

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE



**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES  
CARRERA DE INGENIERÍA 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 INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

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

Tesis revisada por los miembros del tribunal, por lo cual se  
autoriza su presentación como requisito parcial para obtener el

título de:

**INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**APROBADA**

Ing. Jimmy Cuaran, Mg.I

**DIRECTOR DE TESIS**



FIRMA

Ing. Jimmy Nuñez, MSc.

**OPOSITOR**



FIRMA

Ing. Holguer Pineda, MBA.

**OPOSITOR**



FIRMA



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**  
**AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN**  
**FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA**

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

<b>DATOS DE CONTACTO</b>			
<b>CÉDULA DE IDENTIDAD:</b>	0401520150		
<b>APELLIDOS Y NOMBRES:</b>	Lucero Pozo Dania Yamilex		
<b>DIRECCIÓN:</b>	Calle Eugenio Espejo y García Moreno-Huaca-Carchi		
<b>EMAIL:</b>	dylucerop@utn.edu.ec		
<b>TELÉFONO FIJO:</b>	2973-692	<b>CELULAR:</b>	0985165316

<b>DATOS DE LA OBRA</b>	
<b>TÍTULO:</b>	Evaluación de parámetros de operación por lotes para la obtención de galacto-oligosacáridos mediante beta galactosidasa inmovilizada
<b>AUTOR:</b>	Lucero Pozo Dania Yamilex
<b>FECHA:</b>	02/06/2022
<b>PROGRAMA:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <b>PREGRADO</b> ( ) <b>POSGRADO</b>
<b>TÍTULO POR EL QUE OPTA:</b>	Ingeniero Agroindustrial
<b>ASESOR/DIRECTOR:</b>	Ing. Jimmy Cuaran, Mg.I

## 2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los dos días del mes de junio de 2022

**EL AUTOR:**

Firma: \_\_\_\_\_

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dania Yamilex Lucero Pozo', written over a horizontal line.

**Dania Yamilex Lucero Pozo**  
**CI:0401520150**

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado por la Srta. Dania Yamilex Lucero Pozo, bajo supervisión.



.....  
Ing. Jimmy Cuaran, Mg.I  
**DIRECTOR DE TESIS**

## **DEDICATORIA**

*A mi madre, por el apoyo incondicional, por ser una mujer luchadora que desde que yo era pequeña me ha dado lo mejor y nunca me abandonado.*

*A mis hijos, porque son ellos el motor de mi vida, por quienes me levanto cada mañana, ellos son mi inspiración para ser cada día mejor y la principal razón para superarme.*

*A mi esposo, por ser una parte fundamental en mi vida, por ser mi compañero y apoyarme siempre en cada paso que doy.*

*A mi ñaña, por estar siempre a mi lado, apoyándome en cada instante de mi vida, dándome ánimos para nunca decaer.*

*Quiero dedicar este trabajo, también a todos mis amigos y familiares, quienes han sido partícipes de esta lucha constante.*

***Dania L.***

## AGRADECIMIENTOS

*Primeramente, a Dios por permitirme culminar una meta más en mi vida.*

*A mi madre, por cada esfuerzo que ha hecho para que yo pueda culminar esta etapa importante de mi vida.*

*A mi director de tesis, Ing. Jimmy Cuaran por ser mi guía, gracias por sus enseñanzas y su paciencia durante todo este proceso, a mis asesores Ing. Jimmy Nuñez e Ing. Holguer Pineda por sus asesorías para mejorar este trabajo.*

*Finalmente, a mis amistades y familiares cercanos que siempre me dieron esa voz de aliento para seguir adelante.*

***Dania L.***

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ii
ÍNDICE DE ECUACIONES .....	iii
CAPÍTULO I .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1    PROBLEMA .....	1
1.2    JUSTIFICACIÓN.....	2
1.3    OBJETIVOS.....	3
1.3.1    OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2    OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1.4    HIPÓTESIS .....	3
1.4.1    HIPÓTESIS NULA.....	3
1.4.2    HIPÓTESIS ALTERNATIVA .....	3
CAPÍTULO II .....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1    LACTOSA.....	4
2.2    APROVECHAMIENTO DE LA LACTOSA.....	4
2.2.1    HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LA LACTOSA.....	5
2.2.2    ENZIMA BETA-GALACTOSIDASA.....	6
2.3    OBTENCIÓN DE LOS GALACTO-OLIGOSACÁRIDOS POR MEDIO DE TRANSGALACTOSILACIÓN .....	7
2.4    PROCESO DE INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA COMO MEJORA DE PROCESOS PRODUCTIVOS .....	10
2.4.1    MÉTODO DE ATRAPAMIENTO.....	12
2.4.2    FORMACIÓN DE PERLAS DE ALGINATO DE SODIO.....	13

2.5	CUANTIFICACIÓN DE GOS POR DNS .....	15
2.5.1	PREPARACIÓN DEL REACTIVO DNS .....	15
2.5.2	DESARROLLO DE LA REACCIÓN DNS .....	15
CAPÍTULO III .....		16
MATERIALES Y MÉTODOS .....		16
3.1	CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO .....	16
3.2	MATERIALES Y EQUIPOS .....	16
3.2.1	SUSTANCIAS Y REACTIVOS .....	16
3.2.2	EQUIPOS .....	17
3.2.3	MATERIALES .....	17
3.3	MÉTODOS .....	18
3.3.1	EVALUACIÓN DE DUREZA Y PERMEABILIDAD DE PERLAS DE ALGINATO DE CALCIO .....	18
3.3.2	EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA PRODUCCIÓN DE GALACTO-OLIGOSACÁRIDOS CON ENZIMAS INMOVILIZADAS ..	21
3.3.3	CUANTIFICACIÓN DE LOS GOS OBTENIDOS A TRAVÉS DE HPLC	27
3.4	MANEJO DEL EXPERIMENTO .....	28
3.4.1	DIAGRAMA DE BLOQUES PARA LA OBTENCIÓN DE GALACTO-OLIGOSACÁRIDOS MEDIANTE BETA GALACTOSIDASA INMOVILIZADA .....	28
3.4.2	DETALLE DEL PROCESO .....	31
CAPÍTULO IV .....		39
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....		39
4.1	EVALUACIÓN DE LA DUREZA Y PERMEABILIDAD DE LAS PERLAS DE ALGINATO DE SODIO .....	39

4.1.1	ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA VARIABLE DE RESPUESTA DUREZA PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	40
4.1.2	ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PERMEABILIDAD PARA LA OPTIMIZACIÓN DE PERMEABILIDAD DE LAS PERLAS DE ALGINATO DE SODIO.....	41
4.1.3	DETERMINACIÓN DEL PUNTO ÓPTIMO DEL EXPERIMENTO PARA LA FORMACIÓN DE PERLAS DE ALGINATO DE SODIO .....	43
4.2	EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA PRODUCCIÓN DE GALACTO-OLIGOSACÁRIDOS CON ENZIMAS INMOVILIZADAS.....	45
4.2.1	ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA OPTIMIZACIÓN .....	47
4.2.2	DETERMINACIÓN DEL PUNTO ÓPTIMO PARA EL EXPERIMENTO CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	48
4.2.3	ANÁLISIS DE HPLC AL MEJOR TRATAMIENTO.....	49
CAPÍTULO V .....		51
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		51
5.1	CONCLUSIONES.....	51
5.2	RECOMENDACIONES .....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		52
ANEXOS .....		57

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Características de la $\beta$ -galactosidasa proveniente de la levadura <i>Kluyveromyces lactis</i> (Lactozym Pure 6500L).....	7
<b>Tabla 2</b> Especificaciones para preparación de DNS .....	15
<b>Tabla 3</b> Ubicación del experimento .....	16
<b>Tabla 4</b> Niveles porcentuales de concentración de los factores analizados .....	18
<b>Tabla 5</b> Combinación de tratamientos sobre perlas de alginato de sodio .....	19
<b>Tabla 6</b> Niveles de los factores de Temperatura y Concentración de Lactosa.....	22
<b>Tabla 7</b> Combinación de tratamientos de acuerdo con las variables independientes .....	22
<b>Tabla 8</b> Variables de respuesta a evaluar .....	23
<b>Tabla 9</b> Preparación de soluciones estándar a concentraciones conocidas .....	24
<b>Tabla 10</b> Resultados de dureza y permeabilidad.....	39
<b>Tabla 11</b> ANOVA para la variable de respuesta dureza .....	40
<b>Tabla 12</b> Punto óptimo para el experimento dureza y permeabilidad de perlas de alginato de sodio .....	43
<b>Tabla 13</b> Resultado de la absorción y permeabilidad de azul de metileno .....	44
<b>Tabla 14</b> Resultados de porcentaje (%) Azúcares Reductores obtenidos en función la Temperatura y Concentración de lactosa durante el proceso de conversión enzimática .....	45
<b>Tabla 15</b> Análisis de varianza para la variable concentración de azúcares reductores .....	47
<b>Tabla 16</b> Punto óptimo para el experimento de concentración de azúcares reductores .....	48

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Hidrólisis enzimática de la lactosa .....	6
<b>Figura 2</b> Mecanismo de reacción para la transgalactosilación e hidrólisis de lactosa por $\beta$ -galactosidasa .....	8
<b>Figura 3</b> Mecanismo de acción de la $\beta$ -galactosidasa en la síntesis de GOS.....	8
<b>Figura 4</b> Reactor con tanque agitado por lotes.....	9
<b>Figura 5</b> Reactor con tanque agitado por lotes con enzimas inmovilizadas .....	11
<b>Figura 6</b> Métodos de inmovilización enzimática .....	12
<b>Figura 7</b> Proceso para formar las perlas de alginato de calcio.....	14
<b>Figura 8</b> Prueba de resistencia mecánica de perlas de alginato de calcio .....	20
<b>Figura 9</b> Determinación de la permeabilidad de perlas de alginato .....	20
<b>Figura 10</b> Prueba cualitativa de permeabilidad.....	21
<b>Figura 11</b> Absorbancia, X vs Concentración, Y .....	25
<b>Figura 12</b> Curva de calibración de glucosa.....	26
<b>Figura 13</b> Curva de concentración de azúcares reductores en función del tiempo .....	27
<b>Figura 14</b> Diagrama de proceso de la encapsulación de B-Galactosidasa en alginato de sodio .....	28
<b>Figura 15</b> Diagrama de proceso para la hidrólisis de lactosa.....	29
<b>Figura 16</b> Flujograma para la cuantificación de azúcares reductores como medida indirecta de galacto-oligosacaridos .....	30
<b>Figura 17</b> .....	30
<b>Figura 18</b> Pesado del alginato de sodio.....	31
<b>Figura 19</b> Licuado del alginato de sodio.....	31
<b>Figura 20</b> Reposo de la solución de alginato de sodio a 4°C .....	32

<b>Figura 21</b> Encapsulación de la enzima b-galactosidasa .....	32
<b>Figura 22</b> Gelificación de las perlas de alginato de calcio.....	33
<b>Figura 23</b> Filtrado y lavado de las perlas de alginato de calcio .....	33
<b>Figura 24</b> Reacción enzimática .....	34
<b>Figura 25</b> Choque térmico.....	34
<b>Figura 26</b> Centrifugación de la muestra.....	35
<b>Figura 27</b> Centrifugación de azúcares reductores por espectrofotometría.....	35
<b>Figura 28</b> Etiquetado y pesado de muestras.....	36
<b>Figura 29</b> Colocación de Carrez I y Carrez II.....	36
<b>Figura 30</b> Muestra en baño de agua .....	37
<b>Figura 31</b> Baño ultrasónico .....	37
<b>Figura 32</b> Filtración y microfiltración.....	38
<b>Figura 33</b> Porcentajes de azúcares del hidrolizado de lactosa (Anexo 3. Análisis de HPLC) .....	50

## INDICE DE ECACIONES

<b>Ecuación ( 1 )</b> Cuantificación de azúcares reductores.....	25
<b>Ecuación ( 2 )</b> Concentración de GOS .....	28
<b>Ecuación ( 3 )</b> Lactosa hidrolizada.....	28
<b>Ecuación ( 4 )</b> Concentración de GOS .....	50
<b>Ecuación ( 5 )</b> Lactosa hidrolizada.....	50

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 4.1 PROBLEMA

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.

El lactosuero es el principal subproducto que se genera en este sector, en especial en la industria quesera; además su aprovechamiento es escaso, pues comúnmente es utilizado para alimentación animal, o bien, desechado como efluente líquido, generando así gran impacto ambiental y económico, ya que existen industrias que envían el suero a las plantas de tratamiento de aguas residuales, pero antes deben darle un tratamiento previo, esto se hace por exigencias medioambientales, implicando costos extras y reduciendo la utilidad para la empresa. De esta manera se está desperdiciando una importante fuente de proteínas y de macro y micronutrientes.

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. Entre los componentes más importantes del suero se encuentra la lactosa, la cual puede ser utilizada como materia prima para la obtención de distintos productos; entre ellos se encuentran los galactooligosacáridos, considerados como prebióticos, que pueden emplearse en la Industria de alimentos, farmacéutica y cosmética, sin embargo en el año 2019, Gómez y Soto identificaron que el lactosuero sigue siendo utilizado por lo general para obtener lactosueros en polvo y concentrados, aislados de proteína, entre otros productos, por lo que se puede citar que es baja la producción de la galactooligosacáridos, y en especial en Ecuador, ya que estudios mencionan que la mayor producción se da en Japón, Unión Europea y Estados Unidos.

