



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**Trabajo Final Integrador presentado como parte de los requisitos de la
Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de
“Especialista en Ciencia y Tecnología de la Leche y Productos Lácteos”.**

Título

**GALACTO-OLIGOSACÁRIDOS (GOS): CARACTERÍSTICAS,
PROPIEDADES Y TECNOLOGÍAS DE OBTENCIÓN PARA SU USO COMO
INGREDIENTE FUNCIONAL EN ALIMENTOS.**

Autor:

Sandra Elisabeth Gympel

Directora:

Dra. M. Cristina Perotti

Co-directora:

Dra. Carina V. Bergamini

“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”

Marie Curie

A mis padres
A mi hijo

Agradecimientos

A la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) perteneciente a la Universidad Nacional del Litoral (UNL) por posibilitar la realización de este Trabajo Final Integrador para cumplimentar con los requisitos establecidos para la “Especialización en Ciencia y Tecnología de la leche y productos lácteos”.

A mis directoras M. Cristina Perotti y Carina V. Bergamini, quien me guiaron constantemente en la realización del presente trabajo, por los conocimientos brindados y enorme paciencia.

A Yeruvá S. A. por su gran aporte en los insumos y en la infraestructura para poder realizar los distintos ensayos.

A Chr. Hansen y Abastecimientos S.A, por los insumos brindados y el asesoramiento técnico.

Gracias a todos los que de alguna manera estuvieron presentes e hicieron posible este trabajo.

Índice

Resumen	8
1. Introducción.....	9
1.1. Carbohidratos de especial relevancia en la alimentación humana. Definición y clasificación	9
2. Objetivos	14
3. Revisión Bibliográfica	15
3.1. Ocurrencia natural de oligosacáridos de galactosa.....	15
3.2. Definición de fórmulas para lactantes de acuerdo a la Legislación Argentina	20
3.3. GOS como ingrediente funcional. Definición y características. Efectos beneficiosos en la salud humana	25
3.4. Conceptos de Fibra alimentaria y de Prebióticos de acuerdo a la Legislación Argentina	28
3.5. Obtención industrial de GOS.....	31
3.5.1. Lactosa.....	32
3.5.2. Suero como materia prima para la síntesis de GOS	32
3.5.3. Enzimas β -galactosidasas	34
3.5.4. Reacción de hidrólisis y transgalactosilación	37
3.6. Productos comerciales de GOS	38
4. Experiencias llevadas a cabo en una industria alimentaria.....	41
•Ensayo 1. Resultados.....	48
•Ensayo 2. Resultados.....	49
•Ensayo 3. Resultados.....	51
5. Conclusiones.....	57
6. Referencias bibliográficas	69

Índice de Figuras

Figura 1. Estructuras químicas de glucosa, galactosa y lactosa.	13
Figura 2. Representación esquemática de las estructuras químicas de los oligosacáridos de leche humana (HMO) y de oligosacáridos usados como ingredientes (GOS y FOS) ...	20
Figura 3. Estructura típica de GOS	27
Figura 4. Suero de Quesería	33
Figura 5. Procesamiento del suero y producto derivados.....	34
Figura 6. Representación esquemática del modelo de acción de la enzima y su sustrato ...	36
Figura 7. Esquema de hidrólisis y transgalactosilación de la enzima β -galactosidasa sobre la lactosa.....	38
Figura 8. Proceso tecnológico de producción de GOS	40
Figura 9. Procesamiento del suero al arribo a la planta y ensayos a escala laboratorio	43
Figura 10. Recibo de suero en planta industrial	43
Figura 11. Desnatadora centrífuga.....	44
Figura 12. Equipo de nanofiltración	44
Figura 13. Membrana de nanofiltración	44
Figura 14. Evolución de la concentración de lactosa en las experiencias de incubación del suero con enzimas β -galactosidasas, llevadas a cabo a escala laboratorio	54

Índice de Tablas

Tabla 1. Composición y aporte calórico de la leche humana	18
Tabla 2. Oligosacáridos de leche humana (HMO)	19
Tabla 3. Estructuras químicas básicas de oligosacáridos de leche humana (HMO)	19
Tabla 4. Preparaciones comerciales de enzimas β -galactosidasas.....	37
Tabla 5. Preparaciones comerciales de GOS	39
Tabla 6. Especificaciones técnicas de la membrana de nanofiltración	45
Tabla 7. Especificaciones técnicas de la enzima β -galactosidasa DECAZYNE YNL	45
Tabla 8. Especificaciones técnicas de la enzima β -galactosidasa MAXILACT L2000	46
Tabla 9. Especificaciones técnicas de la enzima β -galactosidasa MAXILACT LX5000 ...	46
Tabla 10. Condiciones estudiadas en los ensayos de incubación de suero preconcentrado con las enzimas β -galactosidasa a escala laboratorio	47
Tabla 11. Composición fisicoquímica y microbiológica del suero preconcentrado.....	48
Tabla 12. Resultados obtenidos durante la incubación del suero con la enzima Decazyme YNL (E1) a 42 ± 2 °C, dosis de trabajo: 1 mL/L suero	49
Tabla 13. Composición fisicoquímica y microbiológica del suero preconcentrado.....	50
Tabla 14. Resultados obtenidos durante la incubación del suero con las enzimas Decazyme YNL (E1) a 42 ± 2 °C y Maxilact L2000 (E2) a 36 ± 2 °C, dosis de trabajo: 2 mL/L suero	50
Tabla 15. Composición fisicoquímica y microbiológica del suero preconcentrado	52
Tabla 16. Resultados obtenidos luego de la incubación del suero con la enzima Maxilact LX5000 (E3) a 38 ± 2 °C, dosis de trabajo: 1,5 mL/L suero.....	53
Tabla 17. Porcentajes de hidrólisis de lactosa calculado para los distintos ensayos	55

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión bibliográfica exhaustiva y posterior discusión relacionada a los siguientes aspectos: características, propiedades y usos, efectos beneficiosos en la salud y procesos tecnológicos utilizados para la obtención de galacto-oligosacáridos (GOS), sustancias reconocidas como prebióticos. Asimismo, se incluyeron resultados de experiencias llevadas a cabo en una industria de la provincia de Santa Fe, en las que se aplicaron procesos enzimáticos sobre el suero de quesería; en particular, se estudió el efecto de varias enzimas β -galactosidasas y condiciones de reacción en la hidrólisis de lactosa y en una de las experiencias se analizó la producción de GOS.

Dado que el compuesto de interés posee una estructura hidrocarbonada, en una primera etapa se hizo una descripción de la estructura química, características, y efectos en la salud de los carbohidratos de relevancia en la alimentación humana. Posteriormente, se profundizó sobre la ocurrencia natural de oligosacáridos de galactosa, estructuras químicas y efectos, y la aparición en el mercado del ingrediente GOS obtenido industrialmente. Asimismo, se abordó la temática de fórmulas infantiles, la cual constituye una de las aplicaciones más difundidas del ingrediente GOS, ya que en estas formulaciones se lo emplea para mimetizar los oligosacáridos de galactosa presentes naturalmente en la leche humana. También se explicó detalladamente el proceso enzimático que se emplea para producir GOS, partiendo del sustrato lactosa presente en el suero de quesería, y haciendo uso de enzimas β -galactosidasas, y las tecnologías de purificación. Finalmente, se expusieron y discutieron los resultados de los análisis fisicoquímicos (pH, acidez, sólidos totales y grasa), microbiológicos, contenido de azúcares (lactosa, glucosa, galactosa) y también de GOS (cuantificado en uno de los ensayos), que se obtuvieron antes y durante el tratamiento del suero de quesería con tres enzimas β -galactosidasas comerciales. El propósito de esta actividad experimental fue analizar las condiciones para obtener suero reducido en lactosa y con la presencia de compuestos bioactivos como los GOS, de manera de evaluar otra opción para el aprovechamiento de este desecho de la industria láctea altamente contaminante.

1. Introducción

1.1. Carbohidratos de especial relevancia en la alimentación humana. Definición y clasificación

Los carbohidratos o sacáridos son las moléculas biológicas más abundantes en la naturaleza. Están compuestos por sólo tres elementos: carbono, hidrógeno y oxígeno, respondiendo a la fórmula $(\text{CH}_2\text{O})_n$ donde n es ≥ 3 ; en ocasiones también pueden contener fósforo y nitrógeno. En los seres vivos su principal función nutricional es la de aportar energía (4 kcal/g), la cual se genera durante el metabolismo aerobio en el cual se liberan, además, dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O). Otros carbohidratos tienen una función estructural (celulosa, quitina, mananos) o son componentes de membranas celulares (oligosacáridos conjugados a proteínas o lípidos en glicoproteínas o glicolípidos) (Izydorczyk, 2005). Representan, en general, la mayor proporción de la dieta de los asiáticos, africanos y latinoamericanos, alcanzando el 80% en algunos casos, mientras que representan entre 45 – 50% de la dieta en países industrializados.

Tienen una amplia gama de propiedades químicas, físicas y fisiológicas. Pueden afectar la saciedad, los niveles de glucosa e insulina sanguíneos, el metabolismo de los lípidos y, por medio de la fermentación, ejercen un mayor control en la función del colon: regulación del tránsito y del hábito intestinal, el metabolismo y el balance de la flora comensal y la salud del colon. También pueden ser inmunomoduladores e influenciar la absorción del calcio. Estas propiedades tienen implicaciones sobre la salud en general, contribuyendo particularmente al control del peso corporal, la diabetes y el envejecimiento, la enfermedad cardiovascular, la densidad mineral ósea, el cáncer de colon, la constipación y resistencia a las infecciones intestinales (De la Plaza et al., 2013). Los carbohidratos que suelen formar parte de la dieta humana están sobre todo en forma de almidones y diversos azúcares.

Los carbohidratos dietarios se pueden clasificar desde el punto de vista químico, basándose en el tamaño molecular y la composición monomérica, en tres grandes grupos: peso molecular bajo, mono- y disacáridos; peso molecular intermedio, oligosacáridos; peso molecular alto, polisacáridos. Desde el punto de vista nutricional se clasifican en carbohidratos disponibles, que son los que se digieren y absorben en el intestino delgado humano, siendo fuente para el metabolismo principalmente en forma de glucosa, y los no disponibles o no digeribles continúan su recorrido por el tracto gastrointestinal hasta el colon (fibra dietaria). Dentro de los carbohidratos disponibles se

tienen los monosacáridos, disacáridos, algunos oligosacáridos (malto-oligosacaráridos) y almidón. En el segundo grupo se incluyen los polisacáridos estructurales constituyentes de las paredes celulares de las plantas y polisacáridos complejos (celulosa, pectinas, quitina, β -glucanos, entre otros). Debido a la gran diversidad química, el análisis de los carbohidratos en alimentos ha sido objeto de múltiples estudios en las últimas décadas y hoy en día están disponibles varias técnicas analíticas normalizadas de uso rutinario (De la Plaza et al., 2013; Izydorczyk, 2005).

A continuación, se detallan las características de los distintos carbohidratos:

- **Monosacáridos o azúcares simples:** son los carbohidratos de estructura más simple. Los más comunes son glucosa, fructosa y galactosa, los cuales son absorbidos directamente por las células de la mucosa intestinal sin ser modificados por las enzimas digestivas. La glucosa, a veces también denominada dextrosa, se encuentra en frutas y vegetales; es el principal producto final de la digestión de otros carbohidratos más complejos, como los disacáridos y almidones. La glucosa se oxida para producir energía, agua y dióxido de carbono, que se elimina con la respiración. La fructosa se encuentra en la miel de abeja y en frutas; después de ser absorbida en el intestino pasa al hígado donde se metaboliza rápidamente a glucosa. La galactosa no se encuentra libre en la naturaleza, sino que está formando parte del azúcar de la leche – lactosa – en la leche de los mamíferos.

- **Disacáridos:** compuestos por dos unidades de azúcares simples unidas por enlace glicosídico: sacarosa, lactosa y maltosa. Para que estos compuestos sean absorbidos en el intestino es necesario que las enzimas digestivas los hidrolicen liberando sus monosacáridos constituyentes. La sacarosa (glucosa - fructosa) es el nombre científico para el azúcar de mesa. Se encuentra en tallos, hojas, raíces, frutos (zanahoria, durazno, manzana, ciruela, entre otros) y en la miel. Se produce habitualmente de la caña de azúcar, pero también a partir de la remolacha. La lactosa (galactosa - glucosa) se encuentra en la leche de mamíferos, como se mencionó previamente; la maltosa (glucosa - glucosa) está presente en las semillas germinadas.

- **Oligosacáridos:** compuestos por más de 2 unidades de monosacáridos, hasta un máximo de 10 unidades (grado de polimerización, GP: 3 - 10), unidas por enlaces

glicosídicos. Ejemplos: rafinosa, estaquiosa, maltooligosacáridos, fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, entre otros; sobre algunos de estos se profundizará más adelante. Están presentes en legumbres, cereales, verduras, leche materna.

• **Polisacáridos:** son los carbohidratos más complejos químicamente. Son estructuras poliméricas compuestas por más de 10 unidades de monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos. Tienden a ser insolubles en agua y los seres humanos sólo pueden utilizar algunos para obtener energía.

Los polisacáridos dietarios se pueden clasificar en amiláceos y no amiláceos. Entre los primeros, el almidón es el más abundante en la alimentación humana, encontrándose en granos de cereales, leguminosas, raíces y tubérculos. Es un α -glucano, es decir, un polímero de glucosa formando cadenas lineales (amilosa) y ramificadas (amilopectina), que constituye el carbohidrato de almacenamiento más importante en las plantas. El almidón se libera durante la cocción, cuando el calor rompe los gránulos en los que está almacenado. Los polisacáridos amiláceos se hidrolizan en el tracto gastrointestinal por las enzimas digestivas para formar monosacáridos, que son absorbidos en el intestino pasando posteriormente al torrente sanguíneo. También se incluyen dentro de este grupo los almidones resistentes y modificados; sin embargo, estos compuestos son resistentes a la digestión enzimática en el intestino delgado, y pueden sufrir cierto grado de fermentación en el intestino grueso (De la Plaza et al., 2013; Izydorczyk, 2005).

Entre los polisacáridos no amiláceos se pueden citar la celulosa, hemicelulosas, pectinas e hidrocoloides (gomas, mucílagos, β -glucanos). Los seres humanos no poseen las enzimas para poder hidrolizar los enlaces β -glicosídicos presentes en estas moléculas, por lo que no se pueden digerir hasta los monosacáridos constituyentes y por lo tanto no pueden ser absorbidos. Por el contrario, algunos animales como los rumiantes, poseen microorganismos en el rumen que pueden hidrolizar la celulosa, generando de esta manera los monosacáridos que luego pueden ser absorbidos y utilizados por el organismo. La celulosa y las hemicelulosas son los principales componentes de las paredes celulares vegetales. La celulosa es un polímero de glucosa insoluble en agua; se encuentra en pieles de frutas, cubiertas externas de semillas, tallos y hojas de vegetales. Las hemicelulosas y pectinas son compuestos menos polimerizados que la celulosa. Las hemicelulosas son polímeros de otros azúcares además de la glucosa, por lo general hexosas y pentosas, y pueden ser parcialmente

digeridas por las enzimas digestivas. Las pectinas se encuentran en los tejidos vegetales y en la savia y son polisacáridos coloidales. Las gomas son carbohidratos viscosos extraídos de las plantas. Por otro lado, se tiene la lignina que no es un carbohidrato, pero se encuentra asociado a ellos en las paredes celulares de las plantas (Vilcanqui-Pérez y Vílchez-Perales, 2017).

El término “fibra dietaria” (FD) inicialmente se definió como “la porción de alimento que deriva de la pared celular de las plantas que es muy pobremente digerida por los seres humanos” (De la Plaza et al., 2013; Vilcanqui-Pérez y Vílchez-Perales, 2017). El reconocimiento de que los polisacáridos agregados a los alimentos, sobre todo los hidrocoloides, podían tener efectos similares a aquellos provenientes de las paredes celulares, condujo a la redefinición del concepto de FD para incluir a “todos los carbohidratos y la lignina, que son resistentes a la hidrólisis (digestión) por parte de las enzimas en el intestino delgado humano y, por lo tanto, pasan el tracto gastrointestinal superior y entran al colon prácticamente sin modificarse; una fermentación completa o parcial se puede producir en el colon” (Dhingra et al., 2012); dentro de este grupo se incluyen hemicelulosa, celulosa, lignina, oligosacáridos, pectinas, gomas y mucílagos, ceras.

