



HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON β -galactosidasa DE *Kluyveromyces lactis* PARA LA OBTENCIÓN DE JARABE DE LACTOSUERO

Enzymatic hydrolysis with β -galactosidase de *kluyveromyces lactis* for the obtaining lactosuero syrup

¹Mabel Parada Rivera*, ¹Zoila Tapia González, ¹Evelyn Llerena Toledo, ^{1,2}Francisco Carreras García, ³Paúl Manobanda Pinto

¹Docente Investigador, Carrera de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo – ESPOCH. Riobamba, Ecuador.

²Escuela Básica, Facultad de Ingeniería, Universidad de los Andes – ULA. Mérida, Venezuela

³Departamento de Ciencias de la Tierra, Carrera de Agroindustria, Universidad Estatal Amazónica – UEA. Puyo (Ecuador).

*mparada@epoch.edu.ec

R esumen

La presente investigación tuvo como objetivo principal la obtención de jarabe de suero a partir de residuos lácteos, para provechar todos los nutrientes presentes en este subproducto lácteo y reducir al máximo los impactos generados al ambiente. El jarabe de suero se obtuvo a través de una reacción de hidrólisis con la enzima: β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y la adición de insumos y aditivos, 1 h a 40 °C y 6,4 de pH con agitación constante. El lactosuero cumplió desde el punto de vista fisicoquímico y bacteriológico para ser utilizado como materia prima en la producción del jarabe de suero y tuvo aceptación en una muestra de consumidores. El proceso a nivel de laboratorio logró validarse a escala piloto, obteniéndose resultados similares en ambos casos, los parámetros a controlar fueron: temperatura, agitación, cantidad y calidad del sustrato y de la enzima, pH y tiempo de reacción. Las propiedades del jarabe obtenido muestran ciertas variaciones con respecto al comercializado en Ecuador, lo cual puede ajustarse concentrando el producto final. Se realizaron balances de masa y energía para el diseño de la marmita. Se debe garantizar que la materia prima, insumos y aditivos se encuentren en óptima calidad y verificar las características de la enzima utilizada en caso de que sea sustituida para establecer los nuevos parámetros de reacción (tiempo de reacción, pH y temperatura).

Palabras claves: Lactosuero, Enzima B-Galactosidasa, Hidrólisis del suero, Jarabe de suero.

A bstract

The main objective of the present research was obtaining serum syrup from dairy waste, to take advantage of all the nutrients present in this dairy byproduct, which gives aggregate value to this substance and, in turn, reduce the impacts generated to the environment as much as possible. Serum syrup was obtained through a hydrolysis reaction with the enzyme: β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* and the addition of inputs and laboratory scale additives and then, it was validated on a pilot scale in a 10-liter capacity pot. The reaction conditions were 1 hour at 40 °C and pH 6.4 with constant stirring. The whey complied from the physicochemical and bacteriological point of view to be used as raw material in the production of the serum syrup and it had acceptance in a sample of consumers. The laboratory-level process could be validated on a pilot scale, obtaining similar results in both cases, the parameters to be controlled were temperature, agitation, substrate and enzyme amount and quality, pH and reaction time. The properties of the obtained syrup show certain variations with respect to the one commercialized in Ecuador, which can be adjusted by

concentrating the final product. Mass and energy balances were made for the design of the kettle. It should be ensured that the raw material, inputs and additives are in optimum quality and verify the characteristics of the enzyme used in case it is substituted for establishing the new reaction parameters (reaction time, pH and temperature).

Key words: Enzyme B-*Galactosidase*, Serum Hydrolysis, Serum Syrup, Whey

Fecha de recepción: 03-10-2018

Fecha de aceptación: 30-01-2019

I. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, el consumo de quesos aumentó aproximadamente el doble entre los años 2006 y 2015. Esta tendencia, conlleva a una mayor generación de residuos, específicamente el lactosuero, por lo que deben gestionarse alternativas para aprovechar este material y evitar su impacto negativo en el medio ambiente, incluso obtener beneficios económicos al comercializar nuevos productos.