## 4.2 JUSTIFICACIÓN

Para la industria alimentaria la hidrólisis de la lactosa es un proceso biotecnológico de gran importancia, ya que posee efectos beneficiosos sobre en la digestión de alimentos en el ser humano, así como ventajas tecnológicas y ambientales en su aplicación industrial.

La ventaja de hidrólisis de lactosa se origina sobre el uso del suero lácteo, ya que éste ha sido considerado por muchos años como un desecho industrial, pero hoy en día se le está dando múltiples aplicaciones, con el fin de aprovechar sus propiedades nutricionales y obtener productos con alto valor agregado. Es importante la búsqueda de nuevas alternativas que permitan el aprovechamiento de este residuo industrial y disminuyan el impacto ambiental que éste causa, Una alternativa, es la obtención de galacto-oligosacáridos, que son prebióticos muy beneficiosos para el organismo humano y poseen grandes potenciales para mejorar la calidad de varios alimentos.

Los galacto-oligosacáridos 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).

La presente investigación tiene como fin la obtención de galactooligosacáridos, beneficiosos para la salud humana como prebióticos, a partir de lactosa comercial, que pueden ser utilizados en la Industria alimenticia, farmacéutica y cosmética, beneficiando a las empresas para crecer competitivamente y aumentar considerablemente su margen de ganancia, al lanzar al mercado un producto de alta gama, a partir del subproducto que generan todos los días, de sus procesos actuales.

## **4.3 OBJETIVOS**

### **4.3.1 OBJETIVO GENERAL**

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

### **4.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar dureza y permeabilidad de perlas de alginato de calcio.
- Evaluar parámetros para la producción de galacto-oligosacáridos con enzimas inmovilizadas.

## **4.4 HIPÓTESIS**

### **4.4.1 HIPÓTESIS NULA**

La temperatura y concentración de lactosa no influyen sobre la obtención de galacto-oligosacáridos mediante enzimas inmovilizadas

### **4.4.2 HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

La temperatura y concentración de lactosa influyen sobre la obtención de galacto-oligosacáridos mediante enzimas inmovilizadas.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **5.1 LACTOSA**

La lactosa se encuentra en la leche y sus productos derivados, es el azúcar doble sintetizado en la glándula mamaria de los mamíferos, se produce a partir de los monosacáridos, glucosa y galactosa. Para digerirse tiene que ser metabolizada por las células intestinales, la  $\beta$ -galactosidasa, producida en los enterocitos del duodeno, hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa, mismas que son absorbidas por la mucosa intestinal (Zuniga, 1995; Álvarez, 2013).

Este azúcar es menos dulce y soluble que la sacarosa, se encuentra en la leche en una proporción del 4.99% y constituye el 40% de los sólidos presentes. Además, es el único glúcido libre que se encuentra en cantidades considerables en todas las leches, es de estructura química simple y el más constante en proporción (Mammarella, 2001).

#### **5.2 APROVECHAMIENTO DE LA LACTOSA**

La lactosa por sus propiedades como sabor, textura, hidratación y sus cualidades adhesivas es utilizada como ingrediente en diferentes alimentos, es considerada como un aditivo comercial para carnes procesadas (salchichas, jamón, etc.), margarina, cereales para desayuno y comidas precocidas, también es usado como excipiente de fármacos (Estrella, 2020).

Entre los productos de mayor valor añadido que se pueden obtener a partir de lactosa están los GOS, productos prebióticos derivados de la hidrólisis enzimática de la lactosa mediante el uso de  $\beta$ -galactosidas. Los GOS son carbohidratos que pertenecen a la familia de los oligosacáridos no digeribles, que se encuentran de forma natural en varios alimentos como la cebolla, el ajo, el plátano y la soya, aunque en niveles demasiado bajos para que su ingesta ejerza un efecto significativo en el organismo humano, químicamente están compuestos de un número variable de unidades de galactosilo (de dos a nueve) y una unidad de glucosa terminal unida por diferentes enlaces glicosídicos que varían según la enzima y las condiciones de reacción utilizadas en su síntesis (Peña, 2010; Gómez y Sánchez, 2019).

Las propiedades más importantes de los GOS son su solubilidad en agua y su sabor dulce que por lo general es entre 0.3 y 0.6 veces más dulce que el de la sacarosa, característica por la cual son usados en la producción de alimentos si se desea tener un compuesto que reduzca el sabor dulce y se puedan resaltar otros sabores en el producto final, asimismo por su alto peso molecular trae como consecuencia un aumento en la viscosidad de las soluciones de estos compuestos, lo que lleva a obtener productos con mayor consistencia, por esta propiedad pueden ser ampliamente utilizados en la preparación de bebidas lácteas, helados y galletas (Guío, 2014).

Además de las propiedades fisicoquímicas descritas anteriormente, los GOS tienen gran interés por sus propiedades fisiológicas, puesto que los bajos contenidos de azúcares simples presentes en su estructura hacen que no sean digeridos por los humanos, haciéndolos adecuados para su uso como endulzantes en alimentos de bajo contenido energético y para el consumo de personas con diabetes, por esta razón, son usados como sustitutos de la sacarosa al ser bajos promotores de caries dental, en bebidas, yogurt, gomas de mascar y en confitería (Rodríguez, 2015).

Hay que mencionar, además que los GOS presentan beneficios para la salud humana pues debido a su característica de no ser asimilados por el organismo tienen efectos similares a la fibra dietaria, previniendo el estreñimiento. Por otro lado, su consumo estimula el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos en el intestino, los cuales generan resistencia frente a la colonización de patógenos y así se reduce las infecciones intestinales y se modula el sistema inmunológico (Rodríguez, 2015).

### **5.2.1 HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LA LACTOSA**

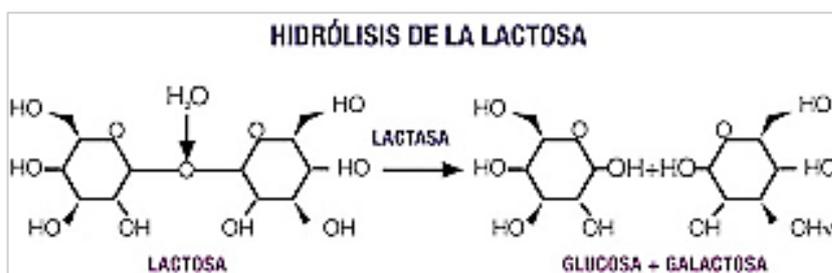
La hidrólisis de la lactosa se puede desarrollar por vía química (hidrólisis ácida) o por vía biológica (hidrólisis enzimática). La primera es una reacción química que requiere de ácidos inorgánicos fuertes como catalizadores, entre ellos, el ácido clorhídrico (HCl) o el ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>S), bajo condiciones operativas de altas temperaturas, entre 100 a 150 °C (Capdevila et al., 2020).

En el presente estudio experimental se empleó la hidrólisis enzimática, la cual se lleva a cabo mediante catalizadores biológicos como son las enzimas. Para esta hidrólisis generalmente se utiliza la enzima  $\beta$ -galactosidasa a temperaturas de

trabajo entre 30 y 50 °C, en este proceso la enzima rompe el enlace glicosídico a través de la inclusión de una molécula de agua que une los dos monosacáridos, separándola en glucosas y galactosa (Figura 1), (Juárez, 2011; Vicaria, 2002).

**Figura 1**

*Hidrólisis enzimática de la lactosa*



Fuente: (Estebáñez, 2018)

### 5.2.2 ENZIMA BETA-GALACTOSIDASA

El uso y la producción de  $\beta$ -galactosidasa o lactasa en la industria de alimentos ha causado gran interés debido a que es posible obtenerla a partir de microorganismos como levaduras, hongos o bacterias utilizando suero lácteo como medio de fermentación. Esta enzima causa la hidrólisis de la lactosa, hasta sus componentes principales glucosa y galactosa, obteniendo un producto de mayor dulzor, gracias a las propiedades de los monosacáridos formados, lo que hace posible usar la lactosa como edulcorante (Ramírez y Rivas, 2003).

Según Rodríguez et al. (2012) las  $\beta$ -galactosidasas de origen microbiano son las más relevantes a nivel de aplicabilidad industrial debido a su potencial biotecnológico. Muchas fuentes de microorganismos productores de  $\beta$ -galactosidasa son conocidos, pero sólo un número limitado de microorganismos ha sido usado en la industria. La mayoría de estas enzimas provienen de levaduras como *Kluyveromyces lactis*; la cual es una  $\beta$ -galactosidasa muy importante en sectores como el alimentario o farmacéutico.

#### 5.2.2.1 Lactozym Pure 6500L

La enzima  $\beta$ -galactosidasa Lactozym Pure 6500 litros de nombre comercial Novozymes Lactozym Pure se produce a partir de la levadura *Kluyveromyces lactis*, muy utilizada en la industria alimentaria ya estudios han revelado su

capacidad y velocidad para hidrolizar la lactosa, sus características se describen en la Tabla 1 (Ramírez et al., 2019).

**Tabla 1**

*Características de la  $\beta$ -galactosidasa proveniente de la levadura Kluyveromyces lactis (Lactozym Pure 6500L)*

Enzima declarada	$\beta$ -galactosidasa
Actividad declarada	6500 LAU/g
Color	Amarillo claro
Forma física	Líquida
Densidad aproximada	1.15 g/ml
Organismo de producción	Kluyveromyces lactis
Rango de temperatura	40 - 50 °C
Rango de pH	6.6 - 7.3

Fuente: (Novozymes, 2016)

### **5.3 OBTENCIÓN DE LOS GALACTO-OLIGOSACÁRIDOS POR MEDIO DE TRANSGALACTOSILACIÓN**

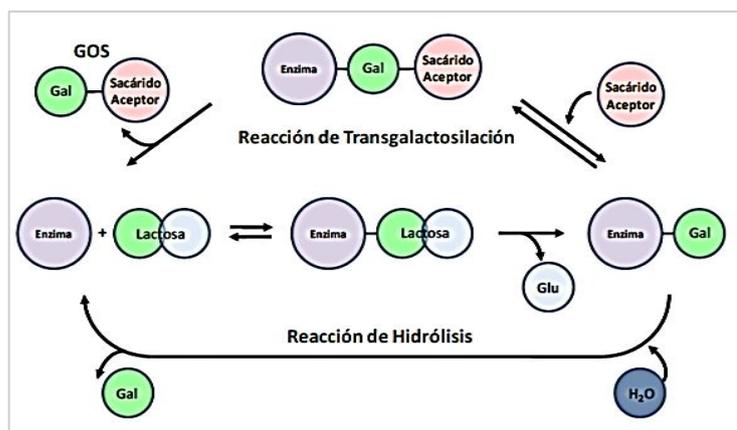
Los GOS se pueden obtener a través de los métodos clásicos de síntesis química, es decir, partiendo desde simples azúcares o por reacciones de transgalactosilación catalizadas por  $\beta$ -galactosidasas durante la hidrólisis de la lactosa, y es precisamente este último el que se utilizó en el presente trabajo de investigación (Mammarella, 2001).

La síntesis de GOS está determinada por dos reacciones importantes que se producen simultáneamente como se puede observar en la Figura 2, la ruta inferior representa la hidrólisis de la lactosa y la ruta superior la transgalactosilación ambas reacciones catalizadas por  $\beta$ -galactosidasa. Conviene subrayar que en el mecanismo de regulación de estas influyen la concentración de lactosa, la temperatura, entre otros factores. Así, por ejemplo, en soluciones con baja concentración de lactosa se producirá hidrólisis formando galactosa, y a concentraciones altas de sustrato, la

molécula de lactosa se comporta de nuevo como aceptor dando lugar a los GOS (Martínez y Cardelle, 2008; Corzo, et al., 2015; Neri et al., 2009).

### Figura 2

*Mecanismo de reacción para la transgalactosilación e hidrólisis de lactosa por  $\beta$ -galactosidasa*

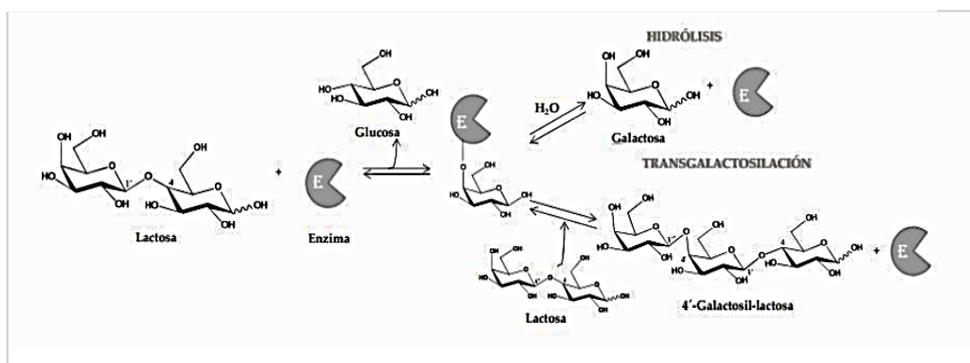


Fuente: (Guío, 2014)

El proceso de transgalactosilación se lleva a cabo por un mecanismo general de reacción establecido en tres pasos: en primer lugar, se forma el complejo enzima-galactosa y al mismo tiempo se libera la glucosa, posteriormente, el complejo enzima-galactosa sufre un ataque nucleofílico transfiriéndose a otro aceptor con un grupo hidroxilo, cuando la transferencia se realiza al agua produce galactosa y si la transferencia es a otro carbohidrato como la lactosa, se forman di- tri- y/o GOS con mayor grado de oligomerización (Figura 3) (Rodríguez, 2015).