Existe un interés creciente en la FD debido a los efectos saludables demostrados para las mismas. La FD contribuye a otorgar sensación de saciedad, pudiendo conducir a un menor consumo de alimentos, contribuyendo de esta manera a mitigar la epidemia de sobrepeso y obesidad – globesidad. Además, enlentece la absorción de glucosa, disminuye los niveles de colesterol total y LDL, regula la presión sanguínea, incrementa la velocidad de tránsito de los alimentos por el sistema digestivo favoreciendo un funcionamiento intestinal normal y saludable aliviando la constipación, pudiendo ser un factor clave en el control de diversas afecciones como diverticulitis, hemorroides y ciertos tipos de cáncer, y estimula la fermentación intestinal produciendo ácidos de cadena corta (Blanco, 2006; Dahl y Stewart, 2015; De La Plaza et al., 2013; Fennema, 2008; Voet et al., 2008).

En este trabajo nos enfocaremos en los oligosacáridos de galactosa (galacto-oligosacáridos, GOS). En la **Figura 1** se presentan las estructuras de glucosa, galactosa y lactosa que son las moléculas de interés para este trabajo, ya que son las que intervienen en la producción de GOS.

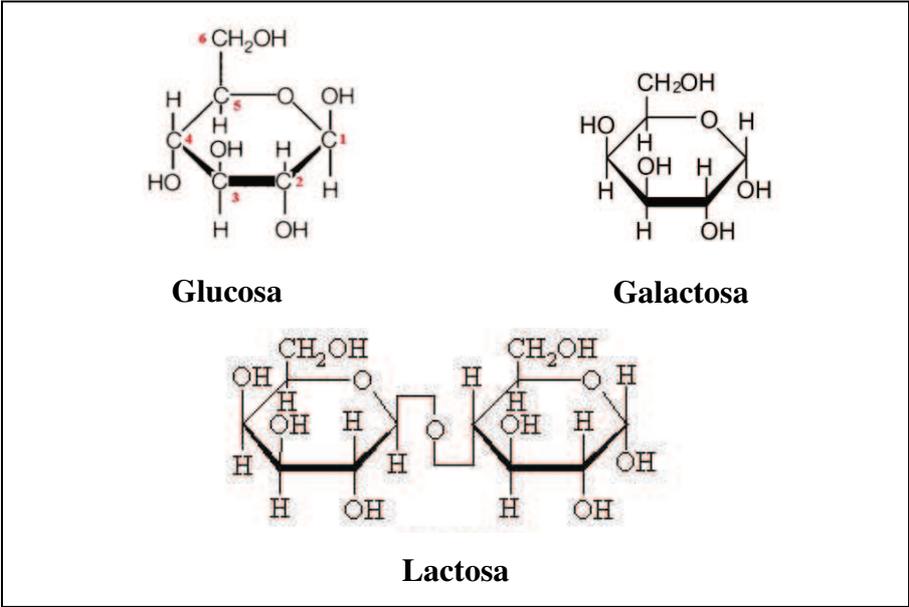


Figura 1. Estructuras químicas de glucosa, galactosa y lactosa.

2. Objetivos

2.1. Realizar una revisión bibliográfica exhaustiva y posterior discusión relacionada a los siguientes aspectos: características, propiedades y usos, efectos beneficiosos en la salud y procesos tecnológicos utilizados para la obtención de galacto-oligosacáridos (GOS), sustancias reconocidas como prebióticos.

2.2. Presentar los resultados obtenidos en una industria de la provincia de Santa Fe, en las que se aplicaron procesos enzimáticos sobre el suero de quesería. Se estudió, en particular, el efecto de varias enzimas β -galactosidasas y condiciones de reacción en la hidrólisis de lactosa y en una de las experiencias se analizó la producción de GOS.

3. Revisión bibliográfica sobre la obtención y características de oligosacáridos de galactosa o galacto-oligosacáridos (GOS)

3.1. Ocurrencia natural

Los oligosacáridos de galactosa se encuentran en forma natural en la leche de mamíferos adquiriendo un rol muy importante en la salud del neonato. Mayores niveles de estos compuestos y con estructuras más complejas han sido detectados en la leche humana en comparación a leches de otras especies de mamíferos.

La leche humana tiene una composición compleja y dinámica, impulsada principalmente por la genética materna y, en menor medida, por la dieta y el medio ambiente. Además del aporte nutricional, proporciona una protección inmunológica al bebé en sus primeros meses de vida. En los últimos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de las necesidades nutricionales del recién nacido y en la composición de la leche humana dado el desarrollo de nuevas herramientas analíticas, lo que ha servido como base para el desarrollo de fórmulas infantiles, o también denominadas leche de fórmula o fórmula para lactantes, que se preparan para asemejar lo más posible la leche materna y de esta manera aportar beneficios similares. Se presentan en el mercado diferentes fórmulas infantiles de diferente composición, ya que se busca que se adapten a los requerimientos nutricionales del bebé según los diferentes estadios de crecimiento (Cilla et al., 2012; Zivcovik et al., 2011). Estos preparados también han sido denominados “leches maternizadas”, sin embargo, este término está entrando en desuso según las guías de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ya que erróneamente crea una similitud implícita entre la leche materna y una fórmula completamente artificial.

Los componentes que se encuentran en mayores niveles en la leche humana son: la lactosa (55-70 g/L) y los lípidos (40 g/L); en tercer lugar, se encuentran los oligosacáridos (HMO, *Human Milk Oligosaccharides*) cuya concentración se ha reportado en el rango de 15 a 23 g/L en calostro y de 1 a 10 g/L en leche madura. El contenido de proteínas es de aprox. 12 g/L. Principalmente la lactosa y los lípidos, y en menor medida las proteínas, suministran la energía necesaria para el normal crecimiento y desarrollo del bebé (**Tabla 1**). Los lípidos, además, son fuente de ácidos grasos esenciales y de vitaminas liposolubles; están compuestos en un 98 % por triglicéridos, cuyos ácidos grasos más abundantes son oleico (C18:1), palmítico (C16:0), linoleico

(C18:2), araquidónico (ARA, C20:4) y docosahexaenoico (DHA, C22:6) (Cilla et al., 2012; Donovan y Comstock, 2016; Macfarlane et al., 2008; Vandenplas, 2002; Zivcovik et al., 2011). El calostro es un líquido pre-lácteo rico en inmunoglobulinas y células inmune que se produce durante las primeras 24-48 horas después del parto. La leche de transición se produce durante el día 3 al 14 posparto, y es rico en grasas, lactosa y vitaminas. La leche madura se produce aproximadamente a partir de las 2 semanas después del parto, está menos concentrada que la leche de transición, y su menor densidad de nutrientes se mantiene durante el primer año posparto. La composición de la leche humana varía con la duración de la lactancia. A su vez, la leche materna prematura, especialmente la leche de transición, contiene niveles más altos de proteínas, sodio, cloruro, calcio, zinc, cobre y ácido fólico que la leche materna a término (Tudehope, 2013).

A diferencia de la leche humana, la leche de vaca que se emplea como materia prima en las fórmulas infantiles contiene menos de 1 g/L de oligosacáridos, niveles muy inferiores a los encontrados en leche materna. Los HMO están compuestos por una combinación de bloques formados por D-glucosa, D-galactosa, ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico/ Neu5Ac), fucosa y N-acetil-glucosamina y lactosa en el extremo reductor (Barile y Rastall 2013; Kunz et al., 2000; Zivcovik et al., 2011). El 35-50% de los HMO están fucosilados, 12-14% están sialilados y 42-55% son HMO no fucosilados (Oliveira et al., 2015; Smilowitz et al., 2014). La composición de los HMO es muy compleja dada la diversidad estructural, las posibles combinaciones de monosacáridos y el tipo de uniones entre ellos; de esta manera, difieren en tamaño, carga y abundancia (Niñonuevo et al., 2015). Hasta el momento han sido identificados alrededor de 200 HMO, de los cuales 80 han sido caracterizados estructuralmente. Una característica emergente del análisis estructural de los HMO es la diversidad entre y dentro de las mujeres (Zivcovik et al., 2011). Estos compuestos se sintetizan en la glándula mamaria por enzimas glicosiltransferasas. Sin embargo, la composición está influenciada por la genética materna y el estado de la glándula mamaria. La fucosilación de HMO está mediada por dos fucosiltransferasas FUT2 y FUT3. Las madres no secretoras, que carecen de la enzima FUT2 y representan alrededor del 30% de las mujeres en todo el mundo, producen leche que carece de oligosacáridos fucosilados. La ausencia de estos compuestos puede tener consecuencias funcionales, por ejemplo, los bebés que consumen leche producida por mujeres que no son secretoras exhiben una

colonización retardada de bifidobacterias y tienen diferencias funcionales en la actividad metabólica de su microbiota (Lewis et al., 2015), así como un mayor riesgo de enfermedades diarreicas (Guerrero et al., 2004). El desarrollo de la microbiota intestinal infantil es un proceso secuencial que se desarrolla durante los primeros 2-3 años de vida. La composición y diversidad microbiana está determinada por la genética del huésped y múltiples factores ambientales de los cuales la dieta es el principal contribuyente (Li et al., 2014). Los estudios realizados durante la última década han demostrado que especies específicas de *Bacteroides* y *Bifidobacterium* que comúnmente colonizan el intestino de lactantes amamantados, utilizan eficientemente HMO como fuente de carbono. Esto ha sido demostrado para cepas de *B. longum* ssp. *infantis*, las cuales son predominantes en la mayoría de los lactantes (Underwood et al., 2015). La evidencia científica reunida por varias disciplinas apunta a que las estructuras de los oligosacáridos y su abundancia es un elemento clave en la estrategia de evolución para establecer y guiar la microbiota infantil humana. Curiosamente, el destete da como resultado un cambio inmediato en la microbiota del infante, y también se asocia con un mayor riesgo de una variedad de enfermedades relacionadas con el intestino (Zivcovik et al., 2011). Además de modular la microbiota intestinal, los HMO tienen potencial para afectar diferentes actividades gastrointestinales e influir en procesos inflamatorios (Kunz y Rudloff, 2006).

Teniendo en cuenta la importancia de la presencia de estos HMO en la leche materna y el acceso limitado a esta fuente, se está trabajando intensamente para encontrar vías alternativas para producir compuestos que se acerquen estructuralmente a los HMO y por lo tanto a su funcionalidad, para ser adicionados en la formulación de las fórmulas infantiles para la alimentación de lactantes (Barile y Rastall, 2013). Como ya ha sido mencionado, la leche bovina contiene menos oligosacáridos (BMO, *Bovine Milk Oligosaccharides*) que la leche humana. Si bien se han detectado que al menos 10 BMO poseen estructuras similares a los HMO, una gran proporción de los mismos aún no han sido identificados o se conocen solamente los monosacáridos constituyentes, mientras que se desconoce la estructura completa (Robinson et al., 2018).

En las fórmulas infantiles se emplean mezclas de fructo-oligosacáridos (FOS) y galacto-oligosacáridos (GOS), las cuales poseen efectos bifidogénicos semejantes a los HMO, aunque son estructuralmente muy diferentes a los BMO y HMO; de hecho, las ramificaciones de fucosa, N-acetilglucosamina y ácido sialico están ausentes en FOS y

GOS (Zivkovic y Barile, 2011). Hay numerosos estudios acerca del efecto bifidogénico de fórmulas infantiles preparadas con 90% de GOS de cadena corta, 10% de FOS de cadena larga e inulina (Arslanoglu et al, 2008; Moreno-Villares, 2011; Moro et al., 2002; Salvini et al., 2011). Esta combinación tiene una distribución de tamaño molecular bastante similar a la de la fracción de los HMO (Fanaro et al., 2009). También hay estudios del efecto beneficioso de fórmulas infantiles con adición únicamente de GOS (Ben et al., 2004). Los estudios clínicos parecen indicar que estos preparados poseen un efecto positivo sobre la microbiota, generan deposiciones más blandas y frecuentes, una disminución de pH y un posible efecto beneficioso relacionado con la disminución de episodios infecciosos y gastrointestinales y manifestaciones alérgicas (Ben et al., 2004; Cilla et al., 2012; Moreno-Villares, 2011).

En la **Tabla 1** se muestra la composición de la leche humana. En las **Tablas 2 y 3** se presentan la composición de la fracción de oligosacáridos de leche humana (HMO) y sus estructuras químicas. En la **Figura 2** se observa una representación esquemática de las estructuras de los HMO comparativamente a la de oligosacáridos usados como ingredientes (GOS y FOS).

Tabla 1. Composición y aporte calórico de la leche humana
(adaptado de Tudehope, 2013)

Componente / Aporte calórico	Leche transicional (6-10 días)	Leche madura (>30 días)
Proteínas (g/100 mL)	1,9	1,2
Grasas (g/100 mL)	3,4	3,4
Carbohidratos (g/100 mL)	6,3	6,7
Energía (kcal/100 mL)	66	64

Tabla 2. Oligosacáridos de leche humana (HMO)

(adaptado de Donovan y Comstock, 2016)

Categorías de HMO (% del total)	HMO (abreviatura)	Concentración (rango, g/L)
Fucosilados (35 - 50%) (HMO neutros)*	2'fucosil lactosa (2'FL)	1,88-4,90
	3'fucosil lactosa (3'FL)	0,25-0,86
	Lacto-N-fucopentaosa (LNFP I)	0,106-0,145
	Lacto-N-fucopentaosa (LNFP II + III)	0,120-0,161
Sialilados (12-14%) (HMO ácidos)*	3'sialil lactosa (3'SL)	0,1-0,3
	6'sialil lactosa (6'SL)	0,20-1,22
No fucosilados (45-55%) (HMO neutros)*	Lacto-N-neotetraosa (LNnT)	0,17-0,45

*Clasificación según Kunz et al. (2014)

Tabla 3. Estructuras químicas básicas de oligosacáridos de leche humana (HMO)

(adaptado de Kunz et al., 2014)

HMO (abreviatura)	Estructura
2'fucosil lactosa (2'FL)	Fuc- α -(1-2)-Gal- β -(1-4)-Glc
3'fucosil lactosa (3'FL)	Gal- β -(1-4)-[Fuc- α -(1-3)]-Glc
lacto-N-fucopentaose I	Fuc- α -(1-2)-Gal- β -(1-3)-GlcNAc- β -(1-3)-Gal- β -(1-4)-Glc
lacto-N-fucopentaose II	Gal- β -(1-3)-[Fuc- α -(1-4)]-GlcNAc- β -(1-3)-Gal- β -(1-4)-Glc
lacto-N-fucopentaose III	Gal- β -(1-4)-[Fuc- α -(1-3)]-GlcNAc- β -(1-3)-Gal- β -(1-4)-Glc
lacto-N-neotetraose	Gal- β -(1-4)-GlcNAc- β -(1-3)-Gal- β -(1-4)-Glc
3'-sialyllactose	Neu5Ac- α -(2-3)-Gal- β -(1-4)-Glc
6'-sialyllactose	Neu5Ac- α -(2-6)-Gal- β -(1-4)-Glc
Cadena tipo I	Gal- β -(1-3)-GlcNAc
Cadena tipo II	Gal- β -(1-4)-GlcNAc

Gal, galactosa; Glc, glucosa; Fuc, fucosa; GlcNAc, N-acetil-glucosamina; NAc, ácido N-acetil-neuramínico.

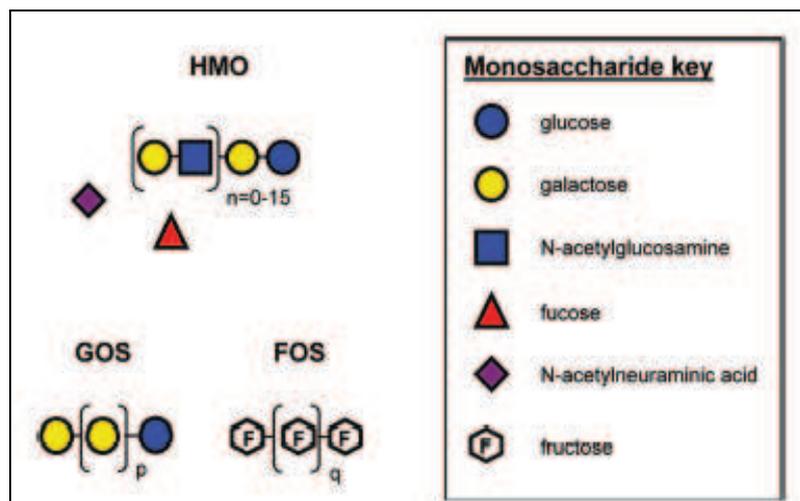


Figura 2. Representación esquemática de las estructuras químicas de los oligosacáridos de leche humana (HMO) y de oligosacáridos usados como ingredientes (GOS y FOS) (adaptado de Niñonuevo y Bode, 2008)

3.2. Definición de fórmulas para lactantes de acuerdo a la Legislación Argentina

En el Capítulo XVII del Código Alimentario Argentino (CAA): Alimentos de régimen o dietéticos, se definen las fórmulas para lactantes en el Artículo 1353 bis - (Resolución Conjunta RESFC-2018-12-APN-SRYGS#MSYDS N°12/2018). “Con la denominación de fórmula para lactantes se entiende a los productos destinados a utilizarse, cuando sea necesario, como sucedáneo de la leche materna para satisfacer las necesidades nutricionales de los lactantes.

