



XXI CONGRESO LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE
DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

XVII CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



CyTAL[®]-ALACCTA 2019



20 al 22 de Noviembre de 2019
Universidad Católica Argentina
Sede Puerto Madero
Buenos Aires - Argentina



Congreso de Tecnología de Alimentos -CyTAL®-ALACCTA

Libro de trabajos completos CyTAL®-ALACCTA 2019 : parte I / compilado por Stella Maris Alzamora. - 1a ed compendiada. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios - AATA , 2020.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

Edición para Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios - AATA

ISBN 978-987-47615-0-7

1. Tecnología de los Alimentos. I. Alzamora, Stella Maris, comp. II. Título.

CDD 664.001





CYTAL-ALACCTA 2019
Buenos Aires, 20 – 22 noviembre 2019

DESARROLLO BIOTECNOLÓGICO DE UN INGREDIENTE FUNCIONAL COMPUESTO POR GALACTOOLIGOSACÁRIDOS PREBIÓTICOS A PARTIR DE SUERO DE QUESERÍA

C. I. Vénica; F. Bula; C. V. Bergamini; G. A. George; M. C. Perotti

*Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), Universidad Nacional del Litoral/Consejo
Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (UNL/CONICET), Facultad de
Ingeniería Química (FIQ), Santiago del Estero 2829, S3000AOM Santa Fe, Argentina
cperotti@fiq.unl.edu.ar*

RESUMEN

Los galactooligosacáridos (GOS) derivan de la lactosa por actividad transgalactosidasa de enzimas β -galactosidasas; actividad enzimática que poseen algunas de estas enzimas, secundaria a la actividad hidrolítica principal. Dado su efecto prebiótico reconocido son utilizados como ingredientes funcionales particularmente en fórmulas infantiles. La concentración de lactosa y el origen de la enzima son los factores principales que afectan el rendimiento de GOS. El uso de suero de quesería como materia prima para la producción biotecnológica de GOS se plantea como una estrategia para su revalorización.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) obtener una solución concentrada de lactosa a partir de suero empleando un equipo de membranas escala piloto recientemente adquirido en el INLAIN y 2) evaluar el potencial de cuatro preparaciones enzimáticas comerciales de β -galactosidasas procedentes de diferentes orígenes para catalizar la reacción de transgalactosilación: E1 y E2 de *Kluyveromyces lactis*, E3 de *Saccharomyces marxianus* var. *lactis* y E4 de *Bifidobacterium bifidum*. Para ello, en una primera etapa, se obtuvo una solución con 25% de lactosa a partir de tratar el suero por membranas de poliamida. En una segunda etapa, se realizaron experiencias de incubación (240 min/42 °C) del concentrado de lactosa con las enzimas E1, E2 y E3 empleando la dosis (D1) para cada una de ellas, y con la enzima E4 se probaron tres dosis (D1, D2 y D3); se analizó la evolución del perfil de carbohidratos por HPLC-IR durante la incubación. Dada una posible protección de los resultados se reservan los detalles y condiciones tecnológicas ensayadas. Las enzimas E1, E2 y E3 demostraron similar performance con la dosis D1, ya que los máximos rendimientos de GOS fueron similares (15%), mientras que la enzima E4 con la dosis D1 tuvo menor capacidad de

síntesis. La presencia de GOS fue evidente desde el inicio de la incubación (30 min) para las cuatro enzimas ensayadas; los máximos niveles se alcanzaron entre los 90 y 135 min para E1, E2 y E3 y luego se apreció una ligera disminución de GOS hacia los 240 min. La capacidad transgalactosidasa de la enzima E4 fue muy inferior a las restantes, ya que aún con las dosis D2 y D3 el máximo rendimiento fue de aprox. 6% obtenido a los 120 min. Los niveles de lactosa disminuyeron paulatinamente en todos los casos, alcanzando a los 240 min una conversión de aprox. 78% para E1, E2 y E3, y de 60, 80 y 90% para E4 con las dosis D1, D2 y D3, respectivamente. Por su parte, los niveles de galactosa fueron menores a los de glucosa para todas las enzimas y dosis ensayadas, ya que parte de la galactosa está comprometida en la formación de GOS. En el presente trabajo se logró obtener una materia prima a partir del procesamiento del suero de quesería por membranas que se destinó a la producción enzimática de GOS. De las cuatro enzimas β -galactosidasas comerciales estudiadas, tres fueron las más promisorias para la obtención del ingrediente funcional enriquecido en GOS.

