Tabla 12 detalla la bandas de absorción características de los grupos presentes en la región 800 –1400 cm^{-1} .

Tabla 12. Longitud de onda (cm^{-1}) y grupo funcional (enlaces) de las bandas de absorción infrarroja de la galactosa en la 800 - 1400 cm^{-1} en el espectro FTIR

Longitud de onda (cm^{-1})	Grupo funcional
837, 973, 1044, 1050, 1067, 1074, 1081, 1104 y 1152 cm^{-1}	C-O, C-C
955 y 1074	C-O-H
1248 y 1297	O-C-H, C-C-H y C-O-H
1326 y 1358	CH ₂

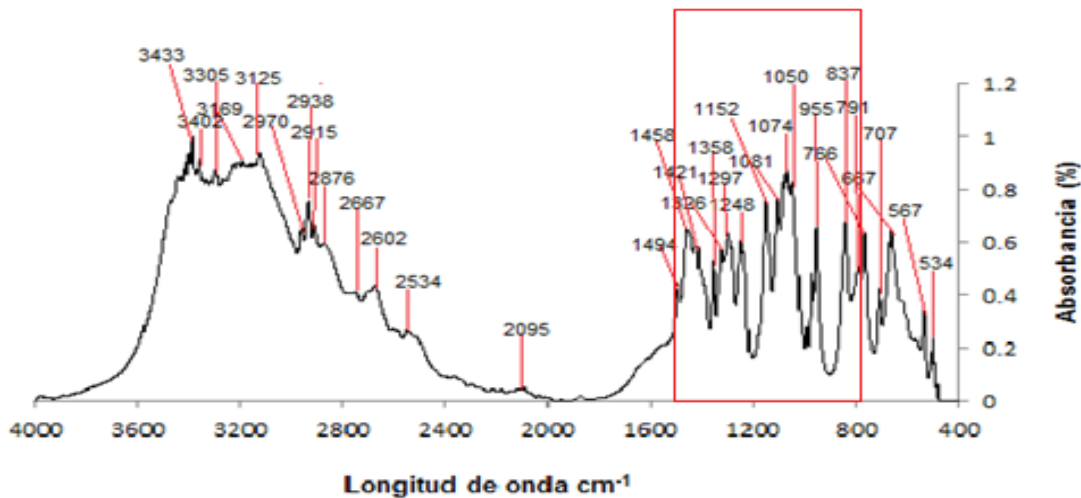


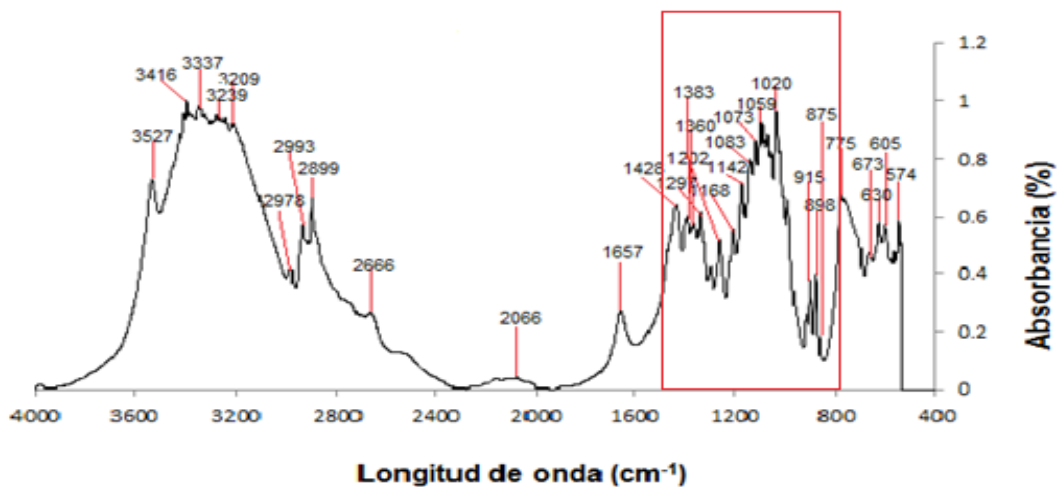
Figura 14. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) de la galactosa.

4.7.1.3 Lactosa

La Figura 15 muestra el espectro FT-IR obtenido del disacárido lactosa, en el cual es posible definir algunas bandas de absorción características de grupos funcionales presentes. En la región 800 – 1400 cm^{-1} se evidencian señales características de los monosacáridos glucosa y galactosa (Tabla 13); además de lo anterior, es posible observar bandas entre 3000 – 3600 cm^{-1} que indican la presencia de agua (OH) y las señales de absorción de 2900 - 2990 cm^{-1} asociadas al grupo CH.

Tabla 13. Longitud de onda (cm^{-1}) y grupo funcional (enlaces) de las bandas de absorción infrarroja de la lactosa en la 800 - 1400 cm^{-1} en el espectro FTIR

Longitud de onda (cm^{-1})	Grupo funcional
875, 898, 915, 987, 1020, 1035, 1059, 1083, 1115, 1142 y 1168	C-O y C-C
1073	C-O, C-C y C-O-H
1202, 1297, 1360, 1383 y 1428	O-C-H, C-C-H y C-O-H



sa.

4.7.1.4 Lactosuero

El espectro FT-IR obtenido del lactosuero (Figura 16) refleja la composición química que éste presenta; observándose las bandas de absorción características para cada uno de sus componentes (lactosa, grasa y agua) que lo constituyen; resaltándose, los picos de absorción 858, 1045, 1078 y 1116 cm^{-1} presentes en la región 800 – 1250 cm^{-1} que indican el contenido de lactosa y las vibraciones C-O y C-C que se dan en los carbohidratos. Las señales 1245, 1317 y 1358 cm^{-1} asociadas a los enlaces O-C-H, C-C-H y C-O-H (Yu Lei *et al.*, 2009, Leopold *et al.*, 2011).

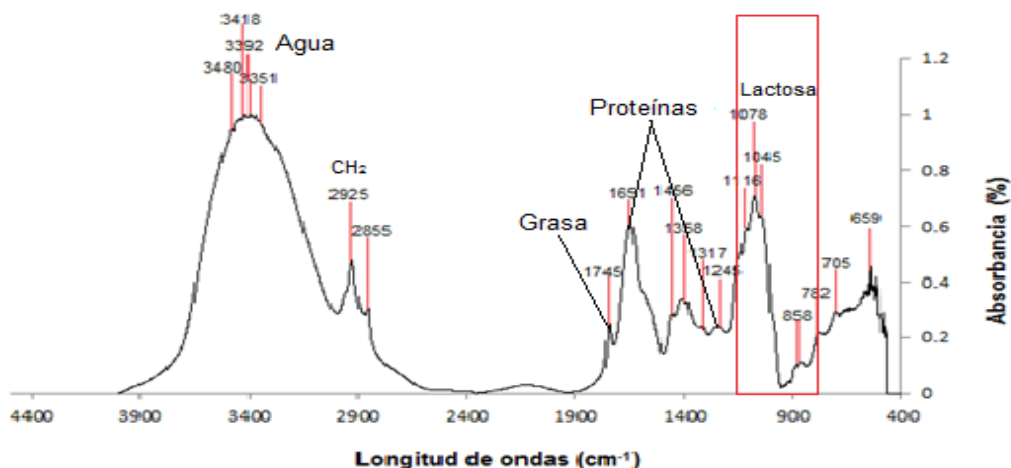


Figura 16. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) del lactosuero nativo.