Deberán presentarse en forma líquida o en polvo y estar elaboradas a base de leche y/o de otros ingredientes idóneos para la alimentación de los lactantes. La leche podrá ser sustituida por derivados de vegetales cuyas proteínas respondan a los requisitos establecidos en el presente artículo.

Deberán ser elaboradas y envasadas de acuerdo a las buenas prácticas de manufactura y contenidas en envases que garanticen la calidad y estabilidad de los productos.

Las empresas que elaboren fórmulas para lactantes deberán implementar un Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) de acuerdo a lo establecido en el artículo 1346 bis del presente Código.

Se clasificarán en:

- *De inicio*: son las fórmulas para lactantes destinadas a satisfacer las necesidades nutricionales de los lactantes durante los primeros meses de vida hasta la introducción

de la alimentación complementaria apropiada. Estos preparados se utilizarán mediante indicación médica cuando la lactancia materna total no sea posible o cuando sea parcial.

- *De continuación*: son las fórmulas destinadas a satisfacer parcialmente las necesidades nutricionales de los lactantes desde la introducción de la alimentación complementaria hasta los 12 meses de vida cuando no es posible la lactancia materna o cuando ésta sea parcial. Constituyen el principal elemento líquido de la dieta progresivamente diversificada.

Estos productos listos para el consumo, comercializados como tales o preparados de acuerdo con las instrucciones del fabricante, deberán responder a las siguientes exigencias:

A) Deberán contener no menos de 60 kcal (250 kJ) y no más de 70 kcal (293 kJ) de energía por cada 100 ml.

B) Tendrán como mínimo 1,8 y como máximo 3,0 gramos de proteína/100 kcal o como mínimo 0,45 y como máximo 0,7 gramos de proteína/100 kJ.

El perfil de aminoácidos de las proteínas deberá responder cualitativa y cuantitativamente a la proteína de referencia (leche materna) según los valores de aminoácidos esenciales y semiesenciales de la leche materna. Se consignan valores de referencia para los aminoácidos: Cisteína, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptófano, Tirosina y Valina.

C) El contenido de grasas será como mínimo de 4,4 y como máximo 6,0 gramos de grasas/100 kcal o como mínimo 1,05 y como máximo 1,4 gramos de grasas/100 kJ. La composición de las grasas deberá responder a valores específicos para los ácidos linoleico y α -linolénico y la proporción de ácido linoleico/ácido α -linolénico, entre 5:1 y 15:1.

La suma de los ácidos láurico y mirístico, constituyentes naturales de las grasas, no deberá superar el 20% del contenido total de ácidos grasos.

El contenido de ácido erúico no deberá superar el 1% del contenido total de ácidos grasos.

Los fosfolípidos no deberán superar los 300 mg/100kcal (72 mg/100 kJ).

En las fórmulas no se permite utilizar aceites y grasas parcialmente o totalmente hidrogenadas de origen industrial.

D) El contenido de carbohidratos de las fórmulas será como mínimo 9,0 y como máximo 14,0 gramos/100 kcal o como mínimo 2,2 y como máximo 3,3 gramos/100 kJ. Solo podrán utilizarse los siguientes hidratos de carbono: lactosa, maltosa, sacarosa, glucosa, maltodextrina, jarabe de glucosa o jarabe de glucosa deshidratado, almidón precocido y almidón gelatinizado. En caso de añadirse almidones precocidos y/o gelatinizados, estos no deberán superar el 30% del total de los hidratos de carbono ni los 2 g/100 ml en el producto listo para el consumo.

Solo se podrá añadir sacarosa a las fórmulas fabricadas a partir de hidrolizados de proteínas. En este caso, su contenido no excederá el 20% del contenido total de hidratos de carbono.

Solo podrá añadirse glucosa a las fórmulas fabricadas a partir de hidrolizados de proteínas. En este caso, su contenido no excederá los 2 g/100 kcal (0,5 g/100 kJ).

El valor mínimo para la lactosa será de 4,5 g/100 kcal o 1,1 g/100 kJ. Este valor no es aplicable a los preparados en los que los aislados de proteínas de soja supongan más del 50% del total del contenido en proteínas.

Podrán elaborarse fórmulas sin lactosa, las que deberán tener un contenido de lactosa inferior a 10 mg/100 kcal (2,5 mg/100 kJ).

E) Vitaminas, Minerales y otros Nutrientes. Se establecen valores para las siguientes vitaminas: A, D, E K, Tiamina, Riboflavina, Niacina, Vitamina B6, Vitamina B12, Ácido Pantoténico, Ácido fólico, Vitamina C y Biotina, minerales: Hierro, Calcio, Fósforo, Magnesio, Sodio, Cloro, Potasio, Manganeso, Yodo, Selenio, Cobre, Zinc, y otros nutrientes: colina, inositol, L-carnitina.

Además de los nutrientes especificados anteriormente, las fórmulas de inicio y de continuación podrán contener los siguientes ingredientes opcionales según los límites establecidos: Taurina, Ácido docosahexaenoico (DHA), Fructooligosacáridos (FOS) y Galactooligosacáridos (GOS)*, Nucleótidos totales, Citidina 5'-monofosfato, Uridina 5'-monofosfato, Adenosina 5'-monofosfato, Guanosina 5'-monofosfato, Inosina 5'-monofosfato.

(*) Si se añade, su contenido no será superior a 0,8 g/100 ml según una combinación de 90 % de oligogalactosil lactosa y 10% de oligofructosil sacarosa de elevado peso molecular. Las proporciones y/o niveles máximos que difieran de lo anterior, deberán ser evaluadas por la Autoridad Sanitaria Nacional.

Las fórmulas podrán contener únicamente los aditivos alimentarios en las concentraciones indicadas para espesantes: Goma guar, Goma de semillas de algarrobo (goma garrofín), Fosfato de dialmidón acetilado, Fosfato de dialmidón fosfatado, Almidón hidroxipropilado, Octenil succinato sódico de almidón, Carragenina; emulsionantes: Lecitina, Mono y diglicéridos de ácidos grasos, Ésteres de mono y diglicéridos de ácidos grasos con ácido cítrico, Mono y diglicéridos de ácido cítrico; reguladores de acidez: Sodio hidróxido, Sodio carbonato, Sodio bicarbonato, Potasio hidróxido, Potasio carbonato, Potasio Bicarbonato, Calcio hidróxido, Ácido L(+) láctico, Ácido cítrico, Sodio (mono) citrato, Sodio (tri) citrato, Potasio (mono) citrato, Potasio (tri) citrato, Fosfato mono, di y trisódico, Fosfato mono, di y trisódico; antioxidantes: Tocoferoles, Ascorbil palmitato; gases de envasado: Carbono dióxido y Nitrógeno”.

“Estos productos se denominarán “Fórmula para lactantes en polvo/líquida (según corresponda). Se deberá indicar por debajo de la denominación el o los ingredientes opcionales distintivos (en el caso de corresponder) y, en las proximidades, la leyenda “de inicio” o “de continuación”, según corresponda.

Cuando las fórmulas estén elaboradas totalmente a partir de las proteínas procedentes de la leche, se denominarán “Fórmula láctea para lactantes en polvo/líquida (según corresponda)”. Se deberá indicar por debajo de la denominación el o los ingredientes opcionales distintivos (en el caso de corresponder) y, en las proximidades, la leyenda “de inicio” o “de continuación” según corresponda.

Cuando las fórmulas estén elaboradas totalmente a partir de proteínas vegetales, se denominarán “Fórmula para lactantes a base de (...) en polvo/líquida (según corresponda)”, especificando el origen de las proteínas. Se deberá indicar por debajo de la denominación el o los ingredientes opcionales distintivos (en el caso de corresponder) y, en las proximidades, la leyenda “de inicio” o “de continuación”, según corresponda.

Deberán cumplir con los requisitos generales de rotulado establecidos en el presente Código y con los siguientes requisitos específicos para la información nutricional:

- Se deberán declarar: valor energético (expresado en kJ y kcal), carbohidratos (enumerando cada mono y disacárido), proteínas, grasas totales, grasas saturadas, grasas trans, grasas mono y poliinsaturadas (indicando cada ácido graso mono y poliinsaturados) y colesterol, fibra alimentaria, sodio, vitaminas, minerales, y cualquier otro nutriente (expresados únicamente en g, mg o µg, según corresponda) por 100 g o

100 ml del producto tal como se ofrece al consumidor y por cada 100 kcal tal como se ofrece al consumidor.

- Adicionalmente, se podrá expresar la información nutricional por 100 ml del producto listo para el consumo de acuerdo a las indicaciones de preparación del fabricante.

En el rótulo de las fórmulas deberá incluirse la siguiente información:

- Gráficas que ilustren el modo de preparación.
- La leyenda “AVISO IMPORTANTE”, con letras de altura no menor de 4 mm y buen contraste, realce y visibilidad, seguida de una afirmación que manifieste la superioridad de la lactancia materna.
- Las frases obligatorias: “Consulte a su Médico”.
- Para las fórmulas de inicio: “La leche materna es el mejor alimento para tu bebé. Hasta los seis meses de vida no necesita ningún otro alimento o bebida.”
- Para las fórmulas de continuación: “La leche materna sigue siendo la mejor leche para tu bebé hasta por lo menos los dos años de vida” y una mención de que el producto solo es adecuado para lactantes mayores de 6 meses y como parte de una dieta diversificada, y que no debe utilizarse durante los primeros 6 meses de vida.
- Instrucciones para el uso apropiado del producto, así como para su conservación y la eliminación del preparado sobrante.
- Una advertencia acerca de los riesgos que pueden derivarse de un almacenamiento, una preparación o un uso inadecuados.
- Para las fórmulas en polvo, además: “Reconstituir con agua potable”.
- Información que indique que los preparados en polvo no son estériles.
- La indicación del origen y la naturaleza de las proteínas y de los hidrolizados proteicos.

Cuando corresponda, podrá indicarse por debajo de la denominación una mención que indique la característica nutricional específica para la cual fue diseñado el producto: sin lactosa, con proteínas hidrolizadas o formuladas con el fin de evitar la regurgitación. Para aquellas fórmulas “Sin lactosa” que contuvieren galactosa, deberá indicarse el contenido de galactosa en la información nutricional.

Toda la información contenida en los rótulos y publicidad deberá cumplir con lo establecido en el Código Internacional de Comercialización de Sucedáneos de la Leche Materna y sus resoluciones posteriores; como también con lo establecido en la Ley Nacional N°26.873 y su reglamentación (Decreto N°22/2015), entendiéndose que la

aplicación de todos los términos del Código Internacional de Comercialización de Sucedáneos de la Leche Materna se extiende hasta los dos años de vida del niño. Además, no deberán incluirse en el rotulado y publicidad (incluidas las marcas) declaraciones de propiedades nutricionales y/o menciones que declaren, sugieran o impliquen que existe una relación entre la fórmula o un ingrediente de la fórmula y la salud del lactante”.

3.3. GOS como ingrediente funcional. Definición y características. Efectos beneficiosos en la salud humana

Los GOS están clasificados como carbohidratos no digeribles (NDO, *Non Digestible Oligosaccharides*) ya que resisten los procesos digestivos en el estómago y en el intestino delgado de forma que el 90% de lo que se consume llega hasta el colon sin ser modificado (Van Loo et al., 1999). Esta indigestibilidad se debe a que los GOS tienen configuración β y las enzimas digestivas gastrointestinales humanas son mayoritariamente específicas de enlaces α -glicosídicos (Sako et al., 1999). Los GOS son fermentados por la microbiota beneficiosa del colon generando un efecto prebiótico. El término prebiótico, definido como ingrediente no digerible que afecta beneficiosamente al huésped mediante la estimulación del crecimiento y/o la actividad de un número limitado de bacterias en el colon, fue introducido por Gibson y Roberfroid en 1995; sin embargo, hace más de cincuenta años que es conocido el efecto beneficioso de algunos carbohidratos sobre la microbiota intestinal. Los prebióticos se caracterizan por no ser digeridos por los jugos digestivos y llegar intactos al colon donde son fermentados selectivamente por la microbiota colónica considerada beneficiosa (bifidobacterias y lactobacilos) en detrimento de la no deseable (bacteroides, clostridios, *Escherichia coli*) (Gänzle y Follador, 2012; Roberfroid et al., 2010).

Además, los GOS son ligeramente dulces (aprox. 40% en relación a la sacarosa) y bastante estables, incluso a altas temperaturas y pH ácido (Voragen, 1998), no son cariogénicos y poseen excelente sabor. Por estas razones, los GOS son muy atractivos como ingredientes alimentarios con rol prebiótico y también con función de edulcorante (Splechna et al., 2006). Los GOS se producen por enzimas β -galactosidasas de diferente origen (levaduras, mohos y bacterias) (Gänzle et al., 2008; Vera y Illanes, 2016; Vera et al., 2012); método considerablemente más simple que la síntesis química

(Sears y Wong, 2001). La actividad de transgalactosilación, actividad secundaria a la actividad hidrolítica principal que poseen estas enzimas, es la responsable de su formación. Los GOS están compuestos por monómeros de galactosa unidos por enlace glicosídico, algunos con una molécula de glucosa terminal y poseen un grado de polimerización (GP) de 2 a 9 (Vera y Illanes, 2016). En general, se representan con la fórmula Gal-(Gal) n -Glu, donde Gal representa el resto de galactosa, Glu el resto de glucosa y n es un número entero que indica el número de unidades de Gal unidas a la Glu terminal. Dependiendo de las enzimas utilizadas y las condiciones de la reacción se consiguen mezclas de tri, tetra o pentasacáridos con enlaces β (1-3), β (1-4) y β (1-6). Esta variabilidad en enlaces glicosídicos puede ser uno de los motivos por los cuales los GOS poseen una gran resistencia a la digestión ácida (Barreteau et al., 2006).

Como ya se ha mencionado, los GOS son muy estables a altas temperaturas y diferentes pH, permaneciendo sin cambios en diferentes condiciones: 160°C por 10 minutos a pH neutro, 120°C por 10 minutos a pH 3, 100°C por 10 minutos a pH 10. También son estables durante períodos largos de almacenamiento (Macfarlane et al., 2008).

Los GOS pueden ser adicionados como ingredientes en diversos tipos de alimentos; su elevada solubilidad permite una fácil inclusión en varias aplicaciones entre las que se incluyen las formulaciones infantiles, como se indicó anteriormente, y bebidas para deportistas, productos lácteos, bebidas fermentadas, panadería y repostería, mermeladas, barras de cereales, espumas y emulsiones, en productos untables y mantequilla, quesos, pasta de hígado, salchichas, helados, etc. (Corzo et al., 2015; Splechtna et al., 2006). Por actuar como una fibra de bajas calorías (aprox. 2 kcal/g) los GOS ofrecen grandes oportunidades para la reducción calórica. Durante la fermentación con levaduras y en el horneado del pan los GOS no son destruidos, proporcionando un sabor y una textura excelentes a los productos de panadería. Los productos lácteos fermentados con adición de bacterias probióticas y GOS son otro buen ejemplo de la utilización de estos compuestos. Los alimentos para los infantes y alimentos específicos para personas mayores son prometedores campos de aplicación de los GOS, ya que estas personas son más susceptibles a tener desequilibrios en su microbiota intestinal, que podrían restaurarse por la ingestión de GOS (Sako et al., 1999).

En la **Figura 3** se observa la estructura de los GOS en distintas representaciones.

