

**INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA LACTOZYM EN SOPORTE MESOPOROSO
(MCM-41) Y SU APLICACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE LECHE BAJA EN LACTOSA**

YENIFFER USURIAGA MULATO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2015

**INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA LACTOZYM EN SOPORTE MESOPOROSO
(MCM-41) Y SU APLICACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE LECHEs BAJAS EN LACTOSA**

Trabajo de grado, presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

YENIFFER USURIAGA MULATO

Directora:

Dra. MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA.

Grupo de Investigación:

Biotecnología, Calidad Medioambiental y Seguridad Agroalimentaria (BICAMSA)

Departamento de Química

Universidad del Cauca

Codirectores

Dr. Alfonso Ramírez Sanabria

Grupo de Investigación:

Catálisis

Departamento de Química

Universidad del Cauca

Dra. María del Mar Villamiel Guerra

Dra. Antonia Montilla

CIAL (CSIC-UAM)

Madrid-España

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2015

Contenido

INTRODUCCIÓN.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo General.....	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	18
4.1 Leche	18
4.2 Enzimas β -d-galactosidasas	19
4.2.1 Mecanismo de acción de las β -D-Galactosidasas en la hidrólisis de lactosa.	20
4.3 Soporte mesoporoso	21
4.3.1 Técnicas de caracterización del soporte mesoporoso:.....	23
4.3.1.1 Espectrometría de absorción en el Infrarrojo (IR)	23
4.3.1.2 Análisis térmico diferencial (ATD)	23
4.4 Inmovilización enzimática.....	24
4.4.1 Mecanismos de inmovilización	24
4.4.2 Evaluación del proceso de inmovilización.....	26
4.4.2.1 Determinación de Proteína con el método del ácido bicínico (BCA).	26
4.4.2.2 Determinación de actividad enzimática con ortonitrofenil galactopiranosido (o-NPG).....	27
4.5 Estudio de la calidad de leches bajas en lactosa y bebidas a base de soya comerciales.....	27
4.5.1 Presencia de indicadores químicos por la reacción de Maillard.....	28
4.5.2 Parámetros utilizados para la caracterización química de muestras comerciales	29
4.5.2.1 Actividad de agua (a_w).....	29
4.5.2.2 Proteínas Kjeldahl	30
4.5.2.3 pH	30

4.5.2.4 Extracto seco.....	31
4.5.2.5 Carbohidratos.....	31
5. METODOLOGÍA.....	32
5.1 Síntesis del soporte (MCM-41).....	32
5.1.1 Caracterización del soporte MCM-41	32
5.1.1.1 Espectrometría de absorción en el infrarrojo (IR-TF).....	32
5.1.1.2 Análisis térmico diferencial (ATD).....	32
5.2 Inmovilización enzimática. Reacción de hidrólisis	33
5.2.1 Activación del soporte.....	33
5.2.2 Purificación enzimática	34
5.2.3 Unión covalente enzima-soporte	35
5.2.4 Determinación de proteína con BCA.....	37
5.2.5 Determinación de la actividad enzimática con ortonitrofenil galactopiranosido (o-NPG).....	38
5.3 Hidrólisis de la lactosa en muestras de leche.....	38
5.3.1 Reúso de la enzima inmovilizada	39
5.4 Determinación del grado de hidrólisis de la lactosa	40
5.4.1 Determinación de la hidrólisis por CLAR.....	40
5.5 Muestras de leche comercial y bebidas a base de soya	41
5.5.1 Muestras con T= 40°C.....	42
5.5.2 Muestras con a_w 0,44 y T= 40°C.....	42
5.6 Caracterización química básica	42
5.6.1 Extracto Seco.....	42
5.6.2 pH.....	43
5.6.3 Proteína: Método Kjeldahl	43
5.6.4 Actividad de agua (a_w)	43
5.6.5 Análisis de carbohidratos por cromatografía de gases (CG).....	44

5.7 Evaluación del avance de la reacción de Maillard	45
5.7.1 Determinación de HMF por CLAR	45
5.7.2 Determinación de furosina por CLAR	46
5.7.3 Determinación del color	48
5.8 Análisis estadístico	48
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS	49
6.1 Estudio del soporte mesoporoso MCM-41	49
6.2 Evaluación del proceso de inmovilización enzimática	50
6.2.1 Determinación de TGA en la enzima libre e inmovilizada.	55
6.2.2 Determinación de la hidrólisis enzimática por CLAR	56
6.3 Evaluación de la calidad de muestras comerciales de leche deslactosada y productos de soya. Hidrólisis de la lactosa y avance de la reacción de Maillard.....	64
6.3.1 Caracterización fisicoquímica	64
6.3.1.2 Actividad de agua (a_w).....	65
6.3.1.3 Proteínas	66
6.3.1.4 Estimación del grado de hidrolisis y la formación de GOS	66
6.3.2 Evaluación del avance d la reacción de Maillard	70
6.3.2.1 Etapas iniciales. Determinación de Furosina	70
6.3.2.2 Etapas intermedias. Determinación del hidroximetilfurfural (HMF)	72
6.3.3 Estudio del efecto del almacenamiento en la calidad de las leches comerciales en polvo.....	73
CONCLUSIONES	78
RECOMENDACIONES.....	79
BIBLIOGRAFÍA.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de hidrólisis de la lactosa con la enzima β -D-galactosidasa.	19
Figura 2. Formación de GOS por transgalactosilación e hidrólisis de lactosa. [Adaptado de Guío, (2014)].....	20
Figura 3. Mecanismo de acción de las β -D-galactosidasas. [Tomado de Corral, (2005)]..	21
Figura 4. Pasos para la preparación de soportes mesoporosos.....	22
Figura 5. Reacción de obtención de o-nitrofenol con la enzima β -D-galactosidasa.....	27
Figura 6. Muestras de leche en polvo almacenadas con a_w 0,44 y $T=40^\circ\text{C}$	42
Figura 7. Muestras para la determinación de furosina.	46
Figura 8. Pasos para la purificación de Furosina.	47
Figura 9. Espectro infrarrojo del soporte mesoporoso MCM-41.	50
Figura 10. Inmovilización enzimática.	51
Figura 11. Curva de calibración para la determinación de proteínas por el método de BCA.	52
Figura 12. Curva de Calibración para la determinación de actividad enzimática con o-NPG.	53
Figura 13. Actividad determinada en los soportes inmovilizados con relación a la actividad de la enzima agregada antes del proceso.	54
Figura 14. Muestras de enzima sometidas a agitación con ultrasonidos. Donde F_1 hace referencia a la muestra sometida a una frecuencia con pulsaciones y F_2 a una frecuencia continua.	54
Figura 15. Actividad enzimática determinada en los diferentes soportes inmovilizados y en la enzima libre.....	55
Figura 16. Curva de análisis termogravimétrico al soporte de óxido de silicio MCM-41, soporte activo y biocatalizador.....	55
Figura 17. Primera derivada del TGA, en el al soporte de oxido de silicio MCM-41, soporte activo y biocatalizador.	56
Figura 18. Perfiles cromatográficos de la mezcla de los patrones por la técnica de CLAR.	57
Figura 19. Rectas de calibrado de los patrones de carbohidratos determinados por CLAR.	57
Figura 20. Primera hidrólisis de lactosa en muestra de leche entera comercial (LEC) mediante el uso de enzima libre.	58

Figura 21. Porcentaje de hidrólisis (LEC) con los dos procesos de inmovilización convencional y con Ultrasonidos.....	59
Figura 22. Formación de GOS durante 24 horas en la hidrólisis de lactosa en (LEC) con la enzima libre e inmovilizada por diferentes tiempos y métodos.	59
Figura 23. Hidrólisis de lactosa en la muestra de leche entera comercial (LEC) con el uso de enzima libre, variando temperatura, tiempo y volumen de enzima.....	60
Figura 24. Porcentaje de GOS generados durante la hidrólisis de lactosa de LEC, con el uso de enzima libre y dos temperaturas de hidrólisis.....	61
Figura 25: Porcentaje de lactosa durante la hidrólisis de LEC con el método de agitación convencional y Ultrasonidos a una temperatura de 4 y 20 °C.	62
Figura 26. Formación de GOS durante la hidrólisis de LEC con el método de agitación convencional y Ultrasonidos a una temperatura de 4 y 20 °C.	62
Figura 27. Reúsos de enzima inmovilizada.	63
Figura 28. Formación de GOS durante la hidrólisis con la enzima inmovilizada durante los reúsos.	63
Figura 29. Curva de calibración para determinación de a_w	65
Figura 30. Perfil cromatográfico obtenido del análisis de una muestra de leche deslactosada comercial por cromatografía de gases.....	67
Figura 31. Perfil cromatográfico del patrón de furosina, por análisis de CLAR.	70
Figura 32. Curva patrón para determinación de furosina.....	70
Figura 33. Cromatograma de HMF.	72
Figura 34. Recta de calibrado patrón para la determinación de HMF.	72
Figura 35. Gráficas de variación del contenido de Furosina en muestras de leche en polvo almacenadas a 40°C.	75
Figura 36. Gráficas de variación en la cantidad de Furosina en las muestras de leche en polvo Lk y Sk almacenadas con a_w controlada.....	75
Figura 37. Gráfica de variación en el contenido de HMF en muestras de leche en polvo almacenadas a 40°C.	76
Figura 38. Gráficas de la variación del contenido de HMF en muestras de leche en polvo Lk y Sk almacenadas con a_w controlada.....	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ensayos de inmovilización enzimática realizados.....	37
Tabla 2. Procesos de hidrólisis 1.	39
Tabla 3. Procesos de hidrólisis 2 y 3.	39
Tabla 4. Gradiente de elución para el análisis de HMF.....	46
Tabla 5. Gradiente empleado para la elución por CLAR de la furosina.....	47
Tabla 6. Análisis de Adsorción y desorción de nitrógeno en el soporte mesoporoso.	49
Tabla 7. Extracto seco y pH en muestras comerciales de leche deslactosada y bebidas a base de soya.	64
Tabla 8. a_w en muestras comerciales de leche en polvo deslactosada.	65
Tabla 9. Proteína (%) en muestras comerciales.....	66
Tabla 10. Carbohidratos en bebidas a base de soya.....	68
Tabla 11. Carbohidratos encontrados en muestras comerciales.....	69
Tabla 12. Proteínas (%) y furosina (mg/100 g de proteína) en muestras de leche y bebidas a base de soya.	71
Tabla 13. Concentración de HMF en las muestras de leche y bebidas a base de soya.	73
Tabla 14. Carbohidratos en muestras de leche en polvo.....	74
Tabla 15. Color en muestras almacenadas.	77

LISTA DE DIAGRAMAS DE FLUJO

Diagrama de flujo 1. Composición general de la leche. [Adaptado de Chandan, 2011]	18
Diagrama de flujo 2. Activación del soporte mesoporoso MCM-41.	34
Diagrama de flujo 3. Procedimiento para la purificación enzimática.....	35
Diagrama de flujo 4. Procedimiento para la inmovilización enzimática.	36
Diagrama de flujo 5. Procedimiento para la determinación de proteínas por el método de BCA.....	37
Diagrama de flujo 6. Procedimiento para la determinación de la actividad enzimática.....	38
Diagrama de flujo 7. Hidrólisis de la lactosa de la leche con la enzima inmovilizada y recuperación.	40
Diagrama de flujo 8. Muestras de leche y bebidas a base de soya estudiadas.	41
Diagrama de flujo 9. Determinación de extracto seco.....	43
Diagrama de flujo 10. Procedimiento para la determinación de color.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

GOS	Galactooligosacáridos
RM	Reacción de Maillard
BCA	Ácido bicincónico
λ	Longitud de onda
HMF	Hidroximetilfurfural
CV	Agitación convencional
US	Ultrasonidos
o-NPG	Ortonitrofenil-galactopiranosido
TGA	Análisis termogravimétrico
LEC	Leche entera comercial

AGRADECIMIENTOS

Como primera medida quiero agradecer a Dios, por permitirme culminar esta etapa de mi vida. A mis padres, los cuales me han brindado su apoyo incondicional y han permitido que pueda llegar alcanzar una nueva meta en mi vida, ellos son mi pilar y mi fuerza para salir adelante. Agradezco inmensamente a mi hermana, quien ha sido mi amiga, mi compañera y a quien adoro con toda mi alma.

Quiero agradecer a mi directora Maite Rada, quien con sus consejos me ha permitido culminar este trabajo de investigación, como también al profesor Alfonso Ramírez, que confió en mí desde el primer momento y hace parte de los codirectores del desarrollo de esta investigación.

A las Dras. Mar Villamiel y Antonia Montilla, que me brindaron un espacio en su grupo para llevar a cabo mi investigación, pero más que ello, fueron unas personas incondicionales, ya que desde que empecé este trabajo han estado todo el tiempo brindándome su apoyo y conocimiento.

Mis amigos y hermanos, Ingry, Laura, Johana, Juan David C., Jairo, Alejandro, Diego, Juan David M., que estuvieron todo el tiempo a mi lado, que los quiero con todo mi corazón y los llevo por siempre presentes.

A mis amigos, compañeros de clase y de laboratorio, que en estos últimos años han estado todo el tiempo a mi lado, Diana, Carolay, Lucía, Omar, Yeison, Hernán, quiero darles gracias porque sus consejos han sido para mí de gran ayuda.

A mis profesores que fueron los encargados de formarme como una profesional y a mis jurados Diana Chito y Germán cuervo, que fueron de gran ayuda para culminar este trabajo.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Directora

Firma de jurado

Firma de jurado

RESUMEN

El objetivo general de este trabajo de investigación, fue la inmovilización de la enzima β -D-galactosidasa en un soporte mesoporoso de óxido de silicio MCM-41, con características diferentes en cuanto a tamaño de poro y área específica. El proceso de unión se llevó a cabo mediante enlace covalente con glutaraldehído y aminopropiltrióxido de silano. Se utilizó el reactivo de ortonitrofenil-galactopiranosido (O-NPG) que mediante un método espectrofotométrico permitió medir la actividad de la enzima inmovilizada, cuyo valor es muy similar a la actividad de la enzima libre, por lo que se concluye que el proceso de inmovilización en las condiciones efectuadas no causó daños al sitio activo de la enzima.

La evaluación de la eficiencia de la inmovilización y deslactosilación de muestras de leche entera comercial, se verificó mediante la cuantificación de los carbohidratos presentes antes y después de la inmovilización, utilizando la técnica de CLAR, donde se realizó la hidrólisis durante 8 horas a 20°C y arrojó valores superiores al 90%. Adicionalmente, se realizó la estimación del contenido de galactooligosacáridos (GOS), que se forman durante la hidrólisis de la leche entera con el uso de la inmovilizada y se obtuvo un porcentaje de GOS aproximadamente del 14% en las muestras hidrolizadas durante 8 horas y 20°C.

Posteriormente se realizó un análisis de la calidad de once muestras comerciales, mediante la cuantificación del contenido de carbohidratos por cromatografía de gases y proteínas por el método de Kjeldahl, donde nueve son muestras de leche deslactosada y tres son de bebidas a base de soya. Las muestras de bebida de soya presentaron valores adecuados de proteínas y carbohidratos, al igual que las muestras de leche, a excepción de la muestra de leche Lk, cuyo valor de proteínas se encuentra por debajo de los límites establecidos por las normas colombianas. Posteriormente, se evaluó el avance de reacciones de Maillard en las muestras, identificando la formación de furosina y HMF, los cuales son más altos en muestras de leche en polvo, debido a los procesos de preparación. Estos análisis nos proporcionaron información complementaria, que puede ser tomada en cuenta para la determinación en las muestras hidrolizadas con la enzima inmovilizada.

INTRODUCCIÓN

La leche es un fluido complejo en el que se han encontrado más de 100 compuestos químicos diferentes, por lo que es un alimento excepcionalmente completo y presenta importantes niveles de vitaminas, proteínas, carbohidratos y un alto contenido de agua. Su composición varía ligeramente con las especies de animales, siendo la lactosa el carbohidrato mayoritario formado por glucosa y galactosa unidas por enlace β -(1-4). El contenido de lactosa en la leche humana está alrededor de 7,2 g/100 mL y en la de vaca aproximadamente 4,7 g/100 mL (Lomer, y otros, 2008).

A pesar de las ventajas de la ingesta de leche, en determinadas ocasiones puede generar algunos desórdenes digestivos debido a las deficiencias en algunas enzimas, siendo la intolerancia a la lactosa uno de los problemas gastrointestinales de mayor incidencia a nivel mundial, que conlleva a que muchos niños y adultos eviten el consumo de leche y de productos lácteos. En el intestino se encuentra la enzima lactasa, cuya función permite la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa, para que puedan ser absorbidos en el tracto digestivo. La disminución progresiva de esta enzima, luego de terminar el periodo de lactancia, afecta a casi el 70% de la población mundial y como resultado de la no hidrólisis, la lactosa llega al colon, donde produce síntomas tales como gases, hinchazón, y diarrea. Por ello, en los últimos años la leche libre de lactosa, ha incrementado su popularidad y consumo en muchos países (Lomer, y otros, 2008; Ruiz-Matute, y otros, 2012).

La hidrólisis de la lactosa es importante para la industria alimentaria al posibilitar, la asimilación de los alimentos que originalmente la contienen por parte de las personas intolerantes a la misma. Por otra parte presenta ventajas tecnológicas y ambientales al facilitar la obtención de ingredientes funcionales como los galactooligosacáridos (GOS). Con estos fines, se han venido utilizando una enzima hidrolítica llamada β -D-galactosidasa, conocida comúnmente como lactasa. El uso de la β -D-galactosidasa, como enzima terapéutica para hidrolizar la lactosa presente en los productos lácteos, se ha convertido en el instrumento que alivia los síntomas de la intolerancia; adicionalmente, son utilizadas para tratar a los bebés con deficiencia genética de lactasa intestinal, aumentando así, la aceptación por parte del consumidor (Lal Verma, y otros, 2012; Seok, y otros, 2010).

Pero se debe tener en cuenta que debido al elevado costo de la enzima, se hace necesaria su reutilización, con el fin de evitar el desecho y pérdida durante el primer proceso de hidrólisis, por lo que la inmovilización, se ha convertido en un proceso económicamente rentable para la elaboración de alimentos, productos farmacéuticos, entre otros productos biológicamente importantes (Aravind y Mulimani, 2008; Giacomini, y otros, 1998).

Cuando se inmovilizan las enzimas por acoplamiento a un soporte sólido adecuado, el biocatalizador resultante, puede ser reutilizado varias veces, en discontinuo, o en continuo, y así reducir los costes del proceso (Seok, y otros, 2010). Las enzimas se pueden inmovilizar por diversos métodos, entre los que se encuentran la adsorción física, la unión covalente y el atrapamiento (Sassolas, y otros, 2012). La adsorción física y el atrapamiento son considerados los métodos más sencillos en la inmovilización enzimática, sin embargo presentan algunas limitaciones: como desorción y pérdida de la enzima, lo que podría conducir a una menor estabilidad y baja actividad catalítica en la enzima. El método de unión covalente, ha sido ampliamente estudiado ya que permite una interacción fuerte entre la enzima y el soporte (Lee, y otros, 2006; Seok, y otros, 2010).

La inmovilización mediante unión covalente de la enzima β -D-galactosidasa procedente de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym), durante décadas se ha estudiado y se ha establecido su uso seguro en varias aplicaciones de la industria alimentaria, por lo que se ha utilizado ampliamente como fuente de β -D-galactosidasa (Van Ooyen, y otros, 2006).

Un gran número de soportes han sido utilizados para llevar a cabo la inmovilización de la enzima β -D-galactosidasa de forma covalente, tales como alginato de calcio, alcohol polivinílico, superficies de grafito y compuestos como óxido de silicio. La funcionalización de compuestos como óxido de silicio puede ser realizada por silanización con trialcoxisilanos que contienen un grupo funcional orgánico (Panesar, y otros, 2010). Un grupo muy utilizado en este caso es el 3-aminopropiltriétoxosilano, donde la alquilamina obtenida puede activarse con glutaraldehído y producir un derivado carbonilo activo, lo que permite la obtención de una base de Schiff, permitiendo de esta forma la unión de la enzima al soporte (Giacomini, y otros, 1998).

Otro aspecto a considerar es, que a medida que aumenta el interés de los consumidores por la leche baja en lactosa, se observa un aumento en la producción a nivel industrial, por lo que se hace necesario evaluar la calidad de éstas. En primer lugar se debe evaluar la lactosa residual presente en estas leches para comprobar que cumplen la legislación,

así como determinar la formación de galactooligosacáridos (GOS), azúcares de reconocido carácter prebiótico formados por reacciones de transgalactosilación tras la hidrólisis de la lactosa (Ruiz-Matute, y otros, 2012).

Por otra parte, al someter a los alimentos a tratamiento térmico, es posible preservarlos pero un calentamiento excesivo, puede dañar las propiedades nutricionales y organolépticas del mismo (Boscha, y otros, 2008; Rufián-Henares, y otros 2007). Las leches deslactosadas contienen mayor cantidad de monosacáridos, debido a la hidrólisis de la lactosa, lo que las hace más susceptibles al deterioro en comparación con la leche entera; esto ocurre porque los monosacáridos (glucosa y galactosa), son más reactivos que los disacáridos (lactosa) durante el desarrollo de reacciones de pardeamiento no enzimático o de Maillard (RM), generada durante el calentamiento y el almacenamiento de la leche (Rada-Mendoza, y otros, 2005; Ruiz-Matute, y otros, 2012).

Uno de los procedimientos para evaluar las primeras etapas de la RM, es la determinación de la furosina (ϵ -N- (furoilmetil) -L-lisina), un amino-ácido artificial derivado de la hidrólisis ácida de los compuestos de Amadori tales como: fructosil-lisina, lactulosil-lisina y maltulosil-lisina, producida por la reacción de los grupos ϵ -amino libre de la lisina con glucosa, lactosa y maltosa, respectivamente. El contenido de furosina proporciona una estimación de la lisina bloqueada y por lo tanto no asimilable; esta es considerada como el primer indicador más específico de la RM (Boscha, y otros, 2008).

El hidroximetilfurfural (HMF), al igual que la furosina es un indicador del deterioro de los alimentos sometidos a calentamiento excesivo, y se forma en las etapas avanzadas de la RM o también por deshidratación de las hexosas (Rada-Mendoza, y otros, 2002).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Gran parte de la población mundial presenta intolerancia a la lactosa, por lo cual, se han implementado estrategias desde la investigación y la industria que permiten a las personas consumir alimentos que en su composición original presenten este glúcido. Una de las soluciones a los problemas de intolerancia es el proceso de hidrólisis de la lactosa, que da como resultado leche deslactosada fácilmente asimilable por el organismo. El estudio de enzimas que permiten la hidrólisis, como la β -D-galactosidasa procedente de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym), se han presentado como alternativa que abarca múltiples campos de investigación (ingeniería, tecnología química, y microbiológica). Hasta el momento, la inmovilización de este tipo de enzimas presenta ciertos problemas como la pérdida de actividad o limitados reúsos, por lo que se necesita mayor investigación en esta tecnología que permita ampliamente su aplicación en la industria láctea, reduciendo costes y aportando beneficios al consumidor.

El uso de soportes mesoporosos como el óxido de silicio (MCM-41), en la metodología de inmovilización enzimática, puede permitir la obtención una enzima inmovilizada que podrá ser reutilizada, creando de esta forma, estrategias innovadoras e interesantes en la industria colombiana para las áreas de investigación y desarrollo, ya que se podrán obtener leches bajas en lactosa con un alto valor nutritivo, económicas y sin alteración de sus propiedades físicas y nutricionales.

Por otro lado, es importante realizar el estudio de la calidad de las leches deslactosadas comerciales para comprobar que los niveles residuales de lactosa son bajos y acordes a la legislación, y además al ser alimentos más susceptibles al deterioro, controlar la calidad nutricional del producto que puede repercutir en la salud de los consumidores. Por lo anterior se analizaron parámetros de calidad tales como formación de carbohidratos prebióticos (GOS), contenido de proteínas y el desarrollo de la reacción Maillard, que provoca pérdidas de aminoácidos esenciales como lisina. Los mismos parámetros de calidad se determinaron en bebidas comerciales a base de soya, ya que son comúnmente utilizadas como alternativa por personas que presentan intolerancia a la lactosa, y cuyo contenido de carbohidratos pueden ser α -galactósidos (rafinosa, estaquiosa) y otros de menor masa molecular. Los resultados del análisis de estas muestras pueden proporcionar información complementaria para los diseños metodológicos posteriores de obtención de muestras hidrolizadas con la enzima inmovilizada.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Inmovilizar la β -galactosidasa procedente de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym) por unión covalente en un sustrato inorgánico con el fin de obtener leches bajas en lactosa de alta calidad.

3.2 Objetivos Específicos

1. Sintetizar un soporte de óxido de silicio mesoporoso tipo MCM-41, con diferente tamaño de poro.
2. Caracterizar el soporte por infrarrojo, análisis termogravimétrico, análisis térmicos y de superficie e isoterms de adsorción-desorción.
3. Inmovilizar la enzima LACTOZYM (β -galactosidasa grado comercial) en el soporte de óxido de silicio MCM-41 y cuantificar su grado de inmovilización.
4. Caracterizar la enzima inmovilizada por análisis termogravimétrico.
5. Aplicar la enzima inmovilizada para la hidrólisis de muestras de leche entera UHT comercial y cuantificar por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) el contenido en carbohidratos antes y después de la hidrólisis.
6. Determinar el contenido de carbohidratos en muestras comerciales de leche UHT deslactosada y en bebidas a base de soya, mediante cromatografía de gases (CG).
7. Determinar por CLAR el contenido en furosina y HMF (indicadores de las primeras etapas de la reacción de Maillard) en muestras comerciales de leche UHT deslactosada y bebidas a base de soya.

4. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

4.1 Leche

La leche se define como la secreción láctea prácticamente libre de calostro, obtenida por ordeño completo de una o más vacas sanas, que contiene no menos de 8,25% de sólidos lácteos no grasos y no menos del 3,25% de grasa (Diagrama de flujo 1). En su composición, las caseínas representan aproximadamente el 80% de las proteínas y las restantes se clasifican como proteínas del suero (Chandan, 2011). La lactosa es el principal componente presente en la leche, cuyo valor oscila entre 4,5 y 4,9%. Está presente en dos formas (α y β), que difieren en su dulzura y solubilidad. La mutarrotación permite que se alcance una mezcla en equilibrio de α y β -lactosa, que le otorga una solubilidad de 170 g/L en agua (Chandan, 2011).

