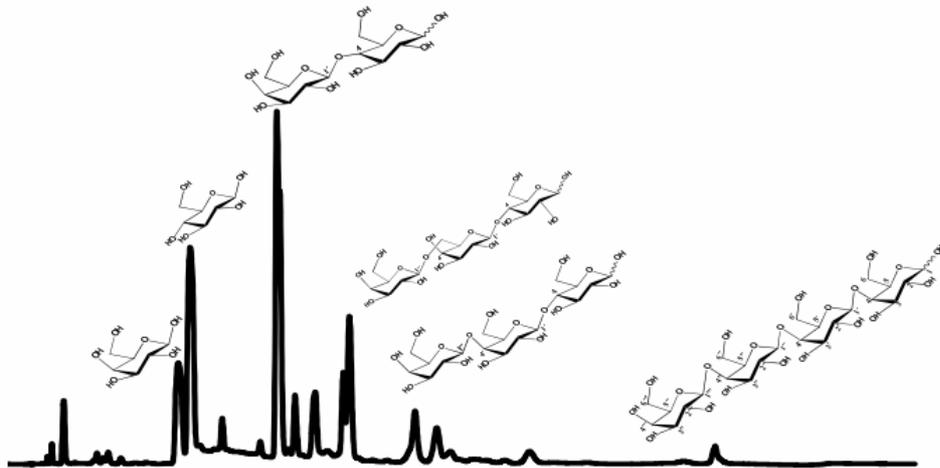


Estudio de la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*

Study of the synthesis of GOS by Kluyveromyces lactis β -galactosidase

Estudo da síntese de GOS pola β -galactosidasa de Kluyveromyces lactis



David Rodríguez Olivenza

Máster en Biotecnología Avanzada

Universidade da Coruña

Febrero 2015

TRABAJO FIN DE MÁSTER

D. Manuel Becerra Fernández autoriza la presentación del Trabajo de Fin de Máster: *Estudio de la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de Kluyveromyces lactis* presentado por el alumno D. **David Rodríguez Olivenza**, estudiante del Máster en Biotecnología Avanzada, para su defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña, a 2 de Febrero de 2015

Fdo.: Manuel Becerra Fernández

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

- Alimentos funcionales.....	3
- Galacto-oligosacaridos.....	4
- Síntesis enzimática de GOS por β -Galactosidasas.....	10
OBJETIVOS.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
- Materiales.....	13
✓ β -Galactosidasa.....	13
✓ Lactosa.....	14
✓ Suero de leche.....	14
✓ Tampones.....	15
- Métodos.....	16
✓ Medida de la actividad β -galactosidasa.....	16
✓ Determinación de azúcares reductores.....	17
✓ Ensayos con disoluciones de lactosa comercial.....	18
✓ Ensayos con disoluciones de ultrafiltrado de suero de leche concentrado.....	18
✓ Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	19
✓ Análisis estadístico.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
✓ Puesta a punto de un método para determinar la síntesis de GOS mediante HPLC.....	20
✓ Aproximación inicial a la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de <i>K. lactis</i>	22
✓ Diseño de un plan factorial completo para evaluar la síntesis de GOS.....	24
✓ Método de la máxima pendiente.....	28
CONCLUSIONES.....	30
AGRADECIMIENTOS.....	31
BIBLIOGRAFIA.....	31

INTRODUCCIÓN

Alimentos funcionales

El concepto de “alimento funcional” se acuñó en Japón a mediados de 1980. En ese momento, las autoridades sanitarias de Japón llegaron a la conclusión de que un mayor consumo de ciertos tipos de alimentos podría reducir los riesgos a padecer ciertas enfermedades. Después de un comienzo relativamente lento, el concepto de alimentos funcionales ha estimulado el interés entre las principales empresas de alimentos de todo el mundo. En la actualidad, el mercado de alimentos funcionales ronda los 43 mil millones de dólares en los EE.UU., con un crecimiento anual de mercado del 5-10% (Sloan, 1999).

Roberfroid fue uno de los primeros en definir un “alimento funcional” en 1996, lo definía como *“un componente de la dieta que puede ejercer efectos fisiológicos sobre el consumidor, que puede eventualmente conducir a un buen estado de salud”*.

En la actualidad un alimento funcional es considerado ampliamente como cualquier alimento o ingrediente que, además de proporcionar beneficios nutricionales, puede contribuir a la salud del consumidor (Marriott, 2000) de forma que se traduzca en una mejora de la salud del individuo y/o una reducción del riesgo de enfermedad (Howlett, 2008). Estos beneficios pueden ser de varios tipos de acuerdo a Bellisle *et al.* (1998), un alimento funcional afecta a uno o un número limitado de funciones en el cuerpo humano de manera específica con el fin de tener efectos positivos sobre la salud.

Tradicionalmente, las frutas y los vegetales se han visto como una fuente de componentes funcionales, pero investigaciones recientes han establecido que los alimentos derivados de los animales como la leche y los productos lácteos también pueden ser una fuente valiosa de estos componentes (Bauman *et al.*, 2006).

Algunos ejemplos de alimentos funcionales son: fibra dietética, prebióticos, probióticos, ácidos grasos, péptidos bioactivos, antioxidantes naturales, vitaminas, minerales, fitoesteroles y fitoestanoles. Para ayudar al restablecimiento del equilibrio intestinal asociado a un estado saludable se encuentran los denominados probióticos, prebióticos y simbióticos (Roberfroid, 2000).

Los productos lácteos funcionales, son uno de los sectores más desarrollados en la Unión Europea.