4.7.2 Análisis de Espectros Base

La Figura 17 muestra los espectros FT-IR de los monosacáridos, disacárido y el lactosuero nativo en la región de interés de estudio 800 – 1400 cm^{-1} ; donde se evidencian señales comunes entre glucosa – galactosa y glucosa – galactosa; la galactosa con respecto a la lactosa presentan señales en intervalos similares y el lactosuero nativo no presenta señales comunes con los monosacáridos pero en él si se observan señales característica de la presencia de lactosa (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis de espectros bases y señales (cm^{-1}) que coinciden en la región 800 – 1400 cm^{-1}

Relación (espectros bases)	Señales (cm^{-1})
Glucosa - Galactosa	837 y 1050
Glucosa - Lactosa	915,1020,1202 y 1341
Galactosa – Lactosa	(1060, 1074 y 1081) (1060, 1074 y 1081) respectivamente
Lactosuero- monosacáridos	No
Lactosuero - Lactosa	1045, 1078 y 1116

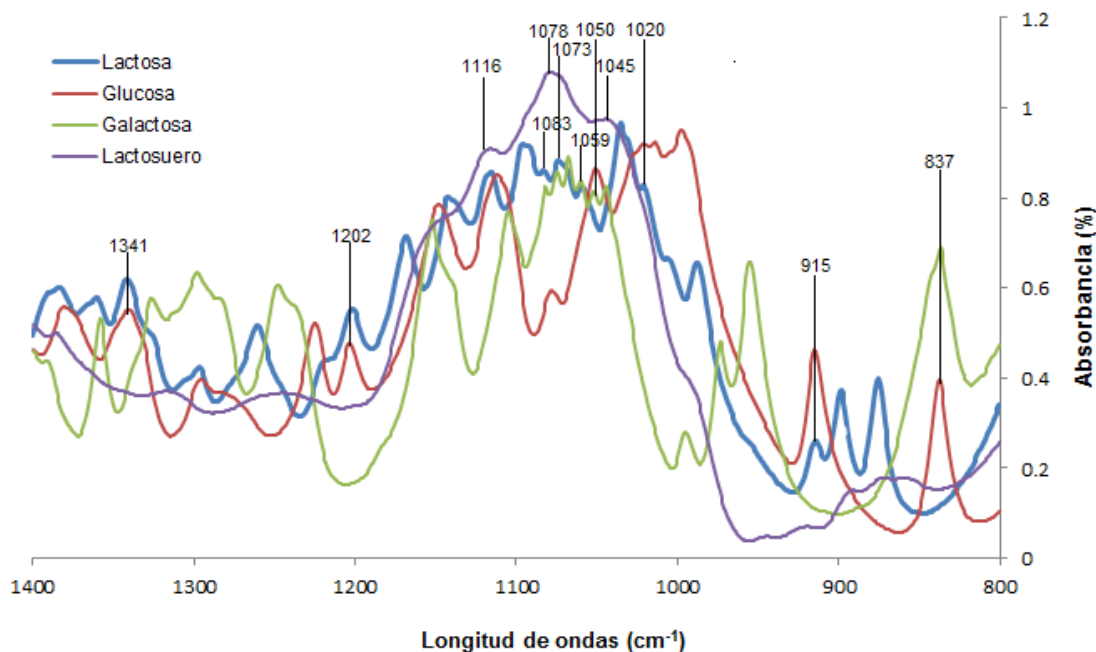


Figura 17. Análisis entre los espectros FT-IR bases de los monosacáridos (glucosa y galactosa), disacárido (lactosa) con el lactosuero nativo en la región 800 – 1400 cm^{-1} .

4.7.3 Comparación entre el Espectro FT- IR del Lactosuero Nativo con los Espectros FT- IR de los Lactosueros Hidrolizados.

La Figura 18, muestra la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier del lactosuero nativo y de los hidrolizados por la acción de la β -galactosidasa; destacándose en cada

uno de ellos, las señales características de sus componentes principales como grasa, proteína, lactosa y agua (Jung, 2000 y Callejas *et al.*, 2012); se evidencia de manera general una diferencia en la intensidad de las señales de cada uno de los componentes de las muestras hidrolizadas con respecto al lactosuero nativo; en el lactosuero hidrolizado, la región $800 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ que corresponde al contenido de lactosa se aprecia la aparición de nuevos picos de absorción, esto se da como efecto de la acción de la enzima en la hidrólisis de la lactosa contenida en el lactosuero en unidades de azúcares como glucosa y galactosa.

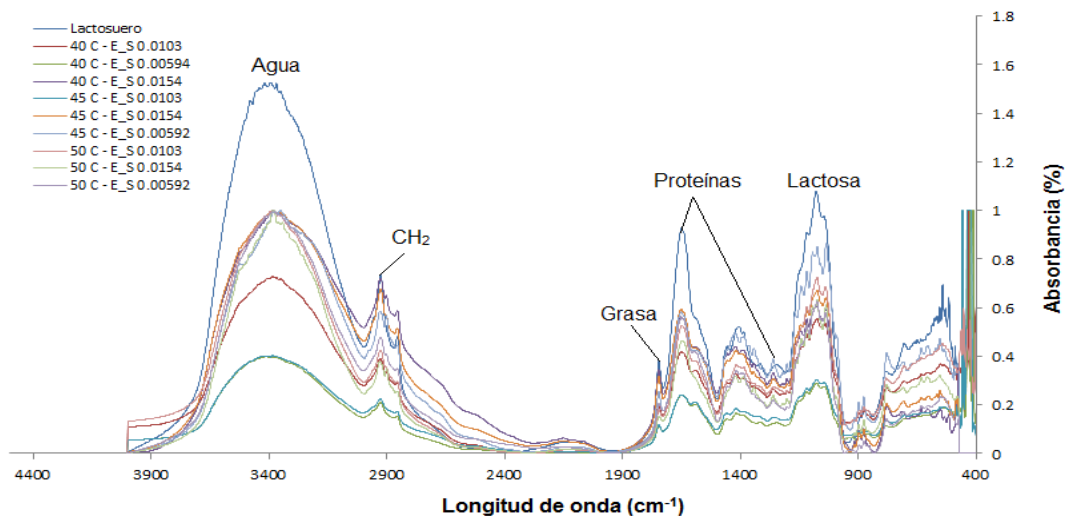


Figura 18. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) del Lactosuero nativo y lactosueros hidrolizados.

4.7.4 Análisis Estructural de la acción de la β -galactosidasa en la Hidrólisis del Lactosuero.

La Figura 19, muestra el espectro FT- IR obtenido del lactosuero hidrolizado con el tratamiento 45C – E_S 0.00592 que al compararse con el espectro FT- IR del lactosuero nativo en la región de estudio $800 - 1400 \text{ cm}^{-1}$, se evidencian diferencias espectrales entre éstos; por la desaparición de la señal 858 cm^{-1} en el lactosuero nativo y la aparición e intensidad de las señales $875, 898, 915, 1035, 1060, 1141, 1166, 1202, 1341$ y 1361 cm^{-1} en los hidrolizados; éstas señales

podrían relacionarse con la lactosa, porque también están presentes en ella; la señal 915 cm^{-1} se aprecia en la glucosa y el pico 1060 cm^{-1} está presente en la galactosa.