### Figura 3

*Mecanismo de acción de la  $\beta$  - galactosidasa en la síntesis de GOS*

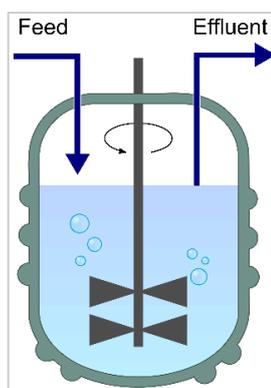


Fuente: (Rodríguez, 2015)

Las reacciones enzimáticas para obtener GOS generalmente se realizan en un baño de mezcla completa al incubar el sustrato (lactosa) con la enzima ( $\beta$ -galactosidasa) en reactores con tanque agitado, que se utilizan especialmente en procesos enzimáticos industriales porque optimizan el mezclado de los reactivos, existen dos tipos; por lotes o “batch” y continuo. Los reactores de tanque agitado por lotes son los más recomendados para investigaciones y experimentos porque son más dúctiles y su control es mucho más sencillo (Figura 4), por estas razones fue empleado en el presente trabajo investigativo (Ceballos et al., 2016).

#### **Figura 4**

*Reactor con tanque agitado por lotes*



Fuente: (Rodríguez, 2015)

En este sentido, se registran diferentes estudios relacionados con la obtención de GOS los cuales permiten analizar los diversos parámetros y condiciones del proceso de síntesis. Al respecto Bohórquez (2016), evaluó la producción de GOS utilizando una  $\beta$ - galactosidasa comercial y determinó que las mejores condiciones de operación con esta enzima se registran en la región comprendida entre las temperaturas de (43 – 47) °C y relaciones (E/S) de 0,00592 – 0,0103 ml del preparado enzimático / g de lactosa.

Otros estudios como el de Guío (2014), evaluó la producción de GOS utilizando una  $\beta$ - galactosidasa inmovilizada con 50 ml de solución del alginato de sodio al 2% (w/v) en agua destilada, que mezcló con 500  $\mu$ l de enzima, dejando en agitación magnética durante 1 hora. Luego bombeó la mezcla con una bomba peristáltica con velocidad graduada, sobre una solución de cloruro de calcio 0.2 M, enfriada

previamente, para obtener pellets de un tamaño adecuado (diámetro promedio: 3 mm aprox.) Los pellets se almacenaron por 12 horas en la solución de cloruro de calcio a 5 °C hasta su posterior uso en los ensayos. Determinó que el mayor rendimiento de la reacción hacía la producción de GOS se logra a pH 6.0, 50°C y concentración inicial de 333 g/l, con un rendimiento de 18.4%.

Por otra parte Vera y Guerra (2010), estudiaron la síntesis por lotes de galactooligosacáridos en base a un preparado enzimático de  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, la enzima produjo GOS-2, GOS-3, GOS-4 y GOS-5 que caracterizaron a través de cromatografía de masa y en la síntesis por lotes obtuvieron un porcentaje máximo de GOS de 25.11 %, con un rendimiento de 0.54 g GOS/ g lactosa, una conversión del 46.37 % y una productividad volumétrica y específica de 4.53 g GOS/min/L y 9.9 g GOS/min/g enzima, respectivamente.

Huerta (2010), analizó la síntesis de GOS a concentraciones muy altas de lactosa con la  $\beta$ -galactosidasa *Aspergillus oryzae* inmovilizada en glicoxil-agarosa. La síntesis fue optimizada con respecto a la concentración de lactosa y la relación enzima- sustrato, usando lactosa para la conversión de GOS como objetivo. Los valores óptimos fueron del 54.6% (p/v) lactosa y 33 UI/g de lactosa y en tales condiciones la conversión fue cercana al 30% similar a la obtenida con la  $\beta$ -galactosidasa soluble y comparada con los mejores valores reportados para la  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada.

## **5.4 PROCESO DE INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA COMO MEJORA DE PROCESOS PRODUCTIVOS**

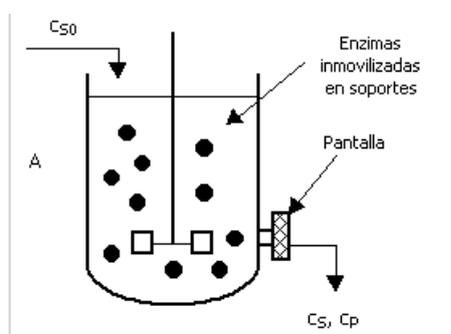
Existen dos procesos a través de los cuales se puede producir GOS, uno que utiliza enzimas libres de células y el otro con células completas. El proceso que se lleva a cabo con enzimas libres se puede clasificar según la utilización de enzimas solubles y la utilización de enzimas inmovilizadas (Park y Oh, 2010).

Las reacciones enzimáticas en sus formas solubles por lo general se desarrollan en un baño de mezcla completa al incubar el sustrato con la respectiva enzima (Figura 5). Cuando este proceso finaliza es difícil recuperar la enzima activa del medio de reacción para poder utilizarla de nuevo, por lo cual es eliminada mediante desnaturalización. La inmovilización de enzimas se presenta como una alternativa

para conservar catalizadores con elevada actividad, estabilidad y adecuada especificidad, debido a que es un proceso para confinar a la enzima en un área del espacio definida y así dar lugar a formas insolubles que detienen su actividad catalítica y hace posible su reutilización repetidamente. En detalle con este método la materia prima fluye a través del soporte que tiene la enzima inmovilizada por un determinado período para lograr hidrolizar el sustrato, conservar la enzima y por consiguiente disminuir el costo de producción (Capdevila et al., 2020; Vicaria, 2002).

### Figura 5

*Reactor con tanque agitado por lotes con enzimas inmovilizadas*



Fuente: (Elnashar, 2010)

En particular la inmovilización de las enzimas  $\beta$ -galactosidasa permite que el proceso de hidrólisis de la lactosa sea más eficiente, de manera que aumenta la productividad. Al respecto diversos autores a nivel mundial ya han inmovilizado la lactasa en diversos soportes con el objetivo de generar mayor resistencia de la enzima al sustrato en diversas condiciones (Brena et al., 2013; Singh, 2013).

Según Elnashar (2010), entre las principales ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas se destacan:

- Aumenta la estabilidad de la enzima respecto a la temperatura, pH, disolventes, impurezas y contaminantes.
- Disminuye costos de producción al hacer posible la reutilización del derivado.
- Permite detener de forma rápida la reacción a través de la eliminación de la enzima en base a la solución de reacción (o viceversa).
- Evita que la enzima contamine el producto.

- Facilita la separación de la enzima a partir del producto (principalmente útil en la industria alimentaria y farmacéutica).

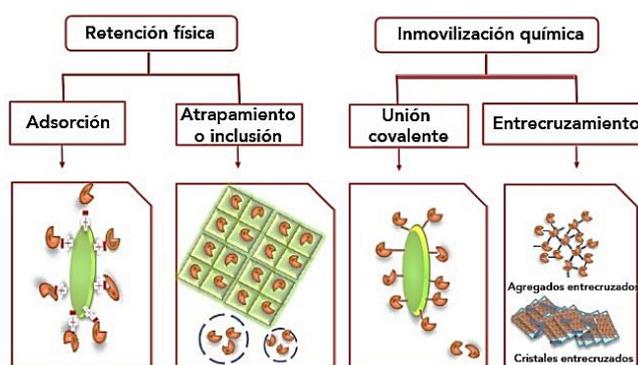
Por otra parte, Martinek y Mozhaev (1985), consideran que las principales desventajas o inconvenientes del proceso de inmovilización son:

- Alta heterogeneidad del sistema enzima-soporte ya que puede contener diferentes fracciones de proteínas inmovilizadas con un diverso número de uniones al soporte.
- Frecuente pérdida de actividad de la enzima durante la movilización.
- El costo del biocatalizador es más elevado que el de la enzima nativa.

El sistema de inmovilización enzimática se constituye principalmente por la enzima, la matriz o soporte y el método de fijación. En la figura 6 se muestran varios métodos para inmovilizar enzimas, los cuales pueden ser físicos y químicos. En el caso de la presente investigación para el sistema de inmovilización se utilizó la enzima  $\beta$ -galactosidasa, el alginato de sodio como material de soporte y se empleó el método de atrapamiento.

**Figura 6**

*Métodos de inmovilización enzimática*



Fuente: (Cedillo et al., 2014)

### 5.4.1 MÉTODO DE ATRAPAMIENTO

Este método consiste en el atrapamiento de la enzima dentro de geles o fibras, por medio de encapsulación para proporcionar el microambiente óptimo, es decir que coincida el entorno fisicoquímico de la enzima y el material de inmovilización. Esta

técnica es eficiente si se realiza empleando alginato de sodio, debido a que previene la pérdida de la enzima y aumenta la estabilidad mecánica (Cedillo et al., 2014).

#### **5.4.2 FORMACIÓN DE PERLAS DE ALGINATO DE SODIO**

Para este proceso se emplean alginatos como material encapsulante, los cuales son polímeros extraídos a partir de algas que al no ser tóxicos y tener facilidad de solubilización (Po  $\text{Ca}^{++}$  secuestrante) son ideales para formar geles, esferas, micro y nanopartículas, debido a esta capacidad han sido ampliamente utilizados para encapsular productos farmacéuticos y aceites esenciales (Lupo et al., 2012).

En el presente estudio se preparó perlas de alginato de sodio constituidas a partir de la reacción de alginato de sodio y cloruro de calcio, que forma una especie de gel, mediante la técnica de esferificación (Adolfo y Huertas, 2010).

En este contexto, se han realizado diversas investigaciones sobre la obtención y uso de las perlas de alginato, entre las más destacadas se registra la realizada por Aviles (2018), que empleó alginato al 2% para el encapsulamiento de nisina, obteniendo un rendimiento del 36.65%. De igual manera Pérez (2007), en su estudio sobre inmovilización de *Lactococcus lactis* en cápsulas de alginato de calcio menciona que es recomendable el uso de capsulas con concentración del 2% de alginato, por su alta viabilidad, además la textura que presenta es más blanda lo que facilitaría su ingesta. Concordando con el estudio realizado por Ayala (2020), para la encapsulación de inulina, donde manifestó que las perlas formadas con la concentración 2% (m/v) fueron más resistentes, uniformes y con un diámetro entre 4 a 5 mm, aptas para la inmovilización enzimática.

Por otro lado, Lopretti y Olazabal (2014), afirman que el alginato tiene muy poca estabilidad física en presencia de agentes quelantes y que, a valores bajos de pH las cápsulas se desintegran rápidamente permitiendo la liberación del producto encapsulado, este trabajo coincide con el estudio realizado por Ayala (2020), en donde menciona que al someter las cápsulas a pruebas de difusividad las esferas son resistentes a pH: 4, 5 y 6, pero se debilitan y desintegran a pH bajos ( $< 3$ ) en determinado tiempo.

### 5.4.2.1 Esferificación

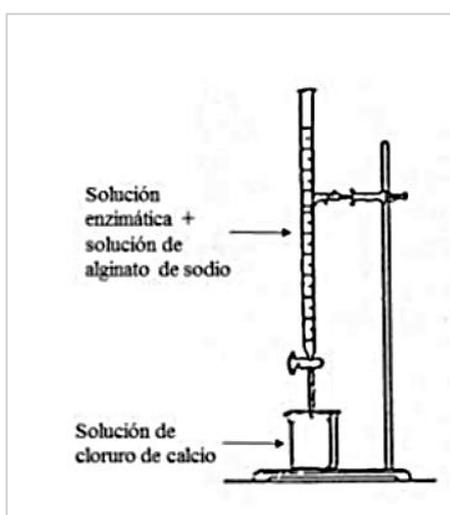
Según Piña (2016), esta técnica consiste en la gelificación controlada de un líquido, el cual forma esferas al ser sumergido en un baño. Se puede realizar dos tipos de esferificación, la primera se denomina básica o directa que se lleva a cabo al sumergir un líquido con alginato en un baño de calcio y la segunda es la esferificación reversa que consiste en sumergir un líquido con gluconolactato de calcio en un baño de alginato.

- **Esferificación Directa**

En este proceso es importante comprobar el nivel de acidez antes de comenzar a través de un medidor de pH, debido a que un medio ácido puede transformar el alginato de sodio en ácido algínico impidiendo la gelificación, pero es posible regular el pH de un líquido agregando 0.1 g de citrato de sodio a la mezcla base. El proceso de esferificación inicia con la adición de alginatos al líquido base, luego por separado se prepara una solución de calcio, posteriormente con una jeringa se absorbe el líquido con el alginato y se deja caer gota a gota en la solución de calcio (Figura 7), cada gota da lugar a una perla individual que tendrá diferente tamaño dependiendo de la jeringa utilizada (Cruz, 2009).

#### **Figura 7**

*Proceso para formar las perlas de alginato de calcio*



Fuente: (Aviles, Dorantes, Constantino, y Beltran, 2018)

## 5.5 CUANTIFICACIÓN DE GOS POR DNS

### 5.5.1 PREPARACIÓN DEL REACTIVO DNS

Según Ayala (2020), para preparar 250 ml de reactivo DNS, se pesan 2.5 g de ácido 3.5 dinitrosalicílico, 4 g de hidróxido de sodio granulado y 75 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado; para diluir los reactivos se prepara una solución de hidróxido de sodio en aproximadamente 100 ml de agua destilada y se añade en agitación el tartrato de sodio y potasio tetrahidratado; al disolverse se completa con agua destilada hasta los 200 ml y se comienza a añadir el ácido 3.5 dinitrosalicílico. Finalmente, se afora hasta los 250 ml y se deja en agitación a 30-35 °C hasta disolución completa (Tabla 2).

