



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES**

CARRERA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

**EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN POR LOTES
PARA LA OBTENCIÓN DE GALACTO-OLIGOSACÁRIDOS
MEDIANTE BETA GALACTOSIDASA INMOVILIZADA**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AGROINDUSTRIAL**

Autora

Lucero Pozo Dania Yamilex

Director

Ing. Jimmy Cuarán, Mg.I

Ibarra – Ecuador

2022

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

ARTÍCULO CIENTÍFICO

TEMA: “EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN POR LOTES PARA LA OBTENCIÓN DE GALACTO-OLIGOSACÁRIDOS MEDIANTE BETA GALACTOSIDASA INMOVILIZADA”

AUTORA: Lucero Pozo Dania Yamilex

DIRECTOR: Ing. Jimmy Cuarán, Mg.I

COMITE LECTOR:

Ing. Jimmy Nuñez, MSc

Ing. Holger Pineda MBA.

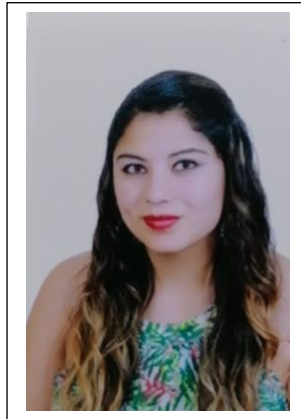
AÑO: Junio 2022

LUGAR DE INVESTIGACIÓN: La presente investigación fue realizada en un Laboratorio particular, en la ciudad de Otavalo.

Ibarra- Ecuador

2022

DATOS INFORMATIVOS



Nombres:	Dania Yamilex
Apellidos:	Lucero Pozo
Fecha de nacimiento:	3/07/1995
Cédula de ciudadanía:	040152015-0
Estado Civil:	Casada
Dirección domiciliaria:	San Pedro de Huaca
Email:	dylucerop@utn.edu.ec
Teléfono:	0985165316
Fecha:	03 de junio del 2022

REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

Guía: FICAYA-UTN

Fecha: 06 de junio del 2022

DANIA YAMILEX LUCERO POZO

“EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN POR LOTES PARA LA OBTENCIÓN DE GALACTO-OLIGOSACÁRIDOS MEDIANTE BETA GALACTOSIDASA INMOVILIZADA”

TRABAJO DE GRADO

Ingeniera Agroindustrial, Universidad Técnica del Norte, Carrera de Ingeniería Agroindustrial, Ibarra 06 de junio del 2022.

DIRECTOR: Ing. Jimmy Cuarán, Mg.I

El objetivo de esta investigación es evaluar parámetros de operación por lotes para la obtención de galacto-oligosacáridos mediante beta galactosidasa inmovilizada.

Ibarra, 03 de junio del 2022



Autora:

Dania Yamilex Lucero Pozo



Director:

Ing. Jimmy Cuarán, Mg.I

Evaluación de parámetros de operación por lotes para la obtención de galacto-oligosacáridos mediante beta galactosidasa inmovilizada

Dania Y. Lucero, Jimmy Cuáran, Mg.I

RESUMEN

En Ecuador la producción de suero de leche ha aumentado considerablemente y su escaso aprovechamiento genera impactos ambientales y económicos para las empresas productivas. En busca de nuevas alternativas que permitan reutilizar este subproducto y generar más utilidades se decidió obtener un producto de alta gama como son los galacto-oligosacáridos (GOS), que son prebióticos muy beneficiosos para la salud humana y con características positivas para mejorar la calidad de varios productos alimenticios.

Se estudió la producción de GOS utilizando como sustrato lactosa y como enzima la β -galactosidasa inmovilizada de *Kluyveromyces lactis*, la experimentación se llevó a cabo en un biorreactor por lotes durante 10 horas, transcurrido ese tiempo se le realizó a la muestra un análisis de HPLC para determinar la cantidad de GOS obtenidos.