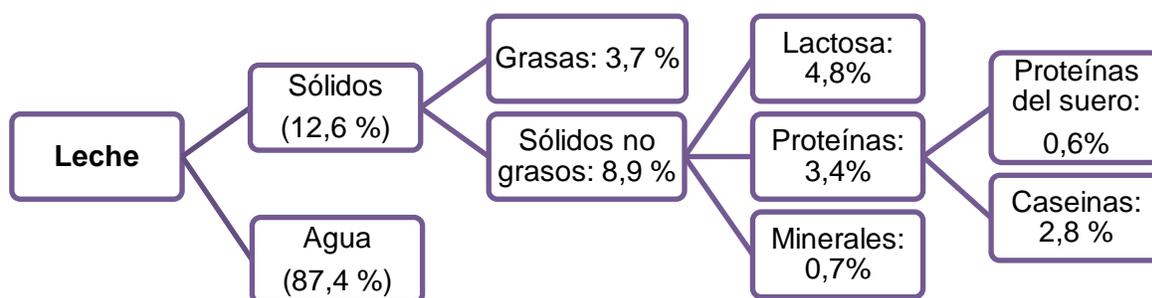


Diagrama de flujo 1. Composición general de la leche. [Adaptado de Chandan, 2011]

Los expertos en nutrición, consideran que la leche es un alimento excepcionalmente completo, ya que en la solución verdadera, contiene lactosa, vitaminas, ácidos, enzimas y algunas sales inorgánicas; en la fase coloidal contiene caseína, fosfato de calcio y las proteínas globulares, mientras que la grasa se encuentra en forma de emulsión (Chandan, 2011).

La lactosa, 4-O-(β -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa), es una hexobiosa de fórmula condensada $C_{12}H_{22}O_{11}$, con un peso molecular de 342 g/mol. Los dos isómeros (α y β), se diferencian únicamente en la posición del grupo $-OH$ del carbono C1 de la glucosa (isomería ciclánica). Por lo tanto, la lactosa está formada por la unión de una molécula de β -galactosa, por el grupo aldehído del C1 y una molécula de glucosa α o β , por el C4 quedando en ésta el grupo aldehído libre (en forma pseudo-aldehídica) lo que le confiere

carácter reductor a este disacárido (Corral, 2005; Mammarella, 2001). A pesar de su alto valor nutritivo, la lactosa tiene como desventaja, que no puede ser absorbida directamente por el organismo, por lo que debe ser hidrolizada en el intestino delgado, por la acción de una β -D-galactosidasa, para permitir la absorción de los productos de la hidrólisis; la actividad de esta enzima se pierde poco a poco, luego de la etapa de lactancia, generando de esta forma intolerancia o mala absorción, convirtiéndose en un problema en busca de solución por parte de la sociedad, pues se estima que más del 70% de la población adulta lo padece en distinto grado (Oliveira, y otros, 2011).

4.2 Enzimas β -d-galactosidasas

Las enzimas β -D-galactosidasas (EC 3.2.1.23), también conocidas como lactasas, son enzimas hidrolíticas, que se caracterizan por actuar como catalizadores en la hidrólisis del extremo no reductor de la lactosa (Figura 1). Aunque la aplicación principal a nivel industrial, es la hidrólisis de la lactosa en la leche o en productos derivados, esta enzima bajo ciertas condiciones cataliza la formación de galactooligosacáridos (GOS), por medio de reacciones de transgalactosilación llegando a obtenerse rendimientos superiores al 40% de GOS en el contenido total de azúcar en la solución, dependiendo de la fuente de la enzima y de las condiciones aplicadas (Figura 2).

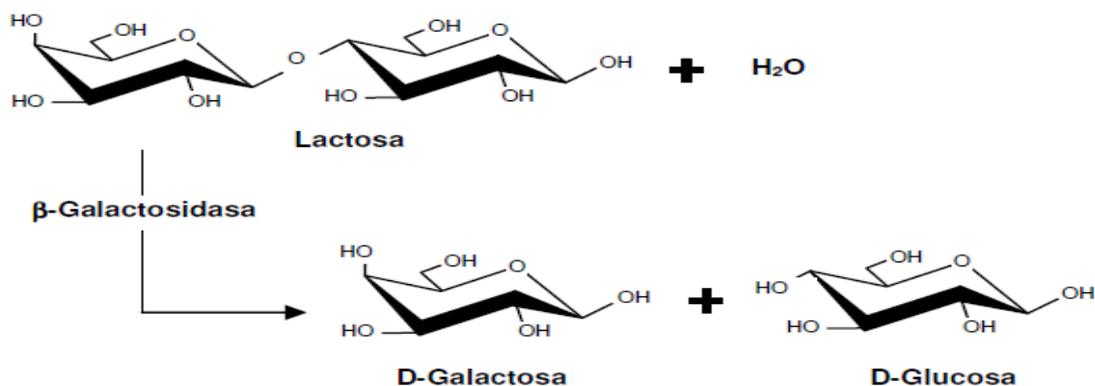


Figura 1. Reacción de hidrólisis de la lactosa con la enzima β -D-galactosidasa.

Actualmente, existe un gran interés en estos procesos de transgalactosilación para la generación de GOS, ya que estos oligosacáridos, de calidad alimentaria, se consideran prebióticos (Ruiz-Matute, y otros, 2012). Esta reacción puede ser modulada por cambios en la concentración de lactosa, pH y la temperatura del medio de reacción.

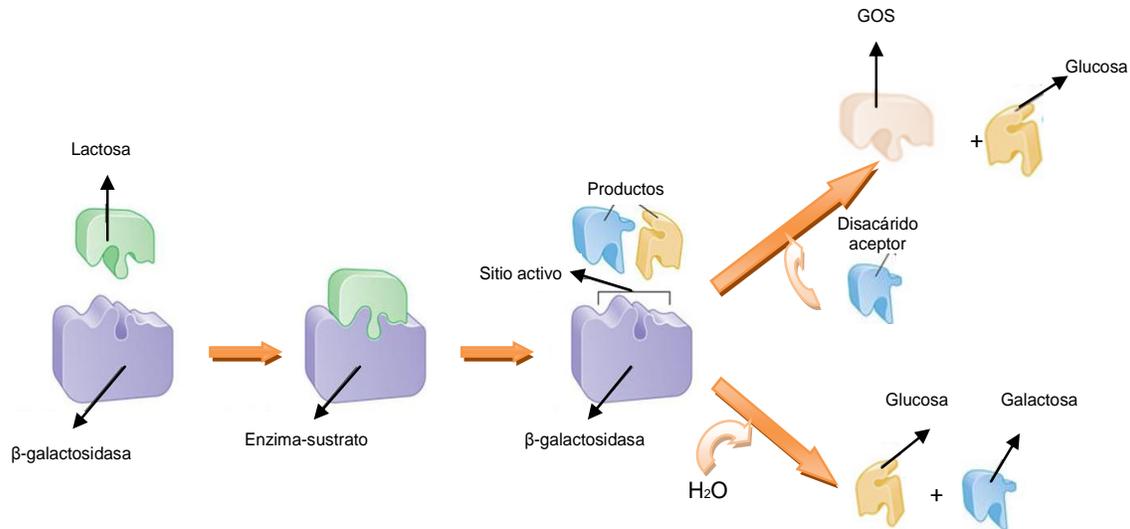


Figura 2. Formación de GOS por transgalactosilación e hidrólisis de lactosa. [Adaptado de Guío, (2014)].

Las β -D-galactosidasas usadas a nivel industrial se caracterizan por su fácil obtención de forma natural a partir de diversas fuentes microbianas, sus buenos rendimientos y alta seguridad para el consumo humano; generalmente, son sintetizadas a partir de *Aspergillus spp.* y *Kluveromyces spp.* (Ansari, y otros, 2013; Oliveira, y otros, 2013).

Estas enzimas son de gran interés biotecnológico en la industria alimentaria, siendo por ejemplo las levaduras, las productoras de gran cantidad enzimas con actividad elevada. El problema de su uso radica en su naturaleza intracelular, lo que hace que el proceso sea más costoso por las limitaciones en su extracción. En la levadura, la lactosa es transportada al interior de la célula por una permeasa e hidrolizada intracelularmente a glucosa y galactosa, y siguen la vía glucolítica o de Leloir. Se han implementado dos estrategias para su secreción: 1. uso de cepas de levadura con la capacidad de lisis espontánea; 2. secreción de secuencias heterólogas de señal para la producción extracelular (Oliveira, y otros, 2013).

4.2.1 Mecanismo de acción de las β -D-Galactosidasas en la hidrólisis de lactosa.

El mecanismo general propuesto para la hidrólisis de la lactosa, se observa en la Figura 3, aunque no se conoce por completo, parece funcionar de un modo análogo a la lisozima. En esta reacción intervienen principalmente dos aminoácidos que actúan uno como ácido/base y otro como nucleófilo. Secuencialmente se tiene: A) El aminoácido ácido/base actúa como ácido y dona un protón al oxígeno glicosídico de la molécula de lactosa, y por

otro lado, el residuo de galactosa se une a la enzima a través del aminoácido que actúa como nucleófilo. B) El complejo enzima-galactosa reacciona con una molécula de agua de modo que el aminoácido ácido/base actúa ahora como base aceptando un protón del agua. C) La galactosa es liberada, y se regenera el centro activo a su estado inicial (Corral, 2005). En el proceso de transgalactosilación el complejo enzima-galactosa reacciona con una molécula de carbohidrato (lactosa, glucosa, galactosa o GOS).

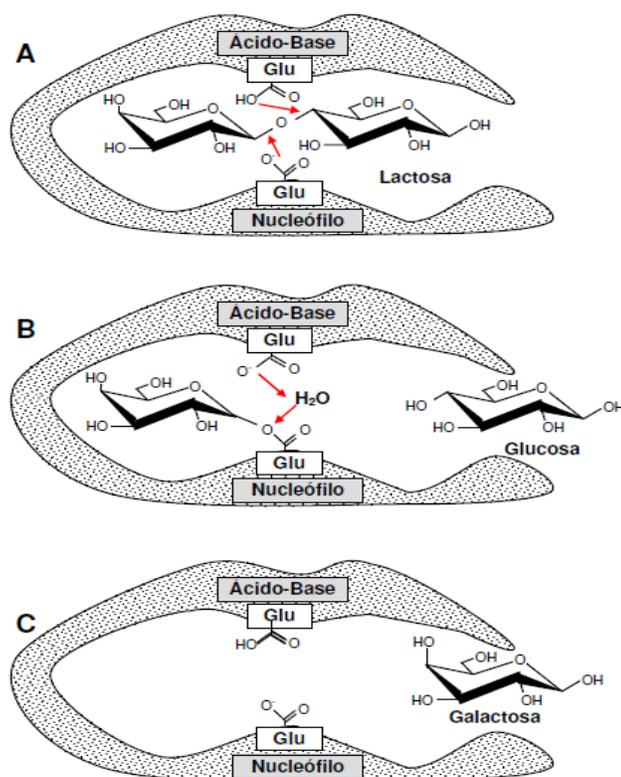


Figura 3. Mecanismo de acción de las β-D-galactosidasas. [Tomado de Corral, (2005)].

Diversos estudios han logrado establecer, que los dos aminoácidos directamente implicados en el proceso enzimático y son el Glu-461 (ácido glutámico, posición 461 de la cadena polipeptídica), que actúa como donador del protón, y el Glu 537 (ácido glutámico, posición 537 de la cadena polipeptídica), que actúa como nucleófilo (Corral, 2005).

4.3 Soporte mesoporoso

Los materiales conocidos como mesoporosos, son sólidos inorgánicos con un diámetro de poro de 2 a 50 nm, con diversas propiedades en cuanto a su forma, morfología y composición; generalmente son óxidos como SiO₂, Al₂O₃, TiO₂ y ZrO₂, con una estructura habitualmente cúbica o hexagonal. Los materiales de óxido de silicio han sido los más estudiados para los procesos de inmovilización enzimática. La formación de estos

materiales mesoporosos puede darse, como se puede ver en la Figura 4, mediante un auto-ensamblaje de tipo inorgánico-orgánico en el que se produce una unión entre un tensioactivo llamado plantilla y un compuesto inorgánico, conocido como precursor; en el proceso de síntesis, la plantilla forma micelas en solución acuosa (Figura 4, a), antes de la adición del precursor (Figura 4, b). El precursor es hidrolizado, luego se genera la condensación y polimerización y de esta forma se llega a una red orgánica alrededor de la plantilla auto-ensamblada (Figura 4, c). Luego de que la reacción se ha completado, el material formado puede ser tratado hidrotérmicamente para una posterior reticulación, ajuste del diámetro de poro y de partícula de crecimiento. Al obtener el material híbrido orgánico-inorgánico, la plantilla de tensioactivo se elimina por calcinación o extracción, generando un material mesoporoso (Figura 4, d) (Carlsson, y otros, 2014).

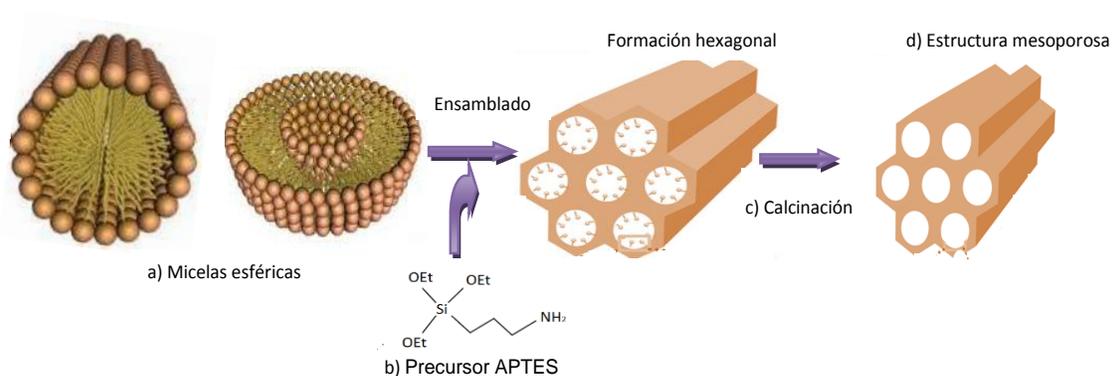


Figura 4. Pasos para la preparación de soportes mesoporosos.

Durante la inmovilización de enzimas, se puede trabajar con diversos materiales mesoporosos, por ejemplo el M41S, que es un grupo de materiales preparados a partir de plantillas de tensioactivos catiónicos con cadenas alquilo que varían de 8 a 22 átomos de carbono; a esta familia pertenece el MCM-41 (mobil composition of matter No. 41), con poros ordenados de forma hexagonal de diámetro entre 3-10 nm (Carlsson, y otros, 2014). El MCM-41 es un material a base de óxido de silicio, con gran área superficial, y poros de diverso tamaño, estructura y volumen, lo que le confiere a este tipo de compuestos, gran utilidad como soportes.

4.3.1 Técnicas de caracterización del soporte mesoporoso:

4.3.1.1 Espectrometría de absorción en el Infrarrojo (IR)

Esta técnica utilizada para la identificación de compuestos mediante la frecuencia de vibración de los enlaces químicos. La espectroscopia infrarroja es una técnica de gran utilidad en la caracterización de materiales mesoporosos ya que confirma la efectividad de los procesos de extracción realizados para la eliminación del surfactante, y permite dar información acerca de los grupos Si-O presentes (Esquivel, 2011). La región de infrarrojo medio, se encuentra aproximadamente entre 670 y 4000 cm^{-1} , y suele ser utilizada para la determinación de los picos más relevantes en los soportes de sílice mesoporosa.

4.3.1.2 Análisis térmico diferencial (ATD)

Es una técnica de análisis térmico en la que se determina la pérdida o ganancia de masa de una muestra en función de la temperatura del ambiente que la rodea. Este proceso permite realizar el estudio del soporte y la determinación de la cantidad de enzima presente luego de la inmovilización. Los cambios de energía que ocurren en la muestra durante el calentamiento (en forma de curva ATD) son claramente observables, siempre que la sensibilidad sea adecuada. El área del pico en la curva de flujo de calor refleja la energía implicada (Esquivel, 2011).

4.3.1.3 Isotermas de adsorción-desorción de N_2 .

La adsorción, se caracteriza por ser un fenómeno por el cual un líquido o un gas (adsorbato) se acumula en la superficie de un sólido (adsorbente). Dependiendo de la naturaleza y propiedades de la interacción adsorbato-adsorbente, esta puede ser clasificada como fisisorción o quimisorción, aunque la fisisorción se produce siempre. Debido a que el calor de adsorción es pequeño (del orden del calor de vaporización del adsorbato), las especies adsorbidas mantienen su estructura electrónica al ser un proceso que no necesita de energía de activación, presenta una resultante de las fuerzas no nula, dirigida hacia el interior que se denomina fuerza de cohesión que son responsables de la fisisorción en los sólidos; en la quimisorción la especie adsorbida (quimisorbida) da lugar a una especie química distinta. La fisisorción de gases es una técnica muy utilizada en la caracterización de sólidos ya que informa acerca de las características texturales de la superficie externa e interna de los materiales. Los adsorbatos más utilizados son nitrógeno y argón.

Por otra parte es usual caracterizar la estructura porosa de los sólidos, con independencia de su composición química, por parámetros como: *superficie específica* (m^2/g) equivalente a la extensión geométrica de la superficie de las paredes de los poros por gramo de sólido adsorbente; volumen acumulado de poros, V_p (mL/g) que equivale al volumen total de poros por gramo de adsorbente y diámetro medio de poro, (Å) (Esquivel, 2011).

4.4 Inmovilización enzimática

El uso de las enzimas como catalizadores biológicos, se ha generalizado en diferentes procesos químicos industriales, debido a su excelente actividad, selectividad y especificidad, sin embargo, debido a su alta solubilidad en agua, su reúso se dificulta, lo que impide su viabilidad económica, generando una alta problemática a nivel industrial. Por ello, se hace necesario innovar en diferentes campos de investigación para implementar procesos de inmovilización que permitan el reúso de las enzimas.

Las enzimas presentan diversas propiedades bioquímicas, las cuales deben ser tenidas en cuenta durante el proceso de inmovilización, entre ellas, su pureza, masa molecular y los grupos funcionales que se encuentran en su superficie. Conociendo estas características, se pueden plantear hipótesis sobre la unión del enzima al soporte, y del efecto de las impurezas que pueden interactuar en el proceso. También se debe tener en cuenta el uso de solventes, pH y temperatura del mismo, debido a que pueden afectar de manera importante a la interacción enzima-soporte. Las características del soporte como estructura, porosidad, distribución del tamaño de poro, también influyen en las propiedades de la enzima inmovilizada, por ejemplo, un tamaño de poro pequeño, puede causar limitación en la difusión, generando reordenamiento estructural de las enzimas y la posterior inactividad; sin embargo, para los tamaños de poro muy grandes, las enzimas pueden agruparse y perder actividad (Miletic, y otros, 2012; Sassolas, y otros, 2012).

4.4.1 Mecanismos de inmovilización

La inmovilización enzimática se puede producir por adsorción, unión covalente, atrapamiento, entrecruzamiento, afinidad o combinación entre estos tipos de inmovilización. Escoger el método adecuado, es muy importante y depende de diversas consideraciones como son la naturaleza de la enzima, su sensibilidad, actividad y

estabilidad, así como el coste y dificultad del proceso (Sassolas, y otros, 2012). Algunas características de estos métodos se describen a continuación:

Adsorción: La ventaja de este proceso es su sencillez y que el soporte puede ser regenerado, al presentar uniones débiles, tales como fuerzas de van der Waals, electrostáticas y/o interacciones hidrofóbicas; presenta desventajas debido a su baja estabilidad ante factores como cambios en la temperatura y el pH.

Reticulación: Se realiza con glutaraldehído u otros agentes bifuncionales, tales como glioxal ó hexametildiamina. La enzima puede ser reticulada con otras enzimas o en presencia de una proteína funcionalmente inerte, como albúmina de suero bovino. En este proceso, se encuentra como ventaja la alta estabilidad, pero la enzima inmovilizada presenta baja actividad.

Afinidad: Se controla la orientación de la biomolécula para evitar la desactivación de la enzima y/o el bloqueo del sitio activo. Las enzimas pueden ser inmovilizados por medio de enlaces de afinidad entre un grupo funcional del soporte (avidina, lecitina, metal quelatos) y un grupo específico (biotina, carbohidratos, histidina) presente en la enzima (Miletic, y otros, 2012; Sassolas, y otros, 2012). En este caso la regeneración del soporte es posible pero, la estabilidad de la enzima es muy baja.

Atrapamiento: Las enzimas se inmovilizan en matrices tridimensionales tales como una película electroquímica, gel de sílice, o un polisacárido. Una ventaja de este proceso es que no se modifica la enzima, por lo que no hay pérdidas en su actividad, lo cual es una gran ventaja, aunque la recuperación del soporte es imposible (Miletic, y otros, 2012; Sassolas, y otros, 2012).

Inmovilización covalente: en este método, los biocatalizadores se unen a la superficie del soporte través de los grupos funcionales que contienen y que no son esenciales para su actividad catalítica. La unión de las enzimas al soporte sólido, es generalmente realizada por la activación inicial de la superficie con reactivos que son multifuncionales (de entrecruzamiento); posteriormente se acopla la enzima al soporte activado, y se elimina el exceso de enzimas no inmovilizadas. El soporte puede ser un material inorgánico (óxido de silicio), orgánico natural (celulosa) o un polímero sintético como el nylon. En este tipo de inmovilización, los enlaces químicos formados pueden modificar de forma importante la estructura de la enzima y provocar la pérdida de actividad de la misma con respecto a la actividad de la enzima en disolución. Al mismo tiempo se logra una estructura más rígida y estable, ya que los nuevos enlaces son fuertes. De hecho, es de esperar que la estructura proteica de la enzima inmovilizada, sea distinta a la estructura

de la enzima libre, ya que ciertas estructuras internas de la enzima quedarían estabilizadas. Este tipo de inmovilización presenta grandes ventajas, como la alta estabilidad y actividad enzimática menos afectada que en otros procesos, aunque tiene un alto coste y no se puede regenerar el soporte (Miletic, y otros, 2012; Sassolas, y otros, 2012).

En líneas generales el proceso de inmovilización presenta muchas ventajas, como (i) aumento de la actividad de la enzima en disolventes orgánicos; (ii) una mayor termoestabilidad; (iii) una notable estabilidad a largo plazo; (iv) aumento de la enantioselectividad; (v) facilidad de recuperación de la enzima después de la reacción y parada de la misma por filtración o centrifugación; (vi) reutilización de las enzimas (Ferrer, y otros, 2000; Miletic, y otros, 2012).

El proceso de inmovilización covalente puede llevarse a cabo mediante el uso de agitación magnética con la cual, la enzima puede interactuar de forma directa con el soporte, generando mayores posibilidades de unión. Otra posibilidad sería sustituir esta forma de agitación por el uso de ultrasonidos como medio de agitación, la acción de las ondas que interactúan con la enzima y el sustrato podrían generar una mayor interacción entre estos.

4.4.2 Evaluación del proceso de inmovilización

Una vez llevado a cabo el proceso de inmovilización se debe evaluar su eficacia. Esto se puede realizar con un análisis de la proteína inmovilizada y de las actividades que presenta la enzima después del proceso, debido a que durante la inmovilización no toda la proteína se fija y el cambio conformacional del enzima puede provocar pérdidas de actividad enzimática. Ambos parámetros pueden variar con el tipo y la forma de realizar la inmovilización.

4.4.2.1 Determinación de Proteína con el método del ácido bicinónico (BCA).

La determinación de la cantidad de proteína en la enzima libre e inmovilizada se realiza por el método de BCA. Este procedimiento fue desarrollado por Smith, y otros, 1985, y se presenta mediante la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+} por proteínas en un medio alcalino (reacción de Biuret) con la alta sensibilidad y selectividad de la determinación colorimétrica de iones de cobre usando el ácido bicinónico. La interacción de dos

moléculas de BCA con un ión de Cu^+ genera un producto de coloración púrpura, soluble en agua y que absorbe a una longitud de onda de 550 nm.

4.4.2.2 Determinación de actividad enzimática con ortonitrofenil galactopiranosido (o-NPG).

La actividad de la enzima puede disminuir en el proceso de inmovilización, esto es debido a las reacciones que se producen entre el centro activo de la enzima y el soporte, lo que reduce la posibilidad de hidrólisis. Para cuantificar esta inactivación, se realiza la determinación de la actividad en la enzima libre y soportada utilizando el sustrato O-NPG en el caso de las enzimas β -D-galactosidasa.

Durante el procedimiento, la enzima β -D-galactosidasa se encarga de la hidrólisis del extremo no reductor, de la β -D-galactosa; liberándose también el orto-nitrofenol (Figura 5), que presenta una coloración amarilla y puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda (λ) de 410 nm. El mecanismo de esta reacción es similar al de la hidrólisis de la lactosa.

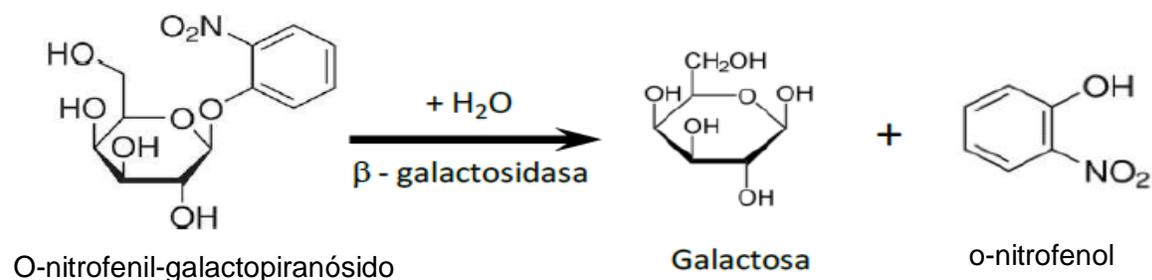


Figura 5. Reacción de obtención de o-nitrofenol con la enzima β -D-galactosidasa.

4.5 Estudio de la calidad de leches bajas en lactosa y bebidas a base de soya comerciales

Cada vez se encuentra en el mercado mayor variedad de bebidas lácteas deslactosadas y otras a base de granos como la soya o el arroz, que algunas veces son catalogadas como leche, y son utilizadas por muchas personas que presentan problemas de intolerancia a la lactosa, como una alternativa a la leche y a los derivados lácteos, pero estos productos no deben ser considerados como leche. Para conocer el estado actual del sector de “bebidas sin lactosa” en Colombia, es necesario hacer un estudio prospectivo de los productos de

mayor consumo. En el caso de los productos no lácteos se comparará su calidad con la de las leches.

En general estos productos sin lactosa presentan alta calidad nutricional y son estas propiedades beneficiosas las que hacen que puedan crecer gran número de microorganismos patógenos y no patógenos, que contribuyen a su deterioro. Para evitarlo es muy importante someter estos productos a procesos térmicos adecuados, con los cuales se pueda aumentar su tiempo de vida útil. Sin embargo, estos procesos, dependiendo de su intensidad, pueden generar cambios en las propiedades nutricionales y organolépticas de la leche.