**Tabla 2**

*Especificaciones para preparación de DNS*

PREPARACIÓN REACTIVO DNS				
Volumen de aforo (ml)	DNS (g)	Hidróxido de sodio (g)	Tartrato de sodio y potasio (g)	Total
250	2.5	4.0	75.0	-
75.4%	1.0%	1.2%	22.6%	100%

Fuente: (Ayala, 2020)

### 5.5.2 DESARROLLO DE LA REACCIÓN DNS

La muestra se debe aforar en balones aforados de 25 ml, en donde 100 µl de muestra se aforan con agua destilada, posteriormente en tubos de ensayo se mezclan 500 µl de muestra diluida con 500 µl de reactivo DNS. Por otro lado, el blanco se prepara con 500 µl de reactivo DNS y 500 µl de agua destilada en un tubo de ensayo. El total de las muestras se llevan a ebullición por 5 minutos y posteriormente se les adiciona 1000 µl de agua destilada y se enfrían con hielo por 10 minutos, estas deben estar en un lugar oscuro debido a la sensibilidad del reactivo DNS a la luz. Finalmente se introducen las muestras en las celdas para la tomar las correspondientes lecturas en el espectrofotómetro (Hurtado et al., 2011).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

El presente capítulo detalla las características generales del área de estudio, métodos y materiales empleados para el cumplimiento de los objetivos e hipótesis planteadas en la investigación.

#### 6.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

En la presente investigación el trabajo experimental se llevó a cabo en el cantón Otavalo de la provincia de Imbabura (Tabla 3).

**Tabla 3**

*Ubicación del experimento*

Datos climatográficos de Otavalo	
Provincia	Imbabura
Cantón	Otavalo
Altitud	2550 m.s.n.m.
HR. Promedio	70.84%
Temperatura promedio	15.72 °C
Clima	Cálido-templado
Precipitación	1897 mm/año

Fuente: (GAD Municipal de Otavalo, 2018)

#### 6.2 MATERIALES Y EQUIPOS

##### 6.2.1 SUSTANCIAS Y REACTIVOS

- Lactosa comercial
- Enzima  $\beta$ -galactosidasa (Lactozym 6500)
- Alginato de sodio
- Cloruro de calcio
- Estándar de glucosa para espectrofotometría

- Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
- Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado
- Hidróxido de sodio
- Agua destilada

### **6.2.2 EQUIPOS**

- Agitador magnético con calefacción SH-2
- Refrigeradora
- Balanza analítica
- Spectronic 20D+ (Milton Roy) UV-Vis
- Durómetro Shore
- Ph-metro

### **6.2.3 MATERIALES**

- Probeta
- Micropipeta
- Matraces aforados
- Tubos de ensayo
- Frascos ámbar
- Papel filtro cualitativo
- Vasos de precipitación
- Pipetas pasteur
- Cronómetro
- Gradilla
- Embudos de vidrio
- Celdas para espectrofotometría
- Recipientes de vidrio
- Cajas Petri

## 6.3 MÉTODOS

### 6.3.1 EVALUACIÓN DE DUREZA Y PERMEABILIDAD DE PERLAS DE ALGINATO DE CALCIO

Para inmovilizar y encapsular la enzima  $\beta$ -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.

#### 6.3.1.1 Factores en estudio

Los factores analizados fueron el porcentaje de concentración de alginato de sodio y de cloruro de calcio considerando tres diferentes rangos de concentración para ambos factores, uno con valores porcentuales de nivel bajo, otro central y un alto, que posteriormente sirvieron para establecer los tratamientos experimentales (Tabla 4).

**Tabla 4**

*Niveles porcentuales de concentración de los factores analizados*

FACTOR A		
Concentración de alginato de sodio (%)		
Nivel bajo	Punto central	Nivel alto
1	2.5	3
-1	0.0	1

FACTOR B		
Concentración de cloruro de calcio (%)		
Nivel bajo	Punto central	Nivel alto
1	1.5	2
-1	0.0	1

En la tabla 5 se presentan los 12 tratamientos evaluados en el experimento, los cuales fueron interrelaciones entre los niveles de concentración porcentual de los dos factores de estudio y a partir de diseños compuestos centrales se propuso cuatro repeticiones al punto central.

**Tabla 5**

*Combinación de tratamientos sobre perlas de alginato de sodio*

Tratamientos	C. Alginato de sodio (%)	C. Cloruro de calcio (%)
T1	2.75	1.50
T2	3.00	1.00
T3	2.50	1.75
T4	2.50	1.50
T5	2.25	1.50
T6	3.00	2.00
T7	2.00	2.00
T8	2.50	1.50
T9	2.00	1.00
T10	2.50	1.25
T11	2.50	1.50
T12	2.50	1.50

### 6.3.1.2 Variables Dependientes

Las variables dependientes medidas en el presente objetivo 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, como se puede observar en la Figura 8 (Fernandez, 2021).

### Figura 8

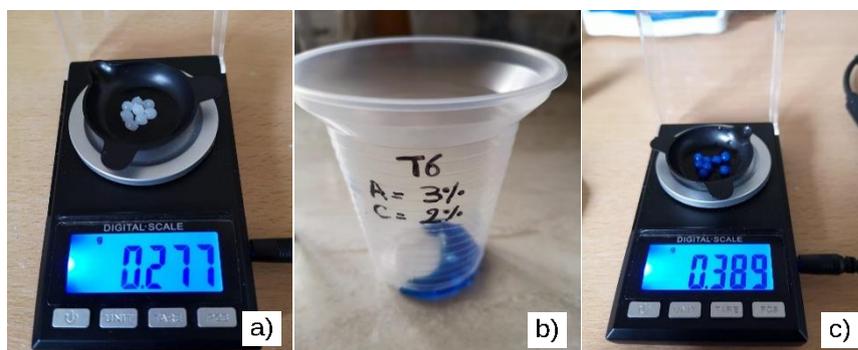
*Prueba de resistencia mecánica de perlas de alginato de calcio*



Así mismo se procedió a evaluar la permeabilidad de las perlas de alginato de sodio a través de una prueba cualitativa. En primer lugar, se registró el peso de ocho unidades, posteriormente se colocó una solución de azul de metileno y se observó la difusión de dicha sustancia hacia el interior de las perlas durante 30 minutos, transcurrido ese tiempo se pesaron las perlas para determinar la cantidad de azul de metileno absorbido en cada tratamiento (Figura 9).

### Figura 9

*Determinación de la permeabilidad de perlas de alginato*



Nota. a) Pesaje de perlas de alginato de sodio. b) Perlas en exposición con el colorante azul de metileno durante 30 min. c) Pesaje de perlas de alginato de sodio después de absorber el colorante

Por otra parte, se realizó una prueba cualitativa adicional que consistió en colocar 2 g de perlas en una solución de azul de metileno durante 60 minutos, en el transcurso de ese tiempo se tomaron muestras en cajas Petri cada 10 minutos para poder comparar las características de absorción de cada tratamiento, es decir se observó de manera visual como las perlas se tornaron de color azul más intenso (Figura 10) (Ayala, 2020).

### Figura 10

#### *Prueba cualitativa de permeabilidad*



Nota. a) Pesaje de perlas de alginato de sodio. b) Perlas en exposición con el colorante azul de metileno durante 60 min. c) Prueba cualitativa de permeabilidad de perlas de alginato de sodio.

### 6.3.2 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 llevaron a cabo siguiendo Diseños Compuestos Centrales con dos factores de estudio (temperatura y concentración de lactosa), evaluando como variable de 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.

### 6.3.2.1 Factores en Estudio

El presente trabajo evaluó dos factores en estudio durante la conversión enzimática: temperatura y concentración de lactosa. En la tabla 6 se describen los valores de los niveles bajos, altos y puntos centrales para cada variable independiente.

**Tabla 6**

*Niveles de los factores de Temperatura y Concentración de Lactosa*

FACTOR A		
Temperatura (°C)		
Nivel bajo	Punto central	Nivel alto
40	50	60
-1	0	1

FACTOR B		
Concentración de Lactosa		
Nivel bajo	Punto central	Nivel alto
25	35	45
-1	0	1

### 6.3.2.2 Características del experimento

Para llevar a cabo el experimento se evaluó un total de 12 tratamientos considerando niveles específicos de las variables de temperatura y concentración de lactosa. En la tabla 7 se describen los valores obtenidos para cada variable independiente.

**Tabla 7**

*Combinación de tratamientos de acuerdo con las variables independientes*

Tratamiento	Variables Independientes	
	TEMPERATURA (°C)	CONCENTRACIÓN DE LACTOSA (%)
T1	60	45
T2	50	30
T3	50	35
T4	55	35
T5	50	35

T6	50	40
T7	40	45
T8	40	25
T9	45	35
T10	50	35
T11	50	35
T12	60	25

### 6.3.2.3 Características de la unidad experimental

Cada unidad experimental estuvo conformada por 100 ml de lactosa (sustrato) y 13 ml de enzima encapsulada (alginato + enzima).

### 6.3.2.4 Variables de respuesta a evaluar

A continuación, en la tabla 8 se muestran las variables de respuesta a evaluar del producto final:

**Tabla 8**

*Variables de respuesta a evaluar*

Variable	Método	Unidades
Concentración de azúcares reductores	DNS	%

### 6.3.2.5 Evaluación de las variables de respuesta

- **Concentración de azúcares reductores**

Para determinar la concentración (%) de azúcares reductores presentes en el producto final se construyó una curva de calibración con soluciones patrón de glucosa estándar a diferentes concentraciones, empleando el método del ácido 3.5 dinitrosalicílico (DNS), que mediante espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 540 nm hizo posible la cuantificación de azúcares reductores de las muestras resultantes de la conversión enzimática.

- **Desarrollo de la reacción DNS y curva de calibración**

Para preparar soluciones a diferentes concentraciones se partió de una solución madre con una concentración de 2 g/l estándar de glucosa. De esta forma en cada uno de los diez tubos de ensayo con ayuda de una micropipeta se colocaron diferentes volúmenes de esta solución, a continuación, se agregó agua destilada hasta completar 500  $\mu$ l, y por último se añadieron 500  $\mu$ l del reactivo DNS (Tabla 9).

**Tabla 9**

*Preparación de soluciones estándar a concentraciones conocidas*

Código	Concentración (g/l)	solución estándar ( $\mu$ l)	Agua destilada ( $\mu$ l)	DNS ( $\mu$ l)	Total (ml)
C0(Blanco)	0,0	0	500	500	1
C1	0,2	50	450	500	1
C2	0,4	100	400	500	1
C3	0,6	150	350	500	1
C4	0,8	200	300	500	1
C5	1,0	250	250	500	1
C6	1,2	300	200	500	1
C7	1,4	350	150	500	1
C8	1,6	400	100	500	1
C9	1,8	450	50	500	1
C10	2,0	500	0	500	1

Posteriormente se colocaron los tubos de ensayo en baño maría a ebullición (90 °C) durante 5 minutos; transcurrido este tiempo se sometieron a un baño de agua helada (4 °C) para detener la reacción. Finalmente, se adicionaron 5 ml de agua destilada a cada uno de los tubos, se agitaron y se realizaron las lecturas a 540 nm para la construcción de la curva de calibración.

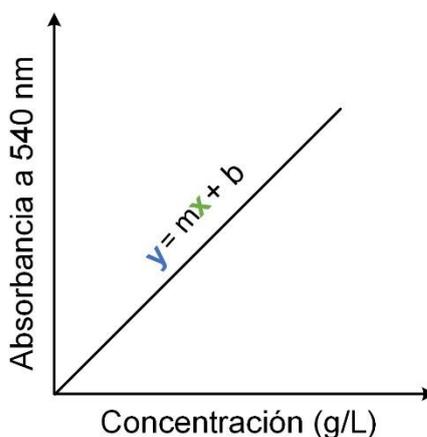
- **Cuantificación**

Para garantizar que la curva de calibración sea válida en la cuantificación de azúcares reductores de las muestras problema, fue necesario conocer el valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Es importante mencionar que el resultado de dicho coeficiente oscila entre 0 y 1, y cuanto más cerca de 1 se sitúa su valor, más exactos y fiables serán los resultados. Una vez determinado este valor se replicó el mismo procedimiento para las muestras de concentraciones desconocidas y mediante la ecuación (1) se obtuvieron las concentraciones de azúcares reductores, dicha ecuación estudia la relación lineal existente entre las variables dependiente (absorbancia a 540 nm) e independiente (concentración g/l) como se observa en la figura 11.

$$\text{Concentración (x)} = \frac{\text{Absorbancia (y)} - \text{Intersección del eje y (b)}}{\text{Pendiente (m)}} \quad (1)$$

**Figura 11**

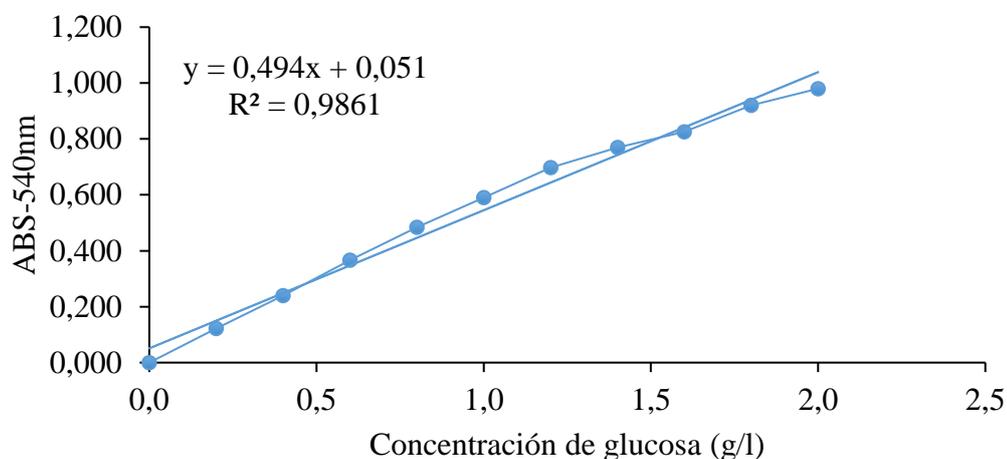
*Absorbancia, X vs Concentración, Y*



Como se puede observar en la Figura 12, el coeficiente de determinación se aproxima al valor 1, es decir la curva de calibración glucosa es válida para la determinación indirecta de la producción de GOS, y por lo tanto las concentraciones de azúcares reductores son los adecuados.