Galacto-oligosacaridos

Un componente funcional típico es lo que se conoce como fibra alimentaria. Los Galacto-oligosacaridos (GOS en adelante) están clasificados como carbohidratos no digeribles (NDOs, *Non Digestible Oligosaccharides*) resistiendo a los procesos digestivos en estomago e intestino delgado de forma que el 90% de los GOS consumidos alcanzan el colon (van Loo *et al.*, 1999).

Los GOS no pueden ser digeridos por las enzimas del intestino delgado, pero son fermentables por bacterias en el intestino grueso (Champ *et al.*, 2003). Esto es debido al sustrato ya que las enzimas digestivas en humanos tienen cierta especificidad hacia enlaces α -glucosídicos mientras que estos GOS tienen una configuración β . Algunas β -galactosidasas localizadas en el intestino delgado son capaces de digerir GOS pero su actividad es por lo general débil o a menudo deficiente (Ito *et al.*, 1993).

Esta fibra puede tener distintos orígenes y por lo tanto distintas propiedades. Los galacto-oligosacaridos son utilizados en la industria alimentaria para añadir un carácter funcional a los alimentos que lo incorporan.

Estos GOS presentan ventajas para la salud del consumidor. El consumo de los mismos en la dieta, estimula la proliferación de bifidobacterias y lactobacilos en el intestino, los cuales son beneficiosos para la salud humana (Sako *et al.*, 1999).

Tienen una fórmula genérica de D-glucosa- $[\beta$ -D Galactosa] $_n$ donde n puede variar, cambiando así la longitud total del azúcar entre tres y diez monosacáridos, aunque los más abundantes son los de tres y cuatro monosacáridos (Figura 1).

Los efectos beneficiosos que aportan los GOS a la salud, son por un lado, mediante la proliferación selectiva de bacterias beneficiosas en el intestino, especialmente *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, se genera una resistencia frente a la colonización de patógenos reduciendo así infecciones intestinales y modulando el sistema inmune. El otro mecanismo es la producción de ácidos grasos de cadena corta

(en adelante, AGCC), que es uno de los procesos fisiológicos más importantes mediado por los microorganismos colónicos mostrando diversos beneficios para la salud.

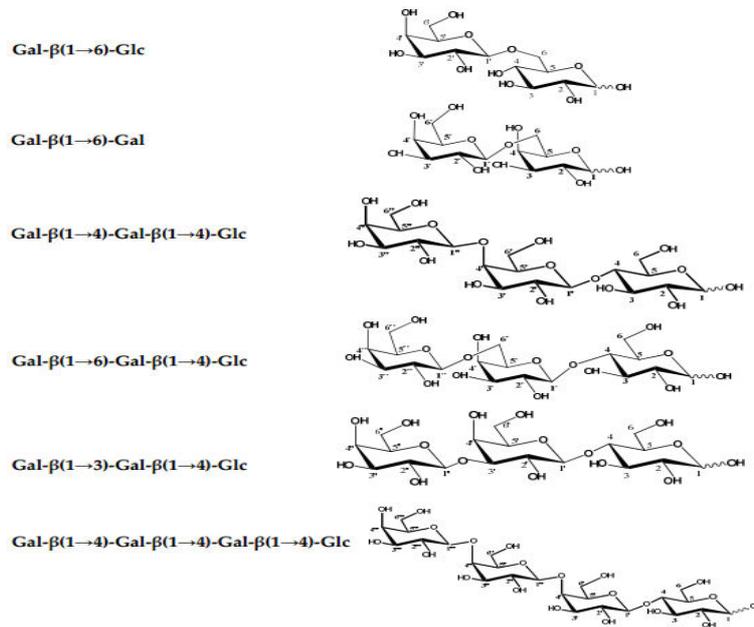


Figura 1: Esquema de algunos de los principales GOS sintetizados a partir de lactosa (Extraído de Colinas, 2013)

La ingesta de GOS estimula el crecimiento y/o activa el metabolismo de algunas bacterias del colon. Esto conlleva una modificación selectiva de la microflora intestinal, asociado con una disminución en el pH fecal, provocando unas condiciones desfavorables para muchos microorganismos patógenos (Kunz *et al.*, 1993).

Entre los productos finales de la fermentación de GOS por las bacterias del colon encontramos, ácido acético, ácido propiónico y láctico (Hidaka *et al.*, 1986; Hidaka *et al.*, 1988). Por ejemplo, el ácido propiónico es absorbido y llega al hígado por vía de la vena porta inhibiendo la litogénesis hepática (Wolever *et al.*, 1991). Estos ácidos también impiden el crecimiento de microorganismos patógenos como *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* (Tanaka *et al.*, 1983).

El valor calórico de los oligosacáridos no digeribles se ha estimado que está comprendido entre 1,0-2,0 kcal/g (Roberfroid *et al.*, 1993). En concreto se calculó el valor calórico de GOS en 1,73 kcal/g (Watanuki *et al.*, 1996). Se ha visto que los GOS son muy estables a altas temperaturas, incluso más estables que los fructo-oligosacáridos (FOS) (Voragen, 1998). Esta propiedad permite su utilización en alimentos tratados térmicamente.

Algunas características generales de estos GOS se engloban en la Tabla 1.

Propiedades físico-químicas	
Solubilidad en agua	80% (p/p)
Dulzor	30-60 % sacarosa
Apariencia	Translúcidos
Viscosidad	Similar al jarabe de maíz con alto contenido en fructosa
Estabilidad	Estable a 160°C / 10 min / pH 7; estable a 100°C / 10 min / pH 2; estable a 37°C / meses / pH 2
Punto de congelación	Se ve reducido en alimentos
Prop. humectante	Aumenta capacidad retención humedad para prevenir excesiva sequedad
Actividad de agua	Baja actividad H ₂ O reduciendo contaminación microbiana
Cariogeneidad	Bajo potencial para su desarrollo
Propiedades fisiológicas	
Digestibilidad	No digestibles pero fermentables, estimándose el valor calórico entre 1-2 kcal/g (Sako <i>et al.</i> 1999)
Propiedades prebióticas	Actividad metabólica y proliferación de bacterias bifidogénicas

Tabla 1. Propiedades generales de GOS (adaptado de Macfarlane *et al.*, 2008; Playne y Crittenden 2009).