Debido a lo anterior, luego de los tratamientos térmicos, es necesario realizar un control de la calidad del producto final obtenido, empleando para ello indicadores químicos adecuados, que son compuestos que pueden estar o no presentes inicialmente en el alimento, y cuya concentración varía dependiendo de las etapas y procesos a los que debe ser sometido

4.5.1 Presencia de indicadores químicos por la reacción de Maillard

Durante el procesado los alimentos que contienen proteínas, péptidos o aminoácidos libres y azúcares reductores, pueden verse afectados en distinta medida por la llamada reacción de pardeamiento no enzimático, concretamente de Maillard (RM). En esta reacción, pueden generarse una gran cantidad de compuestos responsables del color, sabor, y cambio del valor nutricional de los alimentos y que pueden ser utilizados como indicadores químicos en la industria alimentaria. Durante las primeras etapas de la RM, los compuestos ampliamente utilizados como indicadores químicos para los alimentos mínimamente procesados son los compuestos de Amadori, debido a que son muy sensibles (Sanz, y otros, 2003).

Por lo general, los compuestos de Amadori originados comúnmente son los derivados de la reacción entre el azúcar reductor (glucosa o lactosa) y el grupo ϵ -amino libre de la lisina ligada a una proteína, que da como resultado los compuestos fructosil-lisina y lactulosil-lisina, respectivamente. Los compuestos de Amadori son difíciles de determinar directamente por lo que debe realizarse un proceso de hidrólisis ácida, la cual origina 2-furoil-metil derivados, en este caso el 2-furoilmetil-lisina (2-FM-Lys, furosina), que puede ser fácilmente determinado por métodos cromatográficos (Rada-Mendoza, y otros, 2002). Se ha observado tras diferentes estudios que el contenido de furosina incrementa linealmente durante la fase inicial de la RM y disminuye en etapas más avanzadas (Sanz, y otros, 2003).

En las etapas intermedias y finales de la RM se forman, entre otros compuestos Hidroximetilfurfural (HMF) y melanoidinas respectivamente los cuales son de gran utilidad en aquellos alimentos que son sometidos a procesos energéticos fuertes o daño térmico ya que muy altos valores de HMF o presencia de melanoidinas indican que el alimento ha sufrido un gran deterioro.

La presencia de furosina también indica un deterioro de la calidad de la leche y su valor nutricional, al ser una medida indirecta del bloqueo y destrucción de la lisina, un aminoácido esencial, lo que conduce a una menor biodisponibilidad. Este deterioro puede ser más o menos importante, los cambios a nivel organoléptico y generación de sustancias tóxicas en los alimentos se producen en etapas más avanzadas de la RM (De Block, y otros, 2003). Entre los productos lácteos los más sensibles a la RM son los productos en polvo como leche, fórmulas infantiles, debido a la gran cantidad de lactosa y proteínas y especialmente a la forma de elaboración, ya que durante su fabricación se somete a temperaturas elevadas con actividades de agua entre 0,6 y 0,3, condiciones en las que la RM se ve favorecida (Gonzales y Catello, 2000).

De esta forma, en las muestras de leche en polvo almacenadas en condiciones extremas de temperatura y/o a_w , puede producirse un mayor desarrollo de la RM, que afecta a las propiedades químicas y físicas de las muestras. En las etapas avanzadas de la RM las melanoidinas formadas, aportan una coloración oscura que puede determinarse por la medida del color, que se realiza por medición espectrofotométrica a una λ de 420 nm.

Cabe destacar que las muestras de leche bajas en lactosa, presentan un aumento en la RM, esto debido a los monosacáridos formados luego de la hidrólisis son más reactivos que la lactosa.

4.5.2 Parámetros utilizados para la caracterización química de muestras comerciales

4.5.2.1 Actividad de agua (a_w)

El concepto de la actividad de agua (a_w) presentado por Scott (1957), es la expresión más útil de la disponibilidad de agua para el crecimiento microbiano, la actividad enzimática y las reacciones químicas (Vesterlund, y otros, 2012). Este parámetro puede afectar el desarrollo de la RM; se estima que esta reacción se ve favorecida cuando los valores de a_w están entre 0,6-0,9. A menor actividad de agua, hay menor movilidad de los sustratos,

pero si es muy elevada, los reactivos sufren una dilución en el medio. La a_w tiene relación con el agua libre en el producto (agua no ligada a moléculas de los alimentos) que está disponible para el crecimiento microbiano y como solvente de los sustratos que intervienen en reacciones químicas o enzimáticas. En general, los alimentos frescos y húmedos tienen un valor de a_w de hasta 0,99, los frutos secos de 0,4 y los alimentos en polvo (leche y café instantáneo) de 0,2. Cuanto menor es la actividad del agua, mejor es la estabilidad del producto alimenticio, pero incluso con a_w menores a 0,1, la oxidación de lípidos de membrana se produce aunque muy lentamente (Verterlund, y otros, 2012).

4.5.2.2 Proteínas Kjeldahl

La determinación de la cantidad de proteínas en las muestras de leche y bebida a base de soya, permite saber si cumplen la legislación establecida para este tipo de productos. El método Kjeldahl es el más utilizado para la determinación de nitrógeno proteico en muestras y establece la cantidad de proteínas totales, por medio de una determinación cuantitativa del contenido total de nitrógeno. El contenido de proteínas se calcula utilizando diferentes factores multiplicadores adecuados para los diferentes tipos de muestras ya que dependen de las secuencias de aminoácidos de las diferentes proteínas. En el método Kjeldahl se añade sulfato de potasio, con el fin de aumentar el punto de ebullición del medio, y catalizadores (óxido mercúrico y sulfato de cobre), que aceleran la digestión de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico. De esta forma se transforma el nitrógeno orgánico en sulfato de amonio; esta solución digerida se destila con hidróxido de sodio, que convierte el amonio en amoníaco. El amoníaco es atrapado en una solución ácida, por ejemplo, 4% (w/v) de ácido bórico, y se determina por titulación. Aunque el método es exacto, reproducible y se ha utilizado para la normalización de otros métodos, presenta inconvenientes tales como la necesidad de utilizar ácido sulfúrico concentrado a alta temperatura y el tiempo de digestión relativamente largo (una hora o más) (Junsomboon, y otros, 2008; Lima, y otros 1999).

4.5.2.3 pH

Esta determinación permite establecer las características de una muestra y las posibles adulteraciones a las que puede ser sometida, si los valores encontrados son diferentes a los establecidos por las normas. Estas propiedades varían dependiendo el tipo de leche y sobre todo pueden darnos idea si hay una contaminación bacteriana que haría que el pH de la muestra disminuyera. Condiciones como el pH afectan la calidad de la muestra.

4.5.2.4 Extracto seco

Una cantidad inadecuada de extracto seco puede indicar un posible aguado, por lo que es muy importante realizar un estudio de este parámetro.

4.5.2.5 Carbohidratos

La leche hidrolizada presenta una composición en carbohidratos completamente distinta a la leche entera, además de presentar niveles muy bajos en lactosa y muy altos en glucosa y galactosa, puede presentar una cantidad variable de GOS formados por la acción de la enzima en el proceso de hidrólisis. Los GOS, son carbohidratos formados por la unión de un número variable de moléculas de galactosa a una molécula de lactosa. Se encuentran incluidos dentro del grupo de los llamados oligosacáridos no digeribles, que son resistentes a la hidrólisis, por enzimas digestivas gastrointestinales de humanos, por lo que alcanzan intactos el intestino y se consideran prebióticos (Cardelle, 2007). La característica que hace que los GOS presenten un mayor valor comercial y que se les incluya en el grupo de los llamados prebióticos, es que pueden ser fermentados por las bacterias del colon, especialmente bífidobacterias y lactobacilos, dando lugar a la formación de gases (CO₂, H₂, CH₄), ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta, lo que genera una bajada en el pH del intestino grueso (Cardelle, 2007). Los beneficios para el organismo, se deben a que se constituye en un medio apto para el desarrollo de la flora bifidogénica (fermentativa) y limita el crecimiento de bacterias consideradas patógenas (putrefactivas). Algunos de los ácidos grasos volátiles que se forman se absorben y posteriormente se oxidan en las células del colon, hígado y tejidos periféricos (músculo y tejido adiposo) (Cardelle, 2007; Corral, 2005), por lo cual, estos compuestos tienen efectos sistémicos beneficiosos para el huésped.

Los carbohidratos presentes en bebidas a base de soya son fructosa, galactosa, glucosa, sacarosa y α -galactósidos, de los que existen importantes indicios de actividad prebiótica. Los α -galactósidos están formados por una sacarosa a la que se unen por enlaces α 1 \rightarrow 6 una o más galactosas, [α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)]_n- α -D-Glup-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fruf], siendo n=1 rafinosa, n=2 estaquiosa, son por tanto, azúcares no reductores que no van a participar en la RM. Además de estos azúcares también hay importantes cantidades de polialcoholes, compuestos con reconocida bioactividad como reguladores del índice glicémico

5. METODOLOGÍA

5.1 Síntesis del soporte (MCM-41)

La mezcla de reacción se realizó a 40°C. Para la síntesis se adicionó 13,04 g de bromuro de cetil-trimetil-amonio ((C₁₆H₃₃)N(CH₃)₃Br) y 1,47 g de NaOH a 200 mL de agua desionizada, esta solución se agitó de forma vigorosa a 100°C. Posteriormente, se adicionó 40 mL de HNO₃ 1M y 37,04 g de silicato de sodio, con agitación constante. El gel obtenido se transfirió a una autoclave forrada con teflón y se calentó durante 24 horas a 40°C a presión constante y pH 10,5. En esta etapa se obtuvo un producto el cual fue separado por filtración, lavado con agua desionizada y secado a 40°C. Por último se calcinó durante 16 horas a 500°C en flujo de aire a 100 mL/min.

5.1.1 Caracterización del soporte MCM-41

El soporte se caracterizó a través de las siguientes técnicas:

5.1.1.1 Espectrometría de absorción en el infrarrojo (IR-TF)

El sólido calcinado se homogenizó con KBr, grado espectroscópico (99%, Fischer), en un mortero de ágata. La mezcla se sometió a presión mediante un troquel de acero inoxidable-318 hasta formar una pastilla translúcida, que fue analizada en un espectrofotómetro IR Nicole IR 200 provisto del software EZOMINIC 32. El número de barridos fue de 32 a una resolución de 16 s/cm. El procedimiento fue llevado a cabo en la universidad del Valle, Departamento de Química.

5.1.1.2 Análisis térmico diferencial (ATD)

Los análisis termogravimétricos se realizaron en una electrobalanza Setaram Setsys 12, previamente calibrada, con platino como material de referencia, y que consta de un termopar de Pt/Pt-Rh (10%). Las muestras en polvo, con pesos entre 15 y 30 mg fueron introducidas en un porta-muestras de platino y se calentaron en flujo de aire o argón (40 mL/min) desde temperatura ambiente hasta 600°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Antes de realizar las medidas se realizó un ensayo blanco con el porta-muestras vacío, para considerarlo como línea base y poder sustraerla a las mediciones de los demás experimentos.

5.1.1.3 Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno y superficie específica

Las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno se determinaron a una temperatura constante de 77 K, en un analizador de superficies Micromeritics ASAP 2010.

Para ello, se introdujo una cantidad conocida de N₂ en un recipiente que contiene el adsorbente. El volumen de gas adsorbido a la presión de equilibrio es la diferencia entre el volumen de gas introducido y el que se requiere para llenar el espacio muerto a la presión de equilibrio. La isoterma de adsorción se construye punto a punto, introduciendo sucesivas cargas de gas y dejando tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio en cada punto. Previo al ensayo de adsorción, se limpió la superficie del sólido eliminando los gases adsorbidos. Esto se realizó con la ayuda de bombas de vacío y un aumento de temperatura (150 °C durante 24 horas). Los pesos de las muestras utilizados oscilaron alrededor de 0,15 g.

La superficie específica se obtuvo mediante el método BET, en el intervalo de presiones entre $0 < P/P_0 < 0,3$, y el volumen y distribución de tamaño de poro fueron calculados de acuerdo al método BJH, en el intervalo de presiones entre $0,42 < P/P_0 < 0,98$. Los valores se obtuvieron directamente con el software del instrumento.

5.2 Inmovilización enzimática. Reacción de hidrólisis

Los primeros pasos para la inmovilización enzimática de forma covalente fueron la activación del soporte y la purificación de la enzima; se utilizó la enzima β-D-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®] pure 6500 L) de Novozymes.

5.2.1 Activación del soporte

El soporte se lavó y se trató con diferentes reactivos, entre los que se encuentran el glutaraldehído y el aminopropiltriétoxissilano (APTES), como se muestra en el Diagrama de flujo 2.

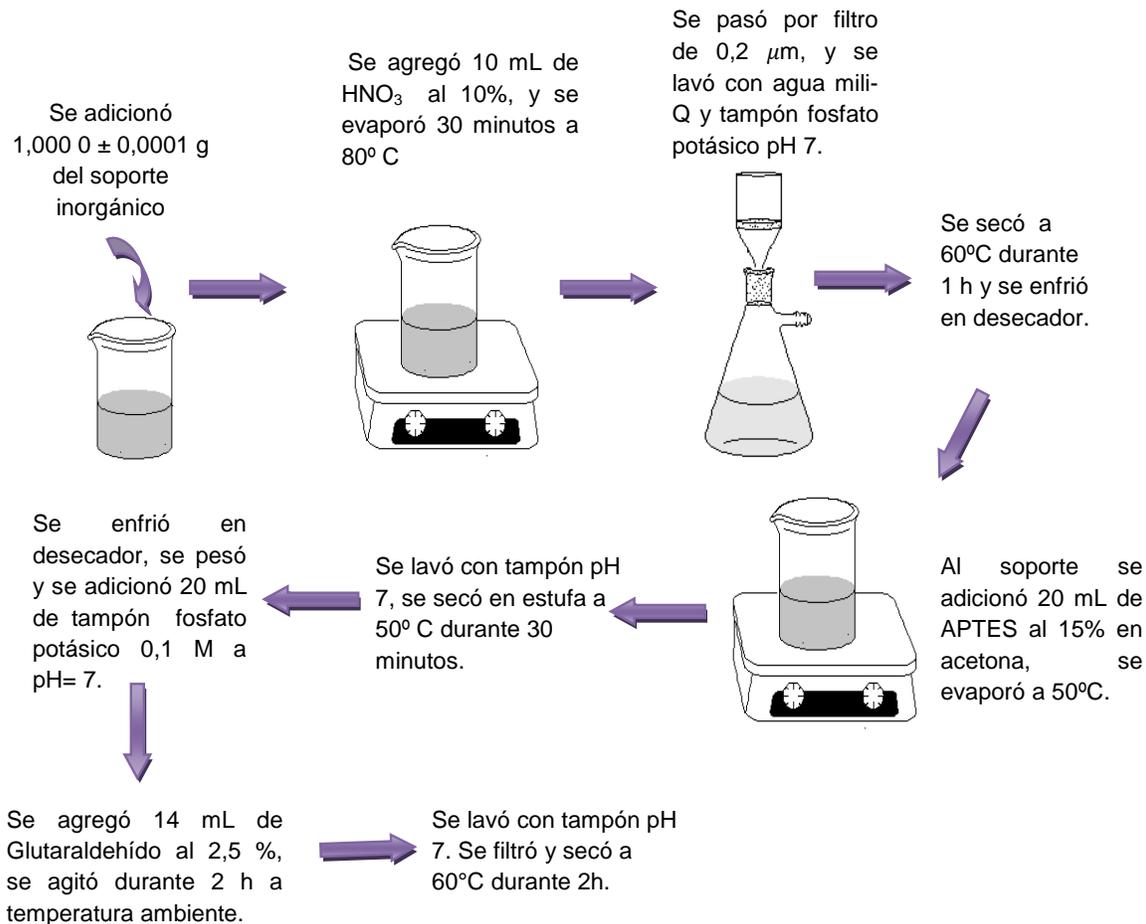


Diagrama de flujo 2. Activación del soporte mesoporoso MCM-41.

5.2.2 Purificación enzimática

Se utilizó una columna PD10 para la purificación de la enzima, posteriormente se llevó a cabo la inmovilización, así como la determinación de la actividad enzimática y cuantificación de proteína (Diagrama de flujo 3).

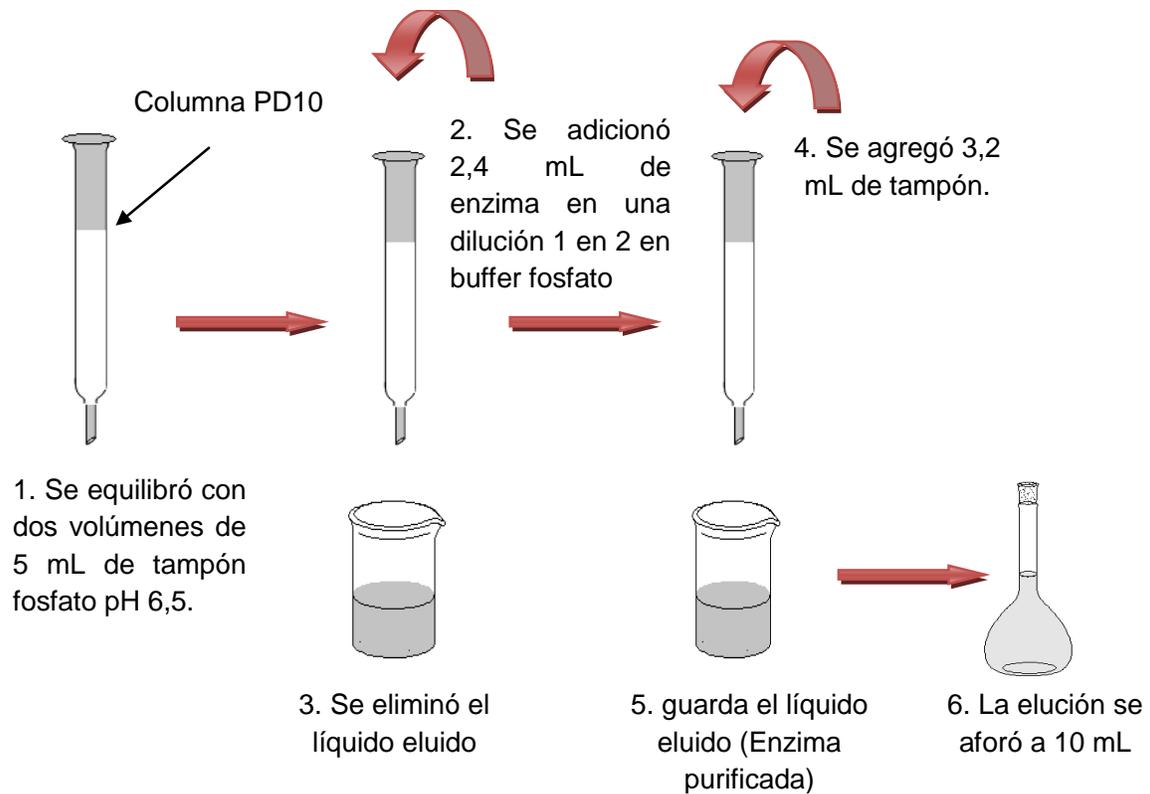


Diagrama de flujo 3. Procedimiento para la purificación enzimática.

5.2.3 Unión covalente enzima-soporte

Con la enzima purificada y el soporte activado se llevó a cabo el paso final de inmovilización, para lo cual se siguió el procedimiento presentado en el Diagrama de flujo 4. Para la inmovilización de la enzima en el soporte mesoporoso por unión covalente inicialmente se activó el soporte con 3-aminopropiltreoxisilano (APTES) y glutaraldehído; posteriormente se agregó la enzima que se unió covalentemente por formación de un grupo imino entre el glutaraldehído (agente de reticulación) y un grupo amino terminal de lisina de la enzima tratada.

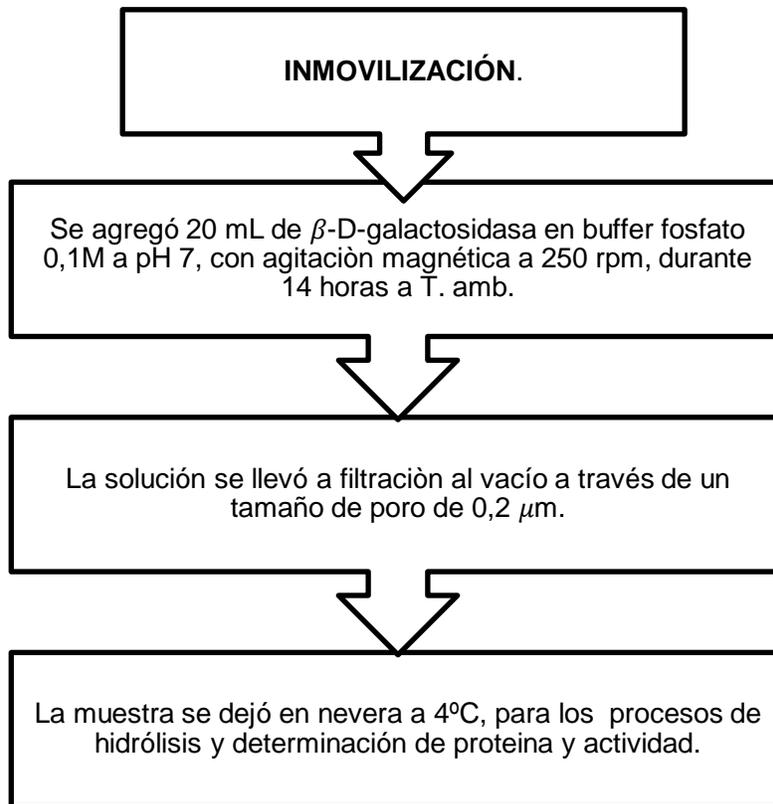


Diagrama de flujo 4. Procedimiento para la inmovilización enzimática.

Para el proceso de inmovilización con US, se siguió el procedimiento presentado en el Diagrama de flujo 4, pero sustituyendo la agitación magnética por un tratamiento en un baño de US (Sonica Sweep System EP 2200 Soltec) a una frecuencia de 45 kHz, en modo continuo y en modo pulsado, por un tiempo de 0,5, 1 y 2 horas, manteniendo la temperatura a 20° C. En la Tabla 1, se muestran todos los parámetros cambiados durante la inmovilización enzimática.

Tabla 1. Ensayos de inmovilización enzimática realizados.

Propiedades	INMOVILIZACIÓN No.				
	1	2	3	4	5
Cantidad de enzima agregada (mL/ g de soporte)	2,4	1,2	1,0	1,0	1,0
Tipo de agitación	CV	CV	CV	CV y US	CV
Tiempo (h)	14	14	14	0,5, 1, 2	0,5, 6, 14
Medida de actividad	O-NPG	O-NPG	O-NPG/ lactosa en leche	lactosa en leche	lactosa en leche

CV agitación convencional y US ultrasonidos.

5.2.4 Determinación de proteína con BCA.

Para la determinación, se realizó una curva de calibración usando soluciones del estándar de albúmina de suero bovino (BSA) al 99% de pureza, con concentraciones en un rango de 0,1-1 mg/mL, preparadas a partir de una concentración madre de 2 mg/mL. El proceso de determinación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento representado en el Diagrama de flujo 5.

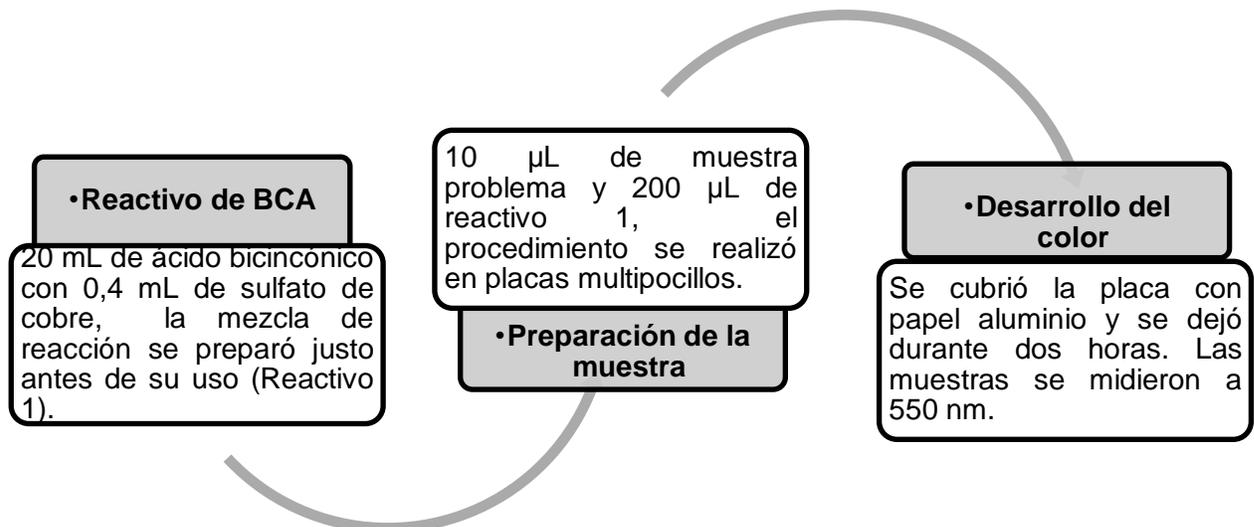


Diagrama de flujo 5. Procedimiento para la determinación de proteínas por el método de BCA.

5.2.5 Determinación de la actividad enzimática con ortonitrofenil galactopiranosido (o-NPG).

El proceso de reacción para la determinación de la actividad β -galactosidasa, se muestra en el Diagrama de flujo 6.