**Figura 12**

*Curva de calibración de glucosa*



- **Producción de GOS en relación con los azúcares reductores**

El comportamiento del sustrato, en este caso la lactosa, frente a la producción de galacto-oligosacáridos es una relación inversamente proporcional, ya que a medida que la lactosa se va hidrolizando, la formación de GOS aumenta (Hurtado et al., 2011).

Por otro lado, haciendo una relación entre la formación de GOS y azúcares reductores se puede decir que el aumento de estos azúcares favorece la hidrólisis de la lactosa y la disminución de éstos la formación de GOS (Bohórquez, 2016).

En base a lo citado, fue necesario determinar la duración del proceso antes de iniciar con la reacción enzimática y establecer el tiempo para que los azúcares reductores dejen de aumentar y por ende los GOS se empiecen a formar.

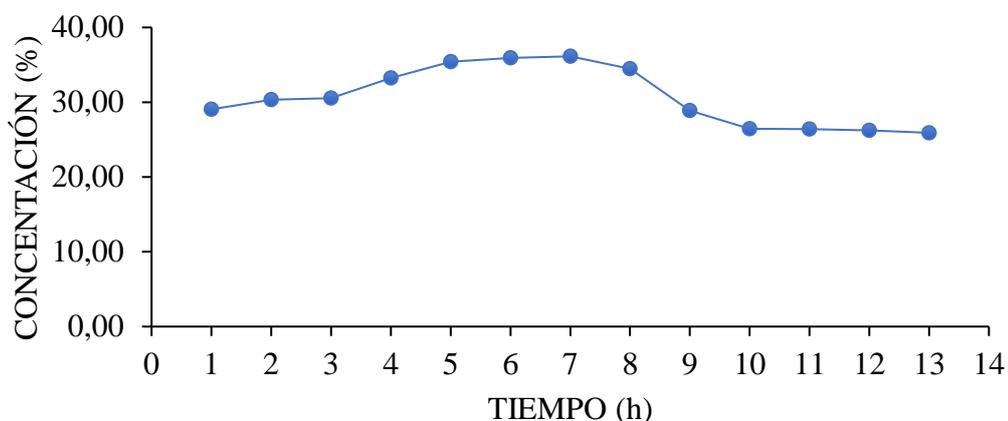
- **Tiempo de reacción**

Para la determinación del tiempo de reacción se consideraron referencias bibliográficas que indican las mejores condiciones para la producción de GOS. En el proceso de reacción se empleó lactosa comercial como sustrato y se tomó muestras cada hora para cuantificar mediante espectrometría Uv-Vis. Durante este proceso se registró un incremento de los azúcares reductores al alcanzar las 5 horas de reacción, momento en el que la lactosa se hidroliza, mientras que durante las dos horas siguientes se presentó un leve incremento y a partir de la octava hora de

reacción comenzó a disminuir la concentración de azúcares reductores y empieza la producción de GOS, además, se observó que a partir de la hora 10 el cambio en la concentración de azúcares reductores se estabiliza (Figura 13). Por lo tanto, se determinó un tiempo de reacción de 10 horas y se trabajó bajo el mismo criterio para los demás tratamientos.

**Figura 13**

*Curva de concentración de azúcares reductores en función del tiempo*



### 6.3.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS GOS OBTENIDOS A TRAVÉS DE HPLC

Al mejor tratamiento proporcionado por el programa estadístico Design Expert al finalizar las 10 horas de reacción enzimática se le tomó una muestra que fue enviada a un laboratorio para la cuantificación de los GOS obtenidos. Esto se realizó a través de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC), la cual es una técnica utilizada para identificar, cuantificar y purificar los distintos componentes de una mezcla, consiste en una fase estacionaria y una fase móvil (Kumar, 2012). En este proceso la muestra junto con un disolvente líquido a alta presión (fase móvil) se hace pasar por una columna llena de un material adsorbente sólido como sílice (fase estacionaria), la presión en el sistema se eleva con la ayuda de bombas. En este caso identificar los porcentajes de lactosa, glucosa y galactosa presentes en la muestra analizada y posteriormente calcular el porcentaje de GOS obtenidos mediante la ecuación (2) como también la cantidad de lactosa hidrolizada, ecuación (3) (Zheng et al., 2006).

$$\text{Concentración GOS} = \frac{\text{Concentración glucosa} + \text{Concentración galactosa}}{\text{Concentración inicial de lactosa}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{Lactosa hidrolizada} = \left(1 - \frac{\text{lactosa residual}}{\text{lactosa inicial}}\right) \times 100\% \quad (3)$$

El principio funcional se basa en que cada compuesto de la mezcla interactúa de manera ligeramente diferente con el material adsorbente en la columna, lo que provoca velocidades de flujo variables para cada componente y produce la separación de los componentes a medida que salen de la columna (Dong, 2006).

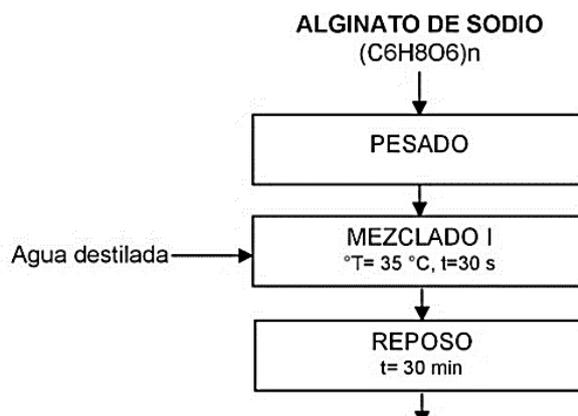
## 6.4 MANEJO DEL EXPERIMENTO

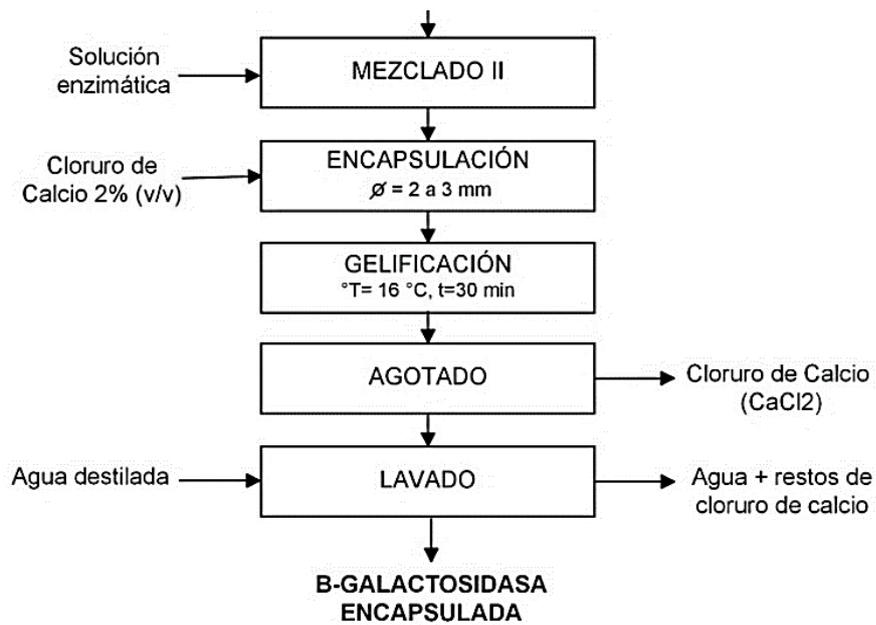
### 6.4.1 DIAGRAMA DE BLOQUES PARA LA OBTENCIÓN DE GALACTO-OLIGOSACÁRIDOS MEDIANTE BETA GALACTOSIDASA INMOVILIZADA.

El proceso para la obtención y cuantificación de galacto-oligosacáridos se dividió en dos etapas principales: la primera corresponde a la inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa en alginato de sodio (Figura 14) y la segunda fase en la conversión del sustrato de lactosa a galacto-oligosacáridos (Figura 15 y 16). Para el proceso de cuantificación se tomó en cuenta dos procesos, el primero consistió en medir indirectamente la producción de GOS para determinar el tratamiento adecuado y el segundo proceso se realizó mediante HPLC para cuantificar la cantidad de GOS obtenidos (Figura 17).

**Figura 14**

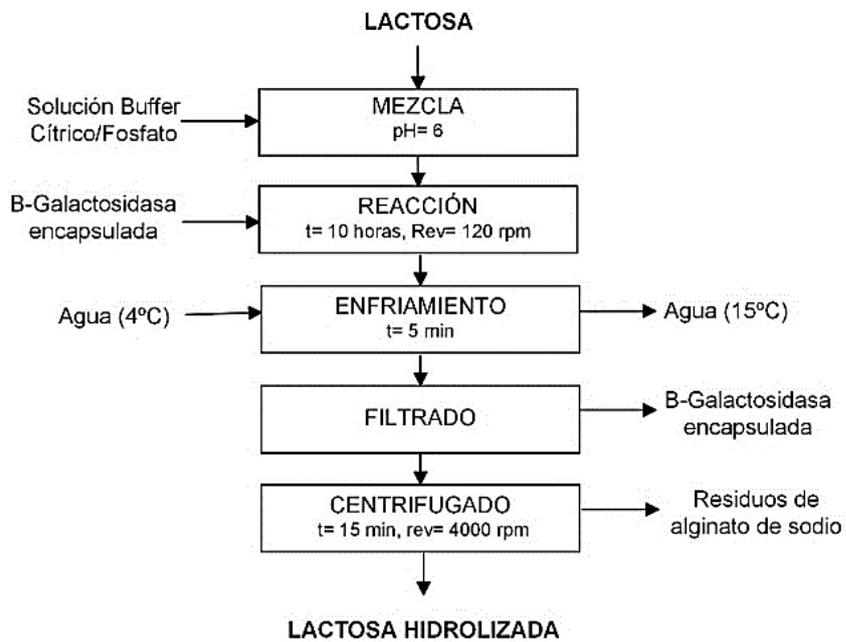
*Diagrama de proceso de la encapsulación de B-Galactosidasa en alginato de sodio*





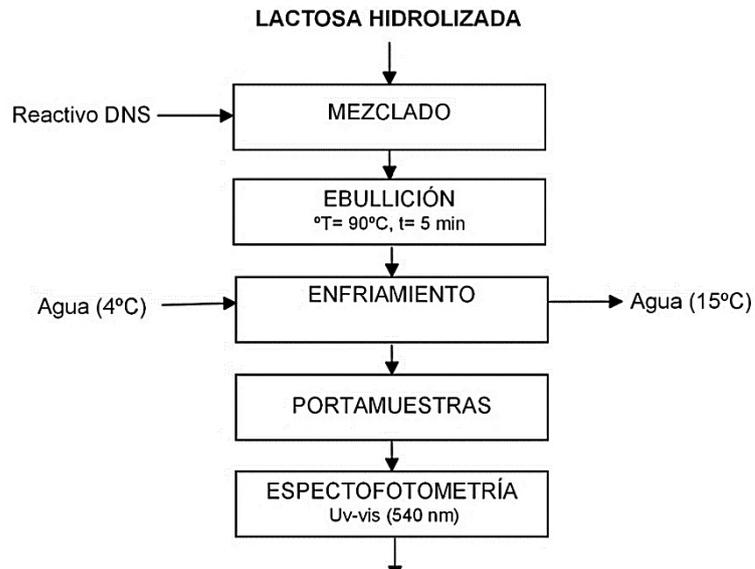
**Figura 15**

*Diagrama de proceso para la hidrólisis de lactosa*



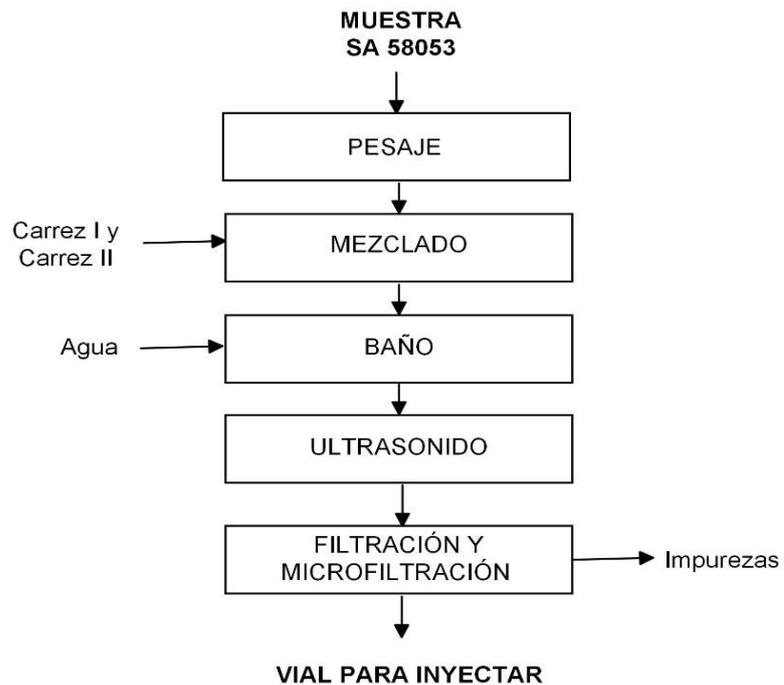
**Figura 16**

*Flujograma para la cuantificación de azúcares reductores como medida indirecta de galacto-oligosacaridos*



**Figura 17**

*Diagrama preparación vial para inyectar para cuantificación HPLC*



## 6.4.2 DETALLE DEL PROCESO

### 6.4.2.1 Encapsulación de la enzima b-galactosidasa Lactozym 6500

- **Pesado**

En primer lugar, se procedió a pesar alginato de sodio en una balanza digital ( $A_p = 0.01$  g), el cual sirvió como material de soporte para encapsular la enzima  $\beta$ -galactosidasa (Figura 18).