Los oligosacáridos se conocen por el nombre de bifidogénicos o bifidofactores, en referencia a su capacidad para promover selectivamente, como se ha comentado anteriormente, la proliferación de: Bifidobacterias spp. (Tales como *B. longum*, *B. breve*, *B. pseudolongum*, *B. infantis* y *B. lactis*) y Lactobacillus spp. (tales como *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, y *L. plantarum*) que se cree que son beneficiosas para la salud intestinal (Shortt, 1999). Estas bacterias se han descrito como amistosas o bacterias probióticas (del griego, *προ βιοτος*, que literalmente significa "para la vida"). La incorporación de cepas probióticas en productos alimenticios tradicionales ha sido bien establecida en la industria láctea, lo que lleva a la producción de nuevos tipos de leches y quesos (Gomes *et al.*, 1999) fermentadas.

Gibson y Roberfroid, definen ya en 1995 un prebiótico, como un alimento o ingrediente no digerible que afecta beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y / o el metabolismo de una o un número limitado de especies bacterianas beneficiosas ya existentes en el colon. Por lo tanto, un prebiótico no hidrolizado y / o absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal, sirve como un sustrato selectivo para al menos una especie bacteriana del colon, alterando la composición positivamente de la microflora.

Muchos de los ingredientes alimenticios como oligosacáridos no digeribles, algunos péptidos, proteínas y lípidos, podrían actuar como prebióticos pero solo los oligosacáridos son capaces de cumplir con todos los requisitos de los prebióticos, específicamente los GOS.

Organismos tales como *E. coli*, *Clostridium perfringens* o *Streptococcus mutans*, potencialmente dañinos no pueden utilizar GOS (Tomomatsu, 1994). Esto conduce a una mejora del equilibrio de la microflora intestinal en el intestino.

Otra estrategia en la gestión de la microflora es el uso de simbióticos, en el que prebióticos y probióticos se utilizan en combinación (Gibson *et al.*, 1995). En vivo, adiciones microbianas pueden ser utilizados en conjunto con sustrato específico para el crecimiento (es decir Bifidobacterias con GOS o FOS) (Collins *et al.*, 1999).

Hay estudios y avances que se producen en las aplicaciones médicas de oligosacáridos específicos. Por ejemplo, el tratamiento de enfermedades infecciosas intestinales utilizando oligosacáridos ha sido propuesto por Playne (2002), quien descubrió la capacidad de oligosacáridos específicos para unirse a la mucosa intestinal y las superficies epiteliales y por lo tanto prevenir la unión de ciertos microorganismos.

Otras investigaciones han establecido que la presencia de la microflora “Bifidus” en los intestinos de los bebés alimentados con leche materna se atribuyó a la presencia de GOS en la leche humana (Matsumoto, 1993). Gyorgy (1973) mostró que la fracción de GOS de la leche humana (denominada como factor de Bifidus) mejora el crecimiento de bifidobacterias en el intestino no sólo de los lactantes alimentados con leche materna, sino también de los lactantes alimentados con leche de vaca suplementada con GOS.

Las propiedades prebióticas de varios oligosacáridos se han demostrado por la administración de cantidades reducidas de dichos productos a los animales. También un estudio en humanos con galacto-oligosacáridos y fruto-oligosacáridos como prebióticos mostró que una dosis diaria de 4-20 g aumenta significativamente los niveles de *Lactobacillus* y de Bifidobacterias en el intestino (Ryocroft *et al.*, 1999). Del mismo modo, los estudios anteriores de Tanaka *et al.* (1983) demostraron que después de una semana de ingesta de β -1 \rightarrow 6 GOS a una dosis de 3-10 g/día en individuos adultos sanos, el conteo fecal de Bifidobacterias se incrementó significativamente. De hecho, una ingesta diaria de 2,5 g de β -1 \rightarrow 6 GOS parece ser suficiente para aumentar el recuento fecal de bifidobacterias cuando el nivel inicial es bajo, lo que es frecuente en el caso de las personas de edad avanzada (Ito *et al.*, 1993; Boehm *et al.*, 2000).

Por otra parte Kanamori *et al.*, (2003) también demostraron que la administración oral de un simbiótico el cual contiene GOS (3 g / día) en combinación

con vancomicina contribuyó a erradicar *Staphylococcus aureus* MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) y restableció la flora en un bebé de 3 meses de edad que sufría enterocolitis MRSA. Deguchi *et al.*, (1997) mostró que las condiciones intestinales mejoran después de la ingestión diaria de 5 g GOS durante una semana. En un estudio de sujetos diabéticos con estreñimiento, se encontró una correlación entre la mejora en el estreñimiento y la disminución de la bacteria fecal *Bacteriodaceae* después de la ingestión de GOS (Narimaya *et al.*, 1996).