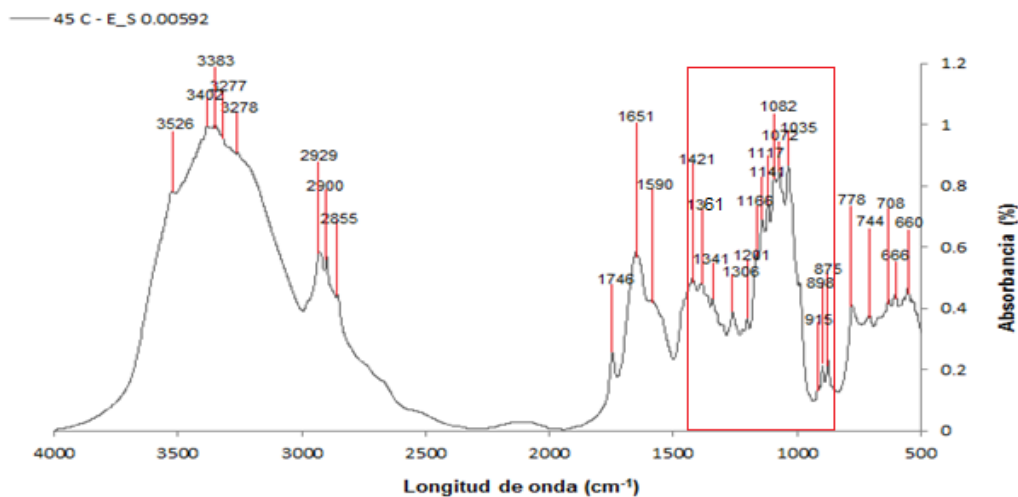


Figura 19. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) del Lactosuero hidrolizado (45C – E_S 0.00592).

Las señales a las longitudes de onda 875 , 898 y 915 cm^{-1} (figura 24) en los hidrolizados presentan diferencias en la intensidad e indican la formación de anillos de carbohidratos e hidratos de carbonos (Yu Lei *et al.*, 2009). A 898 cm^{-1} se tiene la vibración del grupo del carbono anomérico de carbohidrato, C1–H (Contreras *et al.*, 2010) y la señal 915 cm^{-1} es característica de las vibraciones de los grupos C-O y C-C presentes en los hidratos de carbono, como la α -D-glucosa (Ibrahim *et al.*, 2006).

La Tabla 15, muestra la altura de las señales referenciadas en la Figura 20, tomando como línea base $932\text{--}840\text{ cm}^{-1}$; en ella se evidencia que de los tratamientos utilizados para la hidrólisis del lactosuero; el tratamiento 45C – E_S 0.00592 presentó las nuevas señales con la mayor altura; lo que se relaciona con los resultados obtenidos en la producción de GOS, debido a que este tratamiento presenta la mejor condición para la formación de GOS.

Tabla 15. Altura de picos tomados de una línea base de 932 – 840 cm-1 que indican la formación de anillos de carbohidratos.

Longitud de onda cm-1	Lactosuero	40°C - E/S 0.0103	40°C - E/S 0.0154	45°C - E/S 0.0154	45°C - E/S 0.00592	50°C - E/S 0.0103	50°C - E/S 0.00592
915	-0.011	0.014	0.035	0.016	0.046	0.009	0.01
898	0.013	0.035	0.080	0.066	0.104	0.029	0.032
875	0.016	0.051	0.090	0.074	0.118	0.027	0.048

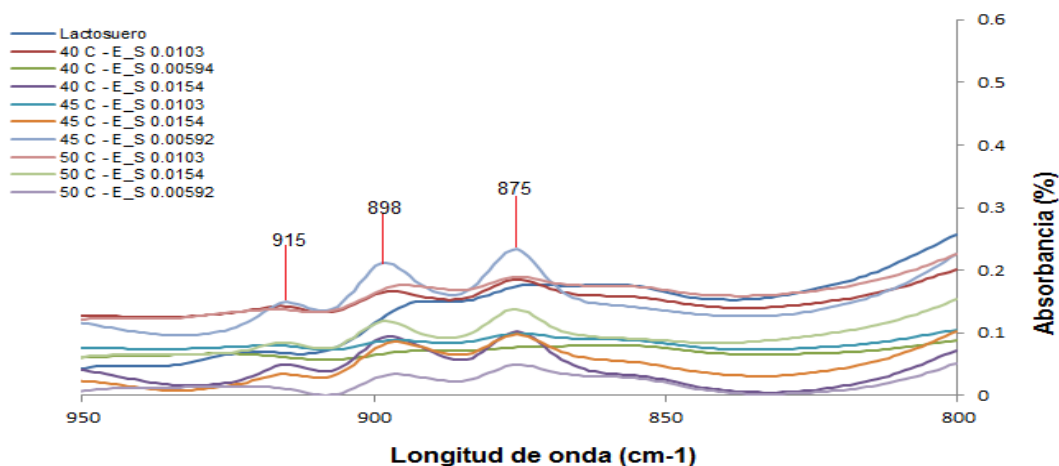


Figura 20. Espectro de FT – IR de los lactosueros hidrolizados para la formación de anillos de carbohidratos.

La aparición de éstas señales en el lactosuero hidrolizado podría relacionarse con la transgalactosilación de la lactosa del lactosuero realizada por la β -galactosidasa (Domínguez *et al.*, 2009); la cual genera una reorganización de la cadena hidrolizada conformando varios oligómeros de diferentes longitudes de cadena. Por lo general tienen un grado de polimerización entre 2 y 10 moléculas de galactosa con una molécula de glucosa terminal, entre los que se encuentran los GOS (Figura 21); los cuales se componen de 1 molécula de galactosa unida a una molécula de glucosa, logrando llegar a 7 moléculas de galactosa unidas entre sí con una terminación de una molécula de glucosa y se diferencian entre sí en la longitud de la cadena y en

el tipo de enlace (Miller *et al.*, 2000; Villareal, 2014). Los principales productos de la reacción son desde tri- hasta hexasacáridos con dos a cinco unidades de galactosa con enlaces β 1-3, 1-6 y 1-4 (Domínguez, 2009) y también se producen en la reacción disacáridos transgalactosilados (DT) formados por una molécula de galactosa y otra de glucosa con un enlace β -glicosídico diferente al de la lactosa (Meléndez *et al.*, 2011).