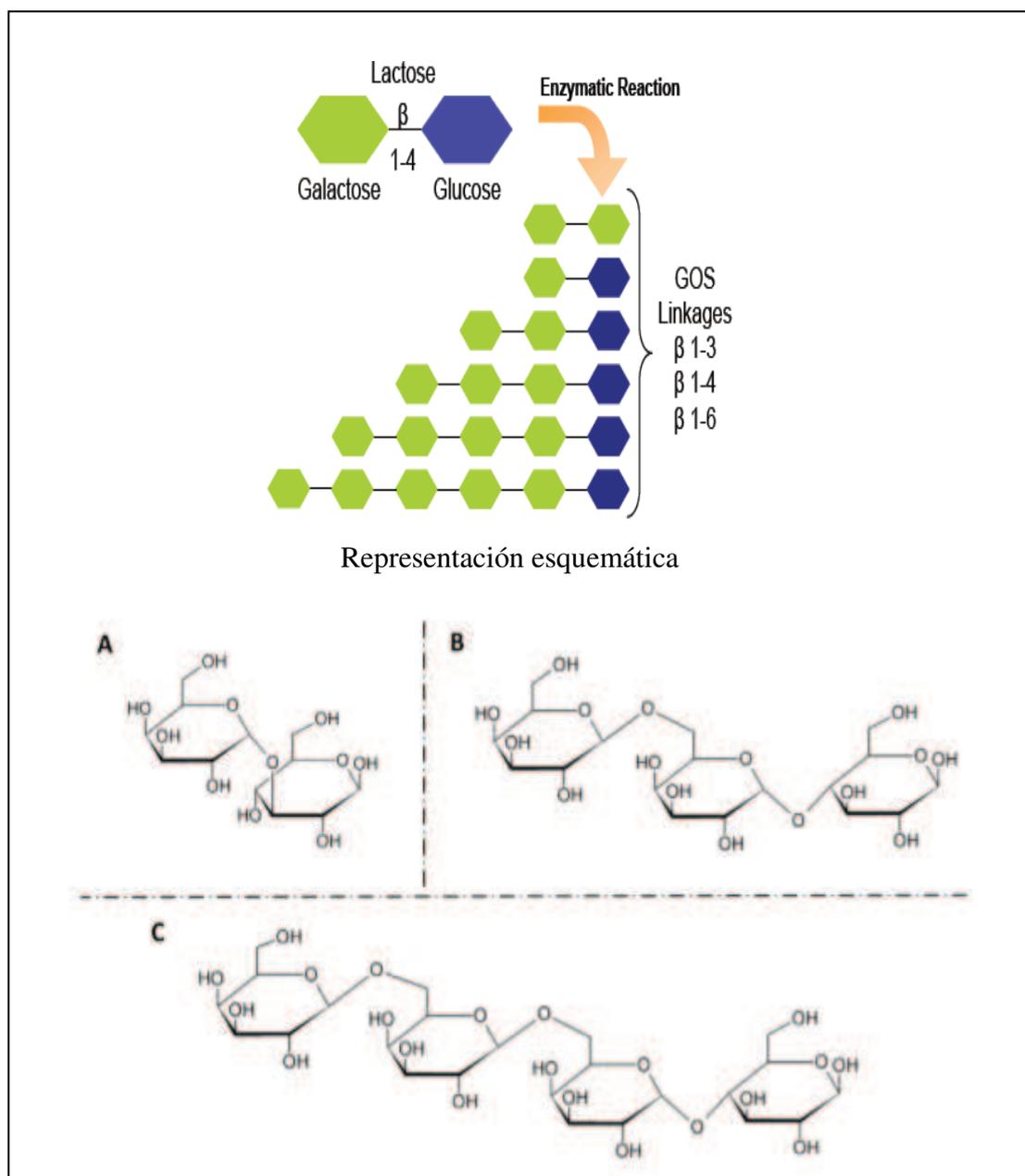


Figura 3. Estructura típica de GOS con distinto número de subunidades (A) disacárido (di-GOS) Gal-β (1-3) Glu, (B) trisacárido (tri-GOS) Gal-β (1-6) Gal-β (1-4) Glu, (C) tetrasacárido (tetra-GOS) Gal-β (1-6) Gal-β (1-6) Gal-β (1-4) Glu (Adaptado de Illanes et al., 2016).

Existe un gran número de estudios científicos que avalan los beneficios de los GOS sobre la salud humana (Roberfroid et al., 2010), los cuales se producen principalmente mediante dos mecanismos, que están relacionados con el efecto prebiótico de los GOS, y son los siguientes (Barile y Rastall, 2013; Macfarlane et al., 2008; Rastall, 2010; Sangwan et al., 2011):

1. Estimulación del crecimiento de bacterias beneficiosas en el colon tales como lactobacilos y bifidobacterias.

2. Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC; acetato, propionato, butirato), hidrógeno, metano y dióxido de carbono durante la fermentación de los carbohidratos. Estos productos del metabolismo de las bacterias pueden ejercer un efecto beneficioso en el intestino y se pueden absorber produciendo otros efectos deseables.

Diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los GOS son estables a la digestión enzimática y llegan mayoritariamente al colon donde son fermentados. Los AGCC producidos en esta fermentación son absorbidos y metabolizados en los colonocitos, las células del hígado o los tejidos periféricos. El valor calórico de los carbohidratos no digeribles pero fermentables se ha estimado en 1,5 - 2 kcal/g. Sin embargo, si no se digieren y son totalmente resistentes a la fermentación colónica ese valor se reduce a 0 kcal/g. Los microorganismos intestinales beneficiosos estimulados por los GOS y los AGCC que se producen durante el metabolismo sacarolítico pueden afectar positivamente al sistema inmune y proteger frente a enfermedades inflamatorias. Durante la fermentación de los GOS, el butirato y el propionato producidos pueden participar en varios mecanismos relacionados con la modulación de la respuesta inmune tales como la estimulación de apoptosis y la regulación de la producción de citoquinas, entre otros.

Los GOS generalmente han sido reconocidos como seguros (GRAS por sus siglas en inglés: *generally recognized as safe*). En pruebas de toxicidad aguda y crónica en ratas, la ingestión oral de GOS a razón de 20 g/kg de peso corporal administrada en una sola dosis, y de 1,5 g/kg de peso corporal durante 6 meses, no ha mostrado toxicidad. Tampoco se encontró mutagenicidad en la prueba de mutación microbiana de Ames que es un método ampliamente empleado para evaluar el potencial mutagénico de nuevos productos químicos. Esta prueba también se utiliza para enviar datos a las agencias reguladoras para el registro o la aceptación de productos químicos, incluidos medicamentos y biocidas.

3.4. Conceptos de Fibra alimentaria y de Prebióticos de acuerdo a la Legislación Argentina

El Código Alimentario Argentino (CAA) en el Artículo 1385 (RESOLUCIÓN CONJUNTA SPREI Y SAGPYA N°95/2008 Y N° 358/2008) del Capítulo XVII: Alimentos de Régimen o Dietéticos contempla la definición de GOS dentro del concepto de fibra alimentaria. A continuación, se transcriben dichas definiciones:

“Se entiende por Fibra Alimentaria a cualquier material comestible que no sea hidrolizado por las enzimas endógenas del tracto digestivo humano. Incluye polisacáridos no almidón, pectinas, almidón resistente, inulina, oligofruktosa, polidextrosa, maltodextrinas resistentes, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), transgalactooligosacáridos (TOS), y todos los que en el futuro incorpore la Autoridad Sanitaria Nacional.

Se entiende por Fructooligosacáridos (FOS) a los oligosacáridos de fructosa con uniones β -2,1 de origen natural o sintético.

Se entiende por Inulina el fructano natural constituido por unidades de fructosil con uniones β -2,1 terminado en una unidad de glucosa. La longitud de la cadena es generalmente de 2 a 60 unidades.

Se entiende por Oligofruktosa natural el producto constituido por 3 a 5 unidades de fructosa con una unidad terminal de glucosa. La oligofruktosa sintética contiene β -2,1 cadenas de fructosa con o sin unidades de glucosa terminales. Las cadenas varían de 2 a 8 residuos de monosacáridos.

Se entiende por Fructooligosacáridos (FOS) sintético el producto de la hidrólisis enzimática (enzima fructofuranosidasa fúngica) de la inulina o de la síntesis o de la transfructosilación de la sacarosa. Los FOS sintéticos poseen la misma composición química y estructural que la oligofruktosa, excepto que el promedio de los grados de polimerización es de 2 a 4.

Se entiende por Galacto-oligosacáridos (GOS) el oligosacárido no digerible (3 a 10 grados de polimerización) compuesto por unidades de galactosa.

Se entiende por Transgalactooligosacáridos (TOS o TGOS) el producto de la transgalactosilación enzimática de la lactosa. Los oligómeros son lineales y consisten en moléculas de lactosa con varias galactosas con uniones β -1,6 y β -1,4”.

Por otro lado, los prebióticos son sustancias no digeribles, esencialmente carbohidratos, que son selectivamente fermentados en el colon, originando cambios beneficiosos en la composición y/o en la actividad de la microbiota intestinal, lo cual tiene un impacto en la salud y el bienestar del individuo (Gibson et al, 2004; Roberfroid et al., 2010). Existe un gran número de estudios, incluyendo los de intervención con humanos, que demuestran el efecto prebiótico de los GOS (Roberfroid et al., 2010). En estudios con animales se ha verificado que cuando se añaden prebióticos a la dieta se obtiene una mayor absorción y biodisponibilidad del calcio, y en menor proporción del magnesio, cinc y del hierro (Oliveira y González-Molero, 2007).

El Código Alimentario Argentino (CAA) en el Artículo 1390 (Res. Conj. SPReI 229/2011 y SAGyP 731/2011) del Capítulo XVII: Alimentos de Régimen o Dietéticos, define a los prebióticos según lo siguiente: “Con la denominación de Prebiótico, se entiende el ingrediente alimentario o parte de él (no digerible) que posee un efecto benéfico para el organismo receptor, estimulando el crecimiento selectivo y/o actividad de una o de un número limitado de bacterias en el colon y que confiere beneficios para su salud”.

Para que un compuesto pueda ser utilizado como ingrediente prebiótico para alimentos deberá cumplir con el siguiente protocolo de evaluación:

I. Requisitos Mínimos

1. Identificación del compuesto

- Nombres químicos.
- Caracterización físico-química.
- Descripción.
- Fuente/Origen.
- Pureza.
- Contaminantes.

2. Caracterización del prebiótico

- Resistencia a la acidez gástrica: ensayo realizado como indicador de que el prebiótico no es modificado por la acidez estomacal.
- Resistencia a la hidrólisis por enzimas de mamíferos: ensayo realizado como indicador de que el prebiótico no es afectado por enzimas presentes en la saliva, así como enzimas pancreáticas e intestinales.

- Resistencia a la absorción gastrointestinal: ensayo realizado como indicador de que el prebiótico no se absorbe a nivel del epitelio intestinal.

- Fermentación por la microbiota intestinal.

- Estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales benéficas que contribuyen a la salud y bienestar: ensayo realizado como indicador de que el prebiótico es utilizado como nutriente selectivamente por la microbiota intestinal considerada benéfica. Deberá observarse crecimiento de bacterias benéficas y no deberá observarse crecimiento de otra microbiota intestinal.

3. Ensayos “*in vivo*” e “*in vitro*” que demuestren el(los) efecto(s) fisiológico(s) adjudicado(s) al prebiótico debidamente documentados y respaldados en estudios efectuados por organismos nacionales y/o internacionalmente reconocidos.

4. Seguridad

El compuesto prebiótico no debe ser riesgoso para la salud. Deberá demostrarse mediante ensayos de toxicidad aguda, subaguda y crónica debidamente documentados y respaldados en estudios efectuados por organismos nacionales y/o internacionalmente reconocidos.

II. Identificación Comercial del ó los Compuestos

El producto se presentará comercialmente en un envase bromatológicamente apto cuyo rótulo indique la identificación precisa del ó los componentes que lo componga(n).

Con la denominación de Alimento con Prebióticos, se entiende aquel alimento adicionado con un prebiótico autorizado.

El producto se rotulará: “...con prebióticos” llenando el espacio en blanco con la denominación de venta del alimento correspondiente.

Los alimentos elaborados con prebióticos serán autorizados, previa evaluación satisfactoria de los ensayos “*in vivo*” en el alimento tal cual se va a consumir, que demuestren la funcionalidad que se le atribuye a el(los) compuesto(s) prebiótico(s) que contiene, de una Comisión Evaluadora integrada por profesionales especializados pertenecientes a la Autoridad Sanitaria o a los que ésta designe a ese efecto para cada caso particular”.

3.5. Obtención industrial de GOS

Como se indicó anteriormente, la lactosa, que se encuentra presente en altos niveles en el suero de quesería, es el sustrato para la síntesis enzimática de GOS con enzimas β -galactosidasas.

3.5.1. Lactosa

La lactosa o azúcar de la leche es el único glúcido libre que existe en cantidades importantes en la leche de diferentes mamíferos aparte de la leche humana. De los componentes de la leche es el más abundante (40% de los sólidos de la leche de vaca), el de estructura química más simple y el más constante en proporción. La lactosa es menos dulce y soluble que la sacarosa y no siempre puede ser absorbida por el sistema digestivo humano (Fennema, 2008). A excepción de la leche, la lactosa es un azúcar muy raro en la naturaleza. Se sintetiza en la glándula mamaria a partir de la glucosa sanguínea y en los rumiantes, a partir de ácidos volátiles, siendo éste el factor que limita la producción de leche. Para los seres humanos y para numerosos animales, la lactosa es prácticamente la única fuente de galactosa (Alais, 1985).

La lactosa, 4-O-(β -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa), es una hexobiosa de fórmula condensada $C_{12}H_{22}O_{11}$, con un peso molecular de 342 g/mol. Existe como dos formas isómeras: α y β , que se diferencian en la posición de un grupo -OH en el carbono C1 de la glucosa (isomería cíclica). Este concepto de isomería es importante, ya que estas dos formas tienen propiedades muy diferentes de solubilidad, cristalización y rotación. A temperatura inferior a 93,5 °C, la forma β es más soluble, mientras que por encima de 93,5°C, el isómero α tiene mayor solubilidad. La lactosa está formada por la unión de una molécula de β galactosa y una molécula de glucosa α ó β . El grupo aldehídico de la galactosa está comprometido en el enlace glicosídico y el de la glucosa está libre (en forma pseudo-aldehídica). Al hidrolizarse, la lactosa libera glucosa y galactosa, cuyo poder edulcorante combinado es de aproximadamente el 80% del de la sacarosa. Este hidrolizado es 3 ó 4 veces más soluble que la lactosa y, además, los monosacáridos son absorbidos fácilmente en forma directa en la mucosa intestinal (Mammarella, 2001).

3.5.2. Suero como materia prima para la síntesis de GOS

El Código Alimentario Argentino (CAA), en el Artículo 582 (Res. Conj. 18/2018), define al suero como el “líquido obtenido de la elaboración de quesos, ricota, manteca y/o caseína, que contiene componentes de alto valor nutricional propios de la leche”. El

suero de quesería, que tiene un color claro verde-amarillento (**Figura 4**), representa alrededor del 90% del peso de la leche utilizada para la elaboración de queso (Castells, 2019), y contiene un elevado nivel de sólidos totales (63-70 g/L) siendo la lactosa uno de sus principales componentes (44-52 g/L), además de proteínas (6-8 g/L), grasa (4-5 g/L) y sales minerales (4-6 g/L) (Illanes, 2011; Musset y Castells, 2017; Perotti et al., 2018). Debido a este elevado contenido de lactosa, el suero de quesería es el sustrato más comúnmente utilizado para la producción de GOS. El suero es un efluente que se deteriora rápidamente a causa de la acción microbiana y su disposición final requiere tratamientos previos que eviten la contaminación ambiental. La necesidad de darle un destino a este subproducto surge de los serios problemas de polución que el mismo puede provocar. El suero es un contaminante orgánico con altos niveles en la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) (40000-60000 ppm) y química de oxígeno (DQO) (50000-80000 ppm) (Cristiani-Urbina et al., 2000; Musset y Castells, 2017).