Los **galacto-oligosacáridos** tienen otros efectos beneficiosos potenciales además de ser bifidofactores. De esta manera se le atribuyen los siguientes beneficios:

- Favorecer la síntesis de vitaminas del complejo B, producido por cepas de bifidobacterias (Perugino *et al.*, 2004; Kanbè, 1992).
- Reducir los niveles de colesterol en el suero, debido a la asimilación del colesterol en la dieta de algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* (Chonan *et al.*, 1995; Gilliland *et al.*, 1990).
- Estimular y mejorar la absorción de minerales de metales tales como calcio y magnesio (Sako *et al.*, 1999). En particular, aumenta la solubilidad del calcio como resultado de la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por Bifidobacterias (Chonan *et al.*, 1995).
- Afectar positivamente a la mineralización ósea (Chonan *et al.*, 1995; Scholz-Arhens *et al.*, 2001).
- Mejorar el nivel de glucosa en sangre y triglicéridos (Nakakuki, 2002).
- La eliminación de compuestos tóxicos (Van den Heuvel *et al.*, 1999.) tales como el amoníaco (Tamai *et al.*, 1992).
- Estimular el peristaltismo intestinal, previniendo el estreñimiento (Deguchi, 1997)
- Aliviar los síntomas de la diabetes mellitus y la intolerancia a la lactosa (Li *et al.*, 2008).
- Prevenir el cáncer de colon (Van Dokkum *et al.*, 1999).

Los GOS son en su globalidad reconocidos como seguros (GRAS, *Generally Recognized/Regarded As Safe*), estos tienen componentes de la leche humana y de productos tradicionales como el yogurt. Se han realizado estudios de toxicidad aguda y crónica que han dado negativo, así como estudios con resultados negativos de mutagenicidad (Sako *et al.*, 1999).

En 1995 se estima que la producción en Europa de GOS fue de alrededor 15.000 toneladas (Playne *et al.*, 1996). Algunas de las empresas que actualmente están produciendo GOS para su distribución comercial son *Friesland Foods Domo* en los Países Bajos o *Snow Brand Milk* en Japón. Los procesos de producción de los productos comerciales Vivinal® GOS (de *Friesland Foods*) o P7L® GOS (*Snow Brand Milk*), están patentados. Estos preparados se utilizan para formular productos dirigidos a grupos específicos de la población, como los bebés, niños, mujeres y ancianos. Comercialmente disponibles, estos preparados de GOS se venden a distintas concentraciones dependiendo de la casa comercial. Por ejemplo, la composición típica de Vivinal GOS es de más del 55% de GOS, lactosa y glucosa en torno al 20% y una pequeña cantidad de galactosa (menos de 1%).

A medida que la investigación y la industria de los GOS aumenten, se entenderán mejor sus propiedades funcionales (Crittenden *et al.*, 1996). Muchos son los productos en los que se pueden incluir los GOS, como el pan o los productos lácteos fermentados, ya que durante la fermentación llevada a cabo por la levadura y la cocción del pan, los GOS no se descomponen y pueden influir positivamente en las propiedades organolépticas de estos alimentos.

Analizando la literatura existente sobre el tema, se llega a la conclusión de que solo unos pocos investigadores afirman que han alcanzado el nivel de GOS sintetizado superior al 40%, mientras que la mayor parte de los investigadores llegaron a la conclusión de que los máximos GOS sintetizados se encuentran entre 20-25% (Colinas, 2013). La producción de niveles más altos de GOS es un desafío actualmente y puede requerir nuevos enfoques y perspectivas.

Síntesis enzimática de GOS por β -galactosidasas

Las β -galactosidasas son enzimas hidrolasas que catalizan la hidrólisis de β -galactósidos en sus monosacáridos correspondientes. Debido a esta capacidad, estas proteínas son muy importantes en las industrias alimentaria, farmacéutica y clínica. Esta enzima fue una de las primeras enzimas en ser aisladas y purificadas a partir de diversas fuentes naturales como plantas, órganos de animales y microorganismos (Richmond *et al.*, 1981).

Existen β -galactosidasas provenientes de procariotas y de eucariotas (incluyendo los seres humanos). La primera β -galactosidasa secuenciada fue la de *Escherichia coli* (Fowler y Zabin 1970) con 1.024 aminoácidos.

Las β -galactosidasas más importantes debido a su potencial biotecnológico son:

1. La β -galactosidasa de *Escherichia coli*
2. La β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*
3. La β -galactosidasa de *Aspergillus niger*

En 1992 se publicó la secuencia de la β -galactosidasa de *K. lactis*, revelando que esta β -galactosidasa está compuesta por 1025 aminoácidos y tiene un peso en KDa de 117.618. Esta β -galactosidasa es muy importante en sectores como el alimentario o farmacéutico/médico y recientemente ha sido publicada su estructura (Pereira-Rodríguez *et al.*, 2012).

El pH óptimo de esta enzima es neutro (cerca de 7), y se considera GRAS por la FDA (*American Food and Drug Administration*). Esto es debido a que es producido a partir de un organismo eucariota considerado como seguro.

Estas β -galactosidasas pueden actuar de diferente manera dependiendo de las características del medio, pudiendo llevar a cabo una reacción de hidrólisis o de transglicosilación en condiciones concretas. Por lo tanto, el mecanismo de reacción β -galactosidasa incluye tanto la hidrólisis de la lactosa como la reacción de transglicosilación (Mahoney, 1998).

Que una β -galactosidasa se comporte de una manera u otra tiene que ver con diversos factores, siendo uno de los más importantes la concentración de lactosa en el

medio, llevando a cabo una mayor actividad de transglucosilación cuando se encuentra en un medio con alta concentración de lactosa. Otros factores influyen en la reacción, tales como: condiciones de reacción, temperatura, el pH y la presencia de inhibidores o activadores específicos para la enzima (Zárate *et al.*, 1990).

Algunos autores (Bakken *et al.*, 1992; Portaccio *et al.*, 1998; Shukla *et al.*, 1993) afirman que la galactosa tiene capacidad para actuar como un inhibidor competitivo tanto de la hidrólisis de lactosa como de la reacción de transglucosilación. Desde un punto de vista termodinámico, la alta concentración de galactosa implicaría una mayor transglucosilación y a su vez, una mayor concentración de GOS, pero estudios demuestran que la adición de galactosa a la reacción, inhibe la actividad de la enzima (Neri *et al.*, 2009).