La concentración de lactosa y la temperatura óptimas para la producción se observaron a 25% y 40 °C, respectivamente, alcanzando 42.80% de concentración de GOS.

ABSTRACT

In Ecuador, the production of whey has increased considerably and its limited use generates environmental and economic impacts for productive companies. In search of new alternatives that allow this by-product to be reused and generate more profits, it was decided to obtain a high-end product such as galacto-oligosaccharides (GOS), which are very beneficial prebiotics for human health and with positive characteristics to improve the quality of food. various food products.

The production of GOS was studied using lactose as a substrate and immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* as an enzyme. The experiment was carried out in a batch bioreactor for 10 hours, after which time an HPLC analysis was performed on the sample. to determine the amount of GOS obtained.

The optimal lactose concentration and temperature for production were observed at 25% and 40 °C, respectively, reaching 42.80% GOS concentration.

1. Introducción

Uno de los sectores más importantes dentro de la economía del Ecuador, es el sector lácteo debido a que este genera plazas de trabajo de forma directa e indirecta en toda su cadena agroalimentaria. De acuerdo con datos del Banco Central del Ecuador, la cadena productiva de la industria láctea en el país genera 1.5 millones de empleos directos e indirectos y su aporte al Producto Interno Bruto (PIB) fue del 8% en el 2015. A pesar de esto las industrias lácteas, no le han proporcionado al lactosuero un valor agregado, que les permita generar nuevos productos de alto contenido nutricional y lograr ser empresas competitivas.

Para la industria alimentaria la hidrólisis de la lactosa es un proceso biotecnológico de gran importancia, ya que posee efectos beneficios sobre en la digestión de alimentos en el ser humano, así como ventajas tecnológicas y ambientales en su aplicación industrial con la posibilidad de obtener galacto-oligosacáridos que son carbohidratos no digeribles, siendo clasificados como ingredientes prebióticos de alto valor añadido. Estudios recientes atribuyen a estos oligosacáridos una serie de potenciales beneficios para la salud y prevención de enfermedades (Cavalcante y Pastore, 2015).

2. Materiales y métodos

En la presente investigación el trabajo experimental se llevó a cabo en el cantón Otavalo de la provincia de Imbabura.

2.1. Descripción de la Metodología

2.1.1. Evaluación de parámetros para la producción de galacto-oligosacáridos con enzimas inmovilizadas

Para inmovilizar y encapsular la enzima β -galactosidasa se utilizó el método de atrapamiento, el cual consistió en la formación de perlas empleando alginato de sodio y cloruro de calcio, posteriormente las mismas fueron sometidas a constante agitación produciendo colisiones que destruían las cápsulas, por lo tanto fue necesario determinar las perlas más resistentes a la tracción mecánica y con capacidad permeable que permitan el ingreso del sustrato y salida del producto durante la reacción enzimática. Además, se utilizó la metodología de superficie de respuesta para optimizar resultados y determinar la combinación de alginato de sodio y cloruro de calcio más propicia para formar las perlas más resistentes.

2.1.2. Variables dependientes

Las variables dependientes medidas en el presente investigación fueron la dureza y permeabilidad de las perlas de alginato de sodio, para determinar las perlas más resistentes a la compresión mecánica se empleó un durómetro shore A; el cual mide la dureza de materiales blandos y semiduros presionando un cuerpo penetrador (indentor penetrante 2,5 mm) en cada perla de alginato de sodio con una fuerza determinada, de este modo se mide la deformación en el punto de presión y finalmente se obtuvo el valor de la dureza de cada perla en escala shore mediante lectura directa (Fernandez, 2021).

2.1.3. Evaluación de parámetros para la producción de galacto-oligosacáridos con enzimas inmovilizadas

Para optimizar los resultados en la producción de galacto-oligosacáridos (GOS) con la enzima B-galactosidasa Lactozym 6500 se empleó la metodología de Superficie Respuesta, con el fin de determinar cuáles son las condiciones más favorables de temperatura y concentración de lactosa. Los ensayos se desarrollaron mediante la aplicación de un Diseño Compuesto Central con dos factores de estudio (temperatura y concentración de lactosa), evaluando como variable respuesta la concentración de azúcares reductores como medida indirecta de la producción de GOS.