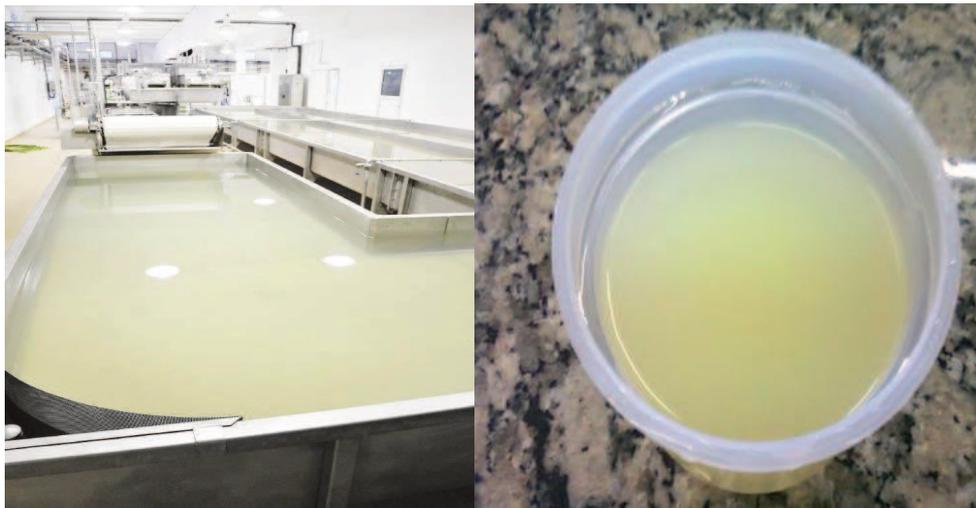


Figura 4. Suero de quesería

Los sueros se pueden clasificar en suero dulce (suero obtenido de la coagulación de la leche con enzimas coagulantes, también llamado suero enzimático) y suero ácido (obtenido de la coagulación de la leche por métodos químicos) (Parra Huertas, 2009). El suero ácido contiene mayor concentración de minerales comparativamente al suero enzimático debido a la disolución del fosfato de calcio coloidal que forma parte de las micelas de caseína. El suero dulce contiene restos de coagulante (cuajo) activo y un

gran número de bacterias provenientes del crecimiento del fermento láctico durante la fabricación del queso.

En Argentina, anualmente se producen alrededor de 10.000 millones de litros de leche, siendo el 70% procesado por aproximadamente 20 empresas grandes y el 30% restante por pymes. Cerca del 50% del total de leche producida es destinada a la elaboración de quesos, generando un estimado de 12 millones de litros de suero por día. Sólo el 45% de este volumen es procesado para la obtención de productos con valor agregado, fundamentalmente por grandes empresas, y el resto es enviado a alimentación animal o vertido como efluente líquido, lo cual no constituye una decisión medioambiental sustentable (Castells, 2019). El suero se destina a alimentación animal porcina y bovina (por ejemplo, en la ración de cerdos se puede utilizar hasta un 30 % de suero líquido), y como materia prima para la obtención de otros subproductos como lactosa y concentrado proteicos, entre otros.

En la **Figura 5** se presentan los distintos tratamientos y derivados que se pueden obtener del procesamiento del suero.

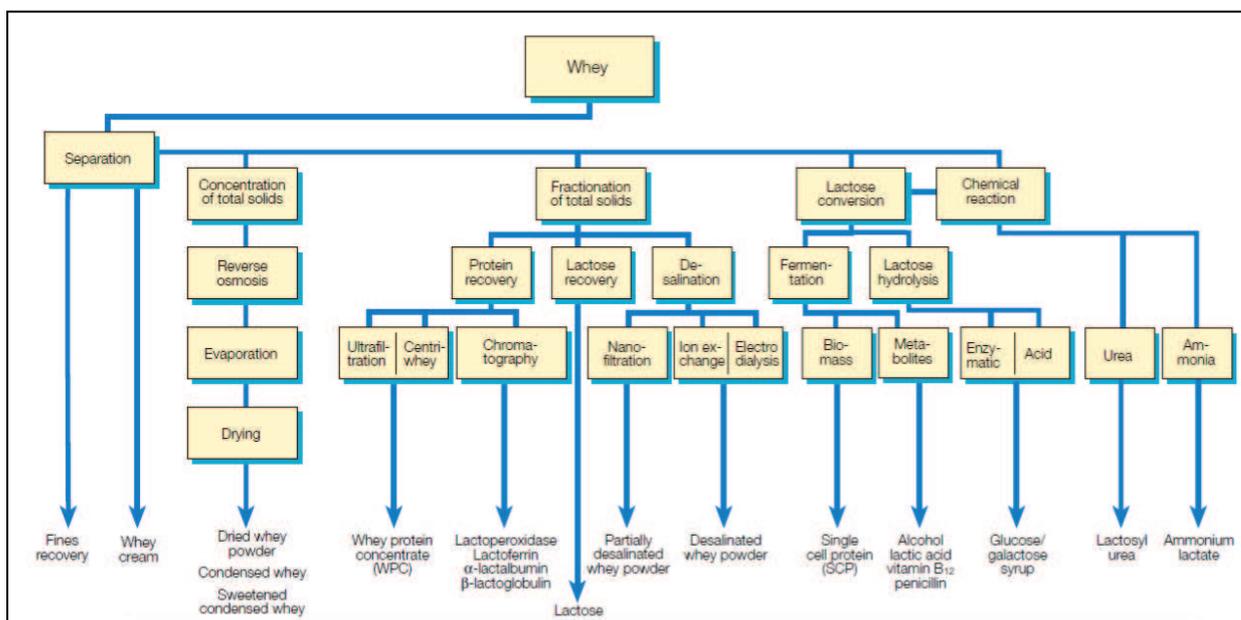


Figura 5. Procesamiento del suero y productos derivados (adaptado de “Handbook of Dairy Processing”, Tetra Pak 2015; <https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/chapter/whey-processing>)

3.5.3. Enzimas β -galactosidasas

Las enzimas son moléculas orgánicas, generalmente de naturaleza proteica, que actúan como catalizadores en reacciones químicas, es decir aceleran la velocidad de reacción, promoviendo la transformación de determinadas moléculas en productos específicos. Son catalizadores biológicos capaces de operar en condiciones moderadas. La alta especificidad con la que se llevan a cabo dichas transformaciones, el volumen reducido de desechos que generan dichos procesos y las condiciones poco agresivas en las que se operan, han permitido que estos biocatalizadores se posicionen como elementos preponderantes en diversos sectores industriales. En efecto, se considera que en aquellos procesos industriales en donde está involucrada al menos una reacción química, existe la posibilidad de integrar una enzima al proceso de transformación (Castillo Rosales y Rodríguez Alegría, 2014). El uso de enzimas presenta ventajas comparado con los procesos químicos convencionales (Fernández, 2010), principalmente en las industrias de alimentos y farmacéutica.

En 1894, Emil Fischer sugirió que la enzima y su sustrato poseen complementariedad geométrica, es decir, sus estructuras encajan exactamente una en la otra, modelo que ha sido denominado "llave-cerradura", refiriéndose a la enzima como a una especie de cerradura y al sustrato como a una llave que encaja de forma perfecta en dicha cerradura. Sin embargo, si bien este modelo explica la especificidad de las enzimas, falla al intentar explicar la estabilización del estado de transición que logran adquirir las enzimas. Posteriormente, en 1958, Daniel Koshland estableció una modificación al modelo de llave-cerradura; las enzimas son estructuras bastante flexibles, por lo que el sitio activo podría cambiar su conformación estructural por la interacción con el sustrato (**Figura 6**). Como resultado de ello, la cadena aminoacídica que compone el sitio activo es moldeada en posiciones precisas, lo que permite a la enzima llevar a cabo su función catalítica (Voet et al., 2008).

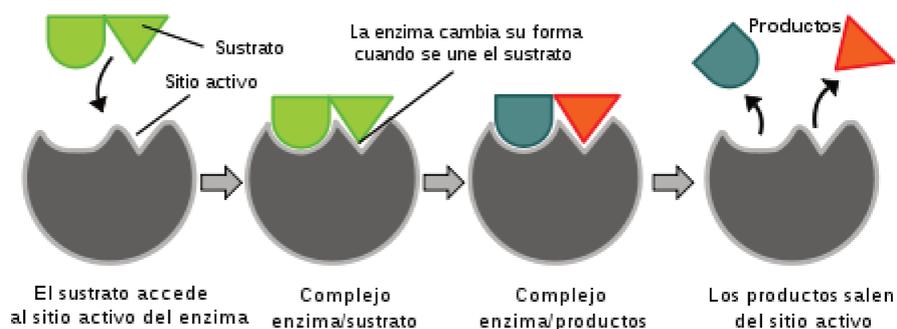


Figura 6. Representación esquemática del modelo de acción de la enzima y su sustrato

Las enzimas β -galactosidasas (β -D-galactósido galactohidrolasas, EC 3.2.1.23) poseen un gran potencial para su uso en la industria de alimentos, teniendo un impacto tanto en el aspecto nutricional como tecnológico (Grosová et al., 2008). Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, por lo que se las puede obtener a partir de una gran variedad de fuentes, lo que define sus propiedades (Panesar et al., 2006). Entre las diferentes fuentes, los microorganismos ofrecen un mayor número de ventajas tales como su fácil manipulación, gran velocidad de multiplicación y gran rendimiento en la producción de la enzima. En la actualidad se comercializan varios preparados enzimáticos con actividad β -galactosidasa, siendo los más extensamente utilizados los derivados de *Kluyveromyces* sp. y *Aspergillus* sp. En la **Tabla 4** se presentan algunas de las preparaciones comerciales de enzimas β -galactosidasas de grado alimenticio que se emplean a escala industrial con el propósito de hidrolizar la lactosa en productos lácteos (Panesar et al., 2006).

La lactosa se transforma en un problema para quienes padecen intolerancia, ya que el 75% de la población mundial sufre de algún grado de intolerancia a la lactosa. Por ello, la industria láctea desarrolló tecnologías para producir lácteos reducidos o libres de lactosa de manera de brindar una alternativa para que el consumidor intolerante a este azúcar no excluya los lácteos de su dieta (Erich et al., 2015; Gänzle et al., 2008; Harju et al., 2012).

Tabla 4. Preparaciones comerciales de enzimas β -galactosidasas
(Panesar et al., 2006)

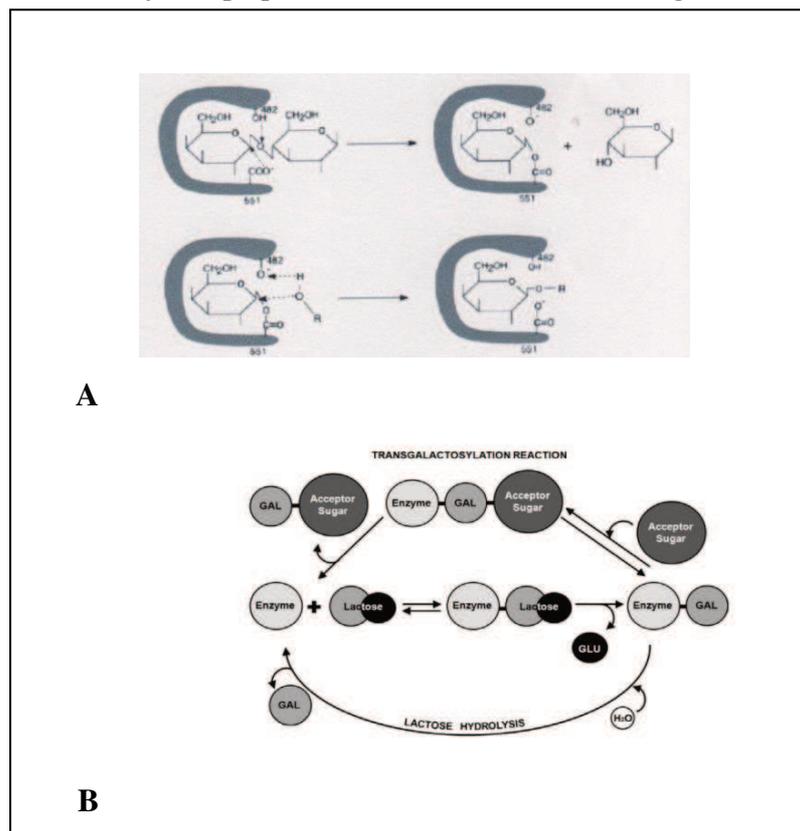
Nombre comercial	Marca	Fuente	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)
LEVADURAS				
MAXILACT L-2000	GIST-BROCADES, THE NETHERLANDS	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5-7,3	35
LACTOZYME	NOVO-NORDISK, DENMARK	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	6,6	37
NEUTRAL LACTASE	PFIZER, USA	<i>Candida pseudotropicalis</i>	6,2	47
MOHOS				
LACTOSE NIGER	RAPIDACE, FRANCE	<i>Aspergillus niger</i>	3,0-4,0	55-60
FUNGAL LACTASE	ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION, NEW YORK, USA	<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	50-55
BACTERIAS				
NOVOZYM 231	NOVO-NORDISK, DENMARK	<i>Bacillus</i> spp.	6,0	40

3.5.4. Reacción de hidrólisis y transgalactosilación

La transgalactosilación de la lactosa mediante enzimas β -galactosidasas con la producción de GOS es un paso intermedio de una reacción más compleja, ya que a mayor tiempo de reacción todos los azúcares formados pueden ser hidrolizados hasta monosacáridos (Zhou y Chen, 2001). En el primer paso de reacción tiene lugar la formación del complejo enzima-lactosa y la liberación simultánea de la glucosa. Posteriormente, la enzima transfiere la galactosa a aceptores nucleofílicos que contienen un grupo hidroxilo. La transferencia al agua produce galactosa y la transferencia a un azúcar, origina di, tri y oligosacáridos de mayor peso molecular. Estos oligosacáridos formados pueden ser sustratos para la enzima, por lo que dependiendo de las condiciones se pueden hidrolizar lentamente (**Figura 7**). Uno de los factores que más influye en la formación de GOS es la concentración inicial de lactosa. A medida que ésta disminuye y la concentración de agua en el sistema aumenta prevalece la reacción de hidrólisis. Por el contrario, la reacción de transgalactosilación se favorece con una disminución de la concentración de agua y altas concentraciones de lactosa. Asimismo, se ha reportado un aumento en la actividad de transgalactosilación de la enzima, y por consiguiente una mayor producción de GOS, al reducir la actividad de agua por adición

de solventes orgánicos que disminuyan su concentración en el medio de reacción (Goulas et al., 2007; Ladero et al., 2002). Sin embargo, estas condiciones conducen a una desactivación más rápida de la enzima y una producción más lenta de GOS. Aparte de la concentración de lactosa y la actividad de agua, otros factores influyen en la producción de GOS tales como temperatura, pH, medio de reacción y presencia de inhibidores como galactosa y/o glucosa (Huerta et al., 2011; Martínez-Villaluenga et al., 2008; Rodríguez-Colinas et al., 2012; Torres et al., 2010; Zheng et al., 2006).

La elección de la enzima es crucial en el rendimiento y tipo de GOS producidos. Se han reportado variaciones en los tipos de GOS obtenidos en cuanto a grado de polimerización y enlaces entre las unidades monoméricas dependiendo del tipo de enzima usada. Por ejemplo, la enzima procedente de *B. circulans* produjo GOS-2 y GOS-3 y en menor cantidad GOS-4 y GOS-5, *Kluyveromyces* spp. generó GOS-2 y en menor medida GOS-3, mientras que la enzima proveniente de *A. oryzae* produjo principalmente GOS-3 y una pequeña cantidad de GOS-4 (Cheng et al., 2006).



A. Según Zhou y Chen (2001). **B.** La ruta inferior representa la hidrólisis de lactosa y la ruta superior la transgalactosilación (Rodríguez Olivenza, 2015).

Figura 7. Esquema de hidrólisis y transgalactosilación de la enzima β -galactosidasa sobre la lactosa.

3.6. Productos comerciales de GOS

Desde hace al menos 30 años, los GOS se utilizan principalmente en Japón y en menor medida en Europa como ingredientes alimentarios; en la actualidad, sus aplicaciones se han extendido rápidamente. Se produjeron comercialmente alrededor del año 1980 en Japón por Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd. y Nissin Sugar Co., Ltd. En Europa, la producción comercial data de 1995. Los GOS también han sido reconocidos en todos los países de la Unión Europea como ingredientes alimentarios y no como aditivos debido a su presencia de forma natural en la leche humana, y están considerados por la FDA en Estados Unidos como compuestos GRAS y en Japón como FOSHU - Food for Specified Health Uses - (Corzo et al., 2015).

En la **Tabla 5** se muestran ejemplos de preparaciones de GOS que se comercializan a nivel mundial.