#### **Figura 18**

*Pesado del alginato de sodio*



- **Mezclado I**

A continuación, se agregó agua destilada como disolvente para obtener una solución de alginato de sodio al 3% (m/v) y mediante una licuadora de mano se homogenizó la solución (Figura 19).

#### **Figura 19**

*Licuada del alginato de sodio*



- **Reposo**

La solución de alginato de sodio obtenida se llevó a reposar en refrigeración a 4 °C durante 30 minutos. Sin embargo, después de 15 minutos se volvió a licuar, debido a que el alginato se precipita (Figura 20).

**Figura 20**

*Reposo de la solución de alginato de sodio a 4 °C*



- **Encapsulación**

Durante este proceso se utilizó la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* de la marca comercial Lactozym 6500L, se inició con una solución de enzima y agua destilada relación 1:5, se utilizó 2.4 ml por cada 12.5 ml de la solución de alginato de sodio anteriormente preparada. A continuación, se agito ligeramente la mezcla para conseguir una correcta homogenización de la enzima y el alginato de sodio; para la encapsulación se procedió a gotear la solución antes mencionada en otra solución formada por cloruro de calcio  $\text{CaCl}_2$  al 2% (Figura 21).

**Figura 21**

*Encapsulación de la enzima  $\beta$ -galactosidasa*



- **Gelificación**

De este modo las perlas formadas que alcanzaron un diámetro aproximado de 2 a 3 mm se dejaron reposar en la solución de cloruro de calcio  $\text{CaCl}_2$  al 2% por un período de 30 minutos, esto permite que los iones de sodio se intercambien con los iones de calcio y así lograr un gel insoluble en agua (Figura 22).

**Figura 22**

*Gelificación de las perlas de alginato de calcio*



- **Agotado y lavado**

Finalmente, las perlas fueron extraídas del cloruro de calcio con la ayuda de un colador, además, se realizó un lavado con agua destilada para retirar los residuos de cloruro de calcio que pudieran quedarse adheridos en las paredes de las perlas (Figura 23).

**Figura 23**

*Filtrado y lavado de las perlas de alginato de calcio*



#### 6.4.2.2 Proceso de conversión enzimática

- **Preparación del medio de reacción**

Antes de iniciar el proceso enzimático se preparó disoluciones de lactosa al 25%, 35% y 45%, ajustando el pH a 6, con el tampón cítrico/fosfato, para cada uno se tomó 100 ml y posteriormente se agregó las perlas de alginato de sodio con la enzima.

- **Reacción enzimática**

La reacción enzimática se realizó en un vaso de precipitación de 250 ml y que se colocó sobre un agitador magnético con calefacción (Figura 24), la temperatura se controló con un termostato, la reacción tuvo una duración de 10 horas con agitación constante de 120 rpm.

**Figura 24**

*Reacción enzimática*



- **Choque térmico**

Al cabo de las 10 horas se tomó una muestra de la reacción, sometiéndolas por 10 min en agua a ebullición y posterior se hizo un choque térmico en agua helada por cinco minutos (Figura 25).

**Figura 25**

*Choque térmico*



- **Centrifugación**

Para separar los residuos de la muestra que puedan interferir en posteriores mediciones de absorbancia, se procedió a centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos, obteniéndose dos fases (Figura 26).

**Figura 26**

*Centrifugación de la muestra*



- **Cuantificación**

Finalmente, las lecturas se hicieron por espectrofotometría Uv-Vis a una longitud de onda de 540 nm utilizando el método DNS, posterior a la construcción previa de la curva de calibración de glucosa (Figura 27).

**Figura 27**

*Centrifugación de azúcares reductores por espectrofotometría*



### 6.4.2.3 Preparación de la muestra para cuantificación HPLC

- **Recepción y pesaje de la muestra**

En primer lugar, como se observa en la figura 28 se procedió a etiquetar adecuadamente la muestra con un código único que servirá para identificarla y realizar el seguimiento correcto del proceso. Posteriormente se realizó el pesaje de la muestra en una balanza electrónica digital.

**Figura 28**

*Etiquetado y pesado de muestras*



Nota. a) Muestra etiquetada. b) Pesaje de la muestra

- **Mezclado**

Para comenzar la preparación de la muestra se agregó soluciones de Carrez I y Carrez II, los cuales son reactivos que permiten obtener una mejor precipitación (clarificación) de la solución y cumpliendo completamente el protocolo del ensayo (Figura 29). Además, el procedimiento del análisis resulta estandarizado.

**Figura 29**

*Colocación de Carrez I y Carrez II*



- **Baño de agua**

A continuación, se procedió a colocar la mezcla en un equipo de baño de agua, el cual puede lograr temperaturas calientes y frías, de acuerdo con la necesidad del laboratorista, se sometió a la mezcla a un tiempo y una temperatura determinados (Figura 30).

**Figura 30**

*Muestra en baño de agua*



- **Ultrasonido**

En el siguiente paso la mezcla fue sometida a un baño ultrasónico que se utiliza para limpiar las partículas adheridas a las superficies y para la homogenización de la solución, para este procedimiento se utilizó un limpiador ultrasónico marca GT SONIC (Figura 31).

**Figura 31**

*Baño ultrasónico*

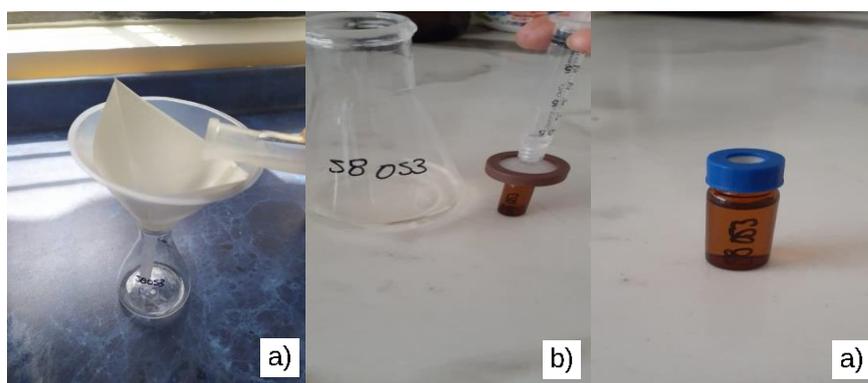


- **Filtración y Microfiltración**

Luego como se observa en la figura 32 se realizó la filtración de la solución en un matraz de vidrio, colocando un embudo de filtración y papel filtro con el fin de retirar las impurezas que pudieran existir, y seguidamente se procedió a realizar una microfiltración, finalmente se obtuvo el vial para inyectar.

**Figura 32**

*Filtración y microfiltración*



Nota. a) Filtración. b) Microfiltración. c) Vial para inyectar

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 7.1 EVALUACIÓN DE LA DUREZA Y PERMEABILIDAD DE LAS PERLAS DE ALGINATO DE SODIO

Con la metodología establecida en el apartado anterior se pudieron obtener los datos de dureza y permeabilidad de las perlas de alginato de sodio, como se indica en la Tabla 10. Donde:

**CA**= Concentración de alginato de sodio en % (m/v)

**CC**= Concentración de cloruro de calcio en % (v/v)

**D**= Dureza expresada en kg/mm<sup>2</sup>

**P**= Permeabilidad expresada en mg/min

**Tabla 10**

*Resultados de dureza y permeabilidad*

Tratamiento	(CA) %	(CC) %	(D) kg/mm <sup>2</sup>	(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	2.075	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

Nota. Resultados obtenidos en función la concentración de alginato de sodio y cloruro de calcio durante el proceso de gelificación de las perlas de alginato

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.

A continuación, se presenta los análisis de varianza correspondiente a cada variable de respuesta, en los cuales se constata el nivel de significancia del modelo.

### 7.1.1 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA VARIABLE DE RESPUESTA DUREZA PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

Para evaluar los efectos de las variables experimentales y sus posibles interacciones se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) AxB, en la tabla 11 se puede visualizar los resultados para la variable dureza.

Donde:

**CA**= Concentración de alginato de sodio en % (m/v)

**CC**= Concentración de cloruro de calcio en % (v/v)

**A**= Variable codificada para alginato de sodio en % (m/v)

**B**= Variable codificada para cloruro de calcio en % (v/v)

**Tabla 11**

*ANOVA para la variable de respuesta dureza*

Fuente	Sum de cuadrados	df	Cuadrados medios	F-valor	p-valor	
Modelo	201.37	5	40.27	9.98	0.0072	significante
A-CA	180.41	1	180.41	44.71	0.0005	
B-CC	2.69	1	2,69	0.6671	0.4453	
AB	0.9584	1	0.9584	0.2375	0.6433	
A <sup>2</sup>	7.37	1	7.37	1.83	0.2252	
B <sup>2</sup>	2.50	1	2.50	0.6184	0.4616	
Residual	24.21	6	4.04			
Lack of Fit	24.07	3	8.02	169.59	0.0008	significante

Pure Error	0.1419	3	0.0473
Cor Total	225.58	11	
R <sup>2</sup>	0.8927		
R <sup>2</sup> Ajustado	0.8032		
C.V %	16.57		

El valor F, de 9.98 implica que el modelo es significativo. Solo hay una probabilidad del 0.72% de que se produzca un valor F tan grande debido al ruido.

Los valores de p inferiores a 0.05 indican que los términos del modelo son significativos y los de mayor valor no significativos, en este caso la interacción AB tiene un valor de 0.64 determinando a esta interacción como no significativo, lo que nos indica que no hay diferencias estadísticas entre las variables concentración de alginato de sodio y concentración de cloruro de calcio para la variable de respuesta dureza.

El modelo tiene un nivel de confiabilidad (R<sup>2</sup>) del 89.27% siendo recomendable su uso en el experimento, además el coeficiente de determinación ajustado (R<sup>2</sup>aj.) es de 0.803 revelando que el modelo utilizado para la búsqueda del punto óptimo es satisfactorio, ya que según Gutiérrez y Vara (2008), si el modelo muestra un mínimo de 0.700 del comportamiento en la respuesta, no se recomienda utilizarlo para fines de optimización ya que su predicción es mala.

### **7.1.2 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PERMEABILIDAD PARA LA OPTIMIZACIÓN DE PERMEABILIDAD DE LAS PERLAS DE ALGINATO DE SODIO**

En la tabla 12 se puede visualizar los resultados de ANOVA AxB para la variable permeabilidad.

Donde:

**CA**= Concentración de alginato de sodio en % (m/v)

**CC**= Concentración de cloruro de calcio en % (v/v)

**A**= Variable codificada para alginato de sodio en % (m/v)

**B**= Variable codificada para cloruro de calcio en % (v/v)

Fuente	Sum de cuadrados	df	Medios cuadrados	F-valor	p-valor	
Modelo	2.31	5	0.4610	6.47	0.0208	significante
A-CA	1.46	1	1.46	20.44	0.0040	
B-CC	0.0450	1	0.0450	0.6317	0.4570	
AB	0.1260	1	0.1260	1.77	0.2318	
A <sup>2</sup>	0.1387	1	0.1387	1.95	0.2124	
B <sup>2</sup>	0.0147	1	0.0147	0.2061	0.6658	
Residual	0.4274	6	0.0712			
Lack of Fit	0.3687	3	0.1229	6.28	0.0827	No significante
Pure Error	0.0587	3	0.0196			
Cor Total	2.73	11				
R <sup>2</sup>	0.8436					
R <sup>2</sup> Ajustado	0.7132					
C.V %	24.03					

El valor F del modelo de 6.470 implica que el modelo es significativo. Solo hay un 2.08% de posibilidades de que se produzca un valor F tan grande debido al ruido.