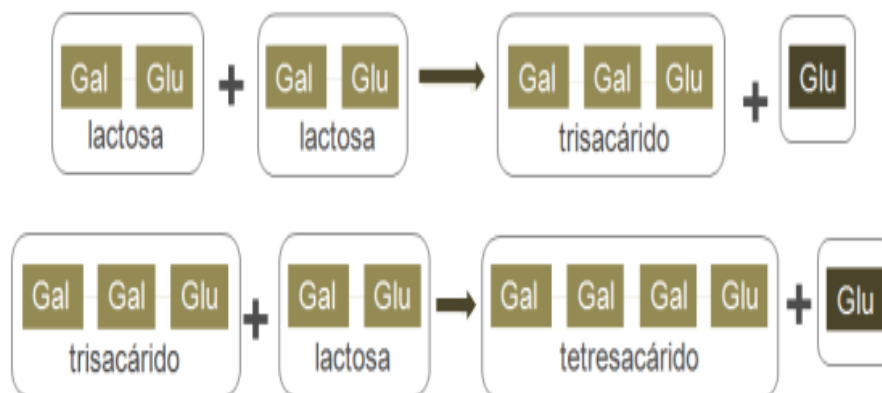


Figura 21. Varios oligómeros de distinta longitud de cadena, obtenidos por transgalactosilación de la lactosa con β -galactosidasa. Fuente: Zeus Química, S.A.

Otro comportamiento donde se evidencia la transgalactosilación de la lactosa o síntesis de los GOS en el lactosuero hidrolizado es el descrito en la Figura 22; en la región comprendida entre $950 - 1250 \text{ cm}^{-1}$, se encuentran las señales características que nos permiten distinguir la presencia de glucosa entre $1034 - 1080 \text{ cm}^{-1}$ (Leopold *et al.*, 2011 y Zapico, 2013) y las señales entre $900 - 1153 \text{ cm}^{-1}$ que se asignan a los enlaces C-O y C-C (Zapico, 2013); destacándose que en el lactosuero nativo se presenta en esa misma región los picos de absorción $1032, 1045, 1078$ y 1116 cm^{-1} , mientras que en el lactosuero hidrolizado la señal 1032 cm^{-1} se traslada a 1035 cm^{-1} y se da la aparición de las bandas de absorción de 1166 y 1141 cm^{-1} en la región espectral $1175 - 1140 \text{ cm}^{-1}$. La Tabla 16, muestra la altura de los picos de las región asociada a las vibraciones de enlace glicosídico C-O-C, tomando como línea base $1190 - 1107 \text{ cm}^{-1}$; evidenciándose que de todos los tratamientos utilizados para la hidrólisis del lactosuero, en el tratamiento $45\text{C} - \text{E}_\text{S} 0.00592$ las nuevas señales vinculadas a las vibraciones de enlace glicosídico C-O-C presentaron mayor

intensidad con respecto a los otros tratamientos. Este comportamiento se aprecia debido a que bajo estas condiciones de operación se dió la mayor formación de GOS.

Tabla 16. *Altura de picos tomados de una línea base de 1190 - 1107 cm-1 que indican las vibraciones del enlace C-O-C.*

Longitud de onda cm-1	Lactosuero	40°C - E/S 0.0154	45°C - E/S 0.0154	45°C - E/S 0.00592	50°C - E/S 0.0154	50°C - E/S 0.00592
1165		0.096	0.103	0.141	0.093	0.185
1141		0.085	0.082	0.150	0.110	0.267

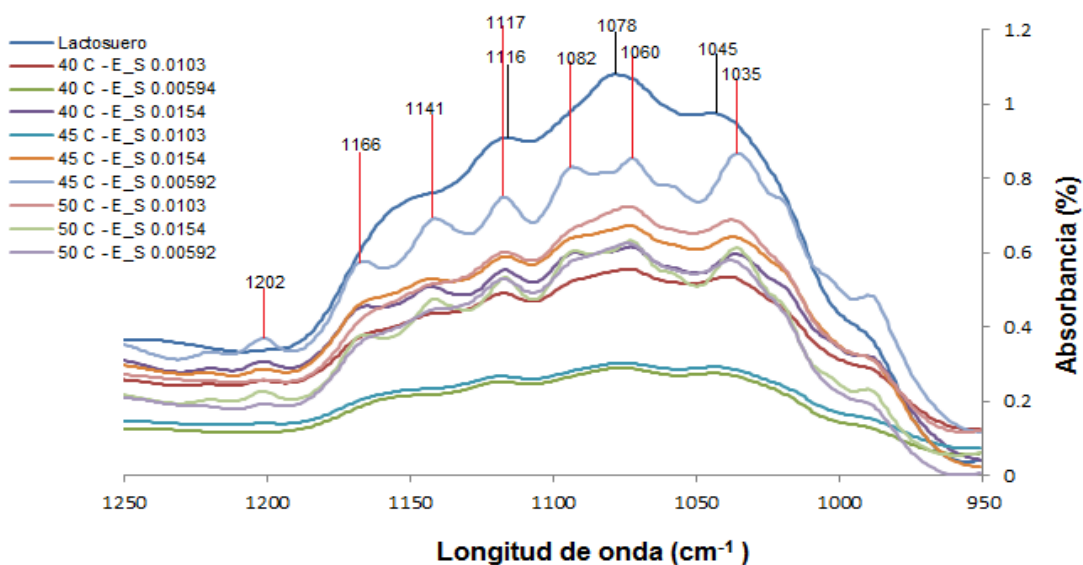


Figura 22. Espectroscopía de infrarrojo con trasformada de Fourier (FT-IR) de las vibraciones del enlace C-O-C.

La aparición de esas señales puede ser una manifestación espectroscópica vinculada con la formación del enlace β 1-4 glicosídico. Este hecho confirma la atribución de las bandas en el rango considerado a las vibraciones de estiramiento del enlace C-O-C glicosídico; también puede utilizarse en la identificación de las diferentes transformaciones estructurales de los polisacáridos con la participación del enlace glicosídico (Nikonenko *et al.*, 2002) y a su vez manifiesta la acción

catalítica de la β -galactosidasa sobre la lactosa; la cual en determinadas condiciones es capaz de catalizar tanto la hidrólisis de la lactosa como la formación de un enlace β -glicosídico entre la galactosa liberada en la hidrólisis y la lactosa u otros carbohidratos presentes en el medio de reacción (Corzo *et al.*, 2015). La enzima β -galactosidasa hidroliza enlaces o-glicosídicos de residuos β -D-galactosa terminales y no reductores, mediante reacciones de transgalactosilación; originando la formación de cadenas 4' o 6'-galactosil-lactosa, entre cadenas más largas de oligosacáridos y algunos disacáridos transgalactosilados (Macfarlane, 2007).

5. CONCLUSIONES

Se evidenció que un aumento de los azúcares totales favorece el proceso de hidrólisis de lactosa; mientras que una disminución de los azúcares totales favorece la formación de GOS.

La temperatura, la relación enzima - sustrato y la interacción entre ellas, tienen un efecto significativo sobre la producción de GOS. La mejor condición para la formación de GOS es a la temperatura de 45°C y a la menor relación enzima - sustrato (0,00592 ml preparado enzimático /gr de lactosa) con una velocidad de formación de 43,39 g/h y la condición menos favorable para la formación de GOS es a la temperatura de 50 °C y a la mayor relación enzima sustrato (0.0154 ml de preparado enzimático/gr de lactosa).

El uso de la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR); permitió obtener claramente los espectros característicos de glucosa, galactosa, lactosa, lactosuero y lactosueros hidrolizados por la acción de la β -galactosidasa; lográndose identificar y analizar las bandas de absorción que se asocian a los grupos funcionales de los componentes del lactosuero como: lactosa, grasa, proteínas y agua.