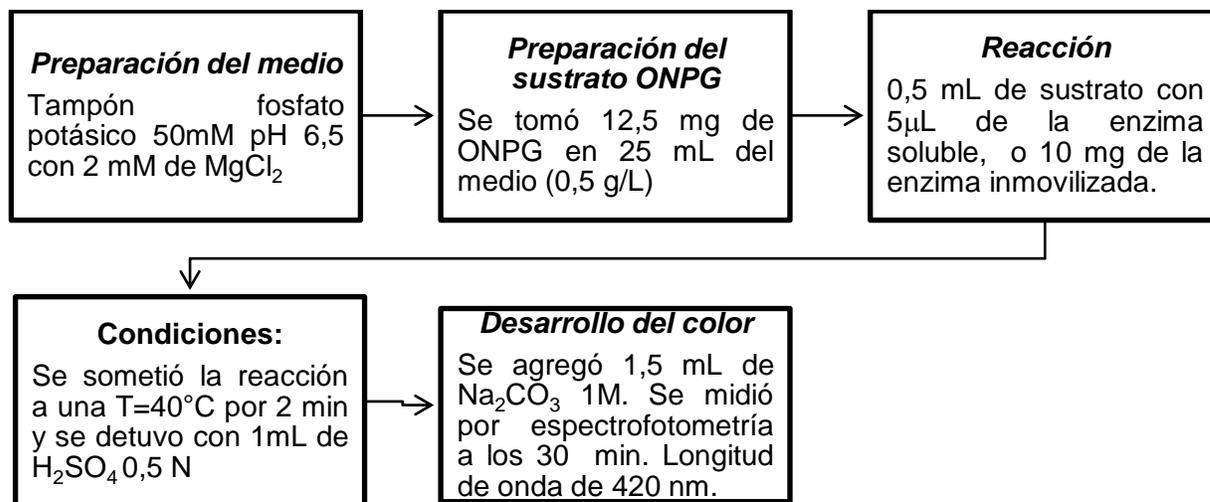


Diagrama de flujo 6. Procedimiento para la determinación de la actividad enzimática.

5.3 Hidrólisis de la lactosa en muestras de leche.

El proceso de hidrólisis se realizó con la enzima libre y la inmovilizada, para lo cual se partió de una muestra de leche UHT española, que en la etiqueta reporta un valor energético de 63 Kcal (264 KJ), conteniendo 4,6 y 3,1 g de hidratos de carbono y proteínas respectivamente, por cada 100 mL. El pH de la muestra fue de 6,75 y se tomaron de 5 y 10µL de enzima/mL de leche para la enzima libre y 100 mg/mL de leche para la enzima inmovilizada.

Las condiciones de hidrólisis ensayadas se reflejan en las tablas 2 y 3, se muestran las tres condiciones de hidrólisis a diferentes tiempos de reacción, cantidad de enzima y/o temperatura. Para todos los procesos llevados a cabo en la hidrólisis 1 con la enzima libre e inmovilizada por diferentes tiempos y modos de agitación, se utilizó una temperatura y agitación de 50°C y 1400 rpm respectivamente, realizando cambios en la cantidad de enzima y tiempo de reacción. Para la hidrólisis 2, se adoptaron temperaturas de 4 y 20°C, y se varió además el tiempo de reacción, pero solo se realizó hidrólisis con la enzima libre, para observar los mejores parámetros para el funcionamiento del sistema, los cuales fueron tenidos en cuenta para la hidrólisis con la enzima inmovilizada, llevada a cabo en

el proceso de hidrólisis 3, donde la enzima inmovilizada a diferentes tiempos se utilizó para la hidrólisis la lactosa presente en las muestras de leche entera comercial.

Tabla 2. Procesos de hidrólisis 1.

Condiciones	Tipo de enzima			
	E. Libre	E. Inmovilizada	E. Inmovilizada	E. Inmovilizada
Tiempo de inmovilización	-	14 h	0,5, 1, 2 h	0,5, 1, 2h
Tipo de inmovilización	-	convencional	convencional	US
Tiempo de hidrólisis (h)	0,5, 1, 3, 6 y 24	0, 3, 24	24	24
Cantidad de enzima/leche ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	1 y 5	100(mg/mL)	100(mg/mL)	100(mg/mL)
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	50	50	50	50
Agitación	1400 rpm	1400 rpm	1400 rpm	45 kHz

Tabla 3. Procesos de hidrólisis 2 y 3.

Condiciones	Proceso de hidrólisis 2	Proceso de hidrólisis 3
	E. libre	E. inmovilizada 0,5, 6,12h
Tiempo de reacción (h)	2,4,8,16, 24	8
Cantidad de enzima/leche	5 ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	100 (mg /mL)
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	4 y 20	20
Agitación (rpm)	1400	1400

5.3.1 Reúso de la enzima inmovilizada

Después de identificar las condiciones adecuadas para la hidrólisis de lactosa en leche se procedió a reutilizar la enzima inmovilizada en diferentes condiciones. El procedimiento con el cual se llevó a cabo este proceso se representa en el Diagrama de flujo 7.



Diagrama de flujo 7. Hidrólisis de la lactosa de la leche con la enzima inmovilizada y recuperación.

5.4 Determinación del grado de hidrólisis de la lactosa

5.4.1 Determinación de la hidrólisis por CLAR

Preparación de la muestra

Se tomaron 200 μL de muestra de leche hidrolizada, a la cual se adicionaron 13 μL del agente clarificante de Carrez I (hexacianoferrato de potasio al 7,2% en agua) y 13 μL de Carrez II (sulfato de zinc heptahidratado al 14,4% en agua). Se agitó de forma continua y se agregó 200 μL de agua Milli-Q acompañados de 550 μL de acetonitrilo grado analítico. La muestra se agitó de nuevo y se llevó a reposo durante 30 minutos. Posteriormente, se sometió durante 3 minutos a centrifugación a una velocidad de 10.000 rpm. El sobrenadante se pasó por un filtro de 0,45 μm (Waters).

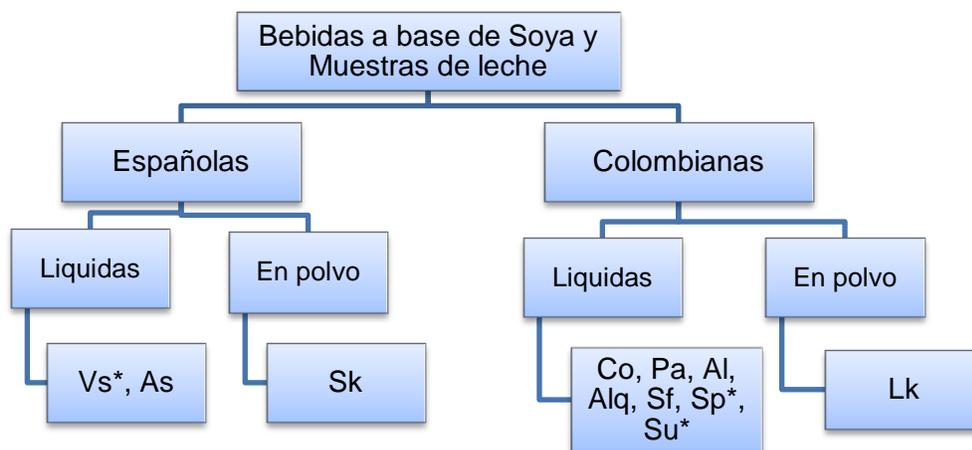
Análisis cromatográfico

Los carbohidratos se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción (CLAR-DIR) en un sistema LC 1220 Infinity Agilent Technologies - 1260 RID (Boeblingen, Alemania). La separación de los carbohidratos se

llevó a cabo con una columna Kromasil (100-NH₂) (250 mm × 4,6 mm, 5 micras de tamaño de partícula) (Akzo Nobel, Brewster, NY) empleando diferentes proporciones de acetonitrilo:agua (70:30 v:v) como fase móvil y se eluyó en modo isocrático a un caudal de 1,0 mL/min. El volumen de inyección fue de 50 µL. La adquisición y procesamiento de datos se realizaron con el software Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Boeblingen, Alemania). Todos los análisis se realizaron por duplicado y los datos se expresaron como la media (± desviación estándar) (SD). Los carbohidratos en las mezclas de reacción, se identificaron inicialmente mediante la comparación de los tiempos de retención (tR) con los de azúcares estándar. El análisis cuantitativo se realizó mediante el método del estándar externo, utilizando curvas de calibración en el rango de 0,01-10 mg de galactosa, glucosa (cuantificación de monosacáridos), lactosa (disacáridos), rafinosa (trisacáridos). Estos análisis se llevaron a cabo por triplicado.

5.5 Muestras de leche comercial y bebidas a base de soya

Se analizaron ocho muestras de leche líquida y en polvo comerciales y tres bebidas a base de soya, clasificadas de acuerdo al Diagrama de flujo 8. El análisis de las propiedades químicas (a_w, pH, proteína, carbohidratos) y de la calidad de estas muestras se realizó mediante la determinación de furosin y HMF. Adicionalmente, las muestras de leche en polvo fueron almacenadas prolongadamente a una temperatura y a_w de 40°C y 0,44 respectivamente, que son condiciones que aceleran la RM.



* son muestras de bebida a base de soya.

Diagrama de flujo 8. Muestras de leche y bebidas a base de soya estudiadas.

Las muestras de leche en polvo deslactosada fueron almacenadas siguiendo dos procedimientos, que permiten que se acelere la RM. Se realizó la determinación de carbohidratos, furosina y HMF luego de los periodos de almacenamiento, como se indica a continuación.

5.5.1 Muestras con T= 40°C

Las muestras se llevaron a la estufa a una temperatura de 40°C, se tomaron alícuotas de cada muestra al cumplir los 31 y 62 días de almacenamiento. Las alícuotas de muestra son tomadas por duplicado.

5.5.2 Muestras con a_w 0,44 y T= 40°C

Este proceso se realizó durante un máximo de 21 días; las alícuotas de muestra son tomadas por duplicado en los días 3, 6, 10, 14 y 21 (Figura 6). El almacenamiento con a_w controlada, se realizó dejando las muestras de leche en un medio con solución saturada de K_2CO_3 , sal utilizada para tener en el medio la a_w especificada. Las muestras fueron analizadas todas al final del periodo de almacenamiento.

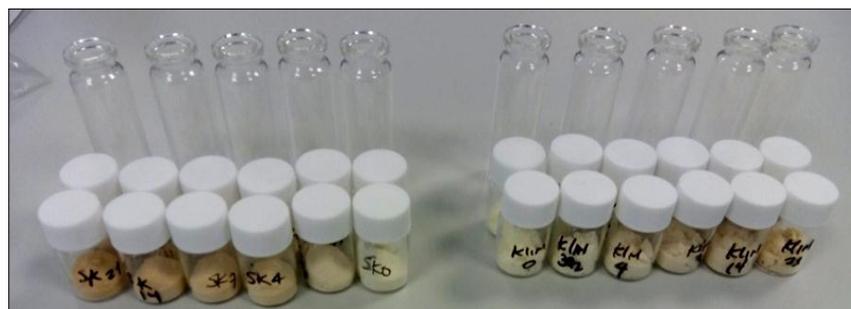


Figura 6. Muestras de leche en polvo almacenadas con a_w 0,44 y T=40°C.

5.6 Caracterización química básica

5.6.1 Extracto Seco

El procedimiento para la determinación del extracto seco se ilustra en el Diagrama de flujo 9.

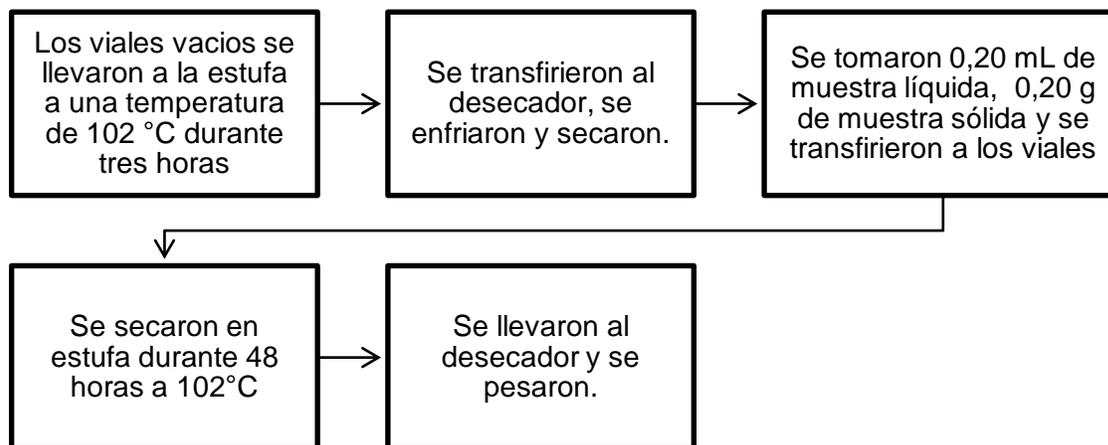


Diagrama de flujo 9. Determinación de extracto seco.

5.6.2 pH

Se tomaron 10 mL de muestra líquida y las muestras de leche sólida fueron diluidas al 10% en agua Milli-Q. Se utilizó para la medición un pH metro MP 225 (Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Suiza) a 20°C. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

5.6.3 Proteína: Método Kjeldahl

Se realizó la medición de nitrógeno orgánico, por medio de oxidación con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores y una posterior destilación por arrastre de vapor en medio alcalino, se recogió el destilado sobre una disolución de ácido bórico (4%) empleando como indicador el rojo de metilo y valorando con ácido clorhídrico 0,1 N, según el método 920.105 (AOAC, 1990; Federación Internacional de Lechería, 1993). Para ello, se empleó un sistema de digestión Tecator y un analizador Kjeltex auto 1030 (Foss Electric S.A.). Para la determinación del contenido en proteína (%), se multiplicó el valor del nitrógeno total (%N) por 6,38 para las muestras de leche. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

5.6.4 Actividad de agua (a_w)

La a_w se determinó a 25°C en las muestras de leche en polvo Lk y Sk por medio de un medidor Novasina a_w Sprint TH-500 (Pfäffikon, Switzerland), equipado con un sensor previamente calibrado con patrones de humedad controlada, consistentes en disoluciones acuosas saturadas con sales inorgánicas puras (LiCl, MgCl₂, Mg(NO₃)₂, NaCl, BaCl₂ y K₂Cr₂O₇), con los cuales se realizó una curva de calibración en un rango de 0,9 a 0,1. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

5.6.5 Análisis de carbohidratos por cromatografía de gases (CG)

Se realizó la cuantificación del grado de hidrólisis y formación de GOS en las muestras de leches comerciales UHT. Adicionalmente, se realizó el análisis del contenido y tipo de carbohidratos presentes en las bebidas a base de soya, según el método reportado por Montilla, y otros, (2006).

Preparación de la muestra

La extracción de los carbohidratos se realizó por duplicado, el procedimiento consistió en una primera extracción de 400 mg de la muestra en polvo con 5 mL de agua Milli-Q ó 3mL de la muestra líquida con 3 mL de agua Milli-Q, a temperatura ambiente y agitación durante 10 min. Posteriormente, se añadieron 200 μ L del reactivo Carrez I, con agitación, y 200 μ L del reactivo Carrez II. La muestra se aforó a 10 mL y se dejó precipitar durante 30 minutos. Por último se centrifugó a 10.000 rpm y se extrajo el sobrenadante.

Análisis

Se tomaron 150 μ L del sobrenadante resultante de la precipitación con Carrez y se llevaron a un matraz de corazón junto a 400 μ L de β -fenilglucósido, utilizado como patrón interno (PI), preparado a una concentración de 0,5 mg/mL y se llevó a sequedad en un rotavapor a 40 °C.

El proceso de derivatización es necesario debido a la baja volatilidad de los carbohidratos, lo que hace difícil su determinación. Se realizó de la siguiente forma:

Para la formación de oximas de los azúcares reductores se adicionó 250 μ L de cloruro de hidroxilamina al 2,5% en piridina, se agitó vigorosamente y luego se sometió a dos etapas de incubación de 15 min en estufa a 70°C, agitando la muestra entre ambas.

Para la formación de los trimetilsilil derivados se adicionó 250 μ L de hexametildisilazano (HMDS) y 25 μ L de ácido trifluoroacético, seguidos de un periodo de 30 min de incubación en estufa a 50°C. Luego se centrifugaron a 10.000 rpm durante 2 minutos y se recogió el sobrenadante en un vial, que fue inyectado en el cromatógrafo de gases.

El análisis se llevó a cabo utilizando un Cromatógrafo de gases (Agilent Technologies) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y empleando nitrógeno como gas portador a un flujo de 1 mL/min. Se utilizó una columna capilar (SGE HT5 Aluminum Clad Fused Silica Capillary Column), de dimensiones 12 m x 0,32 mm x 0,10 μ m (North Harrison Road, Bellefonte, EEUU). La temperatura del inyector fue de 280°C y la del detector 385°C. La temperatura inicial del análisis fue 150°C y la final 380°C, con una

rampa de temperatura de 3°C/min. La adquisición y el tratamiento de los datos se llevaron a cabo utilizando el software Agilent ChemStation (Wilmington, DE, EEUU).

Para la cuantificación de los carbohidratos presentes en las muestras se prepararon patrones de Galactosa (Ga), Glucosa (Glu), Rafinosa (*Raf*), Lactosa (La), Estaquiosa (Stq) en un rango de concentraciones de 2,0 a 0,04 mg/mL. Todos ellos fueron obtenidos de la casa comercial Sigma-Aldrich. Se calcularon los factores de respuesta (FR) frente al patrón interno (P.I.) β -fenilglucósido.

5.7 Evaluación del avance de la reacción de Maillard

5.7.1 Determinación de HMF por CLAR

El análisis del HMF se ejecutó mediante CLAR, según el método reportado por Viñas, y otros, (1992). La preparación de la muestra se realizó siguiendo la metodología reportada por Porretta y Sandei (1991). Para esta determinación se parte de 400 mg de muestra de leche sólida, estos se diluyeron en 5 mL de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA); se tomaron 3 g de leche líquida, los cuales se agitaron en vórtex durante 30 segundos. Posteriormente, se adicionaron como agentes clarificantes 0,4 mL de Carrez I y 0,4 mL de Carrez II, agitando constantemente para eliminar las proteínas y los lípidos, se dejó 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 minutos. La muestra clarificada fue filtrada a través de filtros de 0,45 μ m (Waters) y luego se llevaron a los respectivos viales para ser analizados por CLAR.

El análisis de HMF fue determinado por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección de diodos (FR-CLAR-DAD) en un sistema LC 1220 Infinity Agilent Technologies - 1260 DAD (Boeblingen, Alemania). Se utilizó una columna C18 5 ACE (ACE, Reino Unido) (250 mm x 4,6 mm, 5 micras) termostaticado a 25 ° C. la elución se realizó a un flujo de 1 mL min⁻¹ utilizando como fase móvil metanol y agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA), previamente desgasificados con ultrasonidos durante 2 minutos. El programa de gradiente se muestra en la Tabla 4. La detección se llevó a cabo a 283 nm y 50 μ L fue la cantidad de muestra inyectada.

Para la cuantificación se utilizó un patrón comercial de HMF (Sigma, St. Louis, MO, USA). Se obtuvo una recta de calibrado inyectando un patrón de HMF en el intervalo desde 40 μ g/mL hasta 0.02 μ g/ mL en una solución de metanol:agua 80:20. El registro de los datos se realizó a través del programa Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Boeblingen, Alemania). Todos los análisis fueron llevados a cabo por duplicado y los valores se expresaron como mg/100 g producto.

Tabla 4. Gradiente de elución para el análisis de HMF.

Etapa	Tiempo (min)	Agua (%)	Metanol (%)	Duración (min)
		95	5	
0	0	20	80	6
1	6	20	80	6
2	12	95	5	1
3	13	95	5	5
4	18	95	5	

5.7.2 Determinación de furosina por CLAR

Se tomaron viales de vidrio y se adicionó 1 mL de muestra líquida o 120 mg de muestra sólida disuelta en 1 mL de agua Milli-Q; se adicionaron 3 mL de HCl 10,6 N, siendo la concentración final de ácido en la muestra de 8 N.

La muestra fue agitada suavemente a 500 rpm utilizando un vórtex. El oxígeno presente en el vial fue desplazado burbujeando una corriente de nitrógeno de 0,1 bar durante dos minutos; luego fueron tapados de forma inmediata y se tomó el peso final de estos antes de ser sometidos al proceso de hidrólisis (Figura 7, a).

Hidrólisis Ácida

La hidrólisis ácida se realizó a 110°C durante 23 horas. Luego, las muestras son llevadas al desecador para su enfriamiento (Figura 7, b) y posteriormente pesadas; si el peso antes de la hidrólisis difiere del peso final en menos de 50 mg, se continúa con el análisis, si la diferencia de peso está entre 50-400 mg, el peso perdido se completa con HCl 3N; si esta diferencia es mayor a 400 mg la hidrólisis debe ser repetida, debido a la variación de las condiciones de hidrólisis.

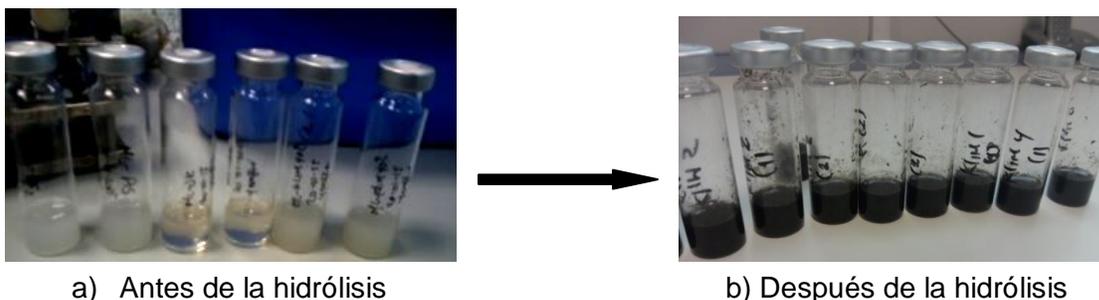


Figura 7. Muestras para la determinación de furosina.

Purificación de furosina

La purificación de la furosina se realizó por extracción en fase sólida; para ello, del hidrolizado filtrado (Figura 8, a) se tomaron 0,5 mL y se pasaron a través de un cartucho Sep-Pak® Plus Short Body de fase inversa C₁₈ (Waters), previamente acondicionado con 5mL de metanol y 10 mL de agua Milli-Q (Figura 8, b). La furosina, adsorbida en el cartucho, fue eluída con 3 mL de HCl 3 N (Figura 8, c).

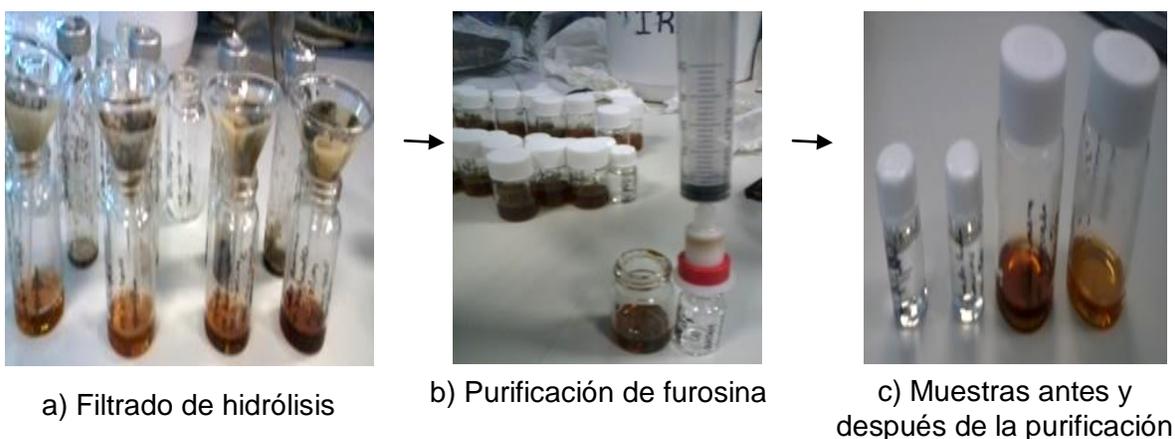


Figura 8. Pasos para la purificación de Furosina.

A partir del volumen eluído, se inyectaron 50 μ L en el sistema cromatográfico (bomba binaria modelo 250 de Perkin Elmer, inyector Rheodyne, horno de Kariba Instruments, detector de longitud de onda variable UV SM 4000 de LDC Analytical e interfase modelo 406 de Beckman). La columna empleada fue C₈ (250 cm x 4,6 mm d.i.) (Alltech, Laarne, Bélgica) termostatazada a 37°C. La elución se realizó a un flujo de 1,2 mL/min con un programa de gradiente que se detalla en la Tabla 5, empleando como fase móvil ácido acético (HAc) 0,4% en agua y cloruro de potasio (KCl) 0,3% en HAc 0,4%. La adquisición y procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa System Gold (Beckman).

Tabla 5. Gradiente empleado para la elución por CLAR de la furosina.

Etapa	Tiempo (min)	HAc (%)	KCl en HAc (%)
1	12,5	100	0
2	19,5	50	50
3	22	50	50
4	24	100	0
5	32	100	0

El análisis cuantitativo se realizó mediante el método del patrón externo, utilizando furosina comercial (Neosystem Laboratoire, Strasbourg, France). Se obtuvo una recta de calibrado inyectando furosina patrón disuelta en HCl 0,1 N con concentraciones de 1483-2ng /50 µL. Los datos fueron los valores medios expresados como mg/100 g proteína.

5.7.3 Determinación del color

La formación de color en las muestras de leche almacenadas. La intensidad de la radiación UV-absorbencia y oscurecimiento de la fase acuosa soluciones que contienen glucosa y lisina se midieron espectrofotométricamente a temperatura ambiente a 294 nm y 420 nm, respectivamente, utilizando un lector de microplacas (Sinergia-HT, BIOTEK Instrumentos, Winooski, VT). Los análisis se llevaron a cabo por duplicado y la desviación estándar relativa fue menor del 10%. Para ello, en las muestras se siguió el procedimiento presentado en el Diagrama de flujo 10 (Ting y Rouseff, 1986).

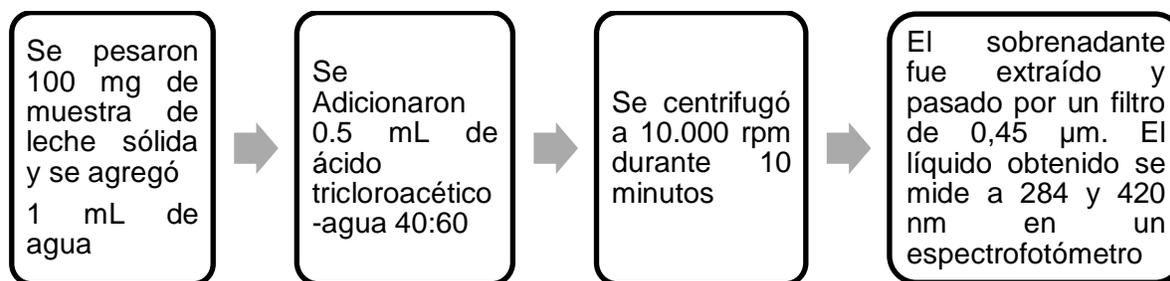


Diagrama de flujo 10. Procedimiento para la determinación de color.

5.8 Análisis estadístico

Todos los análisis fueron llevados a cabo por duplicado. Se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos, utilizando un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas entre las muestras ($P < 0,05$).