Debido a la gran cantidad de residuo lácteo que se produce durante elaboración del queso, se plantea como alternativa la obtención de jarabe de lactosuero a partir de una reacción de hidrólisis con la enzima: β -*Galactosidasa* de *Kluyveromyces lactis*.

El jarabe de suero posee un poder edulcorante considerable, puede ser sustituto parcial de sólidos de leche. Por otra parte, este sería un producto de fácil accesibilidad, económico y amigable con el medio ambiente, lo que seguro generará que tenga gran aceptación dentro de la industria y el mercado.

Para la producción del jarabe, las variables fundamentales para el adecuado control del proceso son: la temperatura, el pH, el tiempo de reacción, la calidad y cantidad de sustrato y la enzima.

La temperatura porque en general los procesos enzimáticos son a temperatura constante (isotérmicos). Esto se debe a que la energía de reacción no es un parámetro de importancia en este tipo de procesos (1). A pesar de ello, la temperatura que se elija si originará mejores o peores rendimientos de reacción.

El tiempo de reacción ya que la cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima (2). Estas reacciones en muchos casos ocurren en reactores discontinuos y la enzima se adiciona para que actúe durante un tiempo determinado (1). Por lo que el tiempo es una variable importante de este proceso de hidrolizado. Cuando debe obtenerse un alto grado de hidrólisis en un corto período de tiempo, se recomienda una temperatura de reacción de 30-45°C (1).

El pH, al igual que la temperatura definirá el grado de actividad de la enzima y, por consiguiente, el rendimiento de la reacción. Como se comentó en el caso de la temperatura, la ficha técnica establece el rango de pH idóneo para llevar a cabo la reacción. Valores de pH entre 5,8 y 7,5 garantizan una actividad relativa superior al 60%. pH por debajo de 5,5 originan una actividad casi nula de la enzima y por encima de 7,5 va disminuyendo, hasta alcanzar un valor mínimo (10% de actividad) en 8,5. Otros autores (3) encontraron la mayor actividad enzimática en un pH de 6,2.

En la calidad y cantidad de sustrato, las levaduras del género *Kluyveromyces*, poseen un sistema lactosa-permeasa. En esta investigación la concentración de lactosa en el lactosuero fue de 4,1%, lo cual resulta un valor cercano a los hallazgos de Araujo (4) por lo que esta variable no fue modificada para llevar a cabo la reacción de hidrólisis.

Las enzimas son proteínas con acción catalítica sobre determinados compuestos llamados sustratos (1). También conocidas como lactasas o más formalmente como 3-D-galactosido galactohidrolasas, las β -galactosidasas se encuentran en el intestino de los mamíferos jóvenes y también en ciertos microorganismos. Su sustrato natural es la lactosa y son enzimas capaces de hidrolizarla e incluso, en ciertas condiciones, de cambiar la glucosa de este azúcar por otro grupo aglicón presente en el medio, en una reacción conocida como transgalactosidación (1). Esta enzima es la responsable de la hidrólisis de la lactosa en galactosa y glucosa teniendo este último más poder

edulcorante que la lactosa, por lo que ha sido escogida en este estudio con el fin de obtener glucosa a partir del lactosuero. En este estudio se escogió la β -galactosidasa obtenida a partir de la levadura *Kluyveromyces lactis* debido a su alta actividad enzimática en las condiciones iniciales del lactosuero y por su relación rendimiento/costo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realiza la toma de muestra (lactosuero) de acuerdo con lo establecido en la Norma NTE INEN 0004 (1984): Para muestreo de leche y productos lácteos, previo al inicio de los ensayos de laboratorio, se llevó a cabo la caracterización del lactosuero según la Norma NTE INEN 2594:201, para determinar los parámetros: porcentajes de lactosa, proteína, grasa y ceniza, que permiten catalogarlo como suero de leche dulce o suero de leche ácido.

La selección de la materia prima es una fase fundamental para llevar a cabo una exitosa transformación del lactosuero en jarabe de suero. Es necesario destacar para la producción de este producto, que los parámetros más importantes a verificar son el pH y la caracterización microbiológica.