Al comparar los espectros FT-IR de los monosacáridos (glucosa y galactosa), del disacárido (lactosa) y del lactosuero nativo en la región de interés de estudio (800 – 1400 cm^{-1}) que corresponden a los azúcares, se pudieron evidenciar señales similares de absorción entre glucosa – galactosa, e Igualmente, entre galactosa y lactosa. El lactosuero nativo no presentó señales comunes con los monosacáridos, pero en él se observaron señales de absorbancia que identifican la presencia de lactosa.

A través del análisis de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), se pudo evidenciar el comportamiento de la síntesis de GOS por las diferencias espectrales del lactosuero nativo con los lactosueros hidrolizados en la región de estudio 800 – 1400 cm^{-1} , con la aparición e intensidad de nuevas señales en los lactosueros hidrolizados, las cuales están presentes en la lactosa y están asociadas con la formación de anillos de carbohidratos e hidratos de carbonos y con la formación de enlaces C-O - C-C y a las vibraciones de enlace glicosídico C-O-C.

El mayor rendimiento de la formación de GOS que se obtuvo con el tratamiento 45C – E_S 0.00592 corresponde a la aparición de nuevos picos con las mayores intensidades en el lactosuero hidrolizado.

6. RECOMENDACIONES

Trabajar con concentraciones altas de lactosa; debido a que a mayores concentraciones se hace más eficiente el proceso, además se obtienen los mejores rendimientos para la producción de GOS.

Emplear la técnica analítica HPLC, la cual es adecuada para determinar si en la síntesis de GOS por la β -galactosidasa, los productos obtenidos en la reacción son por hidrólisis o por transgalactosilación.

Analizar los modelos cinéticos que puedan gobernar el fenómeno y tener en cuenta otras variables de estudio como pH, lactosa inicial las cuales pueden tener incidencias en el proceso de producción de GOS.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aider, M., Halleux, D., & Melnikova, I. (2009). Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(3), 334-341.
- Albayrak, N., & Yang, S. (2002). Production of Galacto-Oligosaccharides from Lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase Immobilized on Cotton Cloth. *Biotechnol Bioeng*; 77(1), 8 – 19.
- Almécija, M. (2007). Obtención de lactoferrina bovina mediante ultrafiltración del lactosuero. Universidad de Granada.
- Almeida, K.E., Tamime, A.Y., & Oliveira, M.N. (2009). Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology* 42(2), 672–678.
- Alvarado, C., & Guerra, M. (2010). Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales venezolanos de nutrición*, 23 (1).
- Álvarez, M. (2013). Caracterización de los diferentes tipos de lactosueros producidos en la cooperativa Colanta LTDA. Corporación Universitaria Lasallista. Recuperado: http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1036/1/Caracterizacion_fisicoquimica_diferentes_tipos_lactosueros_producidos_Colanta.pdf
- Análisis microbiológico de los alimentos (2014). Metodología analítica oficial. Microorganismos indicadores, volumen III. Recuperado: http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I_II.pdf

- Andrade, J.E. (1999). Efecto del flujo de alimentación sobre la ultrafiltración del suero pasteurizado de queso. Tesis de Ing. Agr. Zamorano, Honduras.
- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists (1990). Manual of Official Methods of Analysis. 13th Edition. Washington DC.
- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. (1995). Manual of Official Methods of Analysis. 15th Edition. Washington DC.
- Audic, J.L., & Chaufer, B. (2003). Non-food applications of milk components and dairy co-products. *A review*, Lait 83: 417-438.
- Barrale, L.E. (2014). Estudio de la hidrólisis de lactosa y producción de galacto-oligosacáridos con diferentes dosis de enzima β -galactosidasa y concentración de lactosa inicial. Universidad Nacional del Litoral. Recuperado: [file:///C:/Users/usuario/Downloads/1414_alimentos-7206%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/usuario/Downloads/1414_alimentos-7206%20(3).pdf)
- Beltrán, L.J., & Acosta, A. (2012). Empleo de una β -galactosidasa comercial de *Kluyveromyces lactis* en la hidrólisis de lactosuero. Universidad de Antioquía. *Hechos Microbiol* 3(2), 25-35. <http://www.udea.edu.co/hm>.
- Benavides, L.A. (2013). Nanotubos de carbono aplicados al electrodo negativo de una bacteria de Ni/MH. Universidad Nacional del Cuyo. Recuperado: http://ricabib.cab.cnea.gov.ar/415/1/1Benavides_Castillo.pdf.
- Bernadette, K. (2014, 3 de agosto). Suero lácteo, clave en la innovación de alimentos. Recuperado de <http://www.portafolio.co/economia/suero-lacteo-clave-la-innovacion-alimentos>.
- Boon, M.A., & Janssen, A.E.M. (2000). Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharide. *Enzyme and Microbial Technol* 26: 271 – 281.

- Cáceres, A.P. (2011). (Estudio de caracterización fisicoquímica de látex natural proveniente *Hevea brasiliensis* por medio termogravimetría. Universidad Industrial del Santander. Bucaramanga. Recuperado: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/6775/2/140795.pdf>.
- Callejas, J., Prieto, F., Reyes, V., Marmolejo, Y., & Méndez, M. (2012). Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo. Universidad de Guanajuato 22(1), 11-1.
- Calvacante, A.E. & Pastore G.M. (2015). Galactooligosacáridos: produção, benefícios à saúde, aplicação em alimentos e perspectivas. *Scientia Agropecuaria* 6 (1) .Recuperado: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2077-99172015000100007&script=sci_arttext.
<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.07>
- Calvo, M. Caseínas .Bioquímica de los alimentos
<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/proteins/caseina.html>
- Cardelle-Cobas, A. (2009). Síntesis, caracterización y estudio del carácter prebiótico de oligosacáridos derivados de la lactulosa. Universidad Autónoma de Madrid. Recuperado: <http://digital.csic.es/handle/10261/101625>
- Cardelle-Cobas, A., Villamiel, M., Olano, A., Corzo Nieves. (2008). Study of galactooligosaccharide formation from lactose using Pectinex Ultra SP-L. *J. Sci Food Agric*; 88: 954 – 961.
- Castro, G., Avella, N., & Solano, C. (2015). Comparación de la producción de galactooligosacáridos (Gos) a partir de lactosuero en polvo y lactosa usando *aspergillus oryzae* y enzima β -galactosidasa libre*Programa de Ingeniería de Alimentos Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia.