Para determinar la cantidad de GOS obtenidos en el experimento se realizó una prueba de HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia) al mejor tratamiento que fue establecido por el programa estadístico Design Expert.

2.2. Diseño experimental

En la presente investigación, se utilizó el método de superficies respuesta con un Diseño Centra Compuesto (DCC) para la evaluación de dos variables a tres niveles, donde el factor A corresponde a la concentración de alginato de sodio (%) y factor B la concentración de cloruro de calcio (%)), obteniendo un total de 12 tratamientos evaluados en la investigación.

3. Resultados y discusión

Tabla 1.

Resultados de dureza y permeabilidad

Tratamiento	(CA) %	(CC) %	(D) kg/mm ²	(P) mg/min
T1	2.50	1.25	6.525	0.73
T2	3.00	2.00	19.793	2.03
T3	2.00	1.00	6.525	0.50
T4	2.50	1.50	11.963	1.17
T5	2.50	1.75	13.05	0.77
T6	2.50	1.50	11.528	0.83
T7	2075	1.50	14.138	0.93
T8	2.50	1.50	11.963	1.03
T9	3.00	1.00	20.663	2.17
T10	2.50	1.50	11.963	1.03
T11	2.25	1.50	9.788	1.07
T12	2.00	2.00	7.613	1.07

Tabla 2.

Resultados de porcentaje (%) Azúcares Reductores obtenidos en función la Temperatura y Concentración de lactosa durante el proceso de conversión enzimática

Tratamiento	Factor 1	Factor 2	Respuesta
	Temperatura (°C)	Lactosa (%)	Azúcares Reductores (%)
T1	60	45	27.67
T2	50	30	43.61
T3	50	35	37.97
T4	55	35	29.23
T5	50	35	38.68
T6	50	40	39.42
T7	40	45	27.60
T8	40	25	31.95
T9	45	35	36.99
T10	50	35	39.15
T11	50	35	39.69
T12	60	25	35.31

Tabla 3.*Análisis de varianza para la variable concentración de azúcares reductores*

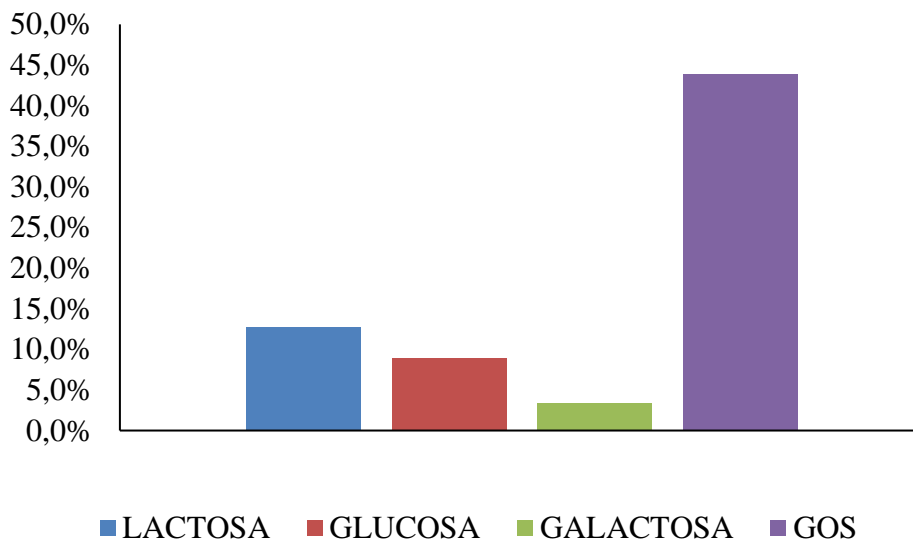
Fuente	Sum de cuadrados	df	Medios cuadrados	F-valor	p-valor	
Modelo	270.12	5	54.02	9.04	0.0092	significante
A-T	0,0450	1	0.0450	0.0075	0.9337	
B-L	44.09	1	44.09	7.38	0.0348	
AB	2.71	1	2.71	0.4527	0.5261	
A ²	105.57	1	105.57	17.66	0.0057	
B ²	39.92	1	39.92	6.68	0.0415	
Residual	35.86	6	5.98			
Lack of Fit	34.27	3	11.42	21.46	0.0157	significante
Pure Error	1.60	3	0.5323			
Cor Total	305.99	11				
R ²	0.8828					
R ² Ajustado	0.7851					
C.V %	6.87					