Palabras claves: ingrediente funcional prebiótico, galactooligosacáridos, suero, membranas, enzimas β -galactosidasas.

1. Introducción

En los últimos años, se ha observado una tendencia creciente en la producción y demanda de alimentos funcionales, que son aquéllos que producen un efecto beneficioso específico para la salud cuando se los consume regularmente, más allá de sus propiedades nutricionales básicas (Ozen y col., 2012). Dentro de esta categoría de alimentos se encuentran los que poseen componentes bioactivos, es decir, compuestos químicos que están presentes naturalmente o que se forman y/o adicionan durante el procesamiento de los alimentos (Saxelin y col., 2003). Un grupo importante de estos compuestos lo constituyen los galactooligosacáridos (GOS). Los GOS se encuentran naturalmente en la leche humana y a nivel de trazas en la leche de rumiantes. Asimismo, mezclas de GOS se producen a nivel industrial para ser usados como ingredientes funcionales. De hecho, el desarrollo de leches maternizadas ha impulsado la obtención de estos ingredientes para ser incorporados como factor bifidogénico (prebiótico) y simular lo más posible la leche humana (Playne, 2004). También, se los emplea en otros alimentos debido a sus interesantes propiedades: estabilidad al medio ácido, excelente sabor y bajo poder edulcorante, bajo poder calórico y anticariogenicidad (Splechna y col., 2006). La obtención industrial de GOS se basa en un proceso biotecnológico con enzimas β -galactosidasas (EC 3.2.1.23) usando lactosa como sustrato. En particular, la transgalactosilación, es una actividad secundaria a la actividad hidrolítica principal que poseen estas enzimas (Park y Oh, 2010). Varios estudios han demostrado que el nivel de

actividad transgalactosilasa, y por lo tanto el nivel y el tipo de GOS sintetizados en cuanto a grado de polimerización y tipo de uniones entre los monómeros, son dependientes del origen y dosis de la enzima entre otros factores (Otieno, 2010). Asimismo, para conseguir altos rendimientos en la producción de GOS se emplean soluciones concentradas en lactosa. En este sentido, el suero de quesería representa una materia prima muy prometedora. Durante la última década se ha incrementado el valor comercial del suero por sus características intrínsecas: proteínas de alta calidad, contenido de lactosa, vitaminas y minerales, y por la necesidad de evitar su descarte ya que es un subproducto de la industria láctea altamente contaminante (Jelen, 2011). Una de las tecnologías utilizadas para su procesamiento es la filtración por membranas, la cual permite la concentración, separación y el aislamiento de los macrocomponentes y también de algunos microcomponentes. Específicamente, soluciones concentradas en lactosa para la síntesis de GOS se pueden obtener a partir del procesamiento del suero con una adecuada combinación de membranas de nano y ultrafiltración (Pázmándi y col., 2017; Mano y col., 2019).

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) obtener una solución concentrada de lactosa a partir de suero de quesería con tecnologías de membranas empleando un equipamiento a escala piloto y 2) evaluar la performance de síntesis de GOS de cuatro preparaciones enzimáticas comerciales de β -galactosidasas de diferentes orígenes: E1 y E2 de *Kluyveromyces lactis*, E3 de *Saccharomyces marxianus* var. *lactis* y E4 de *Bifidobacterium bifidum*.

2. Materiales y métodos

2.1. Procesamiento del suero de quesería por membranas

Se empleó un equipo de filtración por membranas batch a escala piloto (HidroBiot, HBT UF 402, Argentina) recientemente incorporado a la infraestructura de la FIQ y adquirido con proyecto FIN SET N° 005/2013 Dir. J. Reinheimer (proyectos de fortalecimiento de las capacidades para la prestación de Servicios Tecnológicos del programa de innovación Tecnológica, ANPCyT). Se utilizaron membranas (Koch Membrane Systems Inc., USA) de ultrafiltración (UF) (polietersulfona, 10000 Da) para separar las proteínas de la lactosa y luego de nanofiltración (NF) (poliamida, 200 Da) para concentrar la lactosa. Un volumen de suero (aprox. 70 L) con 0,59 g/100 g de proteína se procesó por UF. Un permeado de UF (aprox. 190 L) con 10 °Brix (medido con refractómetro, que equivale a la concentración de lactosa) se procesó por NF.

