



## DESARROLLO BIOTECNOLÓGICO DE UN INGREDIENTE FUNCIONAL COMPUESTO POR GALACTOOLIGOSACÁRIDOS PREBIÓTICOS A PARTIR DE SUERO DE QUESERÍA Bula, Florencia

*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  
Directora: Vénica, Claudia Inés*

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: galactooligosacaridos, ingrediente funcional, suero, membranas.

### 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 (Splechtna y col., 2006). La obtención industrial de GOS se basa en un proceso biotecnológico con enzimas  $\beta$ -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.

## OBJETIVOS

- Obtener una solución concentrada de lactosa a partir de suero de quesería con tecnologías de membranas empleando un equipamiento a escala piloto.
- Evaluar la performance de síntesis de GOS de cuatro preparaciones enzimáticas comerciales de  $\beta$ -galactosidasas de diferentes orígenes: E1 y E2 de *Kluyveromices lactis*, E3 de *Saccharomyces marxianus* var. *lactis* y E4 de *Bifidobarterium bifidum*.

Título del proyecto: Métodos analíticos para monitorear la hidrólisis de lactosa y producción de galactooligosacáridos.

Instrumento: CAI+D Joven

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: UNL

Director/a: Vénica, Claudia Inés

## METODOLOGÍA

**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.

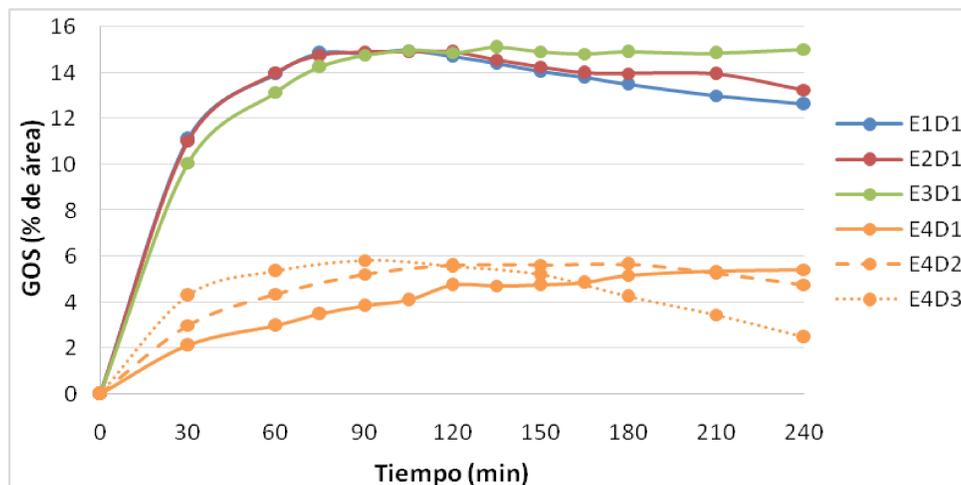
**Experiencias de incubación:** alícuotas (300 mL) de la solución de lactosa se incubaron con las enzimas durante 240 min a 42 °C; para las enzimas E1, E2 y E3 se trabajó con una sola dosis (D1) y con la enzima E4 se probaron tres dosis (D1, D2 y D3). Se analizó la evolución del perfil de carbohidratos (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<sup>+</sup> (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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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). Dada una posible protección de los resultados se reservan los detalles y condiciones tecnológicas ensayadas.

## RESULTADOS

Mediante el proceso de UF se logró separar satisfactoriamente las proteínas en el retentado (40

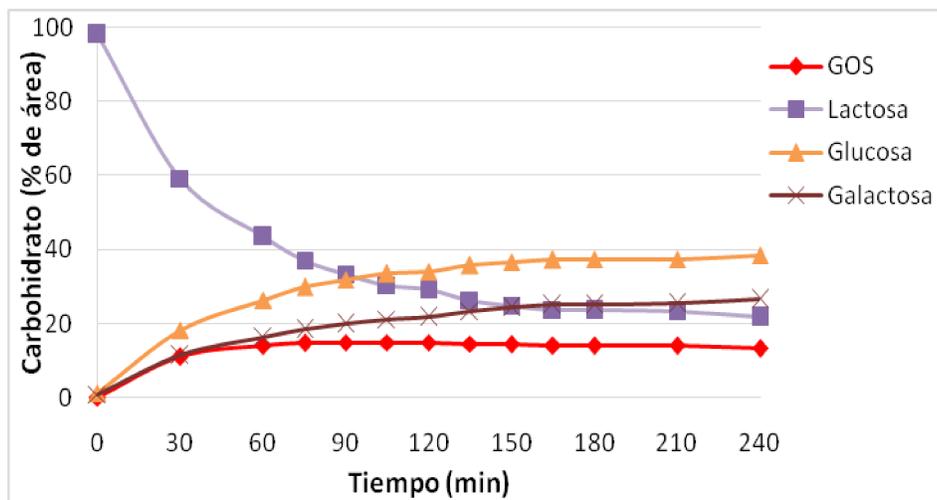
L) conteniendo 0,99 g/100 g de proteínas (factor de concentración: alimentación/retentado = 1,75) y un permeado (30 L) con 0,08 g/100 g de proteínas. Con la membrana de NF se obtuvieron un permeado (130 L) con 3 °Brix y un retentado (60 L) con 25 °Brix (factor de concentración 3,17). Esta solución concentrada 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. 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 90min, mientras que con D2 se consiguió a los 180 min.



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

En la **Figura 2** 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.



**Figura 2:** Evolución de los carbohidratos durante el proceso de incubación de una solución de lactosa con la enzima E2.

## 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  $\beta$ -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.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- 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.
- Otieno, D.O.**, 2010. Synthesis of  $\beta$ -galactooligosaccharides from lactose using microbial  $\beta$ -galactosidasas. 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.
- Park, A.-R., Oh, D.-K.**, 2010. Galacto-oligosaccharide production using microbial  $\beta$ -galactosidase: current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology 85, 1279-1286.
- 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  $\beta$ -galactosidasas from *Lactobacillus reuteri*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(14), 4999-5006.
- 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.