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 Estudio del soporte mesoporoso MCM-41

El sólido mesoestructurado MCM-41, fue utilizado como soporte para la inmovilización enzimática. Presenta gran área superficial, lo que favorece la dispersión de las moléculas de la enzima. Los poros del soporte permiten el acceso-difusión de las moléculas a los sitios activos, gracias a sus propiedades texturales.

El análisis de BET arroja un área superficial de 1108 m²/g, tamaño de poro promedio de 31,2 Å, lo que nos permite concluir que este soporte presenta características idóneas para la inmovilización (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de Adsorción y desorción de nitrógeno en el soporte mesoporoso.

Adsorción-desorción de nitrógeno		
S_{BET} m ² /g	Volumen poroso cm ³ /g	Tamaño de poro Å
1108	1,09	31,2

Para tener un mayor conocimiento de las características del soporte, se realizó el espectro infrarrojo de la sílice mesoporosa MCM-41, que puede observarse en la Figura 9, el cual presenta bandas características entre 1496 y 400 cm⁻¹ que pueden ser asociadas a bandas vibracionales fundamentales de la estructura mesoporosa; la banda encontrada aproximadamente a 464 cm⁻¹, corresponde a estiramientos de grupos O-Si-O y es característica de los compuestos de sílice; la banda próxima a 938 cm⁻¹ puede relacionarse con las vibraciones del grupo funcional Si-OH; las bandas cercanas a 1100cm⁻¹, pueden corresponder a vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico del enlace Si-O. La banda en 3469 cm⁻¹ y la que se encuentra próxima a 1624 cm⁻¹ se puede atribuir al estiramiento del O-H del agua superficial (Daza, 2013). Por lo que se puede concluir que este soporte cumple con las condiciones adecuadas para realizar el proceso de inmovilización.

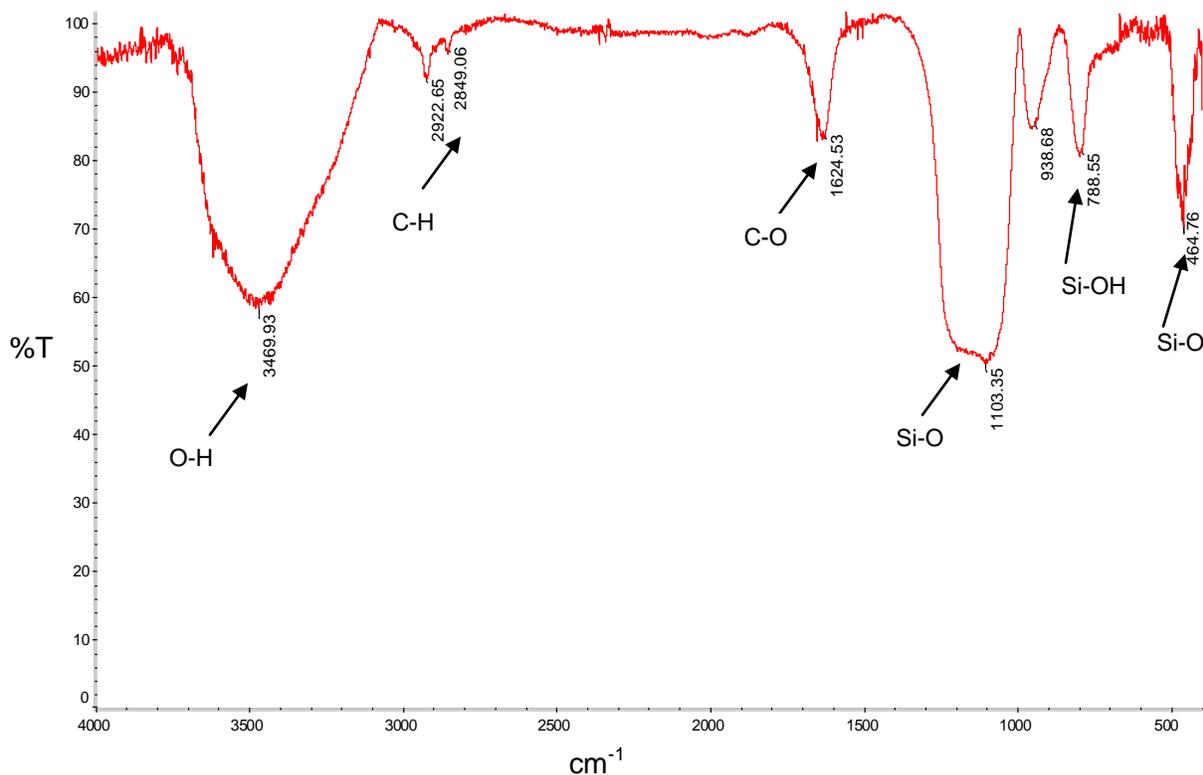


Figura 9. Espectro infrarrojo del soporte mesoporoso MCM-41.

6.2 Evaluación del proceso de inmovilización enzimática

En el proceso de activación del soporte se adicionó aminopropiltrietoxisilano (APTES), de forma que el grupo silano de este reactivo se une al soporte por medio de enlaces Si-O, quedando libre el grupo orgánico amina, capaz de unirse al glutaraldehído para generar enlaces entrecruzados, que da como resultado un grupo imino por un lado del enlace y un grupo libre carboxilo como se muestra en la Figura 10. De esta forma el soporte queda activado y posteriormente se adiciona la enzima β -D-galactosidasa para su inmovilización. La eficacia de la inmovilización se determina habitualmente midiendo la cantidad de proteína fijada al soporte y la actividad de la enzima inmovilizada y no inmovilizada (Giacomini, y otros, 1998).

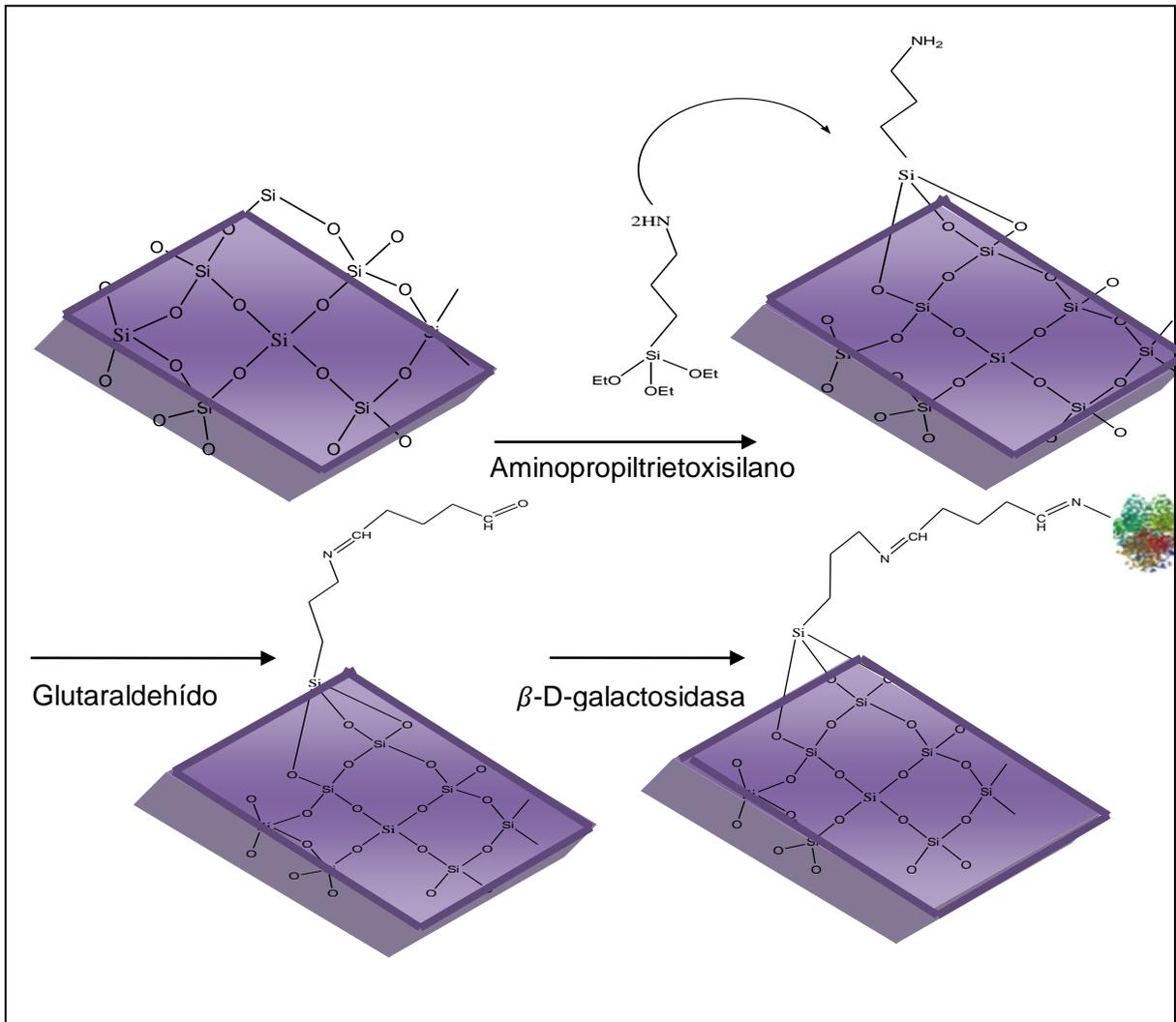


Figura 10. Inmovilización enzimática.

En primer lugar se procedió a realizar la medición de la proteína en la enzima libre e inmovilizada con el reactivo BCA. Se realizó una curva de calibración con un patrón de albúmina de suero bovino con concentraciones entre 2 y 0,1 mg/mL, obteniéndose la siguiente ecuación de la recta: $y = 0,402x + 0,007$ (Figura 11).

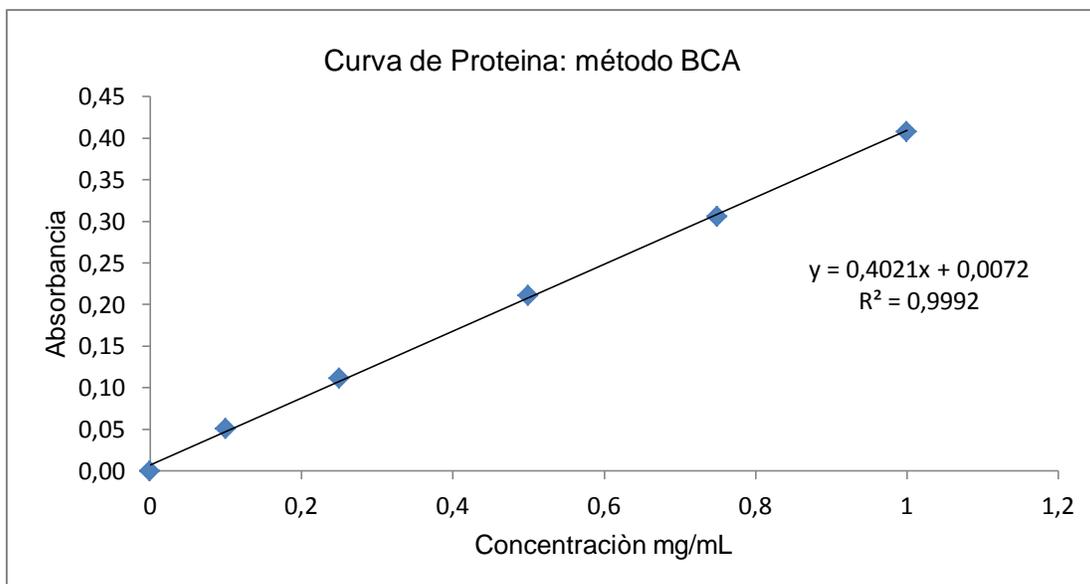


Figura 11. Curva de calibración para la determinación de proteínas por el método de BCA.

La cantidad de proteína encontrada en la enzima libre es de 34,67 mg/mL, valor muy similar al reportado para la misma enzima por Cardelle (2007); en la enzima inmovilizada, mediante BCA, no se obtuvieron buenos resultados ya que el soporte activado presentó una coloración que interfería con la medición y los valores arrojados en este análisis son muy altos y variables.

La unión de la enzima al soporte fue controlada con la determinación de la actividad enzimática; esta se midió en la enzima libre que quedaba en el sobrenadante y en la enzima unida al soporte, lo que permitió observar la pérdida de actividad durante la inmovilización. Se utilizó el reactivo de O-NPG, que al ser hidrolizado por la enzima β -D-galactosidasa da como producto el compuesto coloreado O-nitrofenol, que pudo ser determinado por espectrofotometría a una $\lambda = 410$ nm. Como primera medida se realizó una curva de calibración con el reactivo O-nitrofenol como se puede observar en la Figura 12. A partir de esta curva, se determinó la cantidad de O-nitrofenol liberado por la hidrólisis de O-NPG con la enzima libre e inmovilizada.

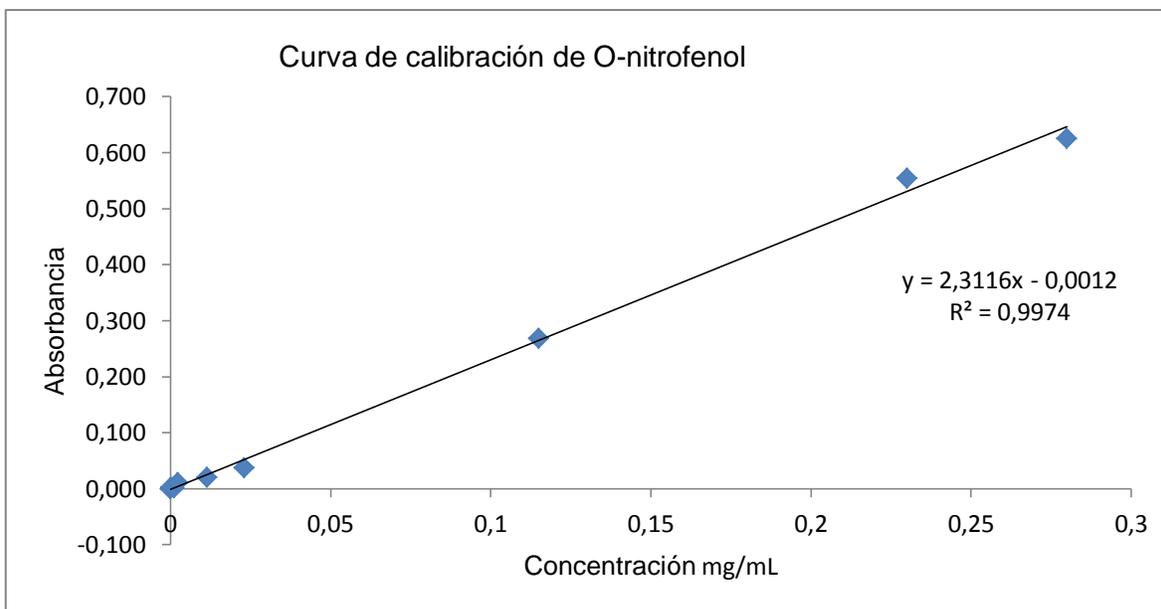


Figura 12. Curva de Calibración para la determinación de actividad enzimática con o-NPG.

Los cambios realizados en el proceso de inmovilización llevados a cabo con la β -D-galactosidasa de *K. lactis* (Lactozym® pure 6500 L), se representan en la Tabla 1, en la cual se observa que en los dos primeros procesos de hidrólisis se obtuvo una actividad de la enzima inmovilizada muy baja, con respecto a la actividad de la enzima agregada, la cual fue medida con el reactivo de o-NPG (Figura 13), en estos dos casos no hubo control del pH en cada paso de la inmovilización, por lo cual, se optó por esta opción durante los procesos posteriores. En la tercera inmovilización, se redujo la concentración del sustrato enzimático y con el control del pH, se observó una mayor actividad de la enzima (Figura 13), en este caso el tiempo de inmovilización fue de 14 horas, similar a los dos anteriores, para el cuarto y quinto proceso de inmovilización, se redujo el tiempo de hidrólisis y se midió además la actividad de la enzima sobre el sustrato lactosa Tabla 1.

En este apartado de estudio se logró concluir que el control del pH durante cada paso del proceso es muy importante para que se fije suficiente cantidad de enzima.

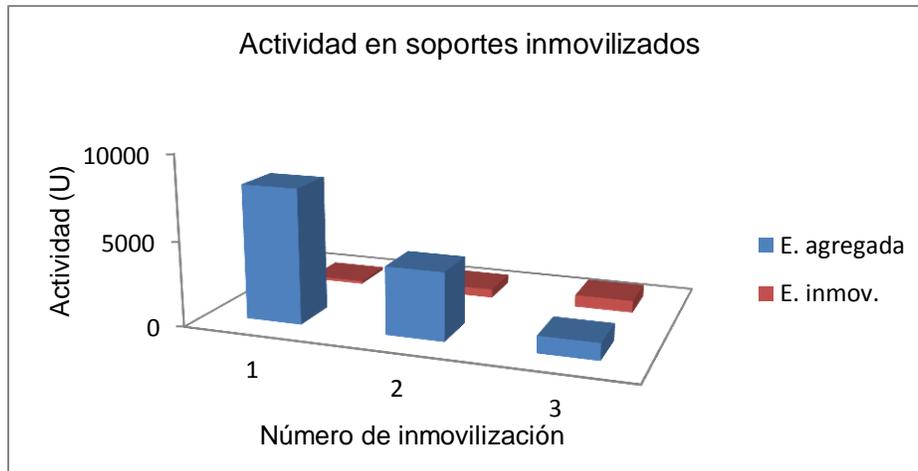


Figura 13. Actividad determinada en los soportes inmovilizados con relación a la actividad de la enzima agregada antes del proceso.

Para la inmovilización, al someter la muestra de preparado enzimático a la agitación por ultrasonidos Tabla 1, se observó la formación de precipitado observar en la Figura 14, donde la muestra F₁ fue sometida a una frecuencia de agitación con pulsaciones y F₂ a una potencia continua. En cuanto a la actividad, hubo alta diferencia entre las dos muestras, aunque se observó que el valor arrojado es un poco más bajo comparado con la actividad de la enzima libre; debido a la precipitación en la muestra F₂, se escoge la frecuencia con pulsaciones para el desarrollo de procedimientos con US.



Figura 14. Muestras de enzima sometidas a agitación con ultrasonidos. Donde F₁ hace referencia a la muestra sometida a una frecuencia con pulsaciones y F₂ a una frecuencia continua.

Al terminar la inmovilización, se compara la enzima inmovilizada por el método convencional y con US, donde este último presentó menor actividad, pérdida que posiblemente se debió al tipo de agitación.

Se observó mayor inmovilización durante los primeros 30 minutos de reacción, pero la diferencia no es considerablemente alta entre las muestras Figura 15.

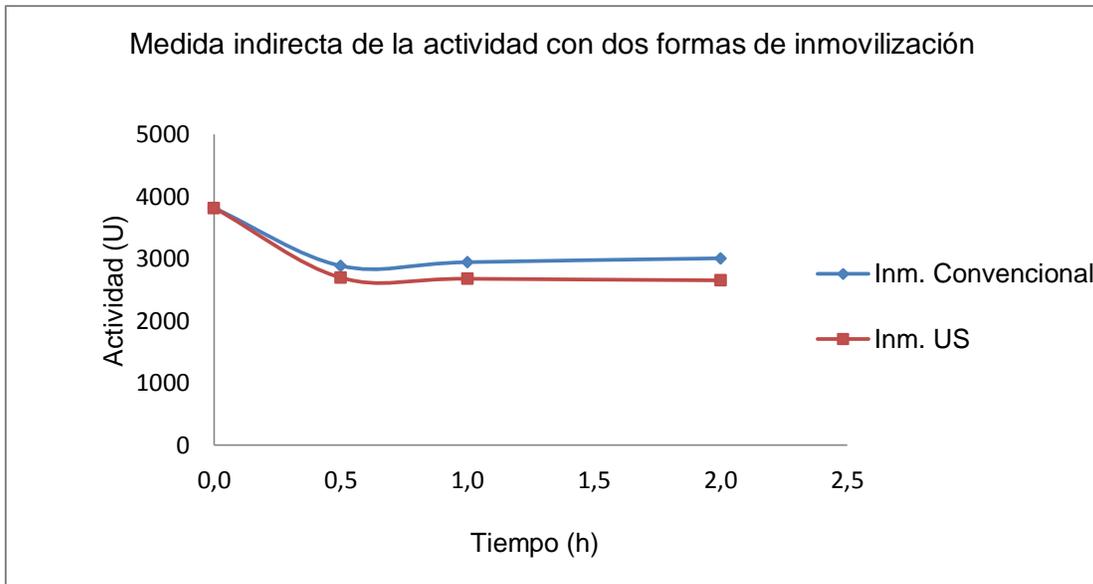


Figura 15. Actividad enzimática determinada en los diferentes soportes inmovilizados y en la enzima libre.

6.2.1 Determinación de TGA en la enzima libre e inmovilizada.

La cantidad de enzima soportada, se determinó mediante un análisis termogravimétrico (TGA), el cual está basado en la pérdida de masa de una muestra; esto permitió encontrar cuánta enzima se perdió en comparación con el soporte no inmovilizado. Se realizó la determinación de TGA, al soporte sin enzima, al soporte activado, el cual contiene APTES y glutaraldehído, y al biocatalizador (Figura 16). Se logró observar una pérdida de masa mayor en el biocatalizador, la cual es de 5%, en comparación con el soporte activo y del 24% en relación al soporte no tratado.

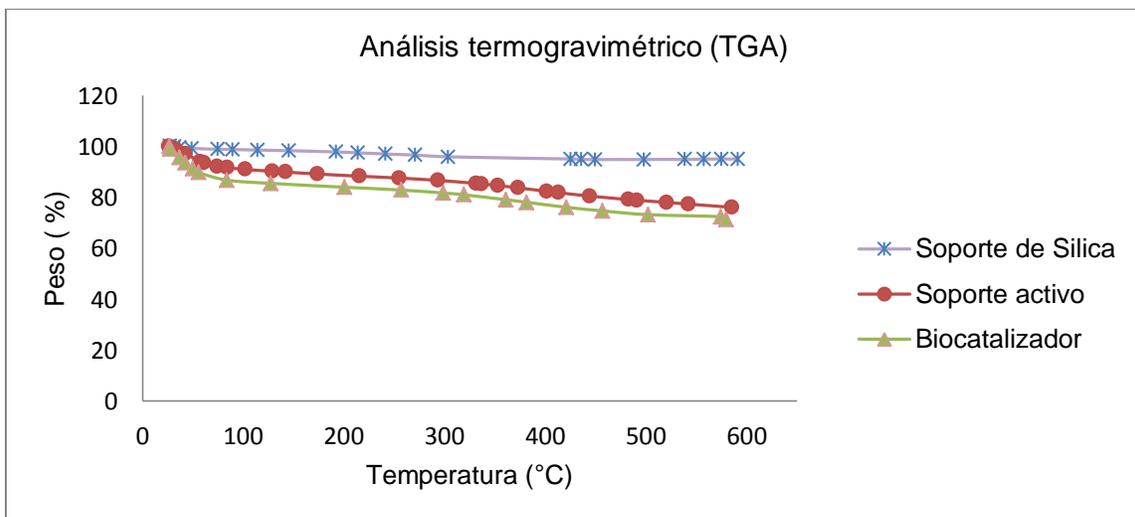


Figura 16. Curva de análisis termogravimétrico al soporte de óxido de silicio MCM-41, soporte activo y biocatalizador.

Se realizó la determinación de la primera derivada de las gráficas obtenidas para cada muestra analizada, con la intención de obtener el pico que representa la temperatura de la mayor pérdida de masa. Se puede observar en la Figura 17, la pérdida de peso antes de los 100°C, esto debido a la humedad de la muestra y que es menor en el soporte de óxido de silicio, que en el soporte activo y el biocatalizador. Hay una leve variación en un rango entre 350 y 450°C, posiblemente debido a la pérdida de los compuestos como glutaraldehído y APTES para el soporte activo, y de los compuestos anteriores junto con la enzima para el biocatalizador, todos estos compuestos estarían ubicados en las cavidades mesoporosas. Por último, se observa variación aproximadamente a 550°C y que es mucho mayor para el biocatalizador. La pérdida de masa es muy baja en las tres muestras y esto se debe a que la composición mayoritaria de las muestras se debe al compuesto inorgánico óxido de silicio, el cual no alcanza a perder un porcentaje muy alto de masa a la temperatura evaluada. Se puede concluir de la inmovilización que un 5 % del biocatalizador está compuesto por la enzima.

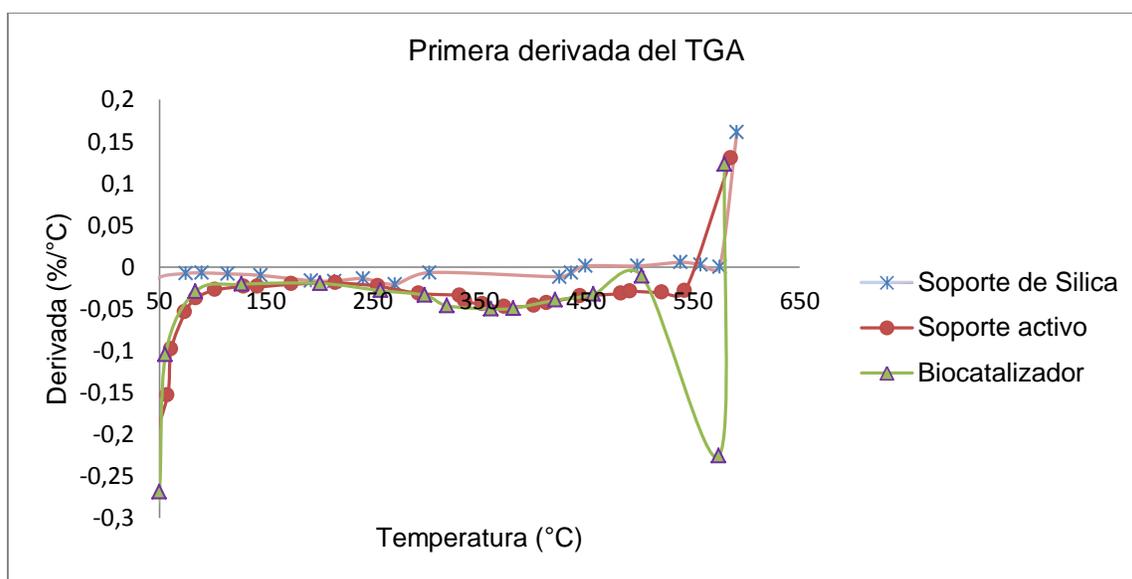


Figura 17. Primera derivada del TGA, en el al soporte de óxido de silicio MCM-41, soporte activo y biocatalizador.