- Colinas, B. (2013). Obtención enzimática, caracterización y propiedades prebióticas de oligosacáridos empleados en leches infantiles. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Contreras, H.j., Trujillo, H.A., Arias, G.O., Pérez, J.L., & Delgado, E.F. (2010). Espectroscopia ATF – FTIR de celulosa: Aspecto instrumental y tratamiento matemático de espectros. *ε-Gnosis* 8, 1-13. Universidad de Guadalajara. México.
- Corzo,N., Alonso, j.L., Azpiroz, F., Calvo, M.A., Cirici,M Leis6,R., Lombó,F., Mateos-Aparicio,I., Plou,F.J., Ruas-Madiedo,P P. Rúperez,P Redondo-Cuenca,A., Sanz, M.L., & Clemente,A. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria* 31(Supl. 1), 99-11. Madrid.
- Crittenden, R. G., & Playne, M. J. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides, *Trends in Food Science & Technology*, 7, 353 - 361.
- Chen, C. W., Ou-Yang, C. C., & Yeh, C. W. (2003). Synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles. *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 497-507.
- Cheng, C.C., Yu, M.C., Cheng, T.C., Sheu, D.C., Duan, K.J., & Tai, W.L. (2006). Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Lett* 2006; 28: 793-797.
- Corzo, N., Alonso, J.L., Azpiroz, F., Calvo, M.a., Cirici, M., Leis,R., Mateos – Aparicio, L., Plou,F.J., Ruperez,P., Redondo- Cuenca, A., Sanz, M.L & Clemente, A. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria* 31(1), 99-118. Recuperado: <http://www.aulamedica.es/nh/pdf/8715.pdf>
- Corral, J.M. 2005. Clonación, expresión y evolución dirigida de β-galactosidasas de procariotas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

- Curia, M.V. (2010). Estudio Físicoquímico y Catalítico del Sistema Mn-O-V. Universidad de La Plata. Recuperado: file:///C:/Users/usuario/Downloads/all-0001.pdf.
- Cury, K., Arteaga, M., Martínez, G., Luján, D., & Durango, A. (2014). Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteínizado) utilizando *Lactobacillus casei*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 137-145.
- Domínguez-Vergara, A., Luz Vázquez-Moreno, L., & Ramos-Montfort, G. (2009). Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion*; Organó Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición 59 (4) .Hermosillo, Sonora, México
- Etzion, Y., Linker, R., Cogan, U & Shmulevich, I. (2004). Determination of protein concentration in Raw Milk by Mid- Infrared Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy. *Journal Dairy Science* 87, 2779-2788.
- Fox, P.F., & McSweeney, P.L. (1998). Dairy chemistry and biochemistry. Primera edición .pp 24-29. London, U.K: Thomson science.
- Gaur *et al.*, 2005. Síntesis de Gos utilizando la β -galactosidasa *Aspergillus oryzae* inmovilizada por tres técnicas diferentes, adsorción, enlace covalente de quitosano y la agregación de enlaces cruzados (CLEA).
- Grizad, D., & Barthomeuf, C. (1999). Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Review. Reprod. Nutr. Dev.* 39: 563 – 588.
- Gobernación de Sucre (2010) .Informe de Coyuntura. Evaluaciones agropecuarias. Secretaria de desarrollo económico y medio ambiente. Sincelejo 2010.

- Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., & Gras, S. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharides production from lactose, *Food Chemistry*, 121, 307 - 318.
- Goulas, A.; Tzortzis, G., & Gibson, G. R. (2007). Development of a process for the production and purification of alpha- and beta-galactooligosaccharides from *Bifobacterium bifidum* NCIMB 41171, *International Dairy Journal*, 17(6), 648 - 656.
- Guerrero & Vera. (2010). Síntesis de Galactooligosacáridos con β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*. Departamento de Biocatálisis, Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.
- Guío, F.A., (2014). Evaluación de la producción de galactooligosacáridos a partir de materias primas lácteas con β -galactosidasa inmovilizada. Universidad Nacional de Colombia. Recuperado: <http://www.bdigital.unal.edu.co/49957/>.
- Gutiérrez, E. (2006). Desarrollo de una bebida de suero dulce derivado de la fabricación de queso fresco, fermentada con cultivos *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus salivarius var thermophilus* (TCC-20), adicionada con cultivo probióticos *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei* LC-01. Tesis para optar el título de licenciado en tecnología de alimentos. Costa Rica. Pág 7.
- Hansson, T., & Adlercreutz, P. (2001). Optimization of Galactooligosaccharides production from lactose using β -glycosidases from hyperthermophiles. *Food Technol* 2001; 15: 79 – 97.
- Ibrahim, M., Alaam, M., El-Haes, Jalbout, H.F., & Ane de Leon. (2006). Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. *Eclética Química*, 31(3), 15-21. São Paulo.
- Illanes, A. (2015). Alimentos funcionales y biotecnología. *Revista Colombiana de Biotecnología* 17(1), 5-8. Recuperado: <http://www.redalyc.org/pdf/776/77639196001.pdf>.

International Food and Drug Administration “Bacteriological Analytical Manual”, BAM Online, enero 2001, capítulo 18.

Hernández, M. (2013). Utilización de lignina de olotedeamíz como componente de en películas base almidón. Universidad Iberoamericana. Recuperado: <http://www.bib.uia.mx/tesis/pdf/015718/015718.pdf>.

Huerta, L.M (2010). Síntesis enzimática de Galacto –oligosacáridos a partir de residuos de la industria láctea: Desafíos tecnológicos y oportunidades. Departamento de Biocatálisis. Universidad Católica Valparaíso.

Huerta, L.M., Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L., & Illanes, A. (2011). Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry* 46, 245–252.

Jelen. (1979). Optimización, Rendimiento y aseguramiento de la inocuidad en la Industria Quesera. Capítulo IV opciones para darle valor agregado al lactosuero de quesería.

Jung, C. (2000). Insight into protein structure and protein – ligand recognition by Fourier Transform infrared spectroscopy. *J. Mol Recognit* 13, 325-357.

Koutinas, A., Papapostolou, H., Dimitrellou, D., Kopsahelis, N., Katechaki, E., Bekatorou, A; & Bosnea, L. (2009). Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology* 100(15), 3734-3739.

Ladero, M., Santos, A., García, J., Carrascosa, A., Pessela, B. C. C., & García-Ochoa, F. (2002). Studies on the activity and the stability of β -galactosidase from *Thermus sp* strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*, *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 392 - 405.

- Leopold, L.F., Leopold, N., Diehl, H., & Socaciu, C. (2011). Quantification of carbohydrates in fruit juices using FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *Spectroscopy* 26, 93 –104. University of Agricultural, Sciences and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca, Romania.
- Liu, X., Chung, K., Yang, S., & Yousef, A. (2005). Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Journal Process Biochemistry* 40, 13-24.
- Londoño, M. (2006). Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. Perspectivas en nutrición humana. *Revista Perspectivas en Nutrición Humana-Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia* 16,11-20.
- Londoño, M., Sepúlveda, J., Hernández, A., & Parra, J. (2008). Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*. *Revista de la Facultad de ciencias agropecuarias* 61(1), 4409-4421.
- López, O.V. (2011). Desarrollo, caracterización y aplicación de envases biodegradables a partir de almidón. Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2651>.
- Macfarlane, G. T., Steed, H., & Macfarlane, S. (2007). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 305-344.
- Mahoney, R. R. (1998). Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose. Hydrolysis: a review. *Food Chemistry*, 63 (2): 147-154.
- Martínez et al., 2007. Estudio sobre la optimización de las condiciones para la formación de galactooligosacáridos durante la hidrólisis de lactosa a partir de la β -galactosidasa *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HPG).