En el caso de la enzima utilizada en este trabajo (β -galactosidasa) la relación entre la temperatura, dosis de enzima, tiempo y rendimiento de la reacción. Se observa que la temperatura más recomendable es 40°C, ya que se obtiene un alto rendimiento en menor tiempo.

La temperatura también juega un factor fundamental para el proceso de inactivación de la enzima, lo que detiene la reacción de hidrólisis. En este caso, cuando ha transcurrido el tiempo de reacción, la temperatura se disminuyó a 20°C y en ese momento puede considerarse que la reacción de hidrolización ha finalizado.

La temperatura de reacción se estableció en 40°C por lo que, en función de los datos suministrados por la ficha técnica de la enzima, la reacción pudiera transcurrir en 1 ó 4 horas en función de la dosis de la β -galactosidasa.

En esta investigación la concentración de lactosa en el lactosuero fue de 4,1%, lo cual resulta un valor cercano a los hallazgos de Araujo (4) por lo que esta variable no fue modificada para llevar a cabo la reacción de hidrólisis.

Se realizó un test de discriminación de tres formulaciones diferentes de gran aceptación a nivel comercial (frutilla, chocolate y natural) generadas a partir del jarabe de suero como materia prima principal. Este tipo de estudios resulta muy importante para establecer si existen diferencias entre los diferentes productos, lo que permite tomar decisiones a nivel industrial para su producción y comercialización. Como su nombre lo indica, se utilizan

los sentidos para que un conjunto de personas evalúe y comparen los tres productos elaborados.

Para el análisis sensorial se aplicó una encuesta donde se evaluaron tres criterios: color consistencia y sabor (con tres alternativas de respuesta: me gusta, ni me gusta ni me disgusta y no me gusta), y la persona encuestada indicó cual jarabe le gustó más en una muestra representativa de la población.

En este sentido, los jarabes fueron denotados con la numeración 5770 (sabor chocolate), 3649 (sin saborizante) y 4853 (sabor frutilla).

La muestra representativa fue calculada con la siguiente ecuación matemática (5):

$$n = \frac{Z^2 * p * q * N}{e^2 * (N - 1) + Z^2 * p * q} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

n = Tamaño muestral.

N = Tamaño de la población, N = 30000.

Z = Valor correspondiente a la distribución de Gauss, $Z\alpha = 1.96$.

p = Prevalencia esperada del parámetro a evaluar, p = 0.5.

q = 1 - p.

e = Error que se prevé cometer, e = 5%.

Sustituyendo los valores en la ecuación 1, se tiene que el tamaño muestral es de:

$$n = \frac{(1.96)^2 * 0.5 * 0.5 * 30000}{(0.05)^2 * (30000 - 1) + (1.96)^2 * 0.5 * 0.5} = 380$$

Se aplicó la encuesta al número de personas del tamaño muestral y se tabularon y analizaron los resultados obtenidos desde el punto de vista estadístico con la prueba chi cuadrado, y así verificar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los productos elaborados en las tres características en estudio: color, sabor y consistencia.

III. RESULTADOS

En función del resultado de acidez, el

lactosuero se considera ácido, pero en cuanto al pH puede considerarse del tipo dulce. El análisis de glucosa del lactosuero

permite realizar la comparación de este parámetro con el valor resultante luego de la hidrólisis, y de esa manera, verificar el rendimiento de la reacción. Tabla 1

Parámetro	Unidad	Método Analítico		Valor de la Muestra	Norma NTE INEN 2594			
		Norma	Referencia		Suero de leche dulce		Suero de leche ácido	
					Min	Max	Min	Max
Lactosa	%	AOAC 984.15	(AOAC International, 2016)	4.1	---	5.0	---	4.3
Proteína	%	NTE INEN 16	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2015)	0.87	0.8	---	0.8	---
Grasa	%	NTE INEN 12	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2013)	0.28	---	0.3	---	0.3
Ceniza	%	NTE INEN 14	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 1984)	0.55	---	0.7	---	0.7
Acidez	%	NTE INEN 13	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 1984)	0.421	---	0.16	0.35	---
pH	Unidad	AOAC 973.41	(AOAC International, 2016)	6.4	6.8	6.4	5.5	4.8
Glucosa	Mg/dL	-----	(Wiener, 2000)	50	---	---	---	---

Tabla 1. Resultados de la caracterización fisicoquímica del lactosuero.