6.2.2 Determinación de la hidrólisis enzimática por CLAR

Las condiciones de hidrólisis (Tabla 2 y 3) presentaron variaciones de temperatura, cantidad de enzima y tiempo de reacción. En primer lugar se inyectaron muestras de patrones, en la Figura 18 se muestra el cromatograma obtenido tras el análisis por CLAR, con los respectivos tiempos de retención (tr). Se inyectaron los patrones con

concentraciones en el rango de 0,05-5 mg/mL, y tras correlacionar las áreas de los mismos con las concentraciones correspondientes se obtuvieron rectas patrón (Figura 19), cuyo R^2 es mayor a 0,99.

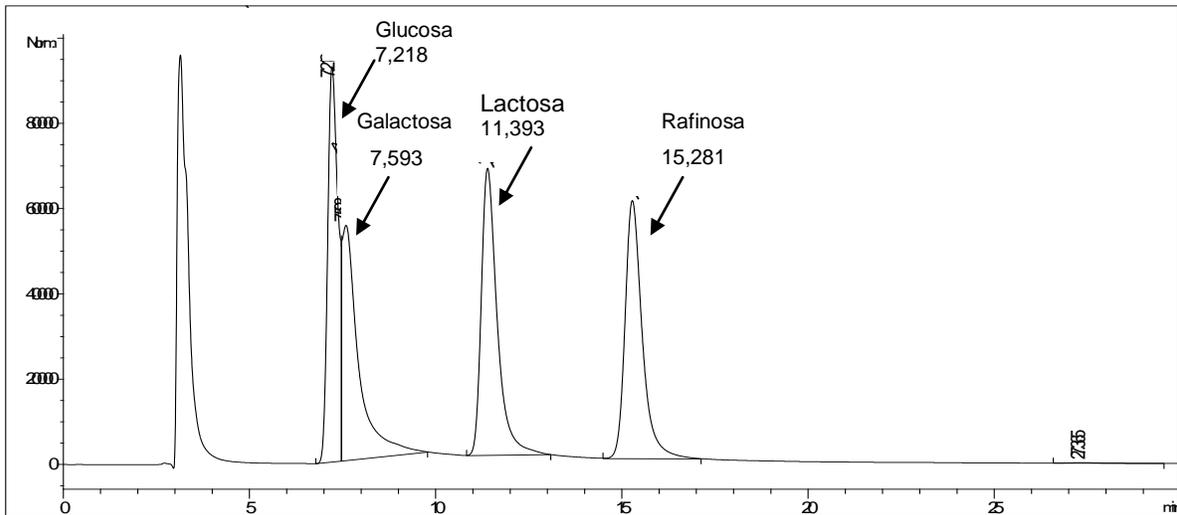


Figura 18. Perfiles cromatográficos de la mezcla de los patrones por la técnica de CLAR.

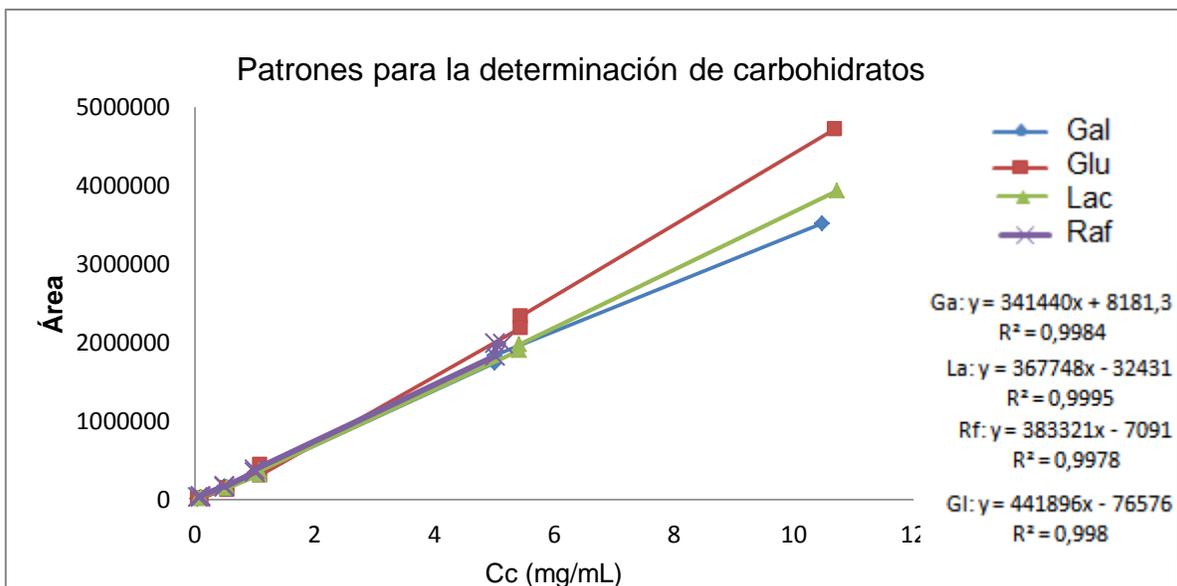


Figura 19. Rectas de calibrado de los patrones de carbohidratos determinados por CLAR.

Tras realizar la hidrólisis de la lactosa tanto con la enzima libre como inmovilizada en la leche UHT, se analizaron las muestras por CLAR y se cuantificó el porcentaje (%) de lactosa hidrolizada en función del tiempo, tal y como se muestra a continuación.

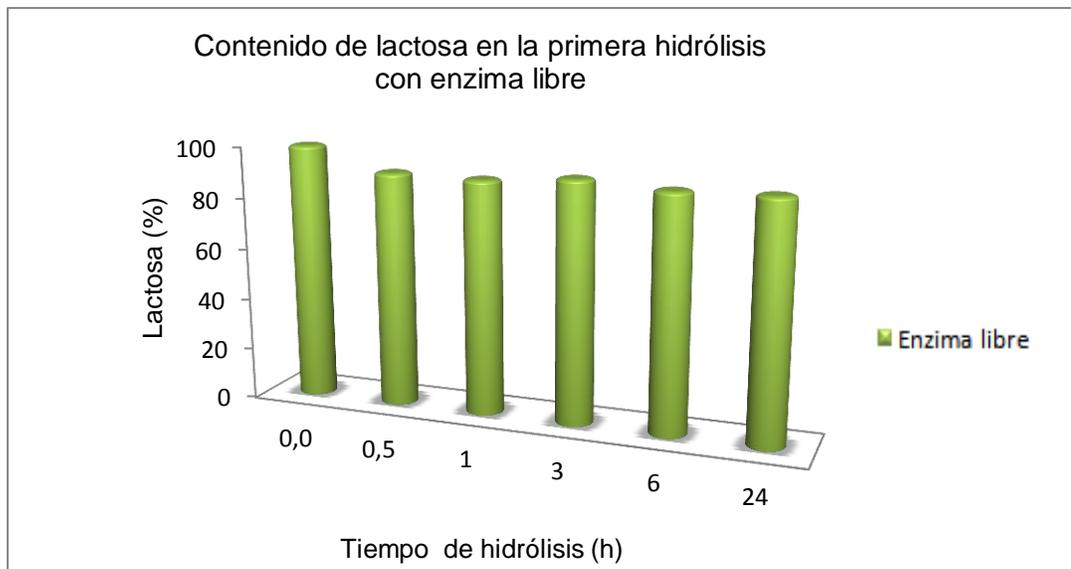


Figura 20. Primera hidrólisis de lactosa en muestra de leche entera comercial (LEC) mediante el uso de enzima libre.

En este proceso se observa que el porcentaje de lactosa hidrolizada en la muestra de leche es muy bajo, para la enzima libre, donde el mayor porcentaje de hidrólisis se observó a las seis horas de reacción (Figura 20).

El proceso de hidrólisis se realizó también con las enzimas inmovilizadas durante 30 minutos, 1 y 2 horas por el método de agitación convencional (CV) y ultrasonidos (US), se puede observar que el porcentaje de lactosa es muy alto, lo que indica una baja hidrólisis. El soporte inmovilizado durante 0,5 h con agitación convencional, presentó menor contenido de lactosa pero este valor con respecto al inicial no superó el 25% Figura 21, debido a que se había establecido una alta actividad enzimática con el reactivo de o-NPG, se puede concluir que la enzima se inactivó durante el procedimiento de hidrólisis.

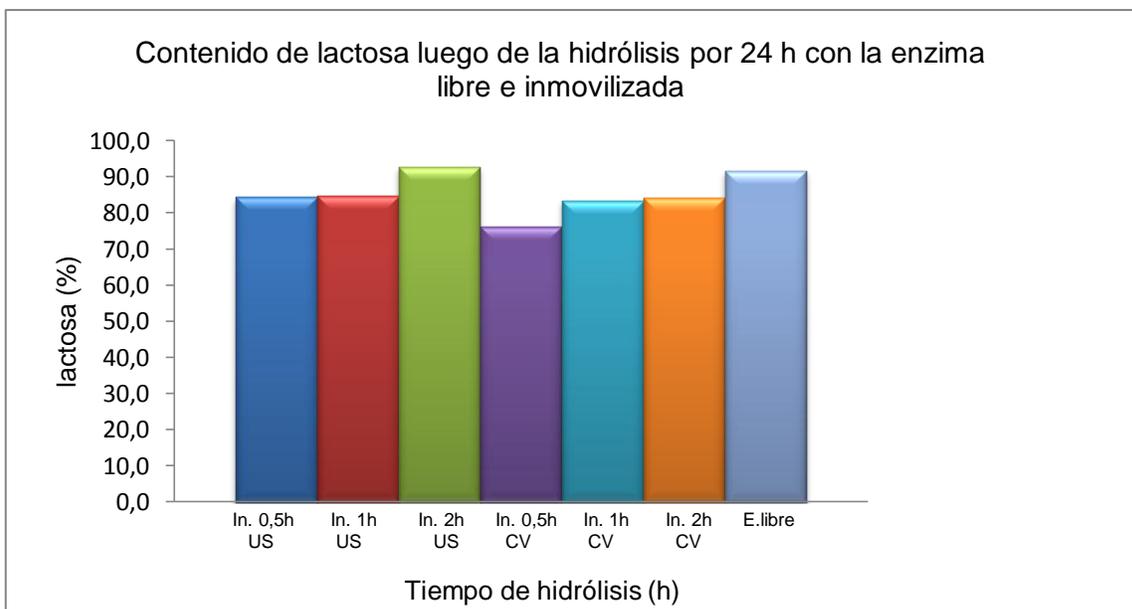


Figura 21. Porcentaje de hidrólisis (LEC) con los dos procesos de inmovilización convencional y con Ultrasonidos.

Como se mencionó anteriormente la hidrólisis puede competir función de las condiciones con el proceso de transgalactosilación, por lo cual entre menor hidrólisis de lactosa, mayor cantidad de GOS, pero en la Figura 21 y Figura 22, se observa un comportamiento diferente, por ejemplo la mayor hidrólisis se presenta con el soporte preparado con agitación convencional 0,5 h y esta muestra es la que presenta mayor contenido de GOS, pero en este caso, se debe a que la hidrólisis fue muy baja en todos los procedimientos.

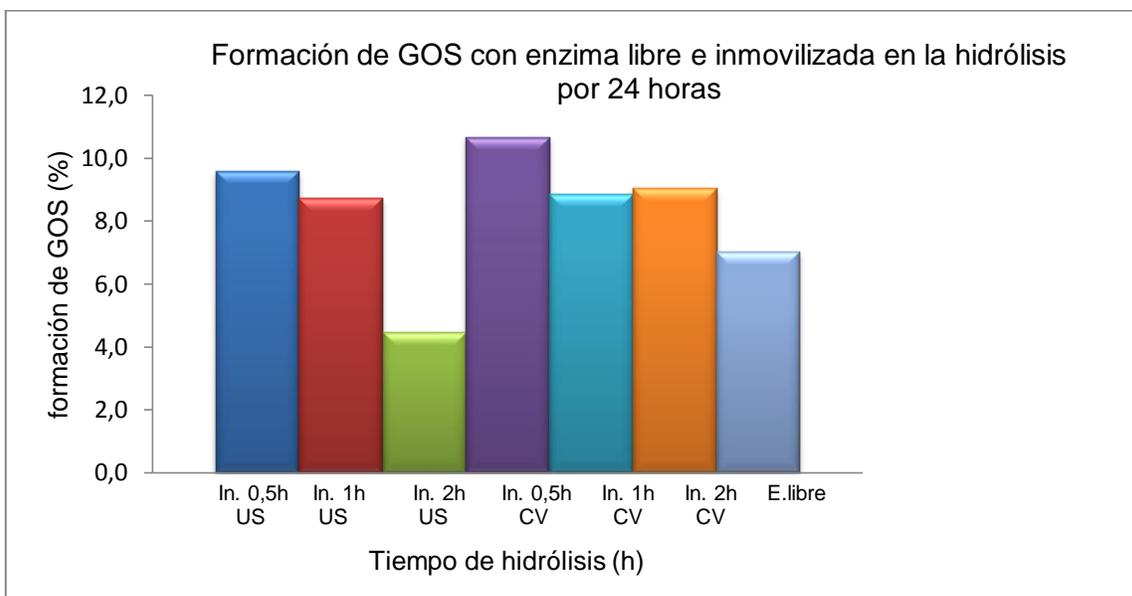


Figura 22. Formación de GOS durante 24 horas en la hidrólisis de lactosa en (LEC) con la enzima libre e inmovilizada por diferentes tiempos y métodos.

Debido a que, el porcentaje de hidrólisis por un tiempo máximo de 24 horas no superó el 25%, se cambió la temperatura de hidrólisis, por lo que utilizaron las condiciones establecidas por Rada (2002). En este caso la hidrólisis con la enzima libre se realizó por 2, 4, 8, 16 y 24 horas y utilizando 5 μ L de enzima por mL de leche a temperaturas de 4 y 20°C (Figura 23).

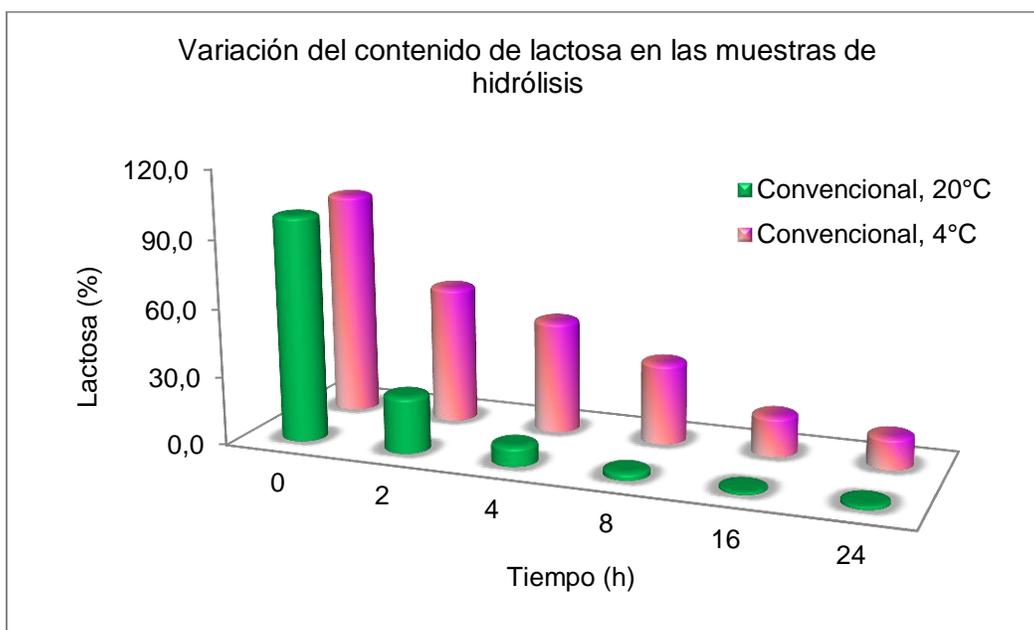


Figura 23. Hidrólisis de lactosa en la muestra de leche entera comercial (LEC) con el uso de enzima libre, variando temperatura, tiempo y volumen de enzima.

Se observó un porcentaje de hidrólisis muy alto a media que avanza el tiempo de reacción llegando a valores cercanos al 10% al cumplir las 8 horas de reacción. Se logró observar que la temperatura de 4°C es menos efectiva durante la hidrólisis, (Figura 23).

En estas muestras se evaluó el contenido de GOS luego de la hidrólisis, donde se observa que el mayor contenido lo presentan las muestras hidrolizadas a una temperatura de 4°C que son las que presentan menos hidrólisis (Figura 24); lo anterior se debe a que normalmente en las condiciones en las que se favorece la hidrólisis, se forman menos GOS.

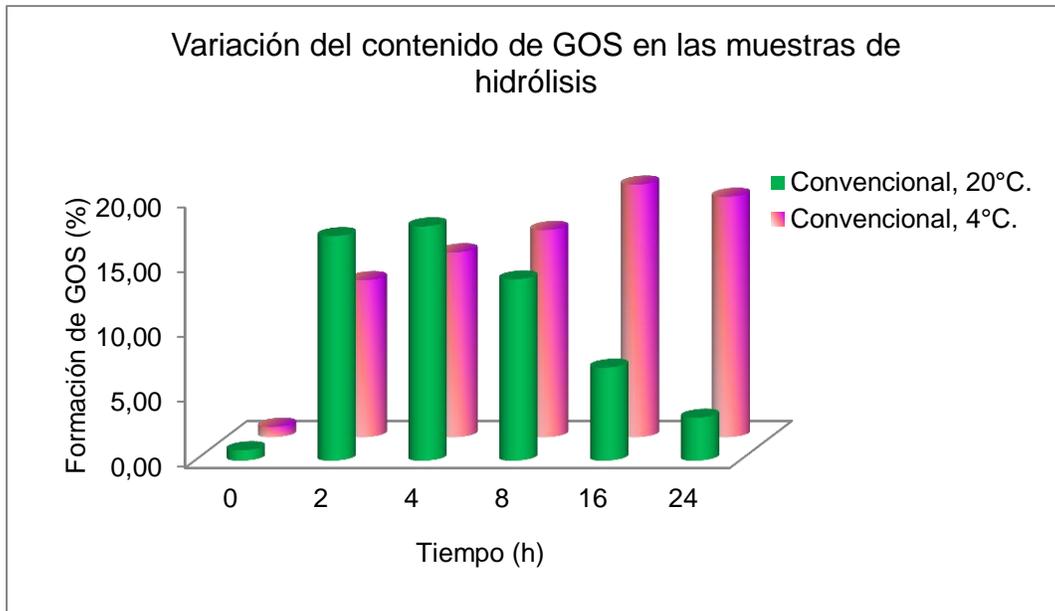


Figura 24. Porcentaje de GOS generados durante la hidrólisis de lactosa de LEC, con el uso de enzima libre y dos temperaturas de hidrólisis.

Se han reportado estudios donde la producción de GOS se encuentra en rangos de 32,7%, a 12,9%, utilizando la enzima de *K. lactis*, y concentraciones de lactosa de 200, 250 y 500 g/L (Foda, 2000; Cardelle, 2007; Guío, 2014), esto se debe a que a menor contenido de agua, hay mayor producción de GOS. En este trabajo se obtuvieron porcentajes de GOS de hasta el 22% alcanzado durante dos horas de reacción con la enzima libre a 4°C y agitación por ultrasonidos (Figura 24).

Se implementó el uso de ultrasonidos para el proceso de agitación durante la hidrólisis y se logró observar que la diferencia entre las muestras es muy baja Figura 25, por lo cual se establece que la agitación convencional es la más adecuada debido a la facilidad de uso.

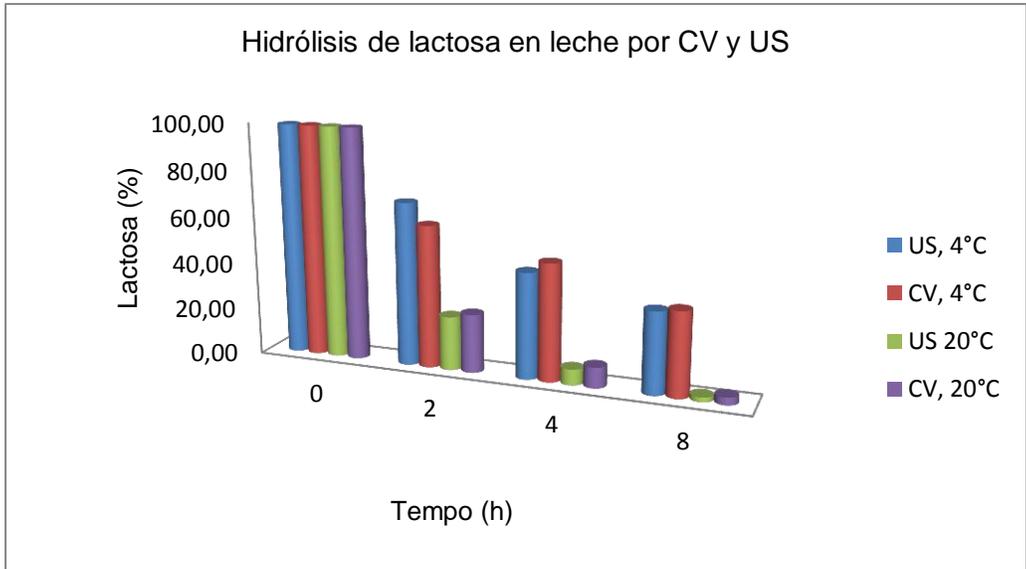


Figura 25: Porcentaje de lactosa durante la hidrólisis de LEC con el método de agitación convencional y Ultrasonidos a una temperatura de 4 y 20 °C.

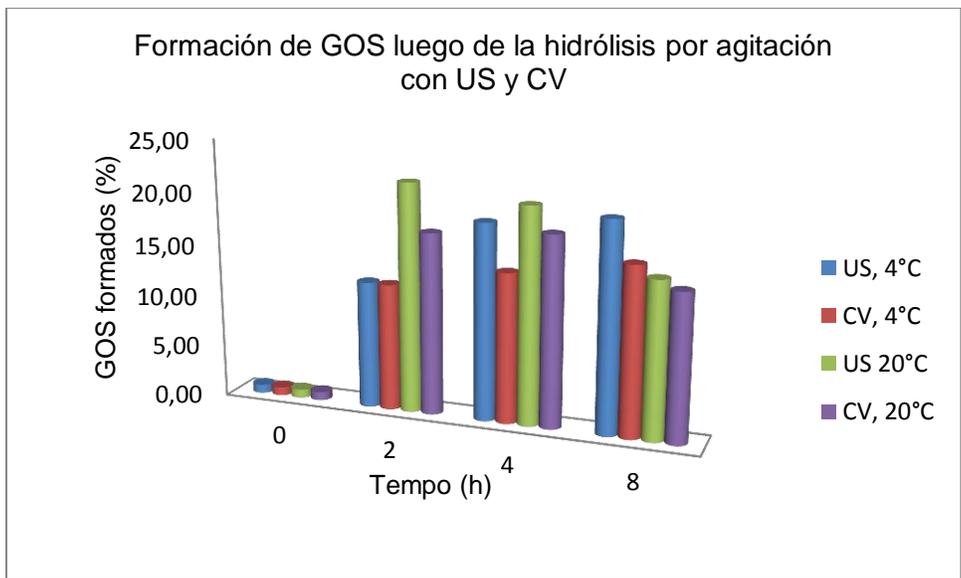


Figura 26. Formación de GOS durante la hidrólisis de LEC con el método de agitación convencional y Ultrasonidos a una temperatura de 4 y 20 °C.

La cantidad de GOS formados no presenta altas diferencias con los métodos de hidrólisis, aunque la mayor formación se presentó con muestras hidrolizadas con agitación por ultrasonidos a 4°C.

Se realizó de nuevo la hidrólisis utilizando las mejores condiciones, tiempo de hidrólisis de 8 horas, con una temperatura de 20°C y agitación convencional, para las muestras de enzima inmovilizadas durante 30 minutos, 6 y 14 horas.

En la Figura 27, se observa el alto porcentaje de hidrólisis, con las enzimas inmovilizadas, se realizaron hasta cinco reúsos, donde la enzima ha perdido una actividad cercana al 5%, por lo que se puede concluir que el proceso de inmovilización se realizó en condiciones adecuadas, con pérdida de actividad muy baja; también se observa que no hay diferencia significativa en los soportes inmovilizados por diferentes tiempos; por lo tanto, se puede establecer que en un tiempo de 30 minutos, ya hay una buena inmovilización con posibilidad de hasta 5 procesos de hidrólisis con alta actividad y que se puede seguir reutilizando en procesos de hidrólisis posteriores.

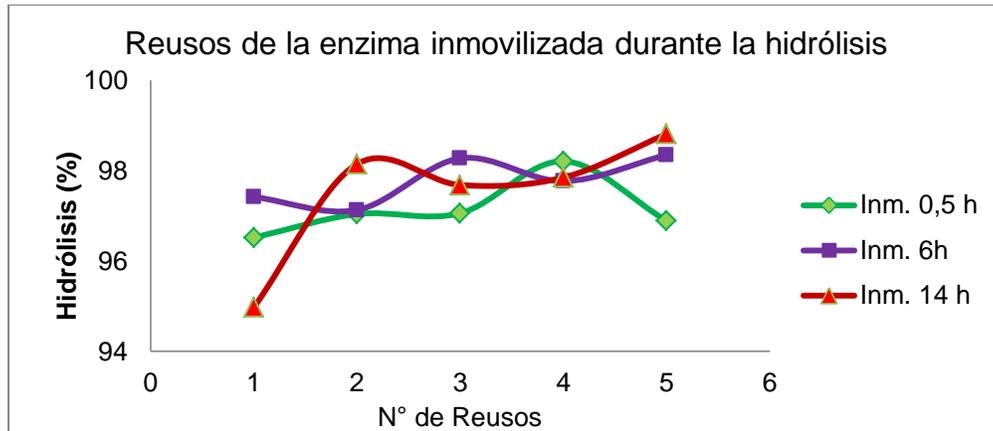


Figura 27. Reúsos de enzima inmovilizada.