- Martínez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A., and Villamiel, M. (2008). Optimization of conditions for galactooligosaccharides synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, *Food Chemistry*, 107, 258 - 264.
- Martínez, A. (2012). Bebida deslactosada y fermentada a partir del lactosuero, con pulpa de maracuyá, y enriquecida con l-glutamina, Tesis Maestría en Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Córdoba, Berastegui.
- Matsumoto, K., Kobayahi, Y., Ueyama, S., Watanabe, T., Tanaka, T., Kan, T., Kuroda, A., & Sumihara, Y. (1990). Galactooligosaccharides. In T. akanuki, Oligosaccharides. Production, Properties and Applications. *Japanese technology reviews*, 3 (2). New York: Gordon: Gordon and Breach Science Publishers. Pp 90-106.
- Meléndez, N.P., Aguilar, C.N., Nervarez, M., & Rodríguez, R. (2011). Compuestos prebióticos: de las moléculas al ser humano. *Revista de la Sociedad Venezolana de microbiología* 31, 6-12.
- Meyer, PD., & Tung land, B.C. (2002). Fate of Fiber in the Gastrointestinal Tract and Consequences. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2002; 3: 78-92.
- Michelon, M., Manera, A.P., Carvalho, A.L., & Filho, F.M. (2014). Concentration and purification of galacto-oligosaccharides using nanofiltration membranes. *International Journal of Food Science and Technology* 49: 1953-1961.
- Microbiología de los alimentos módulo II. (2013). Area química y microbiología de alimentos. Departamento de química orgánica. Disponible: http://www.qo.fcen.uba.ar/quimor/wp-content/uploads/2013/02/Guia-Micro-Alim-Mod-II_2013.pdf
- Miller, G. L. (1959). Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.

- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2000). *Statistic and chemometrics for analytical chemistry*(4th ed.). Harlow: Pearson Education.
- Monsalve, J., & González, D. (2005). Elaboración de un queso tipo ricotta a partir de suero lácteo y leche fluida. *Revista Científica* 15(6), 543-550.
- Morales-Koelliker, D., & Velez-Ruíz, J.F. (2013). Prebióticos. Su importancia en la salud humana y propiedades funcionales en tecnología de alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 7(1),12-24. Recuperado: web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-71-Morales-Koelliker-et-al-2013.pdf.
- Mussatto, S.I., Mancilha, I.M. (2007). Non-digestible oligossaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*. 68:587- 597.
- Nakayama, T., & Amachi, T. (1999). *Encyclopedia of Bioprocess Technology Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. pp 1291-1305. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Neri, D., Balcao, V., Costa, R., Rocha, I., Ferreira, E., Torres, D., Rodríguez, L.; Carvalho, L., & Teixeira, J. (2009). Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol, *Food Chemistry*, 115, 92 - 99.
- Nikonenko, N.A., Buslov, D.K., Sushko, N.I., & Zhibankov, R.G. (2002). Analysis of the structure of carbohydrates with use of the regularized deconvolution method of vibrational spectra. B.I. Stepanov Institute of Physics, Academy of Sciences of Belarus, Skaryna.
- ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). (2008). Situación del mercado del suero en Chile. En: ODEPA, agricultura y mercados Homepage (on line). (Citado: Agosto, 2008). Disponible en: <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servlet/contenidos.ServletResumenesScr?idcla=2&idcat=7>

- Olivero, R., Cury, K., & Aguas, Y. (2011). Comercialización de leche cruda en Sincelejo, Sucre. *Revista colombiana de ciencias animal – recia* issn: 2027 – 4297 1(3), 157- 163.
- Onishi, N., & Tanaka, T. (1996). Purification and Properties of a Galacto- and Gluco-Oligosacáridos producing β -glycosidase from *Rhodoturola minuta* IFO879. *J.Ferm Bioeng*; 82 (5): 439 – 443.
- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105, 1-14.
- Panesar, P. S., Kumari, S., & Panesar, R. (2010). Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries, *Enzyme Research*, 1 - 16.
- Parra, R.A (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 62(1) 4967- 4982.
- Parra, R.A (2010). Digestión Anaerobia de Lactosuero: Efecto de Altas Cargas Puntuales. *Revista Fac.Nal.Agr.Medellín* 63(1), 5385-5394.
- Pereira-Rodriguez, A., Fernandez-Leiro, R., Gonzalez-Siso, M.I., Cerdan, M.E., Becerra, M. & Sanz-Aparicio, J. (2012). Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Journal of Structural Biology*, 177: 392-401.
- Piñeiro, M., Asp, NG., Brunser, O., Macfarlane, S., Morelli, L., & Reid, G. (2007). FAO technical meeting on prebiotics. Disponible en: http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/Prebiotics_Tech_Meeting_Report.pdf.
- Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(4), 397- 403.

- Prenosil, J.E., Stuker, E & Bourne, J.E (1987). Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis and their importance in a whey hydrolysis process: Part II: Experimental. *Biotechnol Bioeng.* 30: 1026-1031.
- Rastall, R. A. (2010). Functional Oligosaccharides: Application and Manufacture, *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 305-339.
- Recinos, L., & Saz, O. (2006). Caracterización del suero lácteo y Diagnostico de alternativas de sus usos potenciales en el salvador. Universidad de el Salvador.
- Restrepo, M. (2006). Producción más Limpia en la Industria Alimentaria. *Revista Producción + Limpia*, 1(1), 88-89.
- Reuter & Rusborg (1999). Síntesis de Gos con β -galactosidasa de *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergillus oryzae* y *Escherichia coli*.
- Richmond, M. L., Gray, J. I., & Stine, C. M. (1981). β -Galactosidase: Review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. *J. Dairy Sci.*, 64:1759-1771.
- Rios, I.A. (2010). Quiometría en miel de abejas para la detección de azúcares y detección de adulteración utilizando espectroscopia infrarroja. Instituto Politécnico Nacional. Recuperado:
<http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/6944/TESIS%20ANTONIETA%20RIOS%20CORRIPIO.pdf?sequence=1>.
- Roberfroid, M.B. (2007). Prebiotics: The concept revisited. *Journal of Nutrition*. 137: 830S-837S.
- Rodríguez, A., Madrid, M. (2012). Elaboración de una bebida fermentada a partir de lactosuero. Tesis de pregrado, Programa de Ingeniería Agroindustrial. Universidad de Sucre. Sincelejo. Sucre.

- Rodríguez, D. (2015). Estudio de la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*. Universidad de Coruna. Recuperado: http://ruc.udc.es/bitstream/2183/14196/2/RodriguezOlivenza_David_TFM_2015.pdf.
- Saarela, M., Lähteenmäki, R., Crittenden, R., Salminen, S., & Mattila-Sandholm, T. (2002). Gut bacteria and health foods-the European perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 99-117.
- Sako, T., Matsumoto, K., & Tanaka, R. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy J* 9, 69 – 80.
- Sánchez, O., Ortiz, M., & Betancourt, A. (2004). Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus spp*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, ISSN 1909-8758, 6(1), 43-54.
- Sanz, J.I. (2009). Production of galacto-Oligosaccharides from lactose by immobilized β -galactosidase and posterior chromatographic separation. School of The Ohio State University. Recuperado: https://etd.ohiolink.edu/rws_etd/document/get/osu1230909589/inline
- Sistema de información de la oferta agropecuaria (2009). Caracterización de la producción de la leche en Colombia.
- Sosa- Ancona, E., Figueroa, I., Rodríguez, G., Jiménez, J., Gómez, L., García, M., Cruz, A. (2011). Producción de galacto-oligosacáridos por reacción de transgalactosilación de β -glicosidasa hipertermofílica. Recuperado: <http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/I/carteles/CI-63.pdf>.
- Spellman, D., O’Cuinn, G., & FitzGerald, R. (2009). Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins. *Food Chemistry* 114(2), 440-446.