Fuente: Llerena (2017).

Los valores de los análisis microbiológicos (Tabla 2), muestran que todos los resultados están en correspondencia a la norma. Después de verificar que la materia prima seleccionada cumple con los valores apropiados, se realizaron ensayos en el laboratorio en función de la

metodología prevista con el fin de ajustar el procedimiento metodológico. La producción del jarabe se realizó con ocho ensayos a nivel experimental (laboratorio) en un volumen de 1 litro y a escala piloto, donde se procesaron 10 L de lactosuero.

Ambos procesos se compararon con el fin de lograr la validación del procedimiento.

Parámetro	Unidad	Método Analítico		Valor	Norma NTE INEN 2594	
		Norma	Referencia		Suero de leche	
					Min	Max
Recuento de m.o. aerobios mesófilos totales	UFC/g	NTE INEN 1529-5	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2006)	97×10^3	30×10^3	10×10^4
Recuento de Escherichia coli	UFC/g	NTE INEN 1529-8	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2015)	8	<10	----
Staphylococcus aureus	UFC/g	NTE INEN 1529-14	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2013)	75	<100	100
Salmonella/ 25g	Ausencia/ Presencia	NTE INEN 1529-15	(Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1996)	Ausencia	----	----
Detección de Listeria monocytogenes / 25g	Ausencia/ Presencia	NTE INEN ISO 11290-1	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 1996)	Ausencia	----	----

Tabla 2. Resultados de la caracterización microbiológica del lactosuero.

Fuente: Llerena (2017).

Otro estudio (6) donde estudiaron la composición de 25 jarabes comerciales, recomienda un mínimo de sólidos totales de 62,5% y obtuvieron valores de glucosa altamente variable (entre no detectable hasta 27,2% dependiendo de la formulación del producto) en el caso de estos dos parámetros, los valores obtenidos en la presente investigación se encuentran dentro de los rangos sugeridos, los sólidos totales 71,9% y la concentración promedio de

glucosa fue de 4,75%. Gerena reporta un valor promedio de glucosa a partir de hidrólisis enzimática de 8,83 g/L (7), en este estudio la concentración obtenida fue de 4,87 g/L, lo que sugiere la necesidad de aumentar el rendimiento de la reacción o realizar un proceso de concentración del producto final.

Ensayo	Método	Unidad	Resultado	
Azúcares totales	INEN 266:2012 (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2012)	%	6,20	
Glucosa (laboratorio) (densidad: 1.025) (pH: 5)	----	mg/dL	480	487,33
			484	
			498	

Tabla 3. Resultados de la caracterización luego de la hidrólisis del lactosuero en el laboratorio.

Fuente: Llerena (2017).

Al comparar los niveles de glucosa del reactivo de partida con respecto al producto de la hidrólisis, se observa que el valor inicial de este parámetro es de 50 mg/dL (Tabla 1) y se obtiene un valor final promedio de 487,3 mg/dL (Tabla 3), lo que representa un incremento de casi nueve veces en función de la cantidad inicial.

A partir del estudio de discriminación de las tres formulaciones de producto (frutilla, chocolate y natural) y al aplicar el estadístico chi cuadrado, se puede concluir con un 95% de confianza que no se encuentran diferencias significativas en las preferencias del jarabe en relación con el color, consistencia y sabor, por lo que se puede fabricar indistintamente cualquiera de los tres productos y tendrán una aceptación similar entre los consumidores. (Fig 1,2,3)

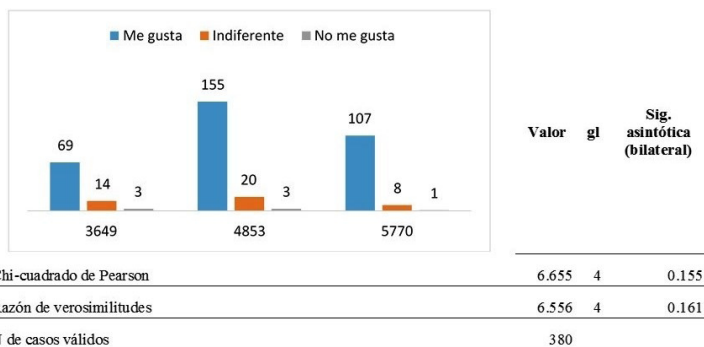


Fig. 1. Análisis sensorial Prueba de chi cuadrado para el parámetro COLOR.

