

## PURIFICACIÓN DE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS (GOS) CON FERMENTOS DE LEVADURAS COMERCIALES

Furrer, Ailén

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

Directora: Vénica, Claudia Inés

Área temática: Ciencias Biológicas

Palabras clave: Galactooligosacáridos, *Saccharomyces*, fermentación.

### INTRODUCCION

Los galactooligosacáridos (GOS) son carbohidratos prebióticos muy usados como ingredientes funcionales. Se obtienen a nivel industrial por acción de la  $\beta$ -galactosidasa sobre la lactosa, en una reacción de transgalactosilación que ocurre simultáneamente con la reacción de hidrólisis. La mezcla obtenida de esta reacción está compuesta por lactosa (residual), monosacáridos (glucosa y galactosa) y GOS con diferente grado de polimerización (Ackerman *et al.*, 2017). Para obtener altos rendimientos en GOS se parte de soluciones con elevado contenido de lactosa, siendo el suero de quesería la principal materia prima; su aprovechamiento resulta muy beneficioso para la industria láctea y contribuye al cuidado del medio ambiente (Gómez Soto y Sánchez Toro, 2019). La presencia de mono y disacáridos en la mezcla se considera indeseable desde el punto de vista del efecto prebiótico del producto (Torres *et al.*, 2010). Se han reportado varias estrategias de purificación tales como la cromatografía de exclusión molecular, tecnología de membranas, tratamiento con carbón activado y fermentación microbiana (Torres *et al.*, 2010; Vera *et al.*, 2016). Particularmente, la fermentación microbiana es una alternativa biotecnológica plausible para el propósito buscado que se fundamenta en la eliminación selectiva de los azúcares presentes (glucosa, galactosa y lactosa residual), que son metabolizados por diferentes microorganismos (levaduras y bacterias lácticas), lográndose incrementar la concentración de GOS (Goulas *et al.*, 2007; Sangwan *et al.*, 2014).

### OBJETIVOS

Evaluar la performance de tres fermentos comerciales de levaduras *Saccharomyces* (L1 y L2, liofilizadas y L3 deshidratada) para purificar los GOS presentes en una mezcla obtenida vía enzimática con una  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*, a partir de permeado de suero concentrado en lactosa.

Título del proyecto: Obtención de un ingrediente alimentario funcional compuesto por galacto-oligosacáridos a partir del suero de quesería. Aplicación de tecnologías de membranas, procesos enzimáticos y fermentativos.

Instrumento: PICT N° 2615

Año convocatoria: 2018

Organismo financiador: FONCyT

Director/a: Vénica, Claudia Inés

## METODOLOGÍA

La mezcla de GOS se obtuvo incubando un permeado de suero concentrado en lactosa (14,2 g/100 g, 4L) (Milkaut S.A., Argentina) con la enzima  $\beta$ -galactosidasa (GODO YNL-2, Japón) (1 g/L) a 42 °C por 60 min. La mezcla se trató a 80 °C/5 min para inactivar la enzima, se fraccionó en 8 alícuotas y a 4 de ellas se les adicionó extracto de levadura (0,5% p/v) y se esterilizaron en autoclave. Las levaduras se inocularon individualmente (100 mL) en una dosis adecuada para tener una concentración inicial de 6 órdenes log UFC/mL en todos los tratamientos (L1, L2 y L3, sin extracto y L1E, L2E y L3E con extracto) y se incubaron (30 °C/48 h). Previamente, las levaduras se hidrataron en agua (3 h/5 °C) y luego se activaron en la mezcla de GOS (50 mL) por 16 h/30 °C. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (0, 8, 24, 32 y 48 h) para determinar el pH, el crecimiento microbiano mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 600 nm, se analizó el perfil de carbohidratos (GOS, lactosa, glucosa y galactosa) para cuantificar el rendimiento de GOS en la mezcla de partida (porcentaje en peso de GOS con respecto al contenido de lactosa inicial) y el factor de purificación (FP) (pureza final ( $P_f$ ) sobre pureza inicial ( $P_i$ ), siendo que la pureza representa el porcentaje en masa de GOS ( $M_{GOS}$ ) con respecto a los carbohidratos totales ( $M_{CT}$ ), al inicio ( $P_i$ ) y al final ( $P_f$ ) del proceso, respectivamente; calculándose de la siguiente manera:  $P_{i,f} = M_{GOS}/M_{CT} \times 100$ ) de GOS luego de la fermentación, y se cuantificó la producción de etanol por HPLC-IR. Los ensayos se realizaron por duplicado. Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para detectar diferencias entre los dos factores estudiados (levaduras y composición del medio) y ANOVA de una vía para analizar el efecto del tiempo de fermentación para cada tratamiento.