En el caso de la interacción AB tiene un valor p de 0.231, siendo mayor a 0.05, por lo cual es determinado como no significativo, indicando que estadísticamente no hay diferencias significativas entre las variables concentración de alginato de sodio y concentración de cloruro de calcio para la variable de respuesta permeabilidad.

El modelo tiene un nivel de confiabilidad (R<sup>2</sup>) del 84.36% siendo recomendable su uso en el experimento, además el coeficiente de determinación ajustado (R<sup>2</sup>aj.) es de 0.713 revelando que el modelo utilizado para la búsqueda del punto óptimo es satisfactorio

### 7.1.3 DETERMINACIÓN DEL PUNTO ÓPTIMO DEL EXPERIMENTO PARA LA FORMACIÓN DE PERLAS DE ALGINATO DE SODIO

Los datos experimentales recopilados de cada tratamiento para dureza y permeabilidad fueron ingresados en el programa estadístico Design Expert y mediante el desarrollo de Diseños Compuestos Centrales y con un análisis de Superficie de Respuesta se optimizó la mejor combinación de alginato de sodio y cloruro de calcio, el cual fue con una concentración de alginato de sodio 3% y concentración de cloruro de calcio 2%, teniendo como puntos óptimos en dureza 20.180 kg/mm<sup>2</sup> y en permeabilidad 1.920 mg/min, como se puede visualizar en la tabla 13.

**Tabla 12**

*Punto óptimo para el experimento dureza y permeabilidad de perlas de alginato de sodio*

Nº	Concentración Alginato de sodio (%)	Concentración Cloruro de calcio (%)	Dureza Kg/mm <sup>2</sup>	Permeabilidad mg/min	Atractivo	
<b>1</b>	<b>3.000</b>	<b>2.000</b>	<b>19.231</b>	<b>1.920</b>	<b>1.000</b>	<b>Seleccionado</b>
2	3.000	1.987	19.211	1.935	0.993	
3	3.000	1.959	19.168	1.965	0.979	
4	2.956	2.000	18.670	1.758	0.978	
5	3.000	1.905	19.085	2.019	0.951	
6	3.000	1.896	19.070	2.028	0.947	
7	3.000	1.844	18.990	2.074	0.919	

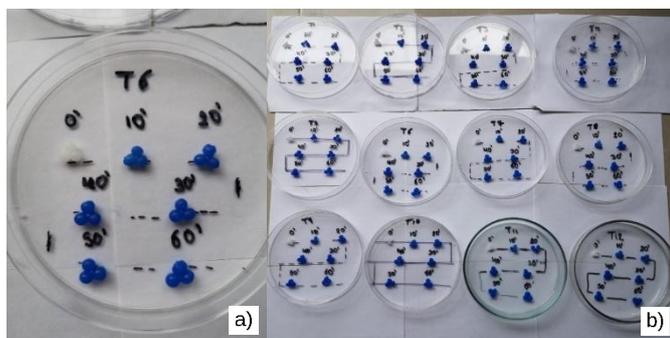
De acuerdo con el experimento realizado (confiabilidad del 81.17 y 84.36%) existe evidencia que tanto la concentración de alginato de sodio y la concentración de cloruro de calcio como la interacción de ambos factores no influyen en la dureza y permeabilidad de las perlas en el rango estudiado.

Respecto a la variable concentración de alginato de sodio, se puede mencionar que la dureza es directamente proporcional, ya que el incremento o disminución de la variable independiente afecta directamente a la de respuesta. Si se trabaja a concentraciones del 2%, las perlas son frágiles y se fragmentan con facilidad, a diferencia de concentraciones superiores a 2.5%, donde las esferas se mantienen estables y resisten a las condiciones de reacción; a una concentración del 3% se obtuvieron cápsulas resistentes y lo suficientemente permeables para el intercambio de sustrato y producto. Así mismo sucede con el factor concentración de cloruro de calcio, ya que la gelificación mostró mayor efectividad a concentraciones superiores al 1.5%, pero no favoreció al disminuir la concentración al 1%; estos resultados coinciden con Sánchez (2014), que en su investigación para evaluar el efecto de la concentración de alginato de sodio en la difusividad efectiva de los azúcares solubles determinó que al usar alginato de sodio al 2.5% y cloruro de calcio al 2%, las perlas son poco resistentes y al cabo de unas horas se rompen dejando las levaduras dispersas en el sustrato, usando alginato de sodio al 4% y cloruro de calcio al 2% no hubo fermentación perceptible, encontrando como la mejor combinación alginato al 3% y cloruro a 2% puesto que fueron resistentes mecánicamente en el fermentador y a la vez permitieron la fermentación.

Para complementar, se realizó una prueba cualitativa adicional de permeabilidad mediante observación de la absorción de azul de metileno hacia el interior de las perlas de alginato de sodio de cada tratamiento (apartado 3.3.1.2) cuyos resultados se presentan en la Figura 34.

**Tabla 13**

*Resultado de la absorción y permeabilidad de azul de metileno*



Nota. a) Resultado de la absorción de azul de metileno hacia el interior de las perlas de alginato de sodio durante 60 minutos. b) Prueba cualitativa de permeabilidad con azul de metileno de todos los tratamientos

En esta prueba se evidenció que la concentración de alginato de sodio y cloruro de calcio no afecta la permeabilidad, ya que se puede visualizar en todos los tratamientos, que no hay variación significativa en su coloración, esto coincide con Ayala (2020), que en su trabajo de investigación hizo la misma prueba de coloración y determinó que la concentración de alginato de sodio no afecta directamente al grado de difusividad del colorante después de someter una muestra de esferas correspondiente a cada una de las concentraciones analizadas a una prueba colorimétrica con azul de metileno a temperatura ambiente (18 °C), puesto que en los tres casos la coloración se mantuvo constante a los 35 minutos de exposición.

## **7.2 EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA PRODUCCIÓN DE GALACTO-OLIGOSACÁRIDOS CON ENZIMAS INMOVILIZADAS**

Una vez determinado el tiempo de reacción, se inició la fase experimental mediante el desarrollo de Diseños Compuestos Centrales y con un análisis de Superficie de Respuesta se optimizó la concentración de azúcares reductores como medida indirecta de GOS a partir de lactosa como sustrato principal y se determinó la mejor combinación de la concentración de lactosa y temperatura.

En la siguiente tabla, se detallan los rendimientos expresados porcentaje (%) de azúcares reductores obtenidos de la relación de los factores temperatura (°C) y concentración de lactosa (%) durante el proceso de conversión enzimática de lactosa a GOS (Tabla 14).

**Tabla 14**

*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

Este 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 (Tabla 15), 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 (Tabla 15) 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.

A continuación, se presenta el análisis de varianza para la variable de respuesta porcentaje de azúcares reductores para analizar la significancia del modelo propuesto.

### 7.2.1 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA OPTIMIZACIÓN

En la Tabla 15 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) AxB del modelo sugerido, este análisis de varianza de la variable de respuesta permitió conocer si el modelo estadístico sugerido es útil para determinar el punto óptimo que nos permita obtener la mayor concentración de GOS en función de los azúcares reductores.

Donde:

**T** = Temperatura en ° C

**L** = Concentración de lactosa en % (m/v)

**A** = Variable codificada para temperatura en ° C

**B** = Variable codificada para concentración de lactosa en % (m/v)

**Tabla 15**

*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 <sup>2</sup>	105.57	1	105.57	17.66	0.0057	
B <sup>2</sup>	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 <sup>2</sup>	0.8828					
R <sup>2</sup> Ajustado	0.7851					
C.V %	6.87					

El experimento realizado tiene una confiabilidad del 88.28% (Tabla 16) 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.

### **7.2.2 DETERMINACIÓN DEL PUNTO ÓPTIMO PARA EL EXPERIMENTO CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES**

En la tabla 16 se puede visualizar el mejor tratamiento sugerido por el programa estadístico Design Expert mediante la optimización numérica del modelo utilizando un análisis de superficie de respuesta, el cual fue a una temperatura de 40 °C y concentración de lactosa 25% (m/v), teniendo como punto óptimo en concentración de azúcares reductores 33%.

**Tabla 16**

*Punto óptimo para el experimento de concentración de azúcares reductores*

Nº	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	

### 7.2.3 ANÁLISIS DE HPLC AL MEJOR TRATAMIENTO

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  $\beta$ -galactosidasa *Kluyveromyces lactis*, obtuvo como mejores condiciones de reacción 40°C y 250 g/L.

A este tratamiento se le realizó un análisis de HPLC para identificar y cuantificar azúcares por separado (Figura 38), como son: la concentración de lactosa, glucosa y galactosa, obteniendo 12.70%, 7.30%, 3.40%, respectivamente, se asume que, al hidrolizarse la lactosa en glucosa y galactosa, las cantidades deberían ser iguales, sin embargo, en los resultados se puede evidenciar mayor contenido de glucosa que de galactosa, esto sucede por la actividad de transgalactosilación que realiza la enzima *kluyveromyces lactis*, puesto que las moléculas de galactosa se unen a una de lactosa para formar GOS.

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  $\beta$ -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.

Para calcular la concentración de GOS y la lactosa hidrolizada se empleó la ecuación (4) y (5) respectivamente.

$$\text{Concentración GOS} = \frac{\text{Concentración glucosa} + \text{Concentración galactosa}}{\text{Concentración inicial de lactosa}} \times 100\% \quad (4)$$

$$\text{Concentración GOS} = \frac{7.30 + 3.40}{25} \times 100\% = 42.80\%$$

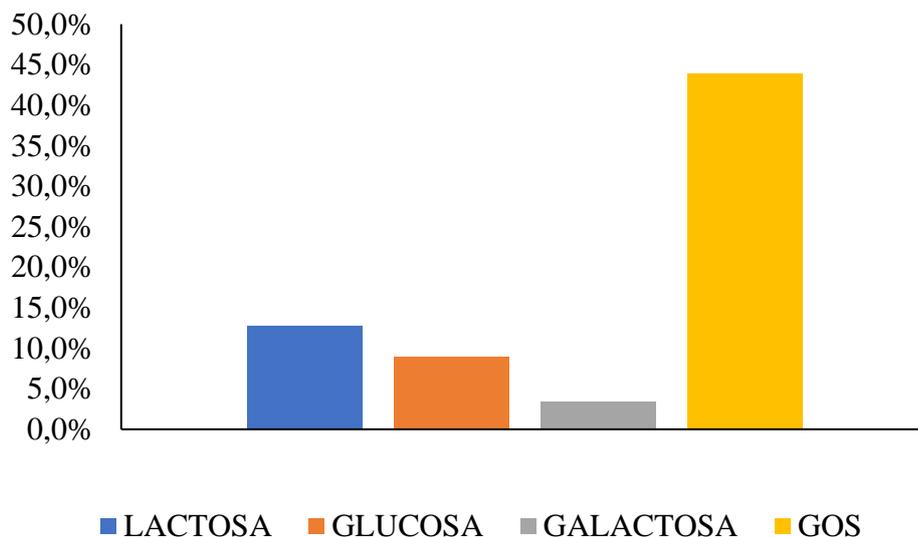
$$\text{Lactosa hidrolizada} = \left(1 - \frac{\text{lactosa residual}}{\text{lactosa inicial}}\right) \times 100\% \quad (5)$$

$$\text{Lactosa hidrolizada} = \left(1 - \frac{12.70}{25}\right) \times 100\% = 49.20\%$$

Dando como resultado 42.80%, de GOS 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.

### Figura 33

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



# CAPÍTULO V

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 8.1 CONCLUSIONES

- La combinación apropiada del material de soporte para inmovilizar la enzima  $\beta$ -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 de lactosa del 25% se logró conseguir en menor tiempo la conversión de lactosa a GOS obteniendo un rendimiento total del 42,80%, coincidiendo con referencias bibliográficas donde se manifiesta que a altas concentraciones de lactosa se obtiene reacciones tardías perdiendo eficiencias en la conversión.
- 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.

### 8.2 RECOMENDACIONES

- Trabajar en investigaciones que utilicen diferentes materiales de soporte como pectina, para inmovilizar la enzima  $\beta$ -galactosidasa, y así verificar rendimientos de conversión.
- Es necesario realizar investigaciones que se enfoquen en la purificación de galacto-oligosacáridos mediante métodos de concentración, con la finalidad de obtener un edulcorante con características comerciales.
- Estudiar en futuras investigaciones el uso de los GOS como espesante en la elaboración de helados, ya que por su bajo peso molecular proporciona mayor viscosidad y cuerpo al helado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adolfo, R., y Huertas, P. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos Food Microencapsulation: a Review. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5669–5684.
- Álvarez, M. (2013). *Caracterización fisicoquímica de los diferentes tipos lactosueros producidos en la Cooperativa Colante LTDA*. Tesis de grado, Corporación Universitaria Lasallis, Colombia.
- Aviles, H., Dorantes, J., Constantino, C. y Beltran, R. (2018). Inmovilización de enzimas. *Pädi Boletín Científico De Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, -5(10), 7-8. <https://doi.org/10.29057/icbi.v5i10.2895>
- Ayala, T. (2020). *Obtención de sirope de fructosa a partir de tuna blanca opuntia ficus-indica por el método de inmovilización enzimática de inulinasa*. Tesis de grado, Universidad Técnica del Norte, Ibarra.
- Bohórquez, D. (2016). *Evaluación de la producción de galactooligosacáridos (GOS) utilizando una  $\beta$ -galactosidasa a partir de la lactosa del lactosuero*. Tesis de grado, Universidad Sucre, Colombia.
- Brena, B., González-Pombo, P., y Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: A literature survey. *Methods in Molecular Biology*, 10(51), 15–31. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2)
- Capdevila, V., Vales, M. E., Gely, C., y Pagano, A. (2020). Analysis of the Lactose Hydrolysis Stage of Milk Whey to Obtain Bioethanol. *Avances En Ciencia e Ingeniería*, 11(4), 1–17.
- 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>
- Ceballos, L., Farías, L. y Rosales, L. (2016). Problemas y soluciones en el diseño de reactores enzimáticos. *Investigación y Ciencia*, 24(67), 78-85.