Tabla 4.*Punto óptimo para el experimento de concentración de azúcares reductores*

N°	Temperatura (°C)	Lactosa (%)	Azúcares Reductores (%)	Atractivo	
1	40.000	25.000	33.003	1.000	Seleccionado
2	40.247	25.000	34.038	0.994	
3	41.698	25.000	39.595	0.957	
4	41.792	25.000	39.924	0.954	

Figura 1.

Porcentajes de azúcares del hidrolizado de lactosa (Anexo 3. Análisis de HPLC)



3.4. Discusiones

El modelo estadístico utilizado exploró dentro de un rango de concentración de alginato de sodio entre 1 y 3% (m/v) y de 1 y 2% (v/v) para el factor concentración de cloruro de calcio. El tiempo de gelificación y volumen de la solución cálcica se mantuvieron constantes.

Además, el experimento exploró dentro de un rango de temperatura entre 40 y 60 °C y de 25 y 45% para el factor concentración de lactosa. El tiempo de reacción, volumen del sustrato, velocidad de agitación y unidades enzimáticas se mantuvieron constantes. Respecto a la variable temperatura, se puede mencionar que al incrementar la temperatura el porcentaje de azúcares reductores aumenta, lo que no es favorable, ya que da incidencias que no se está dando en gran cantidad la formación de GOS; pero al reducir la temperatura el contenido de azúcares reductores disminuye siendo una buena señal para la investigación, puesto que Bohórquez (2016) menciona que la disminución de éstos beneficia la formación de GOS. Así mismo sucede con el factor concentración de lactosa, ya que el experimento mostró una menor producción de azúcares reductores en concentraciones bajas de lactosa; y esto concuerda con lo citado por Rodríguez (2015) en donde indica que niveles bajos de lactosa favorecen la

formación rápida de GOS y niveles más altos de lactosa la aparición tardía de los GOS. Con el análisis de varianza ANOVA se logró determinar que el experimento realizado tiene una confiabilidad del 88.28% y el análisis de varianza del modelo, indica que el valor-p utilizado para la variable de respuesta (azúcares reductores) es significativo debido a que muestra un valor de 0.0092, el cual es menor a 0.05, por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa, la cual nos indica que la temperatura y concentración de lactosa influyen sobre la obtención de galacto-oligosacáridos mediante enzimas inmovilizadas.

El valor F del modelo de 9.04 implica que el modelo es significativo. Hay solo un 0.92% de probabilidad de que un valor F tan grande se produzca debido al ruido.

Además, en el análisis de varianza muestra que el coeficiente de determinación ajustado (R^2 aj.) es de 0.7852 indicando que el modelo utilizado para la búsqueda del punto óptimo es satisfactorio, ya que este valor es mayor a 0.700.

El mejor tratamiento corresponde a los parámetros: 40 °C de temperatura y 25% (m/v) de lactosa, estos resultados concuerdan con Martínez (2007) quien en su estudio sobre la optimización de las condiciones para la formación de GOS durante la hidrólisis de lactosa a partir de la β -galactosidasa *Kluyveromyces lactis*, obtuvo como mejores condiciones de reacción 40°C y 250 g/L.