Tabla 5. Preparaciones comerciales de GOS
(adaptado de Corzo et al., 2015 y Lamsal, 2012)

Fabricante	Nombre comercial del producto (formato)	Descripción Contenido mínimo de GOS declarado (base seca)
Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd. (Japón)	Oligomate 55 (jarabe)	75 % sólidos GOS 55 %
Nissin Sugar Co., Ltd (Japón)	Cup-Oligo H-70 (jarabe)	75 % sólidos GOS 70 %
FrieslandCampina DOMO (The Netherlands)	Vivinal®GOS Syrup (jarabe)	GOS 59 %
Ingredion Incorporated (USA)	BIOLIGO® GL 5700 IMF (jarabe)	GOS 65%
Clasado Biosciences Ltd. (Jersey)	Bimuno (jarabe)	GOS 50%
New Francisco (Yunfu) Biotechnology Corporation Limited (China)	King Prebiotics GOS-570-S (jarabe)	GOS 57%
GTC Nutrition Corn Products International, Inc. (USA)	Purimune™ Prebiotic GOS (polvo)	GOS 90%

En la **Figura 8** se muestra un esquema básico de la producción industrial de GOS, según Lamsal (2012).

La producción de GOS usa soluciones altamente concentradas de lactosa (aprox. 20-40 g/100g) como sustrato. Varios diseños y configuraciones del reactor pueden emplearse: reactor batch con agitación continua, reactor de membrana de fibra hueca, reactor de lecho fijo y reactor de lecho fluidizado. El modo de operación influirá en la composición de la mezcla resultante. Luego, el producto de reacción es tratado con carbón activado y cromatografía de intercambio iónico para su decoloración y desmineralización. Se procede a la filtración y concentración por evaporación hasta 67-74 g/100 g sólidos para el jarabe (transparente) y hasta aprox. 50 g/100 g de sólidos para el producto que será secado por spray para obtener un polvo de color blanco (Lamsal, 2012).

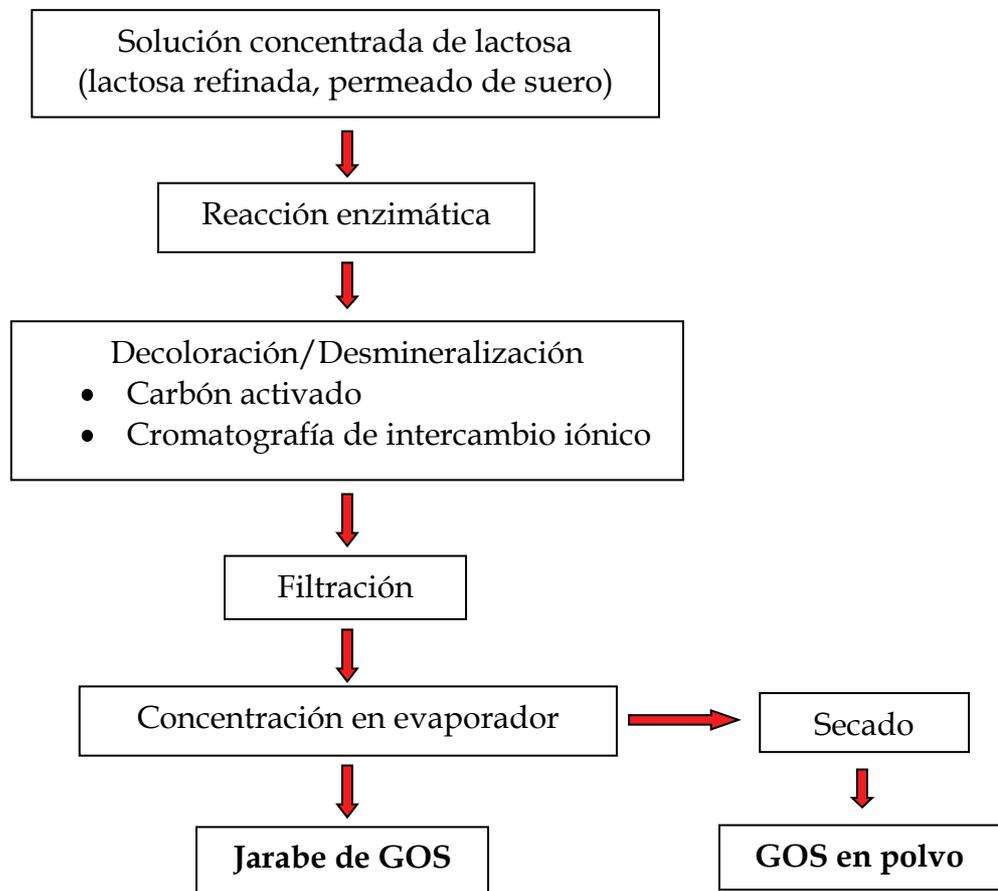


Figura 8. Proceso tecnológico de producción de GOS (adaptado de Lamsal, 2012).

Estos productos comerciales de GOS contienen elevados niveles de monosacáridos (glucosa y galactosa) y lactosa. Para aplicaciones especiales se requiere su purificación. La separación por cromatografía SMB (Simulated Moving Bed Chromatography) es un

procedimiento muy eficiente con el que se logra obtener un producto con elevado nivel de GOS (aprox. 90%), pero muy costoso a nivel industrial. De esta manera, considerables esfuerzos se han llevado a cabo para desarrollar tecnologías alternativas de purificación entre las que se pueden mencionar la nanofiltración, fermentación selectiva con levaduras, filtración con carbón activado y precipitación selectiva con etanol (Vera et al., 2016).

4. Experiencias llevadas a cabo en una industria alimentaria

Las experiencias se llevaron a cabo en una industria alimentaria de la provincia de Santa Fe. Entre los principales productos que se elaboran en dicho establecimiento se encuentran: lactosuero en polvo, lactosuero en polvo desmineralizado, lactosuero reengrasado y como productos en desarrollo lactosa en polvo, lactosuero en polvo deslactosado (hidrólisis > 90 %) y reducido en lactosa (hidrólisis ~ 60%). Dado que el objetivo primordial de la empresa era desarrollar estos productos bajos/reducidos en lactosa, las experiencias estuvieron encaradas hacia esta iniciativa, mientras que solamente en uno de los ensayos se evaluó la formación de GOS, objetivo del presente trabajo. En este sentido, es importante mencionar que la empresa no posee los medios analíticos para realizar el análisis del contenido de GOS, el cual se debió tercerizar, lo que encarecía el costo de las experiencias. A pesar de ello, nos pareció interesante incluir los resultados en este trabajo.

Es de recalcar que la detección y cuantificación de este compuesto bioactivo, por un lado, valoraría la capacidad de las enzimas empleadas para producirlos, ya que no todas las β -galactosidasas poseen esta actividad, y además contribuiría a agregar valor a los productos en desarrollo.

Específicamente, las actividades consistieron en evaluar la capacidad de hidrólisis de lactosa de tres preparaciones enzimáticas comerciales de β -galactosidasas provenientes de *K. lactis*, de diferentes proveedores. Se realizaron tres ensayos por duplicado y a escala laboratorio, empleándose suero de quesería como materia prima; como ya se mencionó, en uno de los ensayos se analizó también la producción de GOS. El suero dulce (5,9-6,2% contenido de sólidos) utilizado en los ensayos fue provisto por queserías de la zona, generalmente procedente de la elaboración de queso fresco o Barra. El suero se transportó hasta la planta en condiciones de refrigeración a 6 ± 2 °C e inmediatamente luego de su arribo a la planta se sometió a diferentes etapas de procesamiento previo a los ensayos a escala laboratorio (**Figura 9**).

En primer lugar, en la zona de recibo (**Figura 10**) se procedió a la descarga y filtración sanitaria con un filtro de acero inoxidable para eliminar los finos de caseínas. Luego ingresó en la zona de procesamiento donde en primer lugar se realizó el descremado en desnatadora centrífuga (**Figura 11**); la crema de suero obtenida se pasteurizó para proceder a su venta a granel. El suero desnatado se pasteurizó en un intercambiador a placas a una temperatura de $72 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos. A continuación, se procedió a la desmineralización y preconcentración en un equipo de nanofiltración compuesto por 4 módulos (**Figura 12**) con membranas NF200 marca KOCH (**Figura 13**) cuyas especificaciones se presentan en la **Tabla 6**, consiguiéndose una reducción de iones monovalentes (sodio y cloruros) y concentración a 18-20 % de sólidos.

Para llevar a cabo las experiencias a escala laboratorio, se tomaron alícuotas (aprox. 1L) del suero preconcentrado de diferentes lotes. En primer lugar, el suero se termostató en baño de agua con agitación a la temperatura adecuada para realizar el proceso enzimático, según corresponda. Luego se adicionó la enzima β -galactosidasa, en las condiciones indicadas. Las especificaciones de las enzimas empleadas se presentan en las **Tablas 7, 8 y 9**. Las condiciones de incubación que se ensayaron en los tres ensayos se presentan en la **Tabla 10**.

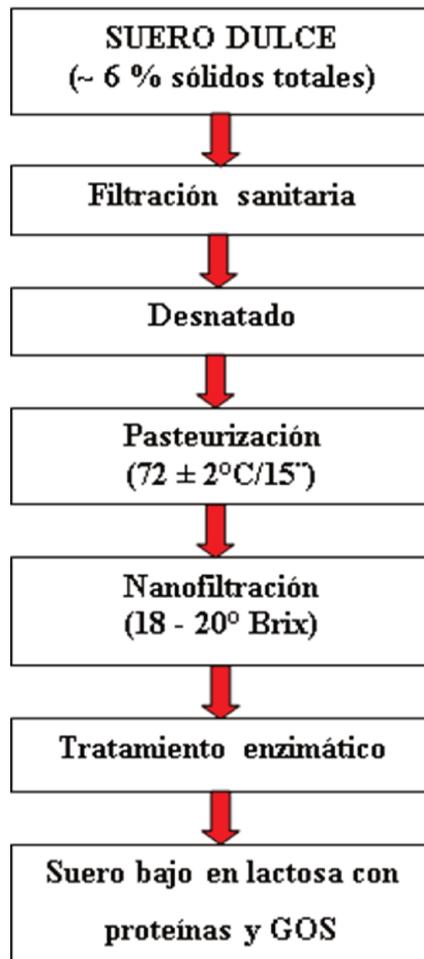


Figura 9. Procesamiento del suero al arribo a la planta y ensayos a escala laboratorio



Figura 10. Recibo de suero en planta industrial



Figura 11. Desnatadora centrífuga (Alfa Laval 3191; <https://alfalaval.lat>)



Figura 12. Equipo de nanofiltración (Hidrobiot S.A., Santa Fe, Argentina)



Figura 13. Membrana de nanofiltración

Tabla 6. Especificaciones técnicas de la membrana de nanofiltración

Membrana de nanofiltración Koch NF-200 (comercializada por Hidrobiot S.A., Santa Fe, Argentina)	
Composición química:	Poliamida TFC
Tipo de membrana:	NF-200 rechazo selectivo nanofiltración
Peso molecular Cut-off:	200 Dalton
Construcción:	En espiral con envoltura exterior de red OD controlada
Aplicaciones:	Desalinización y separación de proteínas y carbohidratos
Presiones de operación:	200 - 450 psi (13,8 – 31,0 bar)
Temperatura de operación:	40 - 122°F (5 - 50°C)
pH de operación:	4,0 – 10,0

Tabla 7. Especificaciones técnicas de la enzima β -galactosidasa DECAZYME YNL (Nutring S.A.) (Enzima E1)

Apariencia	
Microorganismo	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Forma	líquida
Color	amarillento
Olor	libre de olores ofensivos
Sabor	libre de sabores ofensivos
Actividad	
20000 GLU/g (cantidad de enzima que libera 1 μ mol de O-nitrofenol por minuto)	
Activadores	
Manganeso y potasio son necesarios para la completa actividad de la lactasa	
Efectos del pH	
Óptimo	6,00 a 6,50
Estabilidad	6,00 y 8,00
Inhibición	<5,00
Efectos de la temperatura	
Óptima	45°C
Inactivación	por encima de 50°C

Tabla 8. Especificaciones técnicas de la enzima β -galactosidasa MAXILACT L2000
(DSM Food Specialties) (Enzima E2)

Apariencia	
Microorganismo	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>
Forma	líquida
Color	amarillento
Olor	libre de olores ofensivos
Sabor	libre de sabores ofensivos
Actividad	
2000 NLU (Unidades de lactosa) por gramo	
Activadores	
Manganeso, magnesio y potasio son necesarios para la completa actividad de la lactasa.	
Efectos del pH	
Óptimo	6,60 a 6,80
Estabilidad	5,80 – 6,80
Inhibición	< 5,50
Efectos de la temperatura	
Óptima	35 a 40 °C
Inactivación	por encima de 50°C

Tabla 9. Especificaciones técnicas de la enzima β -galactosidasa MAXILACT LX5000
(DSM Food Specialties) (Enzima E3)

Apariencia	
Microorganismo	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>
Forma	líquida
Color	amarillento
Olor	libre de olores ofensivos
Sabor	libre de sabores ofensivos
Actividad	
5000 NLU (Unidades de lactosa) por gramo	
Activadores	

Manganeso, magnesio y potasio son necesarios para la completa actividad de la lactasa.	
Efectos del pH	
Óptimo	6,0 - 7,0
Estabilidad	5,80 – 7,00
Inhibición	< 5,50
Efectos de la temperatura	
Óptima	35-45°C °C
Inactivación	por encima de 50°C

Tabla 10. Condiciones estudiadas en los ensayos de incubación de suero preconcentrado con las enzimas β -galactosidasas a escala laboratorio

Condiciones	Ensayo 1	Ensayo 2		Ensayo 3
Enzima	E1: Decazyme YNL	E1: Decazyme YNL	E2: Maxilact L2000	E3: Maxilact LX5000
Dosis de trabajo (mL/L suero)	1 mL/L	2 mL/L		1,5 mL/L
Temperatura (°C)	42 ± 2 °C	42 ± 2 °C	36 ± 2 °C	38 ± 2 °C
Muestreo	3, 5 y 6 h	1, 3 y 24 h		3 h

Se realizaron mediciones de pH (pHmetro HANNA HI2211 y electrodo HI 1131B, Estados Unidos), acidez titulable por titulación con solución valorada de NaOH 1/9N (0,1 mL de NaOH 1/9 N = 1 °D), grados Brix (Refractómetro Digital M871, 0-85% °Brix, Milwaukee, Rumania), sólidos totales por método gravimétrico de secado en estufa (Bioelec, Argentina), proteínas mediante método Kjeldalh (equipos de digestión y destilación, Buchi Modelos K 435 y B 324, Suiza), grasa por método butirométrico de Gerber, cenizas por calcinación en mufla, glucosa (glucómetro *Prestige IQ*, USA), recuento de bacterias aerobias mesófilas totales (APC, 36°C/48h) y recuento de coliformes totales (ágar VRBA, 36°C/24h), en las muestras de suero al inicio de la incubación. Durante y al final del proceso se analizó el pH, acidez titulable, glucosa y recuentos microbiológicos; también se determinó en algunos ensayos el contenido de galactosa por método enzimático (kit de lactosa/D-galactosa de Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Alemania), y el perfil de carbohidratos: GOS, lactosa y galactosa por cromatografía HPLC con detector de IR (Perkin Elmer, Estados Unidos).

A continuación, se detallan los resultados obtenidos en los tres ensayos realizados.

- **Ensayo 1. Resultados**

La composición fisicoquímica y microbiológica del suero se detalla en la **Tabla 11**. El suero se termostató a 42 ± 2 °C, se adicionó la enzima E1 y se incubó por 6 horas. Durante la incubación se determinó el pH, la acidez y los recuentos microbianos y el proceso de hidrólisis de lactosa se controló a través del análisis del contenido de glucosa empleando el glucómetro (*Prestige IQ*); el método se basa en la medida de la cantidad de luz reflejada por la muestra luego de la reacción de óxido-reducción en una tira reactiva que contiene la enzima glucosa oxidasa. Previo a la realización de los análisis, la muestra se calentó a 60 °C para inactivar la enzima. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 12**.