Fuente: Llerena (2017).

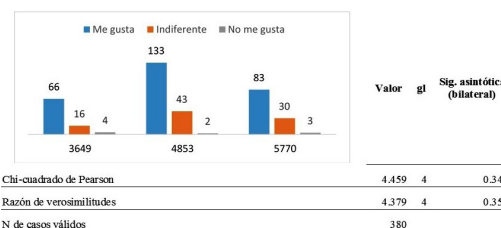


Fig. 2. Análisis sensorial Prueba de chi cuadrado para el parámetro CONSISTENCIA.

Fuente: Llerena (2017).

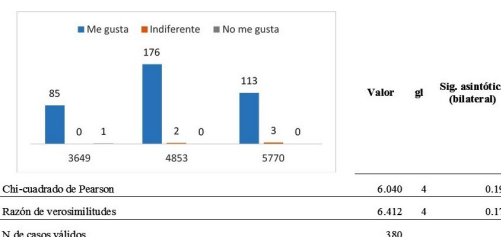


Fig. 3. Análisis sensorial Prueba de chi cuadrado para el parámetro SABOR.

Fuente: Llerena (2017).

Es necesario destacar que no existe una norma INEN que establezca los parámetros a cumplir para este producto, a pesar de ello se ha comparado con algunos parámetros fisicoquímicos de jarabe de glucosa importado al Ecuador (8) ya que este producto no es elaborado en el país (9).

Ensayo	Método	Unidad	Resultado
Cenizas	AOAC 920.181 Ed 20, 2016*	%	1,24
Proteína	AOAC 962.18 Ed 20, 2016*	% (Nx6,25)	2,89
Sólidos totales	AOAC 925.45 Ed 20, 2016*	%	71,9
Fibra dietética total	AOAC 985.29 Ed 20, 2016*	%	0,498
Carbohidratos totales	Cálculo	%	62,6
Energía	Cálculo	kJ/100 g	1272
		Kcal / 100g	304
Grasa	PE08-5.4-FQ AOAC Ed 20, 2016*	%	4,66
pH	AOAC 942.15 Ed 20, 2016*	Unidades de pH	6,54
Acidez	AOAC 942.15 Ed 20, 2016*	mg/100g Ácido cítrico	0,147
Densidad relativa	INEN 391. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2012)	Adimensional	2,275
Sólidos solubles	AOAC 932.12 / INEN 380*	°Bx	68
Sólidos insolubles	INEN 1635. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1989)	%	5,70
Coliformes totales	INEN 1529-7. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2013)	UFC/ml	Ausencia
Coliformes fecales	INEN 1529-8. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2015)	UFC/ml	Ausencia

Tabla 4. Resultados de caracterización del jarabe de suero

Fuente: * (AOAC International, 2016)

Y de acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 4) se sugiere un proceso de concentrado del suero hidrolizado para ajustar estos parámetros, previo a la etapa de formulación del jarabe, y de esta manera, se garantiza un producto final con especificaciones similares a las comerciales

IV. CONCLUSIONES

A partir de la caracterización física, química y microbiológica de este subproducto, se determinó que el mismo presenta algunos parámetros que lo catalogan como suero de leche ácido y otras propiedades que se asemejan al suero de leche dulce. En todos los casos los parámetros cumplen con lo establecido en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2594: 2011 desde el punto de vista físico, químico y microbiológico, y su pH (6.4) y contenido de lactosa fue adecuado para llevar a cabo la reacción de hidrólisis, con una actividad relativa de la enzima de un 90%, por lo tanto, el lactosuero se consideró apto para la producción de jarabe de suero.