## RESULTADOS

### Tratamiento del suero con $\beta$ -galactosidasa

La concentración total de GOS en la mezcla fue de 2,20 g/100 g (13,8%, respecto al total de carbohidratos), lo que representa un rendimiento de 15,5%. Asimismo, la composición de lactosa (residual), glucosa y galactosa fue de 4,70, 5,20 y 3,90 g/100 g, lo que representa un 29,4, 32,5 y 24,4 % del total de carbohidratos, respectivamente. Similares rendimientos fueron obtenidos por Vénica *et al.* (2017) utilizando la misma enzima y partiendo de una mezcla de leche y suero en polvo.

### Fermentación selectiva

En presencia de algunos azúcares (como glucosa y galactosa) y junto con otros nutrientes esenciales como aminoácidos, minerales y vitaminas, *S. cerevisiae* conducirá el metabolismo fermentativo generando metabolitos de fermentación primarios (etanol y dióxido de carbono), entre otros compuestos secundarios (otros alcoholes, ésteres, carbonilos y compuestos de azufre) (Walker y Stewart, 2016).

En general, los dos factores (3 levaduras y el medio: con y sin extracto) y el tiempo de fermentación influyeron ( $p < 0,05$ ) en las variables estudiadas, a excepción de lo observado para GOS y lactosa. Se produjo desarrollo microbiano en todos los tratamientos, el pH disminuyó desde 5,5 hasta aprox. 4,7. La DO aumentó desde 0 hasta 1,9, hasta las 24 h, dependiendo de la levadura, y luego se mantuvo hasta las 48 h. Para ambos medios (con y sin extracto) se tuvieron menores valores de pH para L3 y mayores valores de DO para L2, en la mayoría de los tiempos analizados. La incorporación del extracto incrementó los valores tanto de pH como de DO. Los niveles de etanol se incrementaron durante la fermentación

(desde valores menores de 0,1 g/100g hasta 2,1-3,7 g/100g a las 48 h), de acuerdo a la levadura y medio utilizado; las menores concentraciones fueron para la L1 en ambos medios y las mayores para L2 y L3 en el medio con extracto.

Los tratamientos aplicados no afectaron las concentraciones de GOS y lactosa (2,2 y 4,7 g/100g, respectivamente). Se observó una brusca disminución de glucosa (desde aprox. 5,2 g/100g hasta 0,2 g/100g a las 48 h) en todos los casos, mientras que la evolución de galactosa (concentración inicial 3,9 g/100g) dependió del tratamiento aplicado: para L3 disminuyó en los dos medios (2,2 y 0,2 g/100g a las 48 h, sin y con extracto, respectivamente), para L2 disminuyó solo en el medio suplementado (0,9 g/100g), y para L1 no se observaron cambios (Figura 1). Los niveles inalterados de lactosa y GOS observados en este trabajo y la disminución prácticamente total de glucosa fueron similares a aquellos reportados por Goulas *et al.* (2007) y Sangwan *et al.* (2014). Sin embargo, en estos trabajos no lograron reducir significativamente el contenido de galactosa empleando levaduras (*S. cerevisiae*). Por el contrario, Yoon *et al.* (2003) lograron la eliminación completa de la galactosa cuando incubaron la galactosa con la misma levadura por 24 h a 37 °C. Sangwan *et al.* (2014) sugirieron que es necesario que la levadura se desarrolle en presencia de galactosa como única fuente de carbohidratos, para que se active el mecanismo para su utilización. De hecho, en el presente trabajo la galactosa comenzó a disminuir cuando se agotó la glucosa del medio.