2.2. Experiencias de incubación

Alícuotas (300 mL) de la solución de lactosa concentrada se incubaron con las enzimas durante 240 min a 42 °C; para las enzimas E1, E2 y E3 se trabajó con una sola dosis (D1) y con la enzima E4 se probaron tres dosis (D1, D2 y D3). Se analizó la evolución del perfil de carbohidratos (GOS, lactosa, glucosa y galactosa) durante la incubación, según Vénica y col, (2015), utilizando un sistema HPLC de intercambio iónico marca Perkin Elmer (Estados Unidos), Para ello, se utilizó una columna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) y un guarda columna Aminex Cation-H⁺ (30 mm x 4,6 mm) (Aminex, Biorad Laboratories, Estados Unidos). Las corridas cromatográficas se realizaron manteniendo la temperatura de la columna a 65 °C, el flujo a 0,6 mL/min y empleando una fase móvil de H₂SO₄ 0,01 M. Un detector de índice de refracción (IR) permitió la detección de los carbohidratos. Los resultados se expresaron como porcentaje del área de cada compuesto con respecto al área total. Asimismo, se calculó el rendimiento de GOS en cada punto de muestreo (área de GOS/área de lactosa inicial x 100). La identificación de GOS se realizó por comparación de los cromatogramas con el de una preparación comercial de alta concentración de GOS, Vivinal®GOS (FrieslandCampina Domo, Dinamarca). Según datos reportados en bibliografía, el VivinalGOS contiene principalmente trisacáridos (4'-galactosil-lactosa y 6'-galactosil-lactosa) y en menor proporción tetrasacáridos (Huerta y col. 2011). De esta manera, la rafinosa se utilizó para cuantificar la presencia de oligosacáridos con un grado de polimerización de tres (Lamoureux y col., 2002).

Dada una posible protección de los resultados se reservan los detalles y condiciones tecnológicas ensayadas.

3. Resultados y Discusión

Mediante el proceso de UF se logró separar satisfactoriamente las proteínas en el retentado (40 L) conteniendo 0,99 g/100 g de proteínas (factor de concentración: alimentación/retentado = 1,75) y un permeado (30 L) con 0,08 g/100 g de proteínas. Con la membrana de NF se obtuvieron un permeado (130 L) con 3 °Brix y un retentado (60 L) con 25 °Brix (factor de concentración 3,17). Esta solución concentrada en lactosa (retentado de NF) fue empleada para la síntesis de GOS por tratamiento enzimático.

En la Figura 1 se observa la evolución de la formación de GOS para las cuatro enzimas ensayadas durante la incubación. Las enzimas E1, E2 y E3 demostraron similar performance con la dosis D1, ya que los máximos rendimientos de GOS fueron

similares (aprox. 15 %), mientras que la enzima E4 con la dosis D1 tuvo menor capacidad de síntesis (5,5 %). La presencia de GOS fue evidente desde el inicio de la incubación (30 min) para las cuatro enzimas ensayadas; los máximos niveles se alcanzaron entre los 90 y 135 min para E1, E2 y E3 y luego se apreció una ligera disminución hacia los 240 min. En la Figura 2 se observa, a modo de ejemplo, la evolución en la formación de los carbohidratos obtenidos para la enzima E2. La capacidad transgalactosilasa de la enzima E4 fue muy inferior a las restantes, ya que aún con mayores dosis (D2 y D3) el máximo rendimiento fue de aprox. 6 %. El efecto del incremento de la dosis de enzima se evidencia en el tiempo en que se obtiene el máximo rendimiento; en efecto, con D3 el máximo rendimiento se obtuvo a los 90 min, mientras que con D2 se consiguió a los 180 min. Similares resultados fueron reportados por otros autores (Palai y col. 2012, Urrutia y col., 2013).