En este trabajo investigativo la producción de glucosa y galactosa utilizando 25% de lactosa inicial, es similar a lo reportado por Vera (2012), quienes obtuvieron una producción de 8% de glucosa y 3.8 % de galactosa en la reacción de la enzima β -galactosidasa, como también con los resultados obtenidos por Albayrak y Yang (2001), quienes obtuvieron un 13% de glucosa y 3% de galactosa. Delgado (2017) señala que la relación de Glucosa/galactosa permite evaluar la hidrólisis vs transgalactosilación, por ello afirma que a medida que aumenta esta relación y es mayor a 1, la reacción de transgalactosilación se ve favorecida, puesto que la galactosa del medio se reduce para incorporarse a los GOS y la glucosa libre actúa como inhibidor no competitivo, esto concuerda con los resultados obtenidos, puesto que la relación de glucosa/ galactosa que se obtuvo es de 2.1, lo que indica que la producción de GOS no se vio afectada por el incremento de glucosa durante la reacción.

Como resultado la concentración de GOS fue de 42.80% y 49.20% de conversión de lactosa, los resultados de concentración de GOS obtenidos en la investigación son altos en comparación a otros autores, por ejemplo, Guío (2014) obtuvo 24.5% y Cortez (2021) alcanzó 12.01%. En cuanto a la conversión de la lactosa es similar a 45.7% obtenida por Cortez (2021) y baja en comparación con las de Guío (2014) que reportó 78.8% y Rico (2018) 80%, por lo que se puede decir que la conversión de lactosa fue baja, afectando a la producción GOS.

4. Conclusiones

- La combinación apropiada del material de soporte para inmovilizar la enzima β -galactosidasa fue alginato de sodio 3%(m\v) y cloruro de calcio 2%(v\v), en cuyas perlas se logró alcanzar una dureza y permeabilidad adecuada que permitió la conversión de lactosa a GOS en las condiciones requeridas por el diseño experimental.
- Con una temperatura de 40 °C y una concentración baja de lactosa del 25% se logró conseguir en menor tiempo una buena conversión de lactosa a GOS obteniendo un rendimiento total del 42,80%.
- Se acepta la hipótesis alternativa ya que se demostró que los factores temperatura y concentración de lactosa influyen en el proceso de conversión enzimática del sustrato de lactosa a galacto-oligosacáridos.

5. REFERENCIAS

- Bohórquez, D. (2016). Evaluación de la producción de galactooligosacáridos (GOS) utilizando una β -galactosidasa a partir de la lactosa del lactosuero. Tesis de grado, Universidad Sucre, Colombia.
- Cavalcante, A., y Pastore, M. (2015). Galactooligosaccharides: production, health benefits, application to foods and perspectives. *Scientia Agropecuaria*, 6(1), 69–81. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.07>
- Fernández, C. (2021). Medición de la dureza en materiales. Obtenido de Patología+Rehabilitación+Construcción, Web de información y formación para profesionales y estudiantes: <https://www.patologiasconstruccion.net/2014/10/medicion-de-la-dureza-en-materiales-4/>
- Guío, F. (2014). *Evaluación de la producción de Galactooligosacáridos a partir de materias primas lácteas con B-galactosidasa inmovilizada*. Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia.
- Martínez, C., y Cardelle, A. (2008). Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chemistry*, 1, 258–264. <https://www.infona.pl//resource/bwmeta1.element.elsevier-fff05ae0-d878-3313-b700-336463934056>
- Rodríguez, Á., Fernández, R., González, I., Cerdán, E., Becerra, M., y Sanz, J. (2012). Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Journal of Structural Biology*, 177(2), 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.031>
- Vera, C., y Guerra, C. (2010). *Síntesis de galactooligosacaridos con B-galactosidasa de Aspergillus oryzae*. Tesis de grado, Pontificia Católica de Valparaíso, Chile.