También influye la distinta fuente de la que obtenemos la enzima, ya que por ejemplo algunas β -galactosidasas extraídas de *E. coli* o *A. niger*, parecen promover una fuerte actividad hidrolítica, mientras que la β -galactosidasa de *A. oryzae* o *Bacillus circulans* exhiben una fuerte transglucosilación (Mahoney, 1998).

La síntesis de GOS mediante enzimas β -galactosidasas tiene lugar en tres pasos como se muestra en la Figura 2.

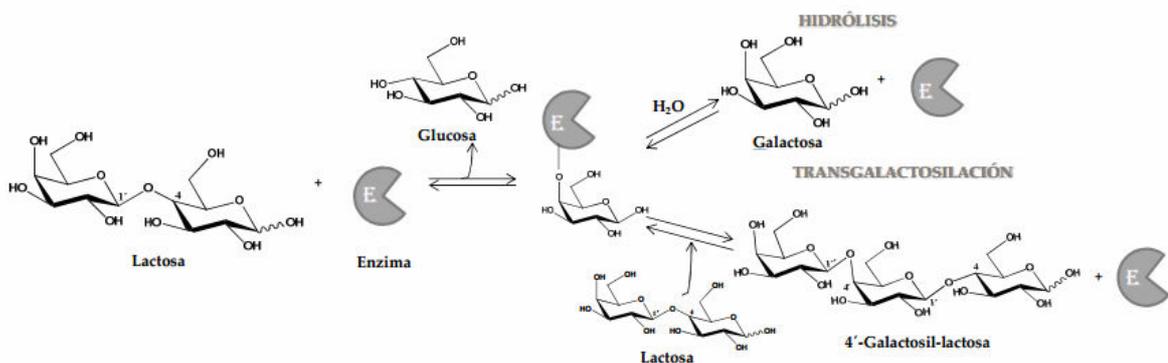


Figura 2: Síntesis de GOS mediante β -galactosidasa (Extraído de Colinas, 2013)

Primeramente, se forma un intermedio galactosil-enzima liberando una molécula de glucosa. Este intermedio sufre un ataque nucleófilo transfiriéndose a otro aceptor con grupo hidroxilo como puede ser una molécula de agua o bien otro carbohidrato. La formación de GOS viene determinada por un balance entre ambas reacciones: hidrólisis y transgalactosilación. En el caso de soluciones con baja concentración de lactosa se

favorecerá la hidrólisis con la consecuente formación de galactosa, y a concentraciones elevadas de sustrato, la molécula de lactosa actúa de nuevo como aceptor formándose así una serie de GOS con diferente grado de polimerización (Figura 3).

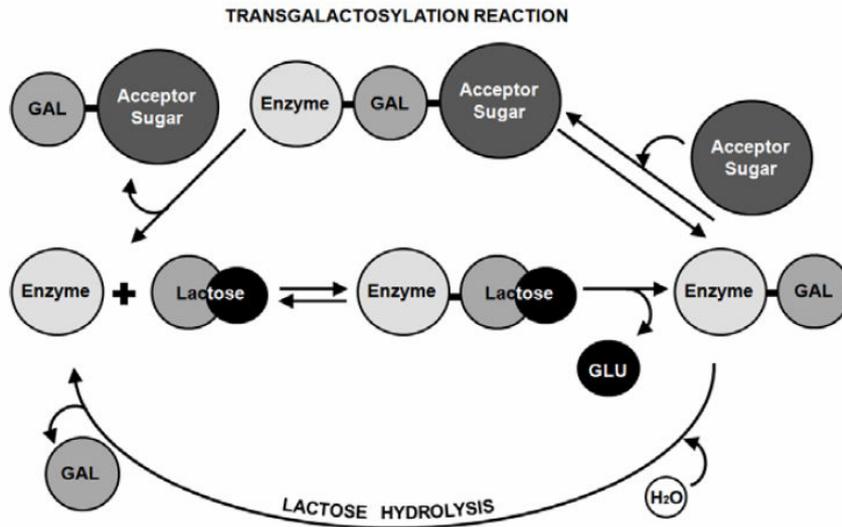


Figura 3: Esquema de la hidrólisis y transglicosilación de la β-Galactosidasa. La ruta inferior representa la hidrólisis de lactosa y la ruta superior la transglicosilación, ambas llevadas a cabo por β-galactosidasa, en el mecanismo de regulación de estas dos actividades influye la concentración de lactosa entre otros factores (Esquema extraído de Neri, 2008).

Roberts *et al.* (1957) demostraron que la transglicosilación por β-galactosidasa a partir de *Saccharomyces fragilis* era útil para la síntesis de GOS a partir de lactosa. Por lo tanto, una mezcla de reacción de 15% de lactosa con 0.5% de β-galactosidasa obtenida de *S. fragilis* condujo a la formación de GOS a partir de lactosa de la siguiente manera (Figura 4).

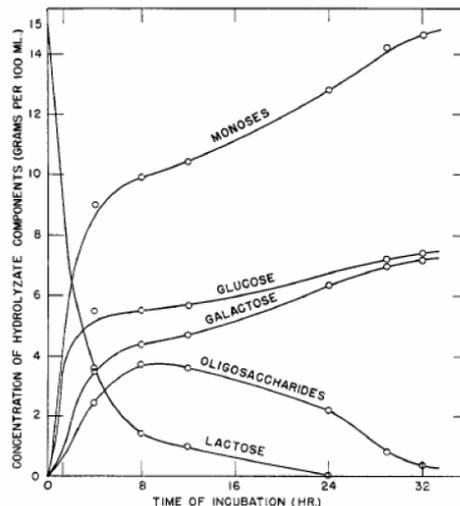


Figura 4: GOS sintetizados a partir de lactosa mediante la utilización de β -galactosidasa de *Saccharomyces fragilis*. Reacción llevada a cabo en buffer fosfato (0,067 M, pH 6,2) y 35°C (Figura extraída de Roberts *et al.*, 1957).