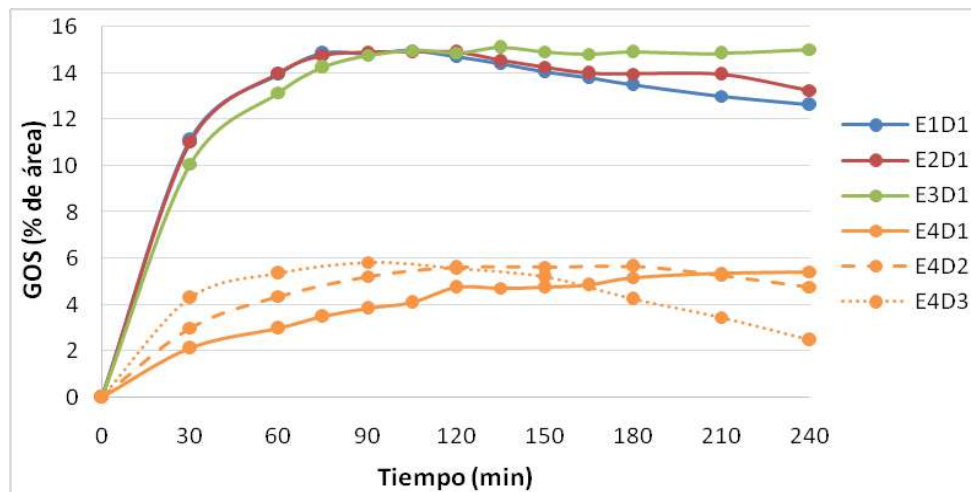


Figura 1. Evolución de la formación de GOS durante el proceso de hidrólisis/transgalactosilación.

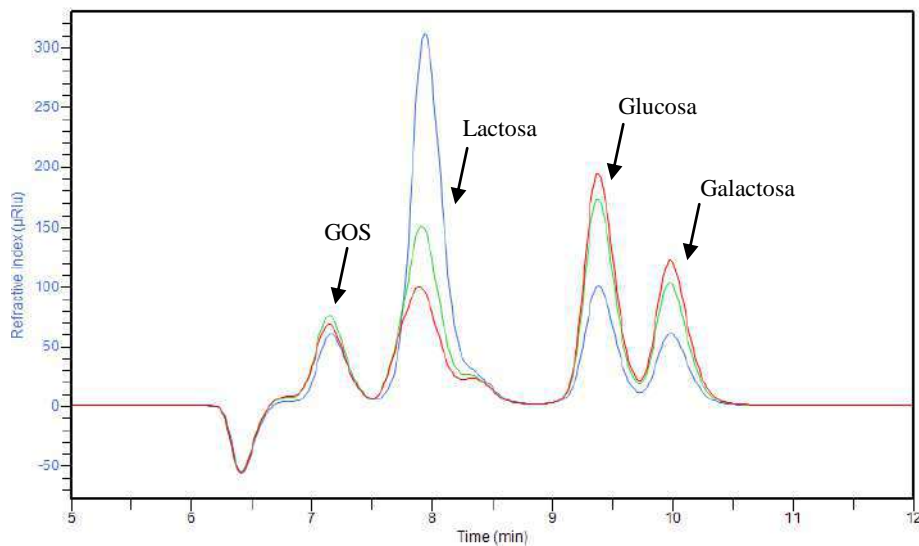


Figura 2. Perfiles de carbohidratos durante el proceso de incubación de una solución de lactosa con la enzima E2 (azul: 30 min.; verde: 90 min.; rojo: 150 min.).

En la Figura 3 se observa, a modo de ejemplo, la evolución de los carbohidratos durante la incubación con la enzima E2; un comportamiento similar se obtuvo para las otras enzimas. Los niveles de lactosa disminuyeron paulatinamente, alcanzando a los 240 min una conversión de aprox. 78 % para E1, E2 y E3 con la dosis D1, y de 60, 80 y 90 % para E4 con las dosis D1, D2 y D3, respectivamente. Contrariamente, los niveles de glucosa y galactosa se incrementaron durante todo el período de incubación. El porcentaje de área de la glucosa a los 240 min estuvo entre el 35 y 40 % para las enzimas E1, E2, E3 y E4-D2, para E4-D1 fue menor (27 %) y para E4-D3 fue mayor (45 %). Los niveles de galactosa fueron siempre menores a los de glucosa para todas las enzimas y dosis ensayadas, ya que parte de la galactosa está comprometida en la formación de GOS. Los valores fueron de 28, 27 y 22 % para las enzimas E1, E2 y E3, respectivamente, mientras que para E4 fue de 25, 37 y 43 % para la dosis D1, D2 y D3, respectivamente, lo que está relacionado con la menor producción de GOS que tuvo esta enzima. Un comportamiento similar fue observado por Mano y col. (2019) para un permeado de suero con 30 % p/p de lactosa.