Tabla 11. Composición físicoquímica y microbiológica del suero preconcentrado

Parámetros	Resultados
Grados Brix (°Bx)	22
pH	6,15
Acidez titulable (°D)	31,0
Sólidos totales (g/100 mL)	20,80
Lactosa (g/100 mL)*	18,32
Glucosa (g/100 mL)	<0,025
Proteínas (g/100 mL)	1,40
Cenizas (g/100 mL)	0,98
Grasa (g/100 mL)	0,10
Bacterias aerobias mesófilas totales (UFC/mL)	130
Bacterias coliformes totales (UFC/mL)	< 10

*Se calculó por diferencia:

$$\text{Lactosa \%} = \text{Sólidos totales \%} - (\text{Proteínas \%} + \text{Cenizas \%} + \text{Grasa \%})$$

$$\text{Lactosa \%} = 20,80 - (1,40 + 0,98 + 0,10) = 18,32\%$$

Tabla 12. Resultados obtenidos durante la incubación del suero con la enzima Decazyme YNL (E1) a 42 ± 2 °C, dosis de trabajo: 1 mL/L suero

Parámetros	Tiempo de incubación		
	3 h	5 h	6 h
pH	6,00	6,00	6,00
Acidez titulable (°D)	33,0	34,0	34,0
Glucosa (g/100 mL)	4,30	4,78	5,72
Bacterias aerobias mesófilas totales (UFC/mL)	1,90E+03	1,50E+04	2,0 E+04
Bacterias coliformes totales (UFC/mL)	1,00E+01	1,00E+02	1,0 E+03

- **Ensayo 2. Resultados**

En este ensayo se incubaron en paralelo dos enzimas a partir de otro lote de suero preconcentrado; la composición del suero de partida se visualiza en la **Tabla 13**. Para ello, dos alícuotas de suero se termostataron a las temperaturas de trabajo según el caso: 42 ± 2 °C para E1 y 36 ± 2 °C para E2, se adicionó la enzima y la incubación se prolongó por 24 horas, según corresponda para cada caso. Se analizó el contenido de glucosa con equipo *Prestige IQ* en dos tiempos de muestreo (1 y 3h), además de pH y recuentos microbianos. Además, no sólo se analizó la capacidad de hidrólisis de las enzimas β -galactosidasas, sino también su actividad transgalactosidasa a través del análisis de los GOS producidos al final de la incubación; para este propósito, es indispensable emplear un método cromatográfico (cromatógrafo líquido con detector de índice de refracción, HPLC-IR) el cual permite analizar simultáneamente otros carbohidratos (glucosa, galactosa y lactosa) presentes en la muestra. Dado que la empresa no posee este equipamiento, el análisis se llevó a cabo en el INLAIN (FIQ, UNL). Previa a la realización de los análisis, la muestra se calentó a 60 °C para inactivar la enzima. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 14**.

Tabla 13. Composición físicoquímica y microbiológica del suero preconcentrado

Parámetros	Resultados
Grados Brix (°Bx)	18,3
pH	6,17
Acidez titulable (°D)	30,2
Sólidos totales (g/100 mL)	16,84
Lactosa (g/100 mL)*	13,71
Glucosa (g/100 mL)	<0,025
Proteínas (g/100 mL)	2,18
Cenizas (g/100 mL)	0,85
Grasa (g/100 mL)	0,10
Bacterias aerobias mesófilas totales (UFC/mL)	150
Bacterias coliformes totales (UFC/mL)	< 10

*Se calculó por diferencia:

Lactosa % = Sólidos totales % - (Proteínas % + Cenizas % + Grasa %)

Lactosa % = 16,84 - (2,18 + 0,85 + 0,10) = 13,71%

Tabla 14. Resultados obtenidos durante la incubación del suero con las enzimas

Decazyme YNL (E1) a 42 ± 2 °C y Maxilact L2000 (E2) a 36 ± 2 °C, dosis de trabajo: 2 mL/L suero

Enzima Decazyme YNL (E1)			
Parámetros	Tiempo de incubación		
	1h	3 h	24 h
pH	5,91	5,91	5,88
Glucosa (g/100 mL)	3,82	4,48	6,60*
Lactosa (g/100 mL)	S/D	S/D	1,25*
GOS (g/100 mL)	S/D	S/D	0,96*
Galactosa (g/100 mL)	S/D	S/D	6,20*
Bacterias aerobias mesófilas totales (UFC/mL)	S/D	S/D	1,00E+05
Bacterias coliformes totales (UFC/mL)	S/D	S/D	4,50E+03

Enzima Maxilact L2000 (E2)			
Parámetros	Tiempo de incubación		
	1h	3 h	24 h
pH	5,96	5,90	5,86
Glucosa (g/100 mL)	3,98	4,32	6,60*
Lactosa (g/100 mL)	S/D	S/D	1,20*
GOS (g/100 mL)	S/D	S/D	0,95*
Galactosa (g/100 mL)	S/D	S/D	6,20*
Bacterias aerobias mesófilas totales (UFC/mL)	S/D	S/D	9,50E+04
Bacterias coliformes totales (UFC/mL)	S/D	S/D	5,00E+03

*Determinada por HPLC – IR en el INLAIN.
S/D: sin datos.

• Ensayo 3. Resultados

La composición del suero de partida empleado en este ensayo se presenta en la **Tabla 15**. El suero se termostató a $38 \pm 2^\circ\text{C}$, se adicionó la enzima E3 en la dosis de trabajo y se incubó por 3 horas. Al final de la incubación se midió glucosa con equipo *Prestige IQ* y galactosa con el kit lactosa/D-galactosa. En este método, en una primera reacción, la lactosa es hidrolizada en glucosa y galactosa con la enzima β -galactosidasa provista por el kit; en la segunda reacción, la galactosa (formada en la primera reacción y la presente originalmente en la muestra o también denominada galactosa “libre”) es oxidada por NAD^+ en presencia de la enzima β -galactosa deshidrogenasa (Gal-DH) y a pH 6,8 formándose ácido galactónico y NADH. Finalmente, se mide la absorbancia de NADH a 340 nm; la cantidad de NADH formado es estequiométrica a la cantidad de lactosa y galactosa, respectivamente. Los resultados se expresaron de la siguiente manera:

$$\% \text{ Galactosa total (g/100 mL)} = \frac{A_1 \times \text{PM}_{\text{Gal}} \times V \times 100}{K \times v \times d}$$

$$\% \text{ Galactosa “libre” (g/100 mL)} = \frac{A_2 \times \text{PM}_{\text{Gal}} \times V \times 100}{K \times v \times d}$$

$$\% \text{ Lactosa (g/100 mL)} = [\% \text{ Galactosa total} - \% \text{ Galactosa libre}] \times \text{PM}_{\text{Lac}}/\text{PM}_{\text{Gal}}$$

Donde: A_1 , absorbancia de la muestra tratada con β -galactosidasa (Galactosa total: proveniente de la hidrólisis de lactosa + galactosa “libre”); A_2 , absorbancia de la muestra sin tratar con β -galactosidasa (galactosa “libre”); PM_{Gal} , peso molecular galactosa (180,06 g/mol); K , coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm ($6,3 \times 10^6$ cm²/mmol); d , trayectoria del haz de luz (espesor de la cubeta, 1 cm); v , volumen de muestra (mL); V , factor de dilución; PM_{Lac} , peso molecular lactosa anhidra (342,30 g/mol).

Además, se midió el pH y los recuentos microbianos. Previo a la realización de los análisis, la muestra se calentó a 60 °C para inactivar la enzima. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 16**.

Tabla 15. Composición físicoquímica y microbiológica del suero preconcentrado

Parámetros	Resultados
Grados Brix (°Bx)	22
pH	6,10
Acidez titulable (°D)	31,1
Sólidos totales (g/100 mL)	20,71
Lactosa (g/100 mL)*	17,58
Glucosa (g/100 mL)	<0,025
Proteínas (g/100 mL)	2,00
Cenizas (g/100 mL)	0,98
Grasa (g/100 mL)	0,15
Bacterias aerobias mesófilas totales (UFC/mL)	160
Bacterias coliformes totales (UFC/mL)	< 10

*Se calculó por diferencia:

$$\text{Lactosa \%} = \text{Sólidos totales \%} - (\text{Proteínas \%} + \text{Cenizas \%} + \text{Grasa \%})$$

$$\text{Lactosa \%} = 20,71 - (2,00 + 0,98 + 0,15) = 17,58\%$$

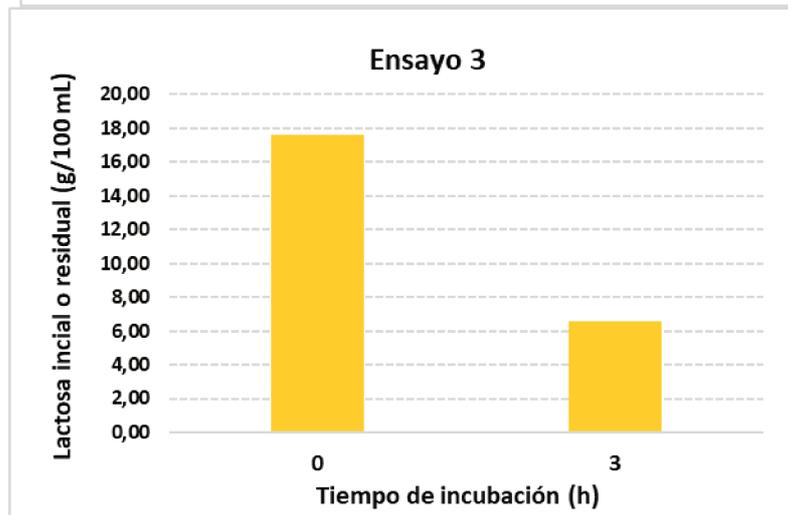
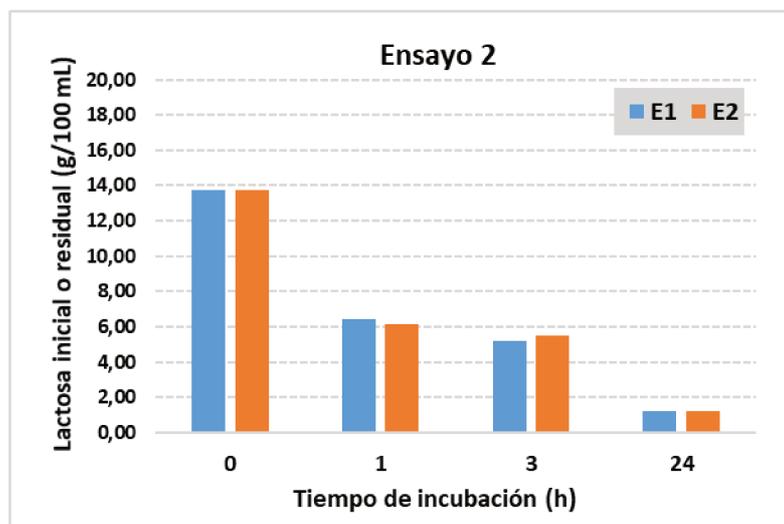
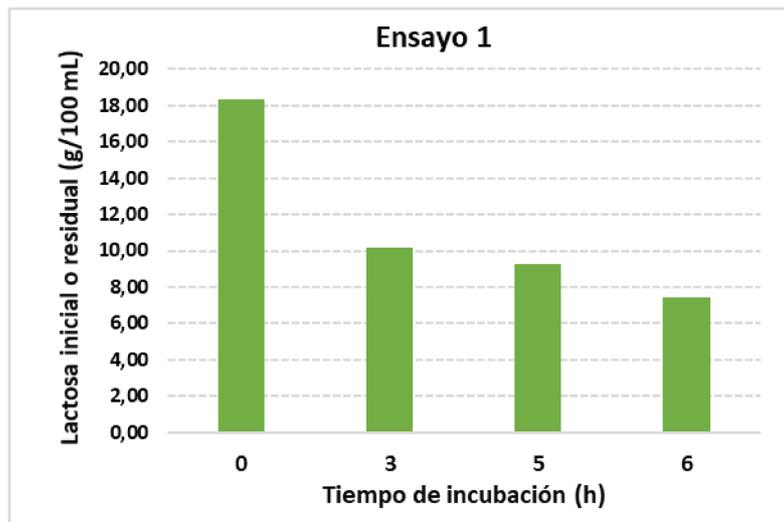
Tabla 16. Resultados obtenidos luego de la incubación del suero con la enzima Maxilact LX5000 (E3) a $38 \pm 2^\circ\text{C}$, dosis de trabajo: 1,5 mL/L suero

Parámetro	Resultados (3 h)
pH	6,00
Lactosa (g/100 mL)	6,58
Galactosa (g/100 mL)	5,60
Glucosa (g/100 mL)	6,20
Bacterias aerobias mesofilas totales (UFC/mL)	1,90E+03
Bacterias coliformes totales (UFC/mL)	1,00E+01

A modo de resumen, en la **Figura 14** se presenta la evolución del contenido de lactosa para cada ensayo. Los valores iniciales son los obtenidos por la diferencia entre los contenidos de sólidos totales y los de proteínas y grasa. El contenido de lactosa residual durante la incubación, es decir la lactosa presente en la solución que no ha sufrido hidrólisis, para los tres puntos de muestreo del Ensayo 1 y para dos puntos de muestreo (1 y 3 h) del Ensayo 2, se calculó a partir del contenido de glucosa determinado con equipo Prestige, según la siguiente expresión:

$\% \text{ Lactosa residual (g/100 mL)} = \% \text{ Lactosa inicial} - \% \text{ Glucosa "libre"}$ (que se forma por la hidrólisis), expresado como lactosa ($\% \text{ Glucosa} \times \text{PM}_{\text{Lac}}/\text{PM}_{\text{Glu}}$).

Los valores de lactosa residual al final de la incubación en el Ensayo 2, son los obtenidos por HPLC. En el caso del Ensayo 3, los valores de lactosa al final de la incubación se calcularon por el método enzimático a partir del contenido de galactosa, como se explicó anteriormente.



Ensayo 1: Decazyme YNL (E1), 1 mL/L, 42 ± 2 °C.

Ensayo 2: Decazyme YNL (E1), 2 mL/L, 42 ± 2 °C; Maxilact L2000 (E2), 2 mL/L, 36 ± 2 °C.

Ensayo 3: Maxilact LX5000 (E3), 1,5 mL/L, 38 ± 2 °C.

Figura 14. Evolución de la concentración de lactosa en las experiencias de incubación del suero con enzimas β -galactosidasas, llevadas a cabo a escala laboratorio

Por otro lado, se calculó el porcentaje de hidrólisis de lactosa en dos tiempos de muestreo (3h) y final de incubación, para los diferentes ensayos (**Tabla 17**), según la siguiente expresión:

$$\text{Porcentaje de hidrólisis } \% = \% \text{ Lactosa hidrolizada} \times 100 / \% \text{ Lactosa inicial}$$

Tabla 17. Porcentajes de hidrólisis de lactosa para los distintos ensayos

Ensayo/Enzima (dosis)		Tiempo de incubación	
		3 h	Final*
Ensayo 1	E1 (D1)	44,6%	59,4%
Ensayo 2	E1 (D2)	62,1%	91,5%
	E2 (D2)	60,0%	91,5%
Ensayo 3	E3 (D3)	62,6%	

* Ensayo 1, 6h; ensayo 2, 24 h; ensayo 3, 3 h.

Enzimas: Decazyme YNL (E1), Maxilact L2000 (E2), y Maxilact LX5000 (E3).

Dosis de enzima: D1, 1 mL/L, D2, 2mL/L y D3, 1,5 mL/L.

Como era de esperar, los contenidos de glucosa y galactosa aumentaron a medida que se prolongó el tiempo de incubación con las enzimas, como consecuencia de la acción de hidrólisis de lactosa (ver Tablas 12, 14 y 16 y Fig. 14); esto se manifestó en la disminución progresiva en los contenidos de lactosa a medida que se prolongaba la incubación (Figura 14) y consecuentemente en los incrementos en los porcentajes de hidrólisis, por ejemplo desde 45 a 60%, y de 60-62 a 92% en los ensayos 1 y 2, respectivamente. Para la enzima Decazyme YNL (E1), los porcentajes obtenidos a las 3 h de incubación se incrementaron de 45% a 62% al duplicarse la dosis de enzima en el ensayo 2 con respecto al ensayo 1. Con la dosis 1, el 60% de hidrólisis se consiguió a las 6 h de incubación, y aprox. 92% de hidrólisis se logró al duplicarse la dosis de enzima y prolongarse la incubación por 24 h. Los niveles de hidrólisis fueron similares para las enzimas 1 y 2, Decazyme YNL y Maxilact L2000, trabajando con la dosis 2.