- Cedillo, L., Hernández, C. M., Zapata, A., Balagurusamy, N., y Escareño, M. P. (2014). Aplicaciones de las Enzimas Inmovilizadas. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 6(11), 1–9.
- Corzo, N., Alonso, J., Azpiroz, F., Calvo, M., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos-Aparicio, I., Plou, F., Ruas-Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo-Cuenca, A., Sanz, M., y Clemente, A. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 99-118. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8715>
- Cruz, D. (2009). Perlas Líquidas. Recuperado el 31 de agosto de 2020, de Mixología Molecular: <https://mixologiablog.com/2009/01/23/mixologia-molecular-perlas-liquidadas/>
- Dong, M. (2006). *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley & Sons, Inc.
- Elnashar, M. (2010). Review Article: Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 01(01), 61–77. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2010.11008>
- Estrella, G. (2020). *Intolerancia a la lactosa y efectos en la microbiota*. Tesis de grado, Universidad de Sevilla, España.
- 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/>
- Gómez, J., y Sánchez, S. (2019). Producción de galactooligosacáridos: alternativa para el aprovechamiento del lactosuero. Una revisión. *Ingeniería y Desarrollo*, 37(1), 129–158. <https://doi.org/10.14482/inde.37.1.637>
- 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.

- Huerta, L. M. (2010). Revisión: Síntesis enzimática de galacto-oligosacáridos a partir de residuos de la industria láctea: Desafíos tecnológicos y oportunidades. 1–14.
- Hurtado, N. A., Constanza, N., y Mojica, S. (2011). *Comparación de la producción de galactooligosacáridos GOS a partir de lactosuero en polvo y lactosa en polvo usando Aspergillus oryzae y enzima B galactosidasa libre*. Tesis de grado, Universidad de la Salle, Colombia.
- Juárez, R. (2011). *Hidrólisis Enzimática De La Lactosa Del Suero En Polvo*. Tesis de grado, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia.
- Kumar, J. (2012). HPLC: Highly Accessible Instrument in Pharmaceutical Industry for Effective Method Development. *Pharmaceutica Analytica Acta*, (3)1. doi:10.4172/2153-2435.1000147.
- Lopretti, M., y Olazabal, L. (2014). Microencapsulación de microorganismos *Kluyveromyces marxianus* en diferentes sistemas y materiales. Evaluación de su actividad biológica en la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(1), 55-65.
- Lupo, B., González, C., y Maestro, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130–151.
- Mammarella, E. (2001). *Estudio del sistema de inmovilización de enzimas para la hidrólisis de lactosa*. Tesis de grado, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.  
<https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/xmlui/bitstream/handle/11185/25/Tesis.pdf>
- Martinek, K., y Mozhaev, V. (1985). Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 57, 179–249.  
<https://doi.org/10.1002/9780470123034.ch3>
- Martínez, C., y Cardelle, A. (2008). Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by  $\beta$ -

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>

Neri, D., Balcão, V., Costa, R., Rocha, I., Ferreira, E., Torres, D., Rodrigues, L., Carvalho, J., y Teixeira, J. (2009). GalactoOligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae*  $\beta$ Galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane- polyvinyl Alcohol. *Food Chem.*, *1*, 92-99.

Novozymes. (2016). Novozymes Lactozym  $\text{\textcircled{R}}$  Pure.

Park, A. y Oh, D. (2010). "Galacto-oligosaccharide production using microbial  $\beta$ -galactosidase: current state and perspectives," *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*, 1279-1286. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2356-2>

Peña, T. (2010). *Producción de galacto-oligosacáridos empleando células libres de Aspergillus oryzae*. Tesis de grado, Universidad de los Andes. Colombia.

Pérez, A. (2007). Inmovilización de *Lactococcus lactis* en Cápsulas de Alginato de Calcio. Guanajuato.

Piña, G. (2016). *En la Elaboración de Propuestas de Repostería utilizando Mora, Uvilla y Babaco*. Tesis de grado, Universidad de Cuenca, Ecuador.

Ramírez, M., y Rivas, N. (2003). Producción y caracterización parcial de beta -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche desproteinizado. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 194–201.  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222003000200012&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222003000200012&lng=es&tlng=es).

Rodríguez, Á., Fernández, R., González, I., Cerdán, E., Becerra, M., y Sanz, J. (2012). Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. *Journal of Structural Biology*, *177*(2), 392–401.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.031>

- Rodríguez, D. (2015). *Estudio de la síntesis de GOS por la  $\beta$ -galactosidasa de "Kluyveromyces lactis"*. Tesis de Maestría, Universidade da Coruña, España.
- Singh, R. (2013). From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 1232. [/pmc/articles/PMC3565319/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111119/)  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3565319/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111119/)
- Vera, C., y Guerra, C. (2010). *Síntesis de galactooligosacaridos con B-galactosidasa de Aspergillus oryzae*. Tesis de grado, Pontificia Católica de Valparaíso, Chile.
- Vicaria, J. M. (2002). *Estudio cinético de la hidrólisis de la lactosa mediante reactor de fibra hueca*. Tesis de grado, Universidad de Granada, España.
- Zheng, P., Yu, H., Sun, Z., Ni, Y., Zhang, W., Fan, Y., y Xu, Y. (2006). Production of galacto-oligosaccharides by immobilized recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus candidus*. *Biotechnology Journal*, 1(12), 1464–1470. <https://doi.org/10.1002/biot.200600100>
- Zúniga, G. (1995). Intolerancia a la Lactosa. *Revista Médica Hondureña*, 63(1), 20-23.

# ANEXOS

## Anexo 1

### *Ficha técnica de Lactosa*



## Specification

1.07657.1000 Lactose monohydrate (milk sugar) for microbiology

Specification	
Identity (IR-spectrum)	passes test
Appearance	White to yellowish, finely crystallized powder
Spec. rotation ( $\alpha$ 20/D; 10 %; water; calc. on anhydrous substance)	+54.4 - +55.9 °
Acidity or alkalinity	passes test
Loss on drying (80 °C, 2 h)	≤ 0.5 %
Water	4.5 - 5.5 %
Suitability for microbiology	passes test

Dr. Till Winzer  
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

## Anexo 2

### Ficha técnica de enzima Beta-galactosidasa

#### Ficha de Datos del Producto

Válido a partir del 2017-09-25

1 de 2

# Lactozym® Pure 6500 L

En este producto, la actividad enzimática clave es proporcionada por beta-galactosidasa que hidroliza beta-D-galactósidos terminal no reductor que libera residuos de beta-D-galactosa

#### CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Enzima Declarada	Beta-galactosidasa
Actividad declarada	6500 LAU/g
Actividades colaterales	El producto no contiene ninguna actividad significativa de Proteasa
Color	amarillo claro
Forma física	Líquido
Propiedades	Ninguno
Densidad aproximada (g/ml)	1,15

El color puede variar de lote a lote, sin que la intensidad del color sea indicativa de la actividad enzimática.

#### ESPECIFICACIÓN DEL PRODUCTO

	Límite Mínimo	Límite Máximo	Unidad
Lactase unit LAU	6500		/g
Cuenta Total en Placa	-	100	/g
Levadura	-	10	/g
Mohos	-	10	/g
Bacteria coliforme	-	10	/g
E. coli	No detectado		/25 g
Salmonella	No detectado		/25 g
Metales pesados		Máx 30	mg/kg
Plomo		Máx 5	mg/kg
Arsénico		Máx 3	mg/kg
Cadmio		Máx 0.5	mg/kg
Mercurio		Máx 0.5	mg/kg

El método analítico de determinación enzimática está disponible en el Novozymes Market o a través de nuestro representante comercial.

#### COMPOSICIÓN

Ingredientes	Aprox. % (p/p)
Glicerol, CAS no. 56-81-5	52
Agua, CAS no. 7732-18-5	44
Beta-galactosidasa, CAS no. 9031-11-2*	4

\*Definida como la conc. enzimática (base de materia seca)

#### INFORMACIÓN SOBRE ALÉRGENOS

Alérgeno	Sustancia contenida*	Alérgeno	Sustancia contenida*
Aplo	no	Makako	no
Cereales con gluten**	no	Mielaza	no
Crustáceos	no	Nueces*	no
Huevo	no	Miel	no
Pescado	no	Sérum	no
Altramuz	no	Suje	no
Leche (incluida la lactosa)	no	Citido de sulfato/sulfato,	no
		más de 10 mg por kg o l	

\*Definición de sustancias de acuerdo con la normativa de la UE 1169/2011, en su versión modificada. Lista cubre alérgenos mencionados en 21 USC 301 (US) y GB 7718-2011 (China).

\*\*es decir, trigo, centeno, cebada, avena, pieles, kamut

\*es decir, almendra, avellana, nuez, anacardo, nuez pecana, nuez de Brasil, pistacho, macadamia y nuez de Queensland

\* Si No: Libre de gluten es decir, < 20ppm (Reglamento UE 628/2014)

#### VALORES NUTRICIONALES

El producto tiene un valor nutricional típico de aproximadamente 565 kJ/100 g enzimas.

• Proteína	4 g/100 g
• Polioles	52 g/100 g
• Humedad	44 g/100 g

Rethink Tomorrow

novozymes 

## Anexo 3

### Análisis de HPLC



#### INFORME DE RESULTADOS

INF.DIV-IN.58053a

#### DATOS DEL CLIENTE

<b>Cliente:</b>	DANIA YAMILEX LUCERO POZO
<b>Dirección:</b>	CALLE EUGENIO ESPEJO Y GARCIA MORENO
<b>Teléfono:</b>	+593 98 516 5316

#### DATOS DE LA MUESTRA

<b>Muestra de:</b>	LACTOSA		
<b>Descripción:</b>	LACTOSA		
<b>Lote</b>	---	<b>Contenido Declarado:</b>	80mL
<b>Fecha de Elaboración:</b>	---	<b>Fecha de Vencimiento:</b>	---
<b>Fecha de Recepción:</b>	2021-12-01	<b>Hora de Recepción:</b>	11:53:21
<b>Fecha de Análisis:</b>	2021-12-01	<b>Fecha de Emisión:</b>	2021-12-10
<b>Material de Envase:</b>	--		
<b>Toma de Muestra realizada por:</b>	El cliente.		
<b>Observaciones:</b>	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a los datos y las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio.		

#### CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

<b>Color:</b>	Característico.	<b>Olor:</b>	Característico.
<b>Estado:</b>	Líquido.	<b>Conservación:</b>	Al Ambiente
<b>Temperatura de la muestra:</b>	AMBIENTE		

#### RESULTADOS INSTRUMENTAL

PARAMETROS	RESULTADO	UNIDAD	METODO DE ANALISIS INTERNO	METODO DE ANALISIS DE REFERENCIA
AZUCARES TOTALES	23,27	%	MIN-93	AOAC 982.14/ HPLC-RI
LACTOSA	12,7	%	MIN-93	AOAC 982.14/ HPLC-RI
GLUCOSA	7,3	%	MIN-93	AOAC 982.14/ HPLC-RI
GALACTOSA	3,4	%	MIN-93	AOAC 982.14/ HPLC-RI

Se prohíbe la reproducción del presente informe de resultados, excepto en su totalidad previa autorización escrita de Multianalityca S.A.

Cualquier información adicional correspondiente a los ensayos está a disposición del cliente cuando lo solicite. El Tiempo de Retención de las Muestras en el Laboratorio a partir de la fecha de ingreso será de 15 días para muestras perecibles y 1 mes calendario para muestras medianamente perecibles y estables. Muestras para análisis microbiológicos 5 días laborables a partir de la fecha de análisis, posterior a este tiempo, el laboratorio no podrá realizar reensayos para verificación de datos o valores no conformes por parte del cliente.

Toda la información relacionada con datos del cliente e ítems de ensayo (muestras) y que pueda afectar a la validez de los resultados, ha sido proporcionada y son responsabilidad exclusiva del cliente. El laboratorio se responsabiliza únicamente de los resultados emitidos los cuales corresponden a la muestra analizada y descrita en el presente documento.

El laboratorio declina toda responsabilidad, acerca de desvíos encontrados en las muestras entregadas por el cliente y que pueden afectar a la validez de los resultados, particular que es comunicado al cliente en caso de ser detectado por el laboratorio.

El tiempo de almacenamiento de los informes de resultados y toda la información técnica relacionada al mismo para dar trazabilidad será de 5 años a partir de su fecha de emisión. (Punto 8.4.2 CR GA01 Criterios Generales Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración según NTE INEN- ISO/IEC 17025:2018).

Quim. Mercedes Parra  
Jefe División Instrumental



EDMUNDO CHIRIBOGA N47-154 Y JORGE ANIBAL PAEZ  
La concepcion - QUITO - PICHINCHA - ECUADOR  
Telf: (02) 226 7895, 226 9743, 244 4670 / email: informes@multianalityca.com

RIN-7.8-01 / Edición RG: 05