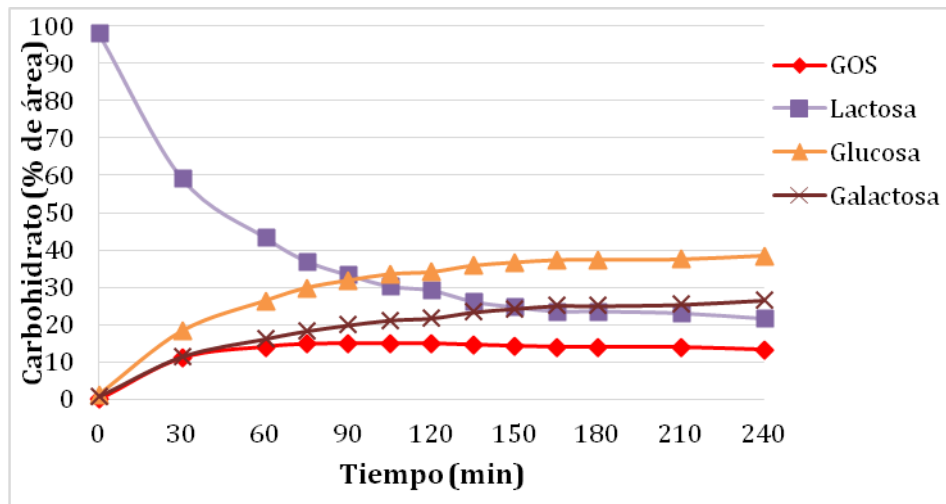


Figura 3. Evolución de los carbohidratos durante el proceso de incubación de una solución de lactosa con la enzima E2.

4. Conclusiones

En la presente investigación se logró, en una primera etapa, obtener una solución concentrada en lactosa a partir del suero de quesería empleando el equipo de membranas escala piloto recientemente instalado en la FIQ. En una segunda etapa, se procedió a ensayar la capacidad de cuatro enzimas β -galactosidasas comerciales para producir GOS a partir de la solución de lactosa. De las cuatro enzimas estudiadas, tres fueron las más promisorias (E1, E2 y E3) y para la dosis ensayada el máximo rendimiento de GOS se obtuvo entre los 90 y los 135 minutos. El presente estudio resulta un aporte para darle un valor agregado al suero de quesería, un subproducto industrial abundante en nuestro país y que muchas veces es vertido como efluente líquido siendo contraproducente para el medioambiente.

Agradecimientos

Trabajo realizado con fondos de la Universidad Nacional del Litoral a través del programa CAI+D Joven 2016 UNL, Nro. 50020150100012LI. Los autores agradecen a las empresas Milkaut S.A y Chr. Hansen quienes suministraron los materiales.

Referencias

Jelen, P. (2011). Whey processing. Utilization and products. En Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), Encyclopedia of Dairy Science. Academic Press, London, pp. 731-737.

- Huerta, L., 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.
- Lamoureux, L., Roy, D., Gauthier, S. (2002). Production of oligosaccharides in yogurt containing bifidobacteria and yogurt cultures. *Journal Dairy Science*, 85, 1058-1069.
- Mano, M.C.R., Paulinob, B.N., Pastore, G.M. (2019). Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. *Food Research International*, 124, 78–85.
- Otieno, D.O. (2010). Synthesis of β -galactooligosaccharides from lactose using microbial β -galactosidases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9 (5), 471-482.
- Ozen, A.E., Pons, A., Tur, J.A., 2012. Worldwide consumption of functional foods: A systematic review. *Nutrition Reviews*, 70 (8), 472-481.
- Palai, T., Mitra, S., Bhattacharya, P. K. (2012). Kinetics and design relation for enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides using commercial grade b-galactosidase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114, 418-423.
- Park, A.-R., Oh, D.-K. (2010). Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1279-1286.
- Pázmándi, M., Maráz, A., Ladámyi, M., Kovács, Z. (2018). The impact of membrane pretreatment on the enzymatic production of whey-derived galacto-oligosaccharides. *Journal of Food Process Engineering*, 41, 1-11.
- Playne, M. (2004). Galacto-oligosaccharides. En Roginski, H., Fuquay, J., Fox, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Science*, 1er ed. Academic Press, London.
- Saxelin, M., Korpela, R.A., Mäyrä-Mäkinen, A., 2003. Functional Dairy Products. En Smith, G. (Ed.), *Dairy Processing. Improving quality*. CRC Press, Washington.
- Splechtna, B., Nguyen, T.-h., Steinböck, M., Kulbe, K.D., Lorenz, W., Haltrich, D. (2006). Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using β -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (14), 4999-5006.
- Urrutia, P., Rodriguez-Colinas, B., Fernandez-Arrojo, L., Ballesteros, A. O., Wilson, L., Illanes, A., et al. (2013). Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with b-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1081-1087.
- Vénica, C., Bergamini, C., Rebecchi, S., Perotti, M. (2015). Galacto-oligosaccharides formation during manufacture of different varieties of yogurt. Stability through storage. *LWT - Food Science and Technology*, 63,198-205.