OBJETIVOS

En el desarrollo del presente trabajo se han perseguido los siguientes objetivos principales:

- Desarrollo de un método para determinar la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* mediante HPLC
- Aproximación inicial a la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de *K. lactis* a partir de lactosa en polvo monohidratada.
- Aplicación de métodos estadístico para determinar las condiciones óptimas de producción de GOS por la β -galactosidasa de *K. lactis*

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

- **β -Galactosidasa**

Se ha empleado como fuente de enzima la β -galactosidasa comercial MAXILACT® LX50000 (*Gist Brocades*). Maxilact es una preparación de β -galactosidasa purificada a partir de *Kluyveromyces lactis*. Este compuesto se suministra como una solución conteniendo glicerol. Maxilact cumple con los requisitos de la

FAO/WHO's Joint Expert Committee of Food Additives (JECFA), con el *Food Chemical Codex* (FCC) y con las directrices exigidas por la *Food Enzymes of the Scientific Committee of Food* (SCF) en Estados Unidos para su uso en la industria alimentaria. La preparación de esta enzima se almacena en su envase original a 4°C. Bajo estas condiciones, la pérdida de actividad sería de menos 1% mensual.

La determinación de su actividad enzimática por el método descrito más adelante dio como resultado 1886,8055 U.E / ml de preparado. Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de o-nitrofenol a partir de o-nitrofenil β -D-galactopiranosido a pH 7,0 y 40 ° C.

- **Lactosa**

Se ha utilizado lactosa en polvo monohidratada de la casa comercial SIGMA para llevar a cabo la mayoría de los experimentos.

- **Suero de leche**

El suero viene a ser un subproducto de la elaboración del queso y el procesamiento de la caseína en la industria láctea. Existen dos tipos; el suero dulce (pH 6 a 7) resultado de la fabricación de los quesos maduros tales como el Cheddar, y el suero ácido (pH 3 a 4) resultado de la producción de quesos frescos tales como el *cottage* (Siso, 1996).

La composición del suero varía considerablemente dependiendo del origen de la leche y el proceso de manufactura que lo envuelve, de ello dependerá su uso. Pero en general, el suero está compuesto principalmente por agua (cerca del 93%), lactosa (4,9 a 5,1%), proteína soluble (0,9 a 1 %), minerales (0,5 a 0,7%), lípidos (0,1 a 0,3%) y ácido láctico (0 a 0,2%). Hacer 1 kg de queso, genera aproximadamente 9 kg de suero, la producción mundial de queso genera más de 145×10^6 ton de suero líquido al año del cual 6×10^6 ton es lactosa (Siso, 1996)

El permeado de la ultrafiltración del suero de leche concentrado (aproximadamente 2X) utilizado en este trabajo fue suministrado por la fábrica de quesos Queizúar, S. L. (Bama, A Coruña, España). Una vez traído de la fábrica, los sueros se almacenaron congelados a -20°C en alícuotas de 1 litro. Como paso previo a su utilización, inmediatamente tras ser descongelados se esterilizaron en autoclave

(121°C durante 20 minutos), provocando la coagulación de las proteínas remanentes. Para separar dichas proteínas, el suero se centrifugó en condiciones estériles (15 minutos a 10000 r.p.m). El sobrenadante así obtenido se ha empleado como medio para realizar las reacciones.

- **Tampones empleados**

Los tampones empleados fueron el Buffer Z para la determinación de la actividad β -galactosidasa y el Buffer fosfato para algunos de los ensayos realizados. Presentan la siguiente composición:

Buffer Z

100 mM Na₂HPO₄

40 mM NaH₂PO₄

10 mM KCl

1.6 mM MgSO₄

Buffer fosfato

Se utilizó un buffer fosfato pH 6,8, 0,1 M. Para ello se prepararon las siguientes disoluciones:

A) Fosfato sódico monobásico 0,2 M

B) Fosfato sódico dibásico 0,2 M

Siguiendo las indicaciones de la tabla 2, para obtener una disolución final pH 6,8 0,1 M, mezclamos 51 ml de la solución A (Fosfato sódico monobásico 0,2 M) y 49 ml de solución B (Fosfato sódico dibásico 0,2 M).

Ph	Sodium dihydrogen phosphate (ml)	di-sodium hydrogen phosphate (ml)	Ph	Sodium dihydrogen phosphate (ml)	di-sodium hydrogen phosphate (ml)
5.8	46	4	7	19.5	30.5
6	44	6.2	7.2	14	36
6.2	40.7	9.2	7.4	19.5	40.5
6.4	36.7	13.2	7.6	6.5	43.5
6.6	31.2	18.7	7.8	4.2	46.7
6.8	25.5	24.5	8	2.6	47.3

Tabla 2. Tabla de preparación de Tampón Sodio fosfato para un volumen total de 50 ml.

MÉTODOS

• Medida de la actividad β -galactosidasa

La determinación enzimática del preparado comercial de la β -galactosidasa de *K. lactis* (Maxilact) se realizó diluyendo el preparado 1/5000 y 1/10000 en Buffer Z.