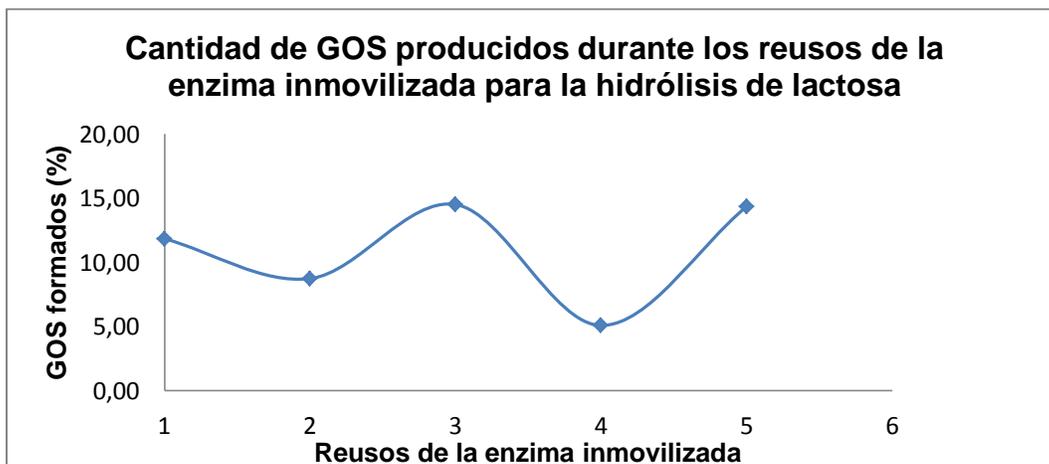


Figura 28. Formación de GOS durante la hidrólisis con la enzima inmovilizada durante los reúsos.

Para la enzima inmovilizada, la cantidad de GOS producida cambia en cada reuso, el valor está en un rango de 5,1-14,5 % (Figura 28); en estudios anteriores se han obtenido porcentajes de GOS de 22,9%, con una concentración de lactosa de 400g/L (Guío, 2014).

6.3 Evaluación de la calidad de muestras comerciales de leche deslactosada y productos de soya. Hidrólisis de la lactosa y avance de la reacción de Maillard.

6.3.1 Caracterización fisicoquímica

Las muestras de leche deslactosada presentaron valores de pH en un rango de 6,53 a 6,97 y las de bebida de soya de 6,70 - 7,15; la leche en estado normal y bebidas de soya, presenta un pH neutro o ligeramente ácido, por lo que se encuentran dentro del rango adecuado (Tabla 7).

Tabla 7. Extracto seco y pH en muestras comerciales de leche deslactosada y bebidas a base de soya.

Muestras		Extracto seco	pH
Leche	Co	9,42(±0,01)	6,59(±0,01)
	Al	10,09(±0,00)	6,65(±0,01)
	Alq	9,95(±0,03)	6,61(±0,01)
	Pa	9,33(±0,19)	6,63(±0,02)
	Sf	8,80(±0,04)	6,66(±0,01)
	As	9,86(±0,70)	6,97(±0,01)
	Lk	95,98(±0,02)	6,67(±0,01)
	Sk	90,51(±0,35)	6,53(±0,01)
Bebida de Soya	Sp	10,26(±0,03)	7,15(±0,01)
	Vs	6,01(±0,12)	7,15(±0,01)
	Su	11,24(±0,05)	6,70(±0,01)

Debido a que el extracto seco se refiere a la cantidad de sólidos presentes luego de ser extraída el agua y el material volátil presente en las muestras, es de esperar que este valor de sólidos sea mucho mayor en las muestras de leche en polvo. El decreto colombiano 6.16 de 2006 (Ministerio de la Protección Social, 28 de febrero de 2006), establece los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano; en cuanto a la leche en polvo, esta debe tener una humedad máxima del 4%, por lo cual la leche Lk se encuentra dentro del rango adecuado, el extracto o materia seca que presenta está cerca

del 96%. El decreto también establece un porcentaje m/m mínimo de 9,70 para la leche líquida UHT, en este caso, de las cinco muestras colombianas estudiadas, tres presentan un valor menor, como son las muestras Co, Pa y Sf, esta última se encuentra muy por debajo de los límites establecidos. La bebida de soya Vs presenta el valor más bajo de extracto seco de todas las muestras estudiadas (Tabla 7).

6.3.1.2 Actividad de agua (a_w)

Para la determinación de este parámetro en primer lugar se realizó una calibración del equipo mediante sales inorgánicas y se obtuvo la recta $y = 0,9925x + 0,008$ con un coeficiente de determinación R^2 de 0,9999 (Figura 29).

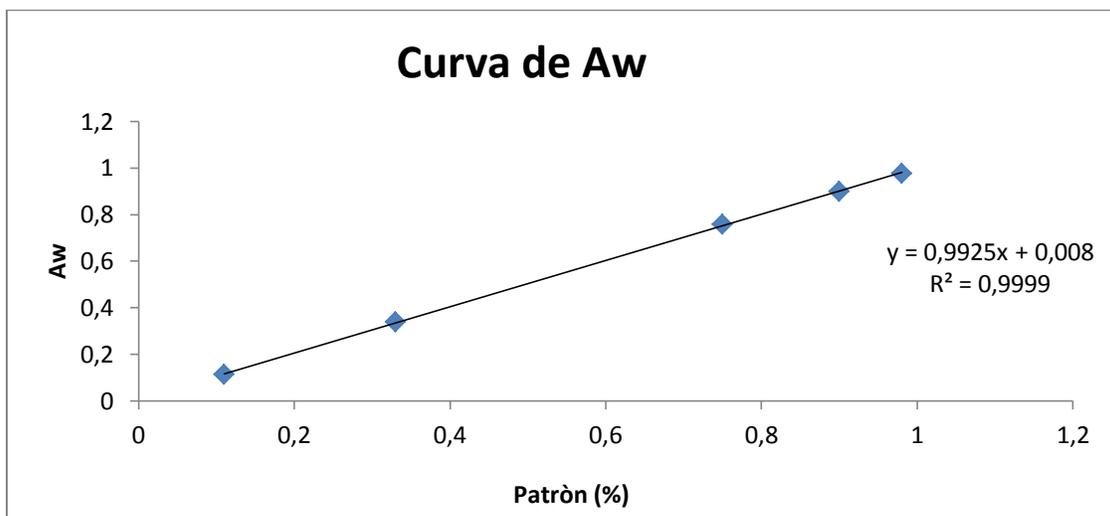


Figura 29. Curva de calibración para determinación de a_w .

Al despejar en términos de la variable dependiente, se obtiene una a_w similar en las dos muestras y se encuentra dentro del rango establecido el cual es de 0,2-0,3 (Tabla 8) para las muestras de leche en polvo. Este valor de a_w para las muestras es muy bajo, por lo que se espera que no haya proliferación microbiana en estas muestras, conclusión a la que también han llegado autores como Gonzales, y otros, (2010).

Tabla 8. a_w en muestras comerciales de leche en polvo deslactosada.

Muestras	a_w
Lk	0,26 ($\pm 0,00$)
Sk	0,27 ($\pm 0,00$)

6.3.1.3 Proteínas

En la Tabla 9, se observa que todas las muestras de leche líquida presentaron un valor muy similar alrededor de 2,9%. La cantidad de proteínas encontrada es menor en las muestras de bebida a base de soya Vs y Sp, con contenidos de 2,01 y 2,45 % respectivamente, aunque se encuentra establecido que este valor no debe ser menor al 3%. En cuanto al contenido de proteínas en la leche en polvo el decreto colombiano 6,16 de 2006 (Ministerio de la Protección Social, 28 de febrero de 2006), establece que las muestras de leche en polvo deben tener un mínimo de proteínas del 30%. Este valor es significativamente bajo para la muestra en polvo colombiana Lk estudiada, por lo que no cumple con el parámetro establecido a diferencia de la leche en polvo Sk que presentó un valor de proteína de 32,77%.

Tabla 9. Proteína (%) en muestras comerciales

Muestras	Proteína (%)	
Leche	Co	3,25
	Al	3,15
	Alq	3,12
	Pa	2,95
	Sf	2,89
	As	3,65
	Lk	19,42
	Sk	32,77
Bebida de soya	Sp	2,45
	Vs	2,01
	Su	3,10

6.3.1.4 Estimación del grado de hidrólisis y la formación de GOS

La medición de los carbohidratos presentes en las muestras de leche deslactosada, permite identificar el grado de hidrólisis y la posible formación de GOS durante el proceso; para las muestras de bebida de soya, se midió la cantidad de carbohidratos totales presentes y la posible presencia de tri y tetra-sacáridos. En la Figura 30 se muestra a modo de ejemplo el cromatograma obtenido mediante CG-FID correspondiente a una de las muestras de leche comerciales. Como se observase se distinguen varias familias de carbohidratos: mono-, di-, tri- y Tetrasacáridos.

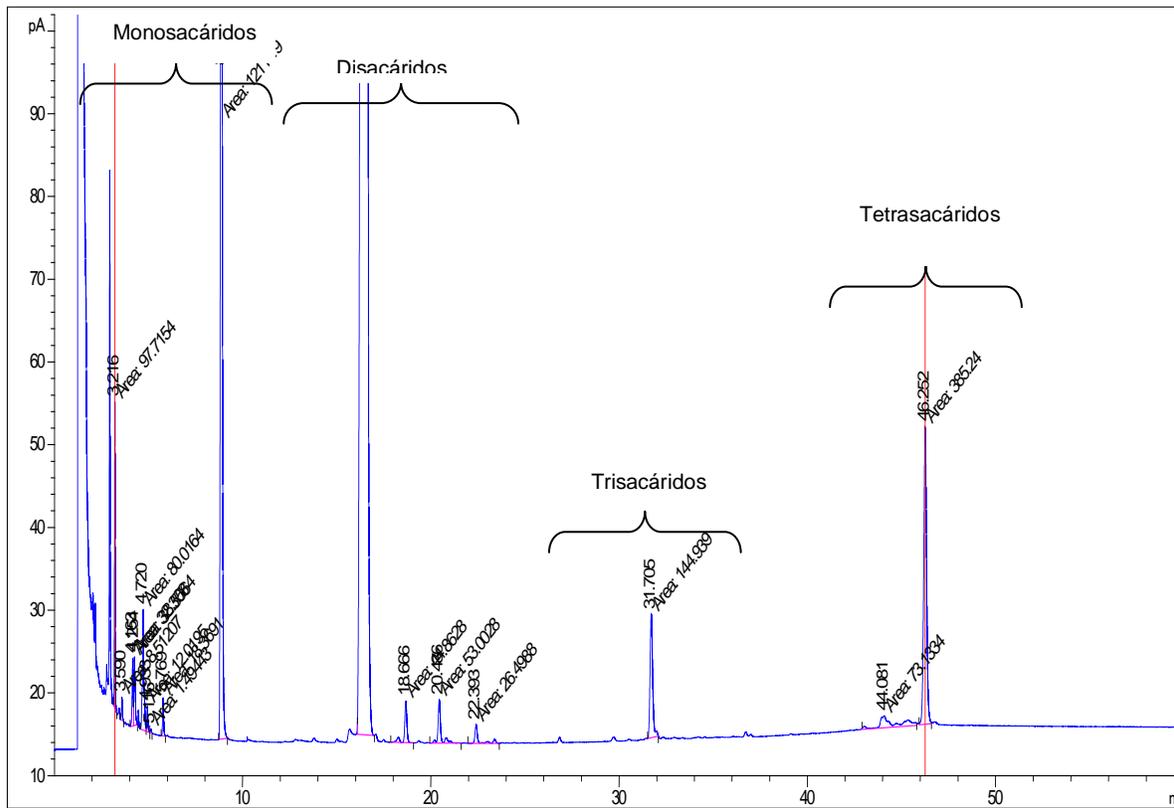


Figura 30. Perfil cromatográfico obtenido del análisis de una muestra de leche deslactosada comercial por cromatografía de gases.

La identificación de diferentes trisacáridos y tetrasacáridos considerados como GOS, se ha realizado con anterioridad, aislándose y caracterizándose compuestos como alolactosa, 6' galactosil lactosa, (1-6)-D-gal (galactobiososa), entre otros (Cardelle, 2007). Basados en estos estudios y tiempos de retención de los picos obtenidos, se realizó la identificación tentativa de los GOS generados en las muestras de leche deslactosada analizadas. El contenido de GOS máximo encontrado en estudios anteriores durante la hidrólisis de leche, fue superior al 50%, pero este valor suele disminuir durante la hidrólisis, debido a que los azúcares formados pasan gradualmente a monosacáridos, aunque muestras con contenido entorno a 7800 mg/L de GOS, son adecuadas para ejercer un efecto beneficioso sobre la salud del consumidor (Mahoney, 1998; Montilla, y otros, 2006; Ruiz-Matute, y otros, 2012).

En las muestras de bebida de soya, no se encontró lactosa. El mayor contenido de carbohidratos se debe a su alto contenido de sacarosa y posiblemente esta alta cantidad puede deberse a la adición de este glúcido, como fue reportado por Tenorio (2015). La

muestra Su presenta el mayor contenido de sacarosa Tabla 10. Se encuentra además una alta cantidad de pinitol, mayoritariamente en las muestras de Su y Vs, esto debido a que es un ciclitol encontrado en las legumbres como la soya, al igual que la estaquiosa, tetrasacárido formado por dos unidades de galactosa, una de glucosa y una de fructosa. El contenido de lactosa en todas las muestras de leche analizadas ha disminuido, quedando al nivel de trazas, aunque es mucho más alto en la muestra Lk, en la cual los valores son similares a los reportados por Montilla, y otros, (2015), con contenidos entre 0,2 y 3,9 g/L. La muestra con menor contenido de lactosa es la Pa, que se encuentra en 1,85 ($\pm 0,07$), valor que se encuentra por debajo del rango reportado por Ruiz-Matute, y otros, 2012, lo que sugiere que las muestras estudiadas si se pueden catalogar como bajas en lactosa.

Tabla 10. Carbohidratos en bebidas a base de soya

Carbohidratos	Muestras de bebida de soya (mg/g de leche)		
	Su	Sp	Vs
Pinitol	39,24 ($\pm 9,51$)	7,69 ($\pm 4,77$)	48,10 ($\pm 4,00$)
Polialcohol	25,82 ($\pm 0,71$)		31,51 ($\pm 0,05$)
Fructosa	8,81 ($\pm 0,63$)	1,54 ($\pm 0,44$)	
Galactosa	27,83 ($\pm 3,15$)	8,52 ($\pm 2,31$)	12,07 ($\pm 2,59$)
Glucosa	4,15 ($\pm 0,28$)	2,22 ($\pm 0,71$)	2,60 ($\pm 0,74$)
Monosacáridos	1,99 ($\pm 0,30$)		
Mio-Inositol	4,90 ($\pm 0,00$)		2,98 ($\pm 0,07$)
Disacáridos	33,75 ($\pm 1,00$)	27,78 ($\pm 8,06$)	17,38 ($\pm 0,35$)
Sacarosa	4565,25 ($\pm 153,81$)	2543,23 ($\pm 731,85$)	1503,33 ($\pm 23,89$)
Rafinosa	74,87 ($\pm 6,65$)		67,14 ($\pm 5,61$)
Trisacáridos		29,80 ($\pm 13,12$)	
Tetrasacáridos	32,16 ($\pm 5,24$)		
Estaquiosa	199,06 ($\pm 14,23$)		40,37 ($\pm 3,95$)

Las muestras Su, Sp, Vs, presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 11. Carbohidratos encontrados en muestras comerciales.

Carbohidratos	Muestras					
	Leche líquida (mg/g de leche)					
	Co	Sf	Pa	Al	Alq	As
Galactosa	2223,32 (±103,22)	1855,00(±153,83)	2212,06(±159,32)	1588,36 (±439,09)	2569,37 (±56,86)	2562,24(±40,68)
Glucosa	2007,50 (±130,08)	1954,87(±145,90)	2017,41 (±47,41)	1525,54 (±332,25)	2172,08 (±43,70)	2309,67(±16,72)
Fructosa	19,78 (±2,95)	41,91 (±4,39)	21,78 (±0,02)	22,85 (±5,77)	27,12 (±0,85)	28,75(±0,77)
Lactosa	357,72 (±30,28)	194,18 (±14,62)	1,85 (±0,07)	3,60 (±0,65)	3,70 (±2,39)	3,13 (±0,72)
Otros disacáridos	60,47 (±6,51)	84,94 (±5,58)	11,35 (±0,90)	14,66 (±3,50)	10,77 (±0,96)	27,25 (±17,41)
Alolactosa	183,72 (±18,42)	165,77 (±14,54)	10,81 (±1,66)	9,78 (±2,88)	9,22 (±1,46)	14,36 (±0,06)
(1-6)-D-gal (galactobiosa)	84,90 (±9,69)	105,97 (±7,48)		8,16 (±2,57)	7,52 (±1,35)	13,81 (±0,04)
6' galactosil lactosa	23,53 (±3,35)	28,91 (±1,51)		2,23 (±0,74)	2,01 (±0,55)	15,74 (±2,94)
Trisacàrido	72,28 (±31,62)	61,50 (±2,96)				
Tetrasacàridos	9,56 (±5,31)	11,01 (±1,34)				
Total GOS	373,99 (±68,66)	373,15 (±62,45)	10,81	20,17(±5,31)	18,75 (±3,77)	43,90 (±0,99)

* El total de GOS, está dado por la suma de Alolactosa, (1-6)-D-gal (galactobiosa), 6' galactosil lactosa, Trisacàrido, Tetrasacàridos, Maltotriosa, tetra Maltotetraosa.

* El total de GOS para la leche líquida Pa, no tiene desviación, ya que solo se debe a la cantidad de alolactosa presente.

*Las muestras presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.3.2 Evaluación del avance d la reacción de Maillard

6.3.2.1 Etapas iniciales. Determinación de Furosina

La representación del perfil cromatográfico de un patrón de furosina se muestra en la Figura 31.

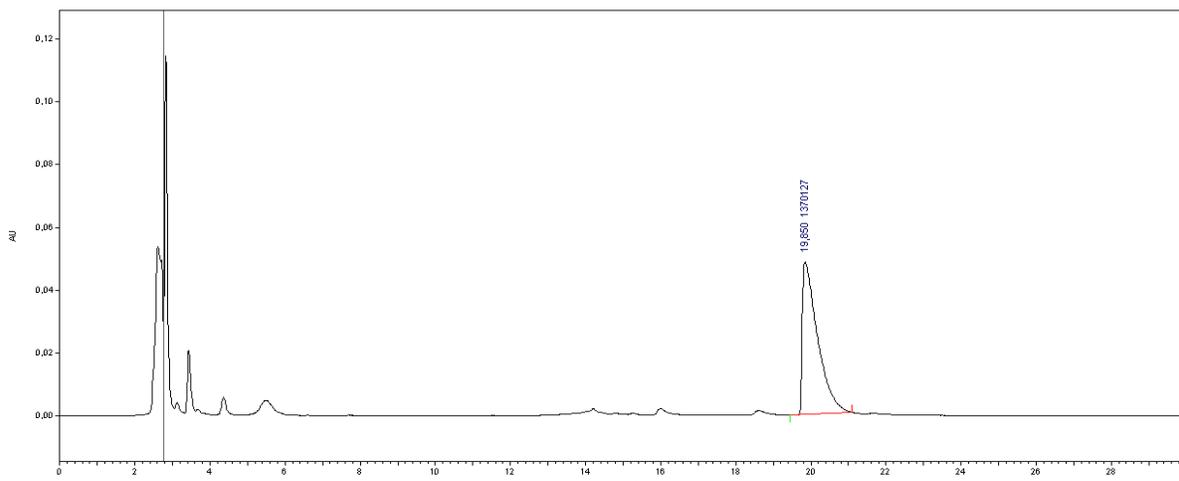


Figura 31. Perfil cromatográfico del patrón de furosina, por análisis de CLAR.

El contenido de furosina (mg de furosina /100 g de proteína) (Tabla 12), se calculó teniendo en cuenta la recta de calibrado $y = 3586,1x - 17428$ (Figura 32).

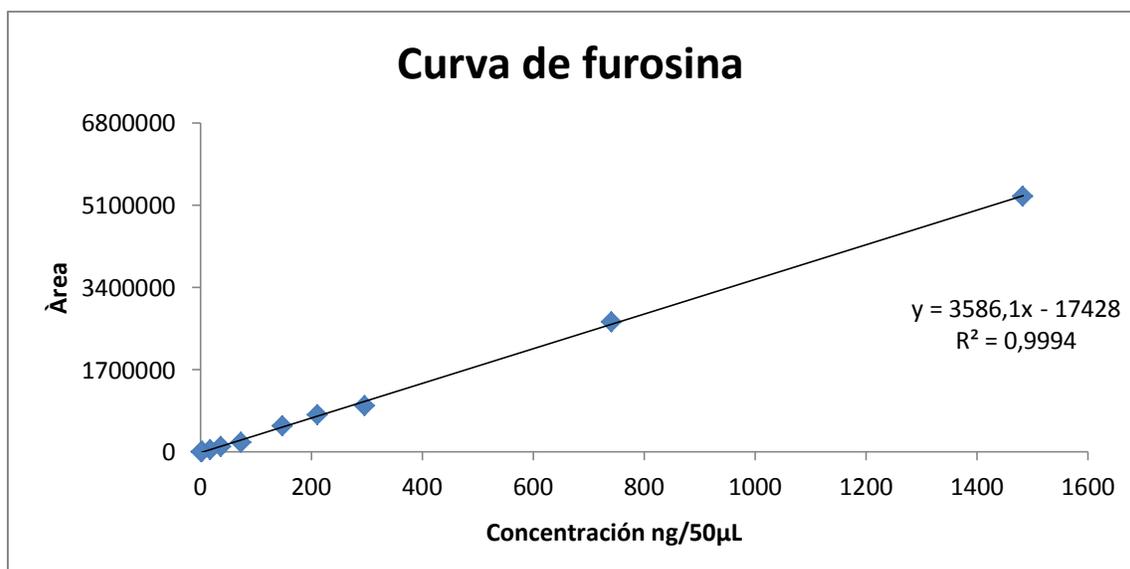


Figura 32. Curva patrón para determinación de furosina.

Respecto a las muestras de bebida de soya, el contenido de furosina más alto lo presenta la muestra Sp, aunque su contenido de carbohidratos no es muy elevado.

El mayor contenido de furosina lo presentan las muestras de leche en polvo Lk y Sk, debido a su formación durante su elaboración y almacenamiento, presentando valores de 956,4 ($\pm 84,9$) y 1539,62 ($\pm 87,31$) mg/g de proteína respectivamente (Tabla 12). Estos resultados fueron más elevados que los esperados. Análisis de leche en polvo previos han reportado valores de 600 mg/g de proteína Van Renterghem y De Block, 1996. Además se han estudiado diversas muestras de preparados lácteos para personas de edad avanzada con rangos de 235,5 a 819,7 mg/100 g proteína (Montilla, y otros, 2015), y aun comparado con estas muestras el resultado obtenido en este análisis fue superior, de esta forma se observa que posiblemente hubo una inadecuada conservación de las muestras o exceso en el tratamiento térmico, lo que incrementa la RM.

En todas las muestras de leche líquida deslactosada, los resultados se encuentran dentro de rangos previamente publicados por otros autores para muestras de leche entera UHT (Van Renterghem y De Block, 1996), siendo el valor de furosina más alto para la muestra Sf.

Tabla 12. Proteínas (%) y furosina (mg/100 g de proteína) en muestras de leche y bebidas a base de soya.

Muestras		Furosina (mg/100 g de proteína)
Leche	Co	100,00($\pm 5,63$)
	Al	198,77($\pm 12,40$)
	Alq	195,70($\pm 6,73$)
	Pa	228,39($\pm 2,90$)
	Sf	489,95($\pm 49,28$)
	As	96,52($\pm 1,86$)
	Lk	956,4($\pm 84,9$)
	Sk	1539,62($\pm 87,31$)
	Bebida de soya	Sp
Vs		12,7($\pm 0,15$)
Su		16,00($\pm 0,01$)

Las muestras presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.3.2.2 Etapas intermedias. Determinación del hidroximetilfurfural (HMF)

La medición en las muestras se realizó con un análisis por CLAR, el pico arrojado se encuentra en un tiempo de retención de 6,953 (Figura 33).

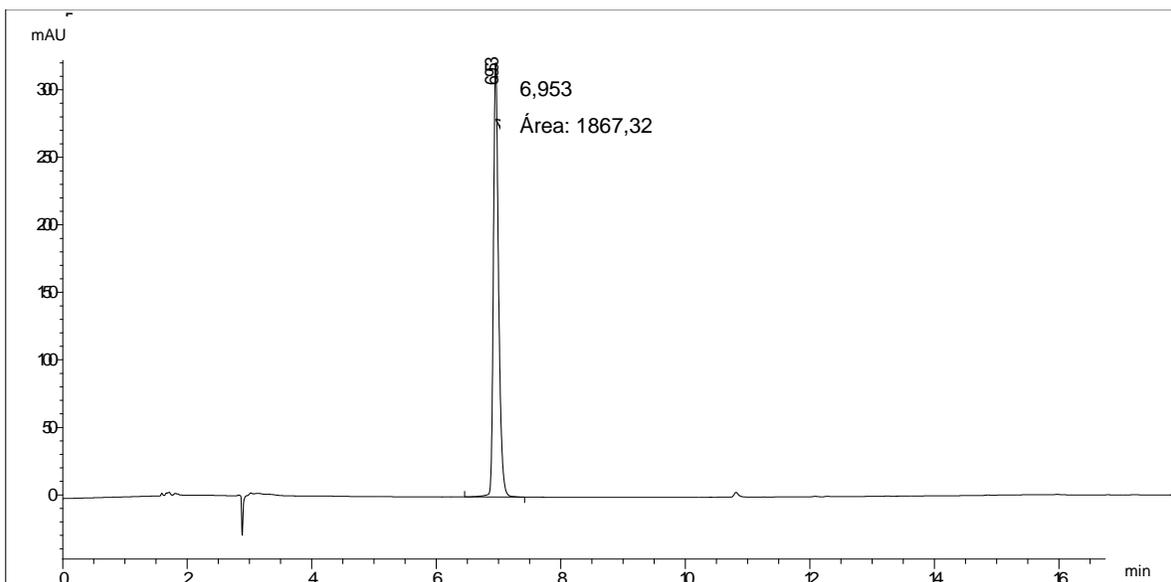


Figura 33. Cromatograma de HMF.

Se realizó una recta de calibración con patrones puros de MHF y observó una linealidad de $y = 38936x - 0,655$ (Figura 34), a partir del cual se calculó la concentración de HMF en las muestras.