Con respecto a la producción de GOS, ambas enzimas sintetizaron niveles similares de aproximadamente 1 g/100 mL a las 24 h de incubación. Es decir, las capacidades de hidrólisis y transgalactosilación de ambas enzimas fueron muy similares. En el ensayo 3, se tuvo un porcentaje de hidrólisis de lactosa después de 3 horas de tratamiento de 63%, similar a los obtenidos para el mismo tiempo de incubación en el ensayo 2,

aunque en este caso se empleó una dosis de enzima inferior (1,5 mL/L versus 2 mL/L), lo que pone de manifiesto la mayor actividad hidrolítica que posee la enzima Maxilact LX5000, y que se correlaciona con lo establecido por el fabricante.

Por otro lado, se observó un deterioro de la calidad microbiológica del producto final ya que la carga microbiana se incrementó significativamente durante la incubación, alcanzándose mayores valores en el ensayo 2 probablemente debido a la mayor extensión del período de incubación. Esto implica tener que aplicar un tratamiento térmico posterior para garantizar la inocuidad del producto, lo que impactaría finalmente en el costo de producción por gastos de energía, mano de obra y también disponibilidad de equipos.

5. Conclusiones

El presente trabajo permitió analizar información relevante sobre las características, propiedades tecno-funcionales y biológicas de los galactooligosacáridos (GOS), su ocurrencia natural y los procesos de obtención para su empleo como ingrediente funcional, abordando también los aspectos teóricos de la reacción enzimática involucrada (sustrato, enzima, condiciones de reacción). También se profundizó en los efectos beneficiosos de las fórmulas infantiles adicionadas de GOS, dado que es uno de los usos más difundidos de estos ingredientes funcionales. Finalmente, se incorporaron los resultados experimentales obtenidos a escala laboratorio en las instalaciones de una industria alimentaria de la provincia de Santa Fe. Los mismos estuvieron dirigidos a evaluar una opción adicional a la empleada en esta industria para el aprovechamiento del suero de quesería (residuo de la industria láctea altamente contaminante), para la obtención de un producto de valor agregado: suero hidrolizado en lactosa y con GOS. Los resultados obtenidos fueron alentadores y estuvieron en concordancia con lo reportado en la bibliografía: el proceso de hidrólisis de lactosa se favorece al prolongarse el tiempo de incubación y al incrementarse la dosis de enzima, con el concomitante incremento en los niveles de glucosa y galactosa. Además, se comprobó que dos de las enzimas empleadas tuvieron la capacidad para sintetizar GOS a través de la reacción de transgalactosilación, reacción secundaria que poseen algunas β -galactosidasas. En este importante hallazgo es de recalcar la participación de la Facultad de Ingeniería Química (UNL) que, a través de sus instalaciones e infraestructura y expertise que posee el INLAIN en esta temática, posibilitaron la ejecución de las determinaciones analíticas para cuantificar el contenido de GOS. Sin embargo, no se pudo evaluar el efecto sobre la producción de GOS de las variables: tiempo de incubación y dosis de enzima, ya que encarecía el costo de la experiencia. Este estudio resultaría de vital importancia a la hora de encontrar las condiciones óptimas que permitan maximizar los rendimientos de GOS en el producto, lo que redundaría en un incremento de las propiedades funcionales y el valor agregado del mismo.

La información y resultados presentados en este trabajo podrían ser de interés para industrias locales que procesan suero, ya que actualmente hay un notorio interés en la búsqueda de alternativas para su aprovechamiento y su conversión a productos o ingredientes valiosos desde el punto de vista nutricional y funcional. Este hecho está sustentado en las tendencias crecientes relacionadas al consumo de alimentos

saludables, mejorados en su perfil nutricional y con propiedades biológicas adicionales, impulsado por consumidores cada vez más informados y exigentes.

6. Referencias bibliográficas

- Alais C. (1985) Ciencia de la leche. Editorial Reverté S.A., Barcelona, España.
- Arslanoglu S., Moro G., Schmitt J., Tandoi L., Rizzardi S., Boehm G. (2008) Early dietary intervention with a mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of allergic manifestations and infections during the first two years of life. *The Journal of Nutrition* 138, 1091-1095.
- Barile D., Rastall R. (2013) Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Current Opinion in Biotechnology* 24 (2), 214-219.
- Barreteau H., Delattre C., Michaud P. (2006) Production of Oligosaccharides as Promising New Food Additive Generation. *Food Technology and Biotechnology* 44, 323-333.
- Ben X., Zhou X., Zhao W., Yu W., Pan W., Zhang W., Wu S., van Beusekom C., Schaafsma A. (2004) Supplementation of milk formula with galactooligosaccharides improves intestinal microflora and fermentation in term infants. *Chinese Medical Journal* 117 (6), 927-931.
- Blanco A. (2006) Química Biológica. 8va edición. Editorial El Ateneo, Argentina.
- Castells M. L. (2019) Suero de quesería: ¿desperdicio o valor agregado? <https://edairynews.com/es/suero-de-queseria-desperdicio-o-valor-agregado-120149/>.
- Castillo Rosales E., Rodríguez Alegría M. E. (2014) Enzimas aplicadas en procesos industriales. *Revista Digital Universitaria* 15 (12), 1-11.
- 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*. *Biotechnology Letters* 28, 793-797.
- Cilla A., Lacomba R., García-Llatas G., Alegría A. (2012) Prebiotics and nucleotides in infant nutrition; review of the evidence. *Nutrición Hospitalaria* 27 (4), 1037-1048.
- Corzo N., Alonso J. L., Azpiroz F., Calvo M. A., Cirici M., Leis R., Lombó F., Mateos-Aparicio I., Plou F. J., Ruas-Madiedo P., Rúperez P., Redondo-Cuenca A., Sanz M. L., Clemente A. (2015) Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria* 31 (Supl. 1), 99-118.
- Cristiani-Urbina E., Netzahuatl-Muñoz A., Manriquez-Rojas F., Juárez-Ramírez C., Ruiz-Ordaz N. Galíndez-Mayer J. (2000) Batch and fed-batch cultures for the treatment of whey with mixed yeast cultures. *Process Biochemistry* 35 (7), 649-657.

Dahl W., Stewart M. (2015) Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Health Implications of Dietary Fiber. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 115 (11), 1861-1870.

De la Plaza M., Llanos P., Pelayo M. S., Zugasti B., Zuleta A. (2013) Revisión actualizada de los Hidratos de Carbono. Su implicancia en el tratamiento nutricional de la Diabetes. *Actualización en Nutrición* 14 (2), 88-107.

Donovan S. M., Comstock S. S. (2016) Human milk oligosaccharides influence neonatal mucosal and systemic immunity. *Annals of Nutrition & Metabolism* 69 (S2), 42-51.

Erich S., Kuschel B., Schwarz T., Ewert J., Böhmer N., Niehaus F., Eck J., Lutz-Wahl S., Stressler T., Fischer L. (2015) Novel high-performance metagenome β -galactosidases for lactose hydrolysis in the dairy industry. *Journal of Biotechnology* 210, 27-37.

Fanaro S., Marten B., Bagna R., Vigi V., Fabris C., Peña-Quintana L., Argüelles F., Scholz-Ahrens K., Sawatzki G., Zelenka R., Schrezenmeir J., de Vrese M., Bertino E. (2009) Galacto-oligosaccharides are bifidogenic and safe at weaning: a double-blind randomized multicenter study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 48 (1), 82-88.

Fennema O. (2008) Fennema's Food Chemistry. Fourth edition. Damodaran S., Parkin K., Fennema O. (Eds.), CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Estados Unidos.

Fernandez P. (2010) Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalyst. *Enzyme Research* 10, 1-19.

Gänzle M., Follador R. (2012) Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. *Frontiers in Microbiology* 340 (3). 1-15.

Gänzle M., Haase G., Jelen P. (2008) Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal* 18 (7), 685-694.

Gibson G., Probert H. M., Van Loo J., Rastall R. A., Roberfroid M. B. (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics, *Nutrition Research Review* 17, 259-275.

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.

Grosová Z., Rosenberg M., Rebros M. (2008) Perspectives and applications of immobilized β -galactosidase in food industry - a Review. *Czech Journal of Food Sciences* 26 (1), 1-14.

Guerrero M., Moreno-Espinosa S., Tuz-Dzib F., Solís-Albino J., Ortega-Gallegos H., Ruiz-Palacios G. (2004) Breastfeeding and natural colonization with *Lactobacillus* spp. as protection against Rotavirus-associated diarrhea. En *Protecting Infants through Human Milk*, Vol. 554, pp. 451-455.

Harju M., Kallioinen H., Tossavainen O. (2012) Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal* 22 (2), 104-109.

Huerta L., Vera 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.

Illanes A. (2011) Whey upgrading by enzyme biocatalysis. *Electronic Journal of Biotechnology* 14, 1-28.

Illanes A., Vera C., Wilson L. (2016) Enzymatic Production of Galacto-Oligosaccharides. En *Lactose-Derived Prebiotics. A Progress Perspective*. Illanes A., Guerrero C., Vera C., Wilson L., Conejeros R., Scott F. (Eds.). Academic Press, Elsevier, pp. 111-189.

Izydorczyk M. (2005) Chapter 1. Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates. En *Food Carbohydrates. Chemistry, Physical Properties, and Applications*. Cui S. (Ed.). CRC Press, Taylor & Francis Group.

Kunz C., Kuntz S., Rudloff S. (2014) Bioactivity of human milk oligosaccharides. En: *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*. F. J. Moreno y Sanz M. L. (Eds.). John Wiley & Sons, Ltd.

Kunz C., Rudloff S., Baier W., Klein N., Strobel S. (2000) Oligosaccharides in human milk: Structural, functional, and metabolic aspects. *Annual Review of Nutrition* 20, 699-722.

Kunz C., Rudloff S. (2006) Health promoting aspects of milk oligosaccharides. *International Dairy Journal* 16, 1341-1346.

Ladero M., Santos A., García J., Carrascosa A., Pessela B., García-Ochoa F. (2002) Studies on the activity and the stability of β -galactosidases from *Thermus* sp strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology* 30 (3), 392-405.

Lamsal P. (2012) Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 2020-2028.

Lewis Z., Totten S., Smilowitz J., Popovic M., Parker E., Lemay D., Van Tassell M., Miller M., Jin Y.-S., German J., Lebrilla C., Mills D. (2015) Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome* 3 (13), 1-21.

Li M., Wang M., Donovan S. (2014) Early development of the gut microbiome and immune-mediated childhood disorders. *Seminars in Reproductive Medicine* 32 (1), 74-86.

Macfarlane G., Steed H., Macfarlane S. (2008) Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology* 104 (2), 305-344.

Mammarella E. J. (2001) Estudio del sistema de inmovilización de enzimas para la hidrólisis de lactosa. Tesis doctoral. Facultad de Ingeniería Química, UNL.

Martínez-Villaluenga C., Cardelle-Cobas A., Corzo N., Olano A., Villamiel M. (2008) Optimization of conditions for galactooligosaccharides synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Food Chemistry* 107, 258-264.

Moreno-Villares J. (2011) Actualización en fórmulas infantiles. Unidad de Nutrición Clínica. *Anales de Pediatría Continuada* 9 (1), 31-40.

Moro G., Minoli I., Mosca M., Fanaro S., Jelinek J., Stahl B., Boehm G. (2002) Dosage related bifidogenic effects of galacto- and fructo-oligosaccharides in formula-fed term infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 34 (3), 291-295.

Muset G., Castells M. L (2017) Valorización del lactosuero. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Gerencia de Cooperación Económica e Internacional INTI-Lácteos.

Niñonuevo M., Bode L. (2008) Infant formula oligosaccharides opening the gates (for speculation). *Pediatric Research* 64 (1), 8-10.

Niñonuevo M., Perkins P., Francis J., Lamotte L., LoCascio R., Freeman S., Mills D., German J., Grimm R., Lebrilla C. (2015) Daily variations in oligosaccharides of human milk determined by microfluidic chips and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2), 618-626.

Oliveira D., Wilbey A., Grandison A., Roseiro L. (2015) Milk oligosaccharides: a review. *International Journal of Dairy Technology* 68 (3), 305-321.

Olveira G., González-Molero I. (2007) Probiotics and prebiotics in clinical practice. *Nutrición Hospitalaria* Suppl. 2, 26-34.

Panesar P., Panesar R., Singh R., Kennedy J., Kumar H. (2006) Microbial production, immobilization and applications of β -galactosidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81 (4), 530-543.

Parra Huertas R. (2009) Lactosuero: importancia en la industria alimentaria. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 62 (1), 4967-4978.

Perotti M. C., Vénica C. I., Blazic M. From an ecological problem to a source of bioactive compounds: Whey from dairy industry. 7th International Professional and Scientific Conference. Occupational Safety and Health. Zadar (Croacia), 12-15 septiembre, 2018.

Rastall, R. (2010) Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annual Review of Food Science and Technology* 1, 305-339.

Roberfroid M., Gibson G., Hoyles L., McCartney A., Rastall R., Rowland I., Wolvers D., Watzl B., Szajewska H., Stahl B., Guarner F., Respondek F., Whelan K., Coxam V., Davicco M., Léotoing L., Wittrant Y., Delzenne N., Cani P., Neyrinck A., Meheust A. (2010) Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition* 104 (S2), S1-S63.

Robinson R., Colet E., Tian T., Poulsen N., Barile D. (2018) An improved method for the purification of milk oligosaccharides by graphitized carbon-solid phase extraction. *International Dairy Journal* 80, 62-68.

Rodríguez Olivenza D. (2015) Estudio de la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*. Tesis de Máster en Biotecnología Avanzada, Universidade da Coruña, España.

Rodríguez-Colinas B., Poveda A., Jiménez-Barbero J., Ballesteros A., Plou F. (2012) Galacto-oligosaccharide synthesis from lactose solution or skim milk using the β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (25), 6391-6398.

Sako T., Matsumoto K., Tanaka R. (1999) Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal* 9, 69-80.

Salvini F., Riva E., Salvatici E., Günther B., Jürgen J., Banderali G., Giovannini M. (2011) A specific prebiotic mixture added to starting infant formula has long-lasting bifidogenic effects. *Journal of Nutrition* 141 (7), 1335-1339.

Sangwan V., Tomar S., Singh R., Ali B. (2011) Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. *Journal of Food Science* 76 (4), R103-R111.

Sears P., Wong C.-H. (2001) Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins. *Science* 291, 2344-2350.

Smilowitz J., Lebrilla C., Mills D., German J., Freeman S. (2014) Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. *Annual Review of Nutrition* 34, 143-169.

Splechtna B., Nguyen T. H., Steinböck M., Kulbe K. D., Lorenz W., Haltrich D. (2006) Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using beta-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (14), 4999-5006.

Torres D., Goncalves M., 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.

Tudehope D. (2013) Human milk and the nutritional needs of preterm infants. *The Journal of Pediatrics* 162 (3), S1, S17-S25.

Underwood M., German J., Lebrilla C., Mills D. (2015) *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*: champion colonizer of the infant gut. *Pediatric Research* 77, 229-235.

Van Loo J., Cummings J., Delzenne N., Englyst H., Franck A., Hopkins M., Kok N., Macfarlane G., Newton D., Quigley M., Roberfroid M., van Vliet T., van den Heuvel E. (1999) Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *British Journal of Nutrition* 81, 121-132.

Vandenplas Y. (2002) Oligosaccharides in infant formula. *British Journal of Nutrition* 87 (2), S293-S296.

Vera C., Córdova A., Aburto C., Guerrero C., Suárez S., Illanes A. (2016) Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 (197), 9-20.

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 (3), 188-194.

Vera C., Illanes A. (2016) Lactose-Derived Nondigestible Oligosaccharides and Other High Added-Value Products. En: Lactose-Derived Prebiotics. A Progress Perspective. Illanes A., Guerrero C., Vera C., Wilson L., Conejeros R., Scott F. (Eds.). Academic Press, Elsevier, pp. 87-110.

Vilcanqui-Pérez F., Vílchez-Perales C. (2017) Fibra dietaria. Nuevas definiciones, propiedades funcionales y beneficios para la salud. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 67 (2), 146-156.

Voet D., Voet J., Pratt C. (2008) Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular, 2da Ed. Editorial Panamericana.

Voragen A. (1998) Technological aspects of functional food related carbohydrates. *Trends in Food Science and Technology* 9, 328-335.

Zheng P., Yu H., Sun Z., Ni Y., Zhang W., Fan Y., Xu Y. (2006) Production of galactooligosaccharides by immobilized recombinant β -galactosidase from *Aspergillus candidus*. *Biotechnology Journal* 1 (12), 1464-1470.

Zhou Q., Chen X. (2001) Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical and Engineering Journal* 9, 33-40.

Zivcovik A., German J., Lebrilla C., Mills D. (2011) Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (1), 4653-4658.