Se utilizó el método de Guarente (1983) con modificaciones. En este método se utiliza ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) como análogo de la lactosa para realizar el ensayo. Este sustrato en contacto con la **β -galactosidasa** es hidrolizado produciendo un compuesto (o-nitrofenol) que presenta un intenso color amarillo (Figura 5). Se cuantifica la actividad enzimática en función de la intensidad de este color amarillo, (medida por absorbancia a una longitud de onda de 420 nm).

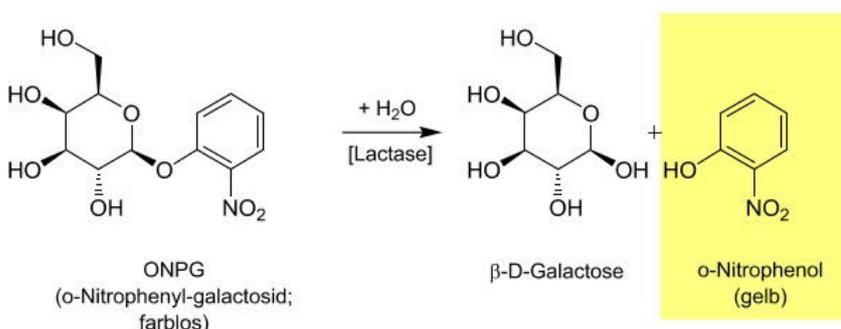


Figura 5: La enzima β -galactosidasa escinde el ONPG a galactosa y *o*-nitrofenol, que se puede detectar fotométricamente a 420 nm. La cantidad de *o*-nitrofenol es directamente proporcional a la cantidad de hidrólisis producida.

Para realizar la determinación, a 150 μ l de enzima convenientemente diluida en Buffer Z se le añadieron otros 150 μ l de la solución de sustrato (4 mg/ml de ONPG en agua destilada) y se dejó que la reacción se desarrollase a 40°C hasta la aparición del color amarillo característico del producto, habitualmente 2 o 4 minutos. Tras la aparición del color se añadió una disolución 1 M de NaCO₃ (300 μ l) para parar la reacción. Posteriormente, se determinó espectrofotométricamente el o-nitrofenol liberado, por medida de la absorbancia a 420 nm.

La actividad enzimática se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{\Delta Abs_{400}}{\Delta T \cdot V \cdot \epsilon} \cdot VR \cdot DF$$

Donde:

ΔAbs_{400} = Absorbancia del o-nitrofenol a 420 nm medida en el espectrofotómetro

ΔT = tiempo de reacción.

V = volumen de muestra real

ϵ = Coeficiente de extinción molar del o-nitrofenol a 420 nm ($4500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

VR= Volumen de reacción

DF= Factor de dilución

Se definió la Unidad Enzimática (U.E) como la cantidad de enzima que libera un μmol de o-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo. Como se ha comentado anteriormente, utilizando esta fórmula se determinó una actividad enzimática inicial para el Maxilact de 1886,8055 U.E / ml.

- **Determinación de azúcares reductores (reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico)**

Se ha empleado el método de Bernfeld (1951) con modificaciones, que se basa en la determinación de los grupos reductores (de la glucosa, galactosa y lactosa) presentes en la muestra a estudiar. El ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) tiene la capacidad de oxidar a los azúcares reductores dando resultados colorimétricos que se pueden leer al espectrofotómetro. Se utilizó este método para determinar la concentración de lactosa presente en el ultrafiltrado concentrado de suero de leche y también en paralelo a las medidas mediante HPLC de las concentraciones iniciales de las disoluciones de lactosa preparadas en el laboratorio. Se mezcla 0,1 ml de muestra convenientemente diluida con 0,1 ml de reactivo. La composición del reactivo DNS para 100 ml es la siguiente: 1 g de Ácido 3,5-dinitrosalicílico; 30 g de Tartrato Na-K- $4\text{H}_2\text{O}$ y 20 ml de NaOH 2 N. La mezcla muestra y reactivo se trata 5 minutos a 95°C , se deja enfriar a temperatura ambiente o en hielo, se añaden 1 ml de agua destilada y se mide la absorbancia a 540 nm frente a un blanco en el que la solución a valorar se sustituye por agua destilada.

El calibrado se llevó a cabo sobre una serie de diluciones preparadas a partir de una solución acuosa de lactosa. Un intervalo de concentraciones adecuado es 1-3 mg/ml. La recta de calibrado obtenida para la lactosa se muestra en la Figura 6.

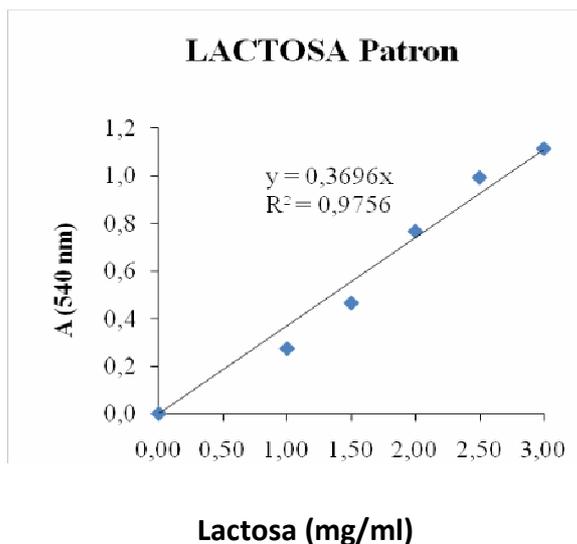


Figura 6: Recta de calibrado para la lactosa mediante el método de los azúcares reductores.

- **Ensayos con disoluciones de lactosa comercial**

Se ha utilizado un tampón fosfato (pH 6,8; 0,1 M) para disolver las distintas cantidades de lactosa en polvo comercial (SIGMA) para cada ensayo. Se ha disuelto la lactosa ayudándonos de un agitador magnético y calor. Una vez disuelta, la disolución se filtró con un filtro con un diámetro de poro de 0,2 μ m.