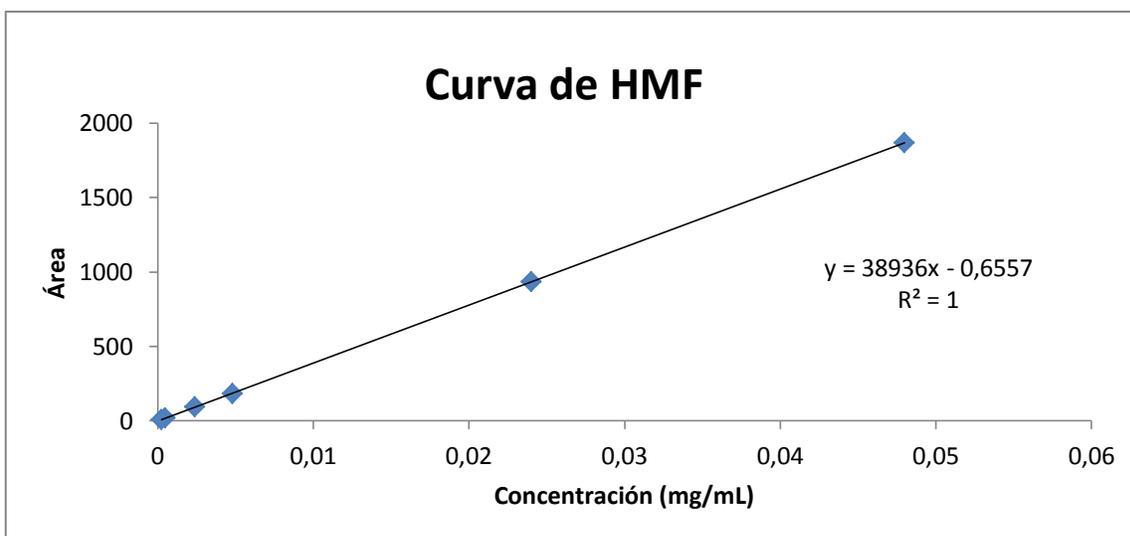


Figura 34. Recta de calibrado patrón para la determinación de HMF.

El HMF en las muestras de leche líquida estudiadas arrojó un valor muy bajo; en la muestra As, es de trazas. El contenido de HMF ha sido estudiado en diferentes muestras de leches para bebés (Demirhan, 2015), y el valor encontrado (0,905-0,013 mg/g) se encuentra del rango de las muestras aquí estudiadas Tabla 13.

En las muestras de bebida de soya encontramos que el contenido de HMF se encuentra a nivel de trazas y sólo puede ser cuantificado en la muestra Sp (Tabla 13), lo cual se relaciona con el contenido bajo en furosin generado en las primeras etapas de la RM.

Tabla 13. Concentración de HMF en las muestras de leche y bebidas a base de soya.

Muestras		HMF (mg/100g de leche)
Leche	Co	0,05(±0,00)a
	Al	0,07(±0,00)a
	Alq	0,12(±0,01)a
	Pa	0,09(±0,01)a
	Sf	0,07(±0,01)a
	As	ND
Bebida de Soya	Sp	0,20(±0,01)
	Vs	ND
	Su	ND

Las muestras no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.3.3 Estudio del efecto del almacenamiento en la calidad de las leches comerciales en polvo.

Almacenamientos: a) T=40°C y b) T=40°C y A_w= 0,44

Las muestras de leche en polvo presentan una alta cantidad de carbohidratos debido que se encuentra en estado sólido (Tabla 14). La mayor cantidad de oligosacáridos se encontró en la muestra de leche Lk, en la cual hay una alta cantidad de maltotriosa y tetramaltotriosa, esto se debe a la presencia de maltodextrinas reportada en la etiqueta. Durante el almacenamiento se observa una disminución de carbohidratos, esto se debe a la pérdida de estos durante el desarrollo de las reacciones de Maillard (Rada Mendoza, 2002).

Tabla 14. Carbohidratos en muestras de leche en polvo.

Carbohidratos	Leche en polvo (mg/g de leche)			
	Lk	Sk	Sk 21 días	Lk 21 días
Galactosa	11525,75 (±933,94)	23633,12 (±1266,80)	13318,86 (±342,61)	4567,18 (±1813,49)
Glucosa	13834,71 (±976,18)	21667,81 (±620,34)	11231,25 (±421,77)	5902,20 (±1969,40)
Fructosa	151,33 (±3,90)	175,47(±15,50)	363,76(±20,71)	123,15 (±54,56)
Lactosa	1097,87 (±84,90)	78,87(±2,15)	56,37 (±12,30)	502,14(±186,50)
Otros disacáridos	1194,96 (±121,03)	258,18 (±13,97)		661,23(±307,89)
Alolactosa	1333,07(±124,78)	214,30 (±4,32)	136,10(±28,03)	568,62(±228,85)
(1-6)-D-gal (galactobiosa)	797,12 (±78,15)	168,79 (±4,60)	92,13 (±11,96)	327,70(±132,45)
6' galactosil lactosa	217,78 (±23,94)	109,16 (±2,92)	54,73 (±34,09)	93,57 (±45,94)
Maltotriosa	1365,4 (±174,36)			
tetra Maltotetraosa	431,70 (±58,18)			
Total GOS	4144,90(±518,19)	492,25(±52,73)	282,95(±40,73)	989,89(±273,53)

* El total de GOS, está dado por la suma de Alolactosa, (1-6)-D-gal (galactobiosa), 6' galactosil lactosa.

*Las muestras presentan diferencias significativas ($P < 0,05$)

La RM incrementa con la temperatura durante el almacenamiento, esto lleva a un aumento de los compuestos de Amadori en las primeras etapas de la reacción, pero este contenido puede disminuir al aumentar el tiempo, como sucede en la determinación de

furosina con los dos almacenamientos (Figura 35 y 36); esto se debe a que la RM puede progresar hacia etapas más avanzadas, dado que la velocidad de formación de los compuesto de Amadori en esta fase es inferior su descomposición (Rada Mendoza, 2002). Se logra observar cómo afecta el almacenamiento en la evolución de las RM, la cantidad de furosina aumenta más rápido en las muestras almacenadas con actividad de agua controlada. Posiblemente el alto contenido de furosina en la muestra de leche colombiana se deba a su contenido de maltodextrinas reportado en la etiqueta.

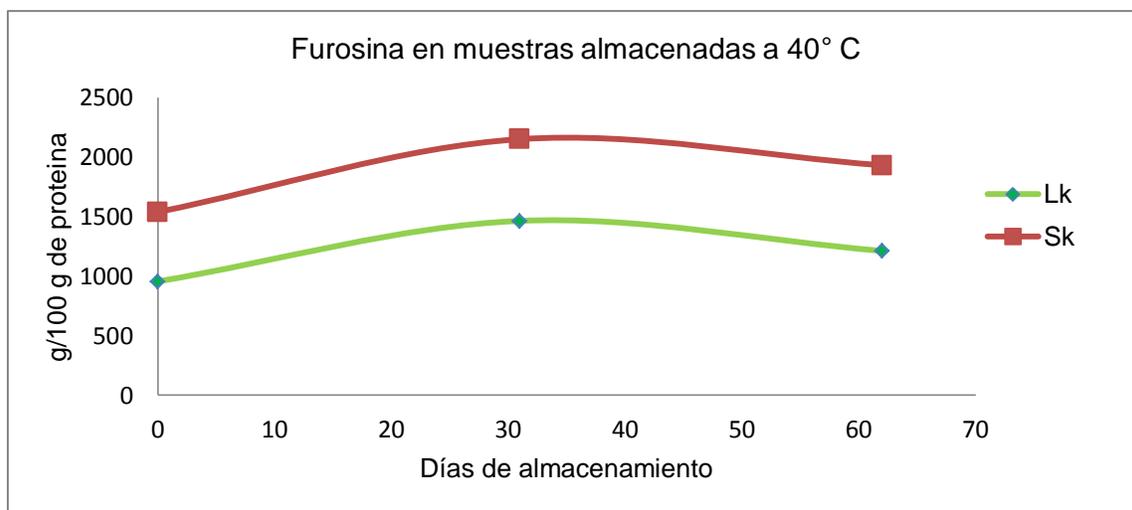


Figura 35. Gráficas de variación del contenido de Furosina en muestras de leche en polvo almacenadas a 40°C.

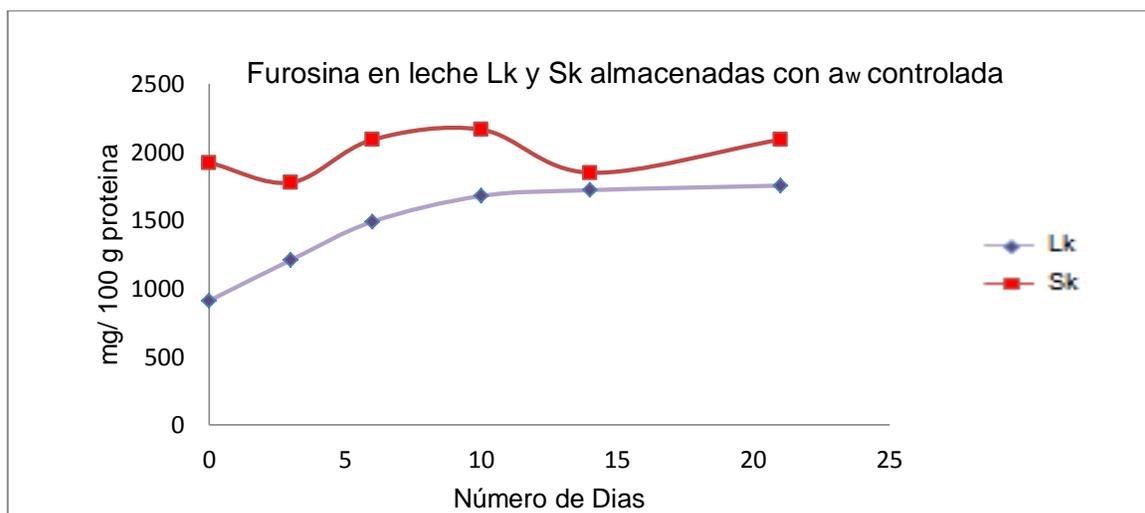


Figura 36. Gráficas de variación en la cantidad de Furosina en las muestras de leche en polvo Lk y Sk almacenadas con a_w controlada.

El contenido de HMF en las muestras estudiadas es bajo y aumenta de forma más rápida en la muestra Sk. La muestra Lk presenta un contenido mayor de HMF lo que sugiere que presenta una RM más avanzada, posiblemente por las maltodextrinas presentes (Figura 37 y 38).

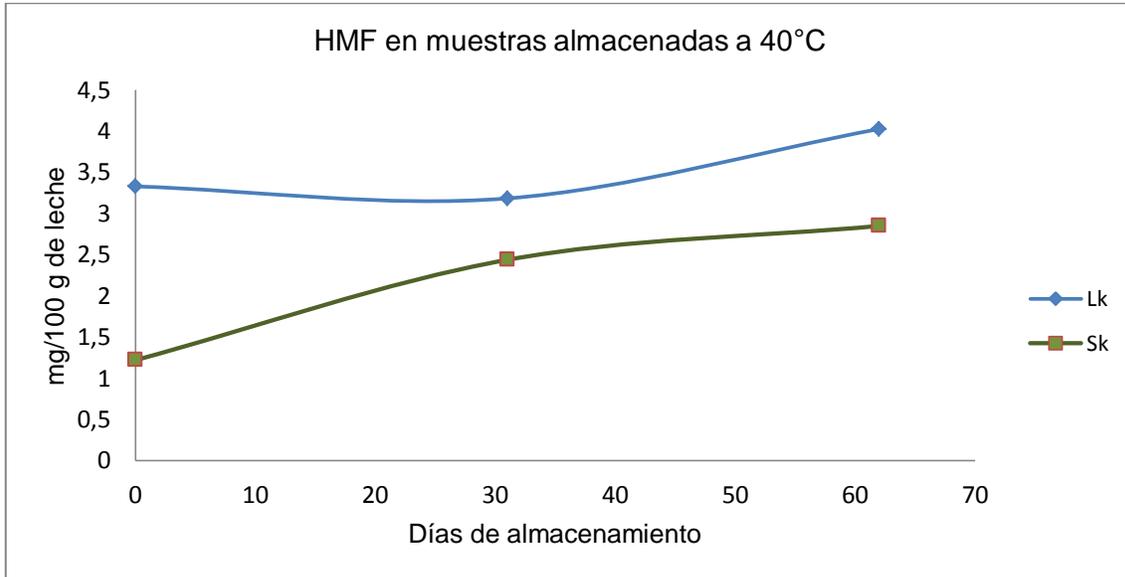


Figura 37. Gráfica de variación en el contenido de HMF en muestras de leche en polvo almacenadas a 40°C.

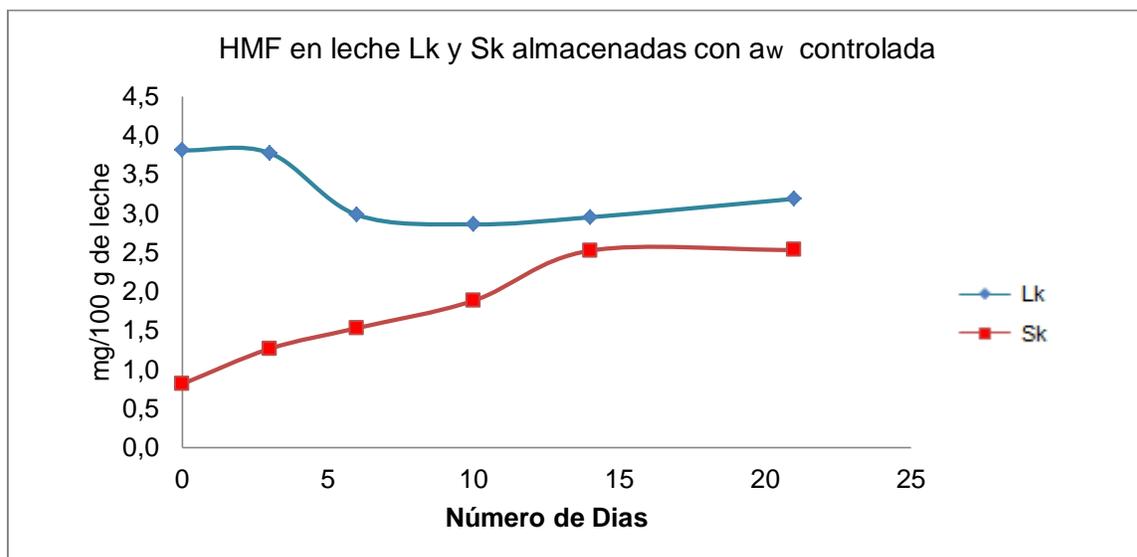


Figura 38. Gráficas de la variación del contenido de HMF en muestras de leche en polvo Lk y Sk almacenadas con a_w controlada.

Con objeto de estudiar la formación de compuestos como melanoidinas por el avance de la RM, se realizó la determinación de color en las muestras almacenadas, el valor encontrado fue muy bajo, mayoritariamente en la muestra Lk Tabla 15. Por lo que se concluye que el tiempo de almacenamiento a las condiciones evaluadas no es suficiente para la formación de compuestos marrón debido al estado avanzado de la RM.

Tabla 15. Color en muestras almacenadas.

Muestras	N° de días	Color
		Abs. a 420 nm
	0	Nd
	3	Nd
Lk	6	Nd
	10	Nd
	14	Nd
	21	Nd
Sk con a _w controlada	31	Nd
	0	0,01(±0,00)
	3	0,01(±0,01)
Sk	6	0,03(±0,00)
	10	0,04(±0,00)
	14	0,05(±0,00)
	21	0,06(±0,00)
Sk con a _w controlada	31	0,03 (0,01)

CONCLUSIONES

Se ha adecuado la metodología para la inmovilización de la enzima β -D-galactosidasa, modificando condiciones como pH, temperatura y cantidad de enzima a soportar, para obtener el mejor rendimiento de inmovilización.

Se ha logrado la inmovilización de la enzima β -D-galactosidasa en el soporte mesoporoso MCM-41 para la hidrólisis de lactosa presente en muestras de leche. Se evidencian cinco reúsos de la enzima inmovilizada en procesos de hidrólisis posteriores manteniéndose una actividad de 95%, mostrando que la unión con la enzima no es solamente superficial, por lo que se puede decir que probablemente se forma un enlace covalente en el proceso.

Se ha establecido las condiciones adecuadas de hidrólisis para un mayor rendimiento de la hidrólisis de lactosa y la formación de oligosacáridos de la lactosa (GOS) con la enzima β -D-galactosidasa de Lactozym 6500 L inmovilizada.

Se implementó el uso de agitación por ultrasonido para el proceso de inmovilización y para la hidrólisis de lactosa, y se encontró que la inmovilización con ultrasonido disminuye la actividad enzimática, y durante la hidrólisis se mejora la obtención de GOS.

La formación de compuestos de las etapas iniciales e intermedias de la RM se determinó en muestras comerciales de leche deslactosadas UHT, encontrándose dentro de los intervalos establecidos en la bibliografía.

Las muestras de leche de soya estudiadas presentan bajo contenido de intermediarios de la RM.

Se evidenció el avance de la RM con la determinación de Furosina y HMF en muestras de leche en polvo comercial deslactosada tras su almacenamiento bajo condiciones controladas (40°C y a_w de 0,44).

RECOMENDACIONES

La inmovilización de la enzima sobre el soporte mesoporoso se realizó utilizando diferentes tiempos de reacción, pero aunque hubo una disminución en la cantidad de enzima utilizada, se deben realizar más estudios para obtener el menor gasto de enzima durante el procedimiento.

Se debe realizar la determinación de proteínas en el soporte inmovilizado por un método como el de Kjeldahl, debido a que es muy importante el conocimiento de las cantidades específicas de proteínas inmovilizadas sobre el soporte y conocer cuanta de esta enzima aun conserva actividad.

En este trabajo se propuso la obtención de muestras de leche bajas en lactosa con la enzima β -D-galactosidasa, y aunque se obtuvo resultados muy positivos, es vital optimizar las cantidades de enzima soportada y tiempos de reacción que permitan establecer la mayor hidrólisis con alta obtención de GOS, lo que le dará a la muestra un valor agregado mayor.

La determinación de las propiedades de las muestras almacenadas dio una idea de la calidad de estas, pero es de gran importancia realizar un estudio en diferentes lotes de muestras para lograr establecer un resultado muy homogéneo sobre el análisis.

El análisis de color en las muestras almacenadas a una temperatura y a_w controlada no se logró obtener debido a que el tiempo de almacenamiento fue poco, pero se pueden establecer condiciones para que el almacenamiento sea mayor y de esta forma obtener un resultado favorable de este análisis.

BIBLIOGRAFÍA

- Ansari, S. A., Satarb, R., Sandesh, C., & Khan, M. J. (2013). Enhanced stability of *Kluyveromyces lactis* β galactosidase immobilized on glutaraldehyde modified multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, 97(15), 258– 263.
- Aravind, G., & Mulimani, V. (2008). Removal of flatulence-inducing sugars by using free and polyvinyl alcohol immobilized α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(3), 354-359.
- Boscha, L., Alegría, A., Farréa, R., & Clemente, G. (2008). Effect of storage conditions on furosine formation in milk–cereal based baby foods. *Food Chemistry*, 107(4), 1681-1686.
- Cardelle Cobas, A. (2007). *Síntesis de galactooligosacáridos a partir de lactosa y lactulosa con β -galactosidasas de aspergillus acuelatus y kluyveromyces lactis*. Trabajo para obtener el diploma de estudios avanzados, Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Química Física Aplicada, Madrid.
- Cardelle, A. (2007). *Síntesis de galactooligosacáridos a partir de lactosa y lactulosa con β -galactosidasas de aspergillus acuelatus y kluyveromyces lactis*. Trabajo para obtener el diploma de estudios avanzados, Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Química Física Aplicada, Madrid.
- Carlsson, N., Gustafsson, H., Thorn, C., Olson, L., Holmberg, K., & Akerman, B. (2014). Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical–chemical perspective. *Advances in Colloid and Interface Sciecnce*, 205, 339-360.
- Chandan, R. C. (2011). *Dairy-based Ingredients. Capítulo 1: Properties of milk and its components*. illustrated.
- Corral, J. M. (2005). *Clonación, expresión y evolución derigida de β -galactosidasas de procariotas*. Tesis doctoral, Univerisdad de Granada, Departamento de Genética, Granada.
- Daza, K. (2013). *Síntesis de sílce mesoporosa ordenada hexagonalmente MCM-41 pentóxido de niobio incorporado y su efecto fotodegradante*. Universidad del Cauca, Departamento de Química.

- De Block, J., Merchiers, M., Mortiera, L., Braekmana, A., Ooghe, W., & R., V. R. (2003). Monitoring nutritional quality of milk powders: capillary electrophoresis of the whey protein fraction compared with other methods. *International Dairy Journal*, 13(2-3), 87-94.
- Demirhan, B. D. (2015). Short communication: Determination of potencial 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde and 2-furaldehyde compounds in follow-on milks and infant formulas using the high-performance liquid chromatography method. *Journal of Dairy Science*, 98(2), 818-822.
- Esquivel, M. D. (2011). *Síntesis, caracterización y aplicaciones de materiales periódicos mesoporosos organosilícicos*. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, Departamento de Química Orgánica, Córdoba.
- Ferrer, E., Alegría, A., Courtois, G., & Farré, R. (2000). High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra high-temperature-treated cows' milk. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 599-606.
- Foda, M. I.-L. (2000). Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor. *Process Biochem*, 35, 581-587.
- Giacomini, C., Villarino, A., Franco-Fraguas, L., & Batista Viera, F. (1998). Immobilization of b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: Comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4(5-6), 313-327.
- Gonzales, A., Naranjo, G., G.E, L., & Malec, L. (2010). Maillard reaction kinetics in milk powder: Effect of water activity at mild temperatures. *Internacional DairyJournal*, 20, 40-45.
- González, L., & Castello, P. R. (2000). La glucosilación no enzimática de proteínas. *Ciencia al día internacional*, 3(2), 1-17.
- Guío, F. A. (2014). *Tesis: Evaluación de la producción de galactooligosacáridos a partir de materias primas lácteas con β - galactosidasa inmovilizada*. Tesis para optar como Magister en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Bogotá.
- Junsomboon, J., & Jakmunee, J. (2008). Flow injection conductometric system with gas diffusion separation for the determination of Kjeldahl nitrogen in milk and chicken meat. *Analytica Chimica Acta*, 627(2), 292-298.
- Ladero Galán, M. (1999). *Hidrólisis de lactosa con β -galactosidasas de *Kluyveromyces fragilis* y de *Eseherichia colí**. Memoria que para optar al Grado de

Doctor en Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Ingeniería Química, Madrid.

- Lal Verma, M., Barrow, C. J., Kennedy, J., & Puri, M. (2012). Immobilization of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(2), 432-437.
- Lee, D. H., Kim, J. M., Kang, S. W., Lee, J. W., & Kim, S. W. (2006). Pretreatment of lipase with soybean oil before immobilization to prevent loss of activity. *Biotechnology Letters*, 28(23), 1965-1969.
- Lima, J. F., Delerue-Matos, C., & Vaz, M. C. (1999). Flow-injection analysis of Kjeldahl nitrogen in milk and dairy products by potentiometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 385(1-3), 437-441.
- Lomer, M., Parkes, G., & Sanderson, J. (2008). REVIEW ARTICLE: Lactose intolerance in clinical practice-myths and realities. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(2), 93-103.
- Mahoney, R. R. (1998). Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry*, 63(2), 147-154.
- Mammarella, E. J. (2001). *Estudio del sistema de inmovilización de enzimas para la hidrólisis de lactosa*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Del Litoral, Ingeniería Química.
- Marciello, M., Bernal, C., Mesa, M., Sierra, L., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., y otros. (2013). Immobilisation and stabilisation of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* using a glyoxyl support. *Internacional Dairy Journal*, 28(2), 76-82.
- Miletic, N., Nastasovic, A., & Loos, K. (2012). Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*, 115, 126-135.
- Ministerio de la Protección Social, R. d. (28 de febrero de 2006). Decreto 616 de 2006., (pág. 41).
- Montilla, A., Megías-Pérez, R., Olano, A., & Villamiel, M. (2015). Presence of galactooligosaccharides and furosine in special dairy products designed for elderly people. *Food Chemistry*, 172(481–485), 481-485.
- Montilla, A., Van de Lagemaat, J., Olano, A., & Del Castillo, M. D. (2006). Determination of oligosaccharides by conventional High-Resolution Gas Chromatography. *Chomatographia*, 63(453-458), 453-458.

- Oliveira, C., Guimarães, P. M., & Domingues, L. (2011). Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 29(6), 600-609.
- Panesar, P. S., Kumari, S., & Panesar, R. (2010). Review Article: Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. *Enzyme Research*, 2010, 1-16.
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J., Guamis, B., & Trujillo, A. (2009). Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1974-1979.
- Porretta, S., & Sandei, L. (1991). Determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural (HMF) in tomato products: proposal of a rapid HPLC method and its comparison with the colorimetric method. *Food Chemistry*, 39(1), 51-57.
- Rada Mendoza, M. (2002). *Influencia de la presencia de oxígeno y la hidrólisis de la lactosa en la formación de lactulosa y furosina durante el tratamiento térmico de la leche*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Ciencia y Tecnología de alimentos.
- Rada-Mendoza, M., Olano, A., & Villamiel, M. (2002). Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods. *Food Chemistry*, 79(4), 513-516.
- Rufián-Henares, J. A., Delgado-Andrade, C., Jiménez-Pérez, S., & Morales, F. J. (2007). Assessing nutritional quality of milk-based sport supplements as determined by furosine. *Food Chemistry*, 101(2), 573-578.
- Ruiz-Matute, A. I., Corzo-Martínez, M., Montilla, A., Olano, A., Copovi, P., & Corzo, N. (2012). Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 28(2), 164-169.
- Sanz, M. L., Olano, A., & Castillo, Z. M. (2003). Nuevos indicadores químicos para el control de la calidad de alimentos. *ALIMENTACION, NUTRICION Y SALUD*, 10(4), 91-99.
- Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489-511.
- Scott, W. (1957). Water relations of food spoilage microorganisms. *Advan. Food Res.*(7), 83-127.

- Seok, Y., Ho, J., Woo, S., & Wook, S. (2010). Performance of b-galactosidase pretreated with lactose to prevent activity loss during the enzyme immobilisation process. *Food Chemistry*, 123(1), 1-5.
- Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., y otros. (1985). Measurement of protein using bicinchonic acid. *150*, 76-85.
- Tenorio, D., Victor, A., & Villanueva, J. (2015). Sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content milk- and soy-juice beverages. *Food Chemistry*(173), 1100-1106.
- Van Ooyen, A. J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M. M., Jacobs, D. I., Colussi, P. A., y otros. (2006). Minireview: Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Federation of European Microbiological Societies*, 6, 381-392.
- Van Renterghem, R., & De Block, J. (1996). Furosine in consumption milk and milk powders. *Dairy Journal*, 6(371-382).
- Vesterlund, S., Salminen, K., & Salminen, S. (2012). Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 319-321.
- Viñas, P., Campillo, N., Hernández- Córdoba, M., & Candela, M. E. (1992). Simultaneous liquid chromatographic analysis of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde and methyl anthranilate in honey. *Food Chemistry*, 44(1), 67-72.