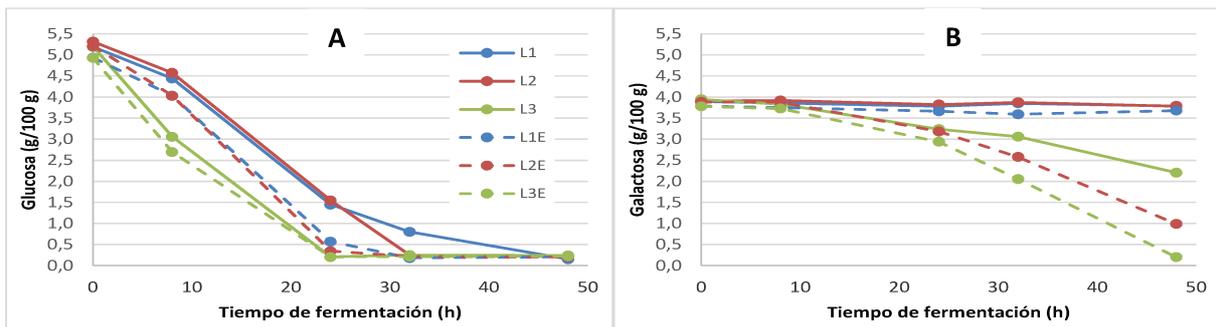


Figura 1. Concentración de glucosa (A) y de galactosa (B) durante las fermentaciones con las levaduras en los medios sin (L1, L2 y L3) y con (L1E, L2E y L3E) extracto de levadura.

Las tres levaduras fueron capaces de purificar los GOS en diferente grado: L3 arrojó los mejores resultados con un FP de 1,72 en el medio sin extracto, y se incrementó por la presencia del mismo (FP 2,18), L2 presentó una performance intermedia (FP 1,48 y 2,01, sin y con extracto, respectivamente) y L1 fue la menos eficiente (FP 1,48), para ambos medios.

## CONCLUSION

La presencia de mono y disacáridos en ingredientes de GOS es altamente indeseable, ya que disminuye el efecto prebiótico entre otros aspectos. Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto que el uso de levaduras para la purificación es un método eficaz para mejorar la calidad del producto, ya que se logró purificar parcialmente la mezcla de GOS. Los mejores resultados se obtuvieron para las levaduras L3 y L2 y con la suplementación de extracto de levadura. Futuros estudios serán llevados a cabo para conseguir mayores niveles de purificación, a través del empleo de otros cultivos microbianos que metabolizan la lactosa.

## BIBLIOGRAFÍA

**Ackerman, D.L.; Craft, K.M.; Townsend, S.D. (2017).** Infant Food Applications of Complex Carbohydrates: Structure, Synthesis, and Function, *Carbohydrate Research*, 437, 16-27.

**Gómez Soto, J.A.; Sánchez Toro, Ó.J. (2019).** Producción de Galactooligosacáridos: Alternativa Para el Aprovechamiento del Lactosuero. Una Revisión, *Ingeniería y Desarrollo. Universidad del Norte* 37(1), 129-158.

**Goulas, A.; Tzortzis, G.; Gibson, G. (2007).** Development of a Process for the Production and Purification of a- and b-Galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, *International Dairy Journal* 17, 648-656.

**Sangwan, V.; Tomar, S.K.; Ali, B.; Singh, R.R.B.; Singh, A.K.; Mandal, S. (2014).** Galactooligosaccharides Purification Using Microbial Fermentation and Assessment of its Prebiotic Potential by In Vitro Method, *International Journal of Current Microbiology Applied Science* 3(4), 573-585.

**Torres, D.P.M.; Gonçalves, M.d.P.F.; Teixeira, J.A.; Rodrigues, L.R. (2010).** Galactooligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9(5), 438-454.

**Vénica, C.; Bergamini, C.; Perotti, M. (2017).** Response Surface Methodology as a Tool for Modeling the Galactooligosaccharides Production, *Journal of Dairy Research* 84(4), 464-470.

**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.

**Walker, G.M.; Stewart, G.G. (2016).** *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages, *Beverages* 2 (4), 30.

**Yoon, S.H.; Mukerjea, R.; Robyt, J.F. (2003).** Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation, *Carbohydrate Research* 338(10), 1127-1132.