- Taniguchi, H. (2005), Carbohydrate active enzymes for the production of oligosaccharides, in *Handbook of industrial biocatalysis*, edited by I. C.-T. H. (Ed). pp. 20-21-20-23, CRC Press, Boca Raton.
- Tewari, J., & Irudayaraj, J. (2004). Quantification of saccharides in multiple floral honeys using fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy. *J. Agric Food Chem* 52(11), 3237-3243.
- Thammarutwasik, P.; Hongpattarakere, T.; Chantachum, S.; Kijroongrojana, K.; Itharat, A.; Reanmongkol, W.; S., T., and Ooraikul, B. (2009), Prebiotics – A Review, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 31(4), 401-408.
- Tokošová, S., Hronská, H., Rosenberg, M. (2015). Production of galacto-oligosaccharides by commercial preparates of fungal β -galactosidase. *Acta Chimica Slovaca* 8(2), 101—106. DOI: 10.1515/acs-2015-0018.
- Torres, J. (2001). Utilización del ultrafiltrado de suero pasteurizado del queso para el desarrollo de una bebida isotónica. Carrera de Agroindustria. Zamorano. Recuperado: <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1332/1/T1263.pdf>
- Torres, D., Goncalves, M. P., Teixeira, J., & Rodrigues, L. (2010). Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications and significances as prebiotics, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 438 - 454.
- Vera, C., Guerrero, C., Conejeros, R., & Illanes, A. (2012). Synthesis of galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. *Enzyme and Microbial Technology* 50, 188– 194
- Villarreal, F.A. (2014). Evaluación de la producción de galactooligosacáridos a partir de materias primas lácteas con β - galactosidasa inmovilizada. Universidad Nacional de Colombia. Recuperado: <http://www.bdigital.unal.edu.co/49957/1/80075266.2014.pdf>.

- Wattiaux, M.A. (2008). Composición de la Leche y Valor Nutricional. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin-Madison.
- Yang, S.-T., & Bednarcik, J. (2001). Production of Galacto-Oligosaccharides from Lactose by Immobilized β -Galactosidase, in *Applied Biocatalysis in Specialty Chemicals and Pharmaceuticals* edited by B. D. Saha, D., pp. 131 - 153, American Chemical Society, Washington D.C.
- Yang, S.T., & Silva, E.M. (1995). Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *J. Dairy Sci.* 78, 2541-2562.
- Yu Lei., Qun Zhou ., Yan-ling Zhang ., Jian-bo Chen ., Su-qin Sun ., & Isao Noda. (2010). Analysis of crystallized lactose in milk powder by Fourier-transform infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation infrared spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 794, 88-93.
- Zeus Química, S.A. Galactooligosacáridos GOS Fibra Prebiótica.
Recuperado:<http://www.zeusquimica.com/ftp/noticias/Nutricion/dipticgoses.pdf>
- Zhou, Q. Z. K., and Chen, X. D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, *Biochemical Engineering Journal*, 9, 33 - 40.
- Zapico, S. (2013). Determinación simultánea de mono y disacáridos en zumos de frutas mediante técnicas espectroscópicas. Trabajo de Maestría. Universidad de Oviedo.

ANEXOS

ANEXO A

Protocolo para la determinación de la actividad enzimática de la enzima comercial de tipo β -galactosidasa proveniente de la levadura *Kluyveromyces lactis* (Lactozym Pure 6500L).

Preparación de los baños térmicos

Previamente al desarrollo de las corridas experimentales se preparan varios baños térmicos para hacer más ligera la actividad de la enzima, la cual se ve fuertemente influenciada por la temperatura a la cual es sometida.

Baño termostatado: preparar el baño a una temperatura de 45°C, la cual es la temperatura óptima de trabajo de la enzima, en él se calentará la solución de lactosa a la que se le adicionará la enzima.

Baño de hielo: con la ayuda de cubetas, preparar el baño que esté por debajo de los 5°C; en él se deben depositar las muestras tomadas a cada tiempo de operación; con el fin de desactivar la enzima.

Baño de maría: preparar un baño de maría ~100°C; él se empleará para preparar las muestras a las cuales se le hará la medición de azúcares reductores por el método de DNS.

Preparación de la muestra blanco

El blanco es necesario para establecer un punto de medición de las muestras a las cuales se les debe determinar los azúcares reductores por acción enzimática. Realizar los siguientes pasos:

En un tubo de ensayo depositar 0,5ml de agua destilada y 0,5ml de DNS.

Agitar en vortex y someter a calentamiento en el baño de maría por un tiempo de 5 minutos.

Llevar el blanco, al baño de agua fría hasta llegar a temperatura ambiente.

Agregar 5ml de agua destilada al tubo y agitar en vortex y dejar en reposo y leer en el espectrofotómetro a 540 nm.

Corrida experimental

Preparar 50 ml de solución de lactosa al 1%; diluir 0,5 gr de lactosa anhidra en 50 ml de solución tampón fosfato a un pH entre 6,2 a 6,5 hasta obtener una solución homogénea. Calentar la solución a 45°C en el baño termostatado. Estabilizar la temperatura de la solución y adicionar 74,25 µL de la enzima β-galactosidasa.

Muestreo

Tomar muestras de 0,5 ml en tiempos de 0 a 5 minutos y depositarlas en el baño frío hasta completar el muestreo.

Determinación De Azúcares Reductores

Adicionar a cada tubo con muestras 0,5 ml de DNS.

Agitar todos los tubos en vortex.

Llevar a baño de maria por 5 minutos.

Enfriar hasta temperatura ambiente.

Adicionar a cada tubo 5 ml de agua destilada y agitar en vortex.

Dejar en reposo y leer a 540 nm

Realizar curva de abs vs Tiempo.

Realizar curva de concentración de lactosa vs tiempo.

ANEXO B

Determinación de glucosa (método de la glucosa oxidasa peroxidasa GOD-PAD)

Para preparar las muestras se usa la siguiente dosificación:

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón (S)	-	20 µL	-
Muestra	-	-	20µL
Reactivo (A)	2 ml	2 ml	2 ml

Agitar bien e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.

Leer absorbancia del patrón y la muestra a 500 mn frente al blanco.

Para los cálculos de la glucosa se emplea la siguiente ecuación

$$\frac{A_{muestra}}{A_{patron}} * C_{patron} = C_{muestra}$$

En donde:

$A_{muestra}$: absorbancia de la muestra.

A_{patron} : absorbancia de patrón

C_{patron} : concentración del patrón en mg/Dl

$C_{muestra}$: concentración de la muestra

ANEXO C

Método para determinar lactosa por DNS (MILLER, 1959)

Para la prueba de lactosa se usa el método DNS, empleando el protocolo planteado en la metodología; confrontando los resultados de la absorbancia en la siguiente curva patrón, para las mediciones se realiza una dilución 1:50.