Con el fin de producir jarabe de suero, el parámetro más importante para verificar fue el pH, ya que es un factor de gran importancia para la actividad y acción de la enzima β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* sobre el sustrato. El lactosuero presentó un pH de 6,4 valor que origina una actividad relativa de la enzima muy favorable (90%), por lo que se considera que dicho lactosuero es apto para la fabricación del jarabe de suero.

Las condiciones establecidas para el proceso de validación durante la hidrólisis fueron: tiempo de reacción (1 h), temperatura de la reacción de hidrólisis (40 °C), pH (alrededor de 6), cantidad de lactosuero y cantidad de enzima dependiendo del tipo de proceso (experimental o piloto).

Al comparar la concentración de glucosa obtenida en la fase experimental y a nivel piloto se observa que ambos procesos generan valores similares de este parámetro, por lo que el procedimiento ha sido validado en función a este parámetro, altos valores de glucosa al final de la reacción demuestran una alta conversión de reacción, es decir, la lactosa fue descompuesta en glucosa y galactosa, siendo la glucosa el producto de interés.

Se realizó una encuesta con el fin de conocer las preferencias en cuanto a color, consistencia y sabor del jarabe en una muestra representativa de la población. Para las tres propiedades a través de la prueba Chi cuadrado, a un 95% de confianza, se verifica que no existen diferencias significativas en las preferencias de las personas.

Referencias

1. Ladero, M. Hidrólisis de Lactosa con B-Galactosidasas de *Kluyveromyces fragilis* y de *Escherichia coli*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 1999.
2. Sosa, M. & Galvis, P. Caracterización de la enzima glucosa oxidasa (GOX) (E.C.1.1.3.4) libre e inmovilizada en dos soportes (alginato de sodio y agarosa) para la producción de ácido glucónico. Bogotá: UNAD, 2010.
3. Ramirez, A. & Rivas, N. Producción y caracterización parcial de b -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche desproteínizado. ALAN, 2003.
4. Araujo, K. Efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* y la producción de b-D-galactosidasa (E.C. 3.2.1.23). Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia, 2007, pp. 64-73.
5. Bolaños, E. Muestra y Muestreo. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2012.
6. Rivera, M., Herrera, C. & Barquero, M. Caracterización fisicoquímica de los siropes comerciales preparados a base de sacarosa. Tecnología en Marcha, 2000. pp. 48-54.
7. Gerena, F. Obtención de jarabes azucarados a partir de la hidrólisis química de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* l var valencia) y papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) para ser empleados como edulcorantes en la industria de alimentos. Duitama: UNAD, 2013.
8. Proaño, a. & Serrano, J. producción de jarabe de glucosa. guayaquil: espol, 2015.[citado 17 febrero 2017].
9. Donoso, J. Utilización de almidón de banano (*Musa cavendish*) para la elaboración de jarabe de glucosa. Quito: Universidad San Francisco de Quito, 2014.
10. AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International. 2016. Rockville: AOAC.
11. Hernández-Rojas, M. & Vélez-Ruiz, J. Suero de Leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. Temas selectos de Ingeniería de alimentos , 2014, pp. 13-22.
12. Instituto Ecuatoriano de Normalización. leche y productos lácteos. determinación de contenido de nitrógeno. método kjeldahl. quito: instituto ecuatoriano de normalización, 2015.
13. Periago, M. Leche y Productos Lácteos. [Internet] 2014 [citado 14 febrero 2017]. Disponible en: www.um.es/aulasenor/saavedrafajardo/apuntes/doc/productos-lacteos.ppt
14. Servicio Ecuatoriano de Normalización. leche. determinación de las proteínas. quito: servicio ecuatoriano de normalización, 2015.
15. Souza, R., Gimenes, M., Costa, S. & Müller, C. Eliminación de grasas del suero de queso para obtener proteínas y lactosa. Información Tecnológica, 19(2), 2008. pp. 41-50.
16. SV, M. Procesos de Manufactura. [Internet] 2011. Disponible en: <https://manuii.wordpress.com/category/visita-tecnica/>
17. Universidad Nacional Autónoma De México. Productos Lácteos. [Internet] 2015 [citado 13 febrero 2017]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Composicionlecheygrasa_1694.pdf