En ocasiones, estos medios filtrados se guardaron hasta 12 horas en estufas a 30°C. No se observaron diferencias significativas, con lo que a la concentración de lactosa respecta, con respecto a aquellos medios utilizados tras su preparación.

Se añadió una cantidad de enzima variable, dependiendo del experimento, al sustrato y se incubó durante un tiempo prolongado en un rango de temperatura tolerable para ésta enzima, estas temperaturas variaron en cada uno de los ensayos con la finalidad de encontrar un óptimo de producción de GOS. La incubación se llevó a cabo con agitación (80 rpm).

- **Ensayos con disoluciones de ultrafiltrado de suero de leche concentrado**

Previamente a realizar los ensayos con el ultrafiltrado de suero de leche concentrado se determinó la cantidad de lactosa presente mediante el método de los azúcares reductores. Se obtuvo una concentración inicial de lactosa del 7.8%, por lo que fue necesario suplementar con lactosa comercial (SIGMA) para alcanzar la

concentración requerida para el experimento. Así mismo se determinó el pH del suero mediante un pH-metro marca *Crison* y se ajustó a un pH de 6,83 con NaOH.

- **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography)**

La determinación de los niveles de lactosa, glucosa, galactosa y de GOS se realizaron en un HPLC de la casa comercial *Waters* con bomba isocrática de la serie *Breeze* modelo 1515 con detector de índice de refracción modelo 2414 y una columna *Sugar Pak I* de *Waters* de 6.5 mm x 300 mm. El solvente utilizado fue agua ultrapura sonicada a un flujo de 0,5 ml/min manteniendo la temperatura a 90°C. Como patrones se han empleado estaquiosa, rafinosa, lactosa, glucosa y galactosa todos ellos de la casa comercial SIGMA. El software utilizado para el análisis de las cromatografías fue el *Waters Breeze I*.

Tras la recogida de muestras (1 ml) en cada uno de los tiempos en los diferentes ensayos, se para la reacción de la enzima. Para parar la reacción de la β -galactosidasa se somete a una desnaturalización de la enzima por calor, calentando la muestra en un bloque a 100°C durante 10 minutos. A continuación se llevan a cabo diferentes diluciones de las muestras recogidas. Dichas diluciones son de 1/100 salvo la correspondiente a tiempo 0 que se diluye a 1/200. Las diluciones se hacen con agua bidestilada y desgasificada por sonicación. Por último, las muestras diluidas son filtradas por filtros de 0,2 μ m y depositadas en viales específicos para HPLC. El volumen de inyección fue de 10 microlitros.

- **Análisis estadístico**

Los datos estadísticos (plan factorial y el método de la máxima pendiente) fueron analizados con la ayuda del programa informático *StatGraphics Plus* para *Windows* (*Statistical Graphics Corporation*) versión 5.1. La significancia estadística de las diferencias entre medias fue determinada mediante el *test t* de Student realizado con el mismo *software*. Aquellos valores con un $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Puesta a punto de un método para determinar la síntesis de GOS mediante HPLC

En primer lugar se intentó poner a punto un método para determinar y monitorizar la síntesis de GOS mediante HPLC. El HPLC es una técnica sencilla, rápida y relativamente barata que ofrece la posibilidad de observar todos los componentes de la síntesis de GOS al mismo tiempo. Así, bajo las condiciones adecuadas se puede determinar la concentración de GOS, lactosa, glucosa y galactosa simultáneamente. Para ello es necesario tener unos patrones adecuados de concentración conocida que nos permitan realizar una gráfica de los datos obtenidos para las soluciones estándar con el área de pico *versus* la concentración de la muestra y nos posibilite posteriormente determinar la concentración de cada componente presente en la muestra desde la curva estándar creada.

Un cromatograma típico obtenido para una solución estándar con sus tiempos de retención está recogido en la Figura 7. Dada la imposibilidad de conseguir GOS puros de tres y cuatro osas, como estándares para GOS se han utilizado la estaquiosa y la rafinosa. La estaquiosa [gal ($\alpha 1 \rightarrow 6$) gal ($\alpha 1 \rightarrow 6$) glc ($\alpha 1 \leftrightarrow 2\beta$) fru] es un tetrasacárido que consiste en dos unidades de α -D-galactosa, una unidad de D-glucosa y una β - D-fructosa unidas secuencialmente por enlaces glicosídicos que presenta una estructura similar a alguno de los GOS formados por la unión de cuatro osas. La rafinosa [gal ($\alpha 1 \rightarrow 6$) glc ($\alpha 1 \leftrightarrow 2\beta$) fru] es un trisacárido que consiste en una unidad de α -D-galactosa, una unidad de D-glucosa y una β - D-fructosa unidas secuencialmente que presenta una estructura similar a alguno de los GOS formados por la unión de tres osas. Además de la estaquiosa y la rafinosa se ha empleado también la lactosa, glucosa y galactosa en la solución patrón.

Las curvas estándar creadas para cada uno de los patrones: estaquiosa, rafinosa, lactosa, glucosa y galactosa se realizaron con un rango de concentración de 0.125 mg/ml a 1 mg/ml (Figura 8).

Las condiciones ensayadas, utilización como solvente agua ultrapura a un flujo de 0,5 ml/min manteniendo la temperatura a 90°C, parecieron adecuadas para separar, utilizando la columna *Sugar Pak I* de *Waters*, la lactosa, los productos de hidrólisis de la lactosa (glucosa y galactosa), así como los productos de transglicosilación posibles de 3 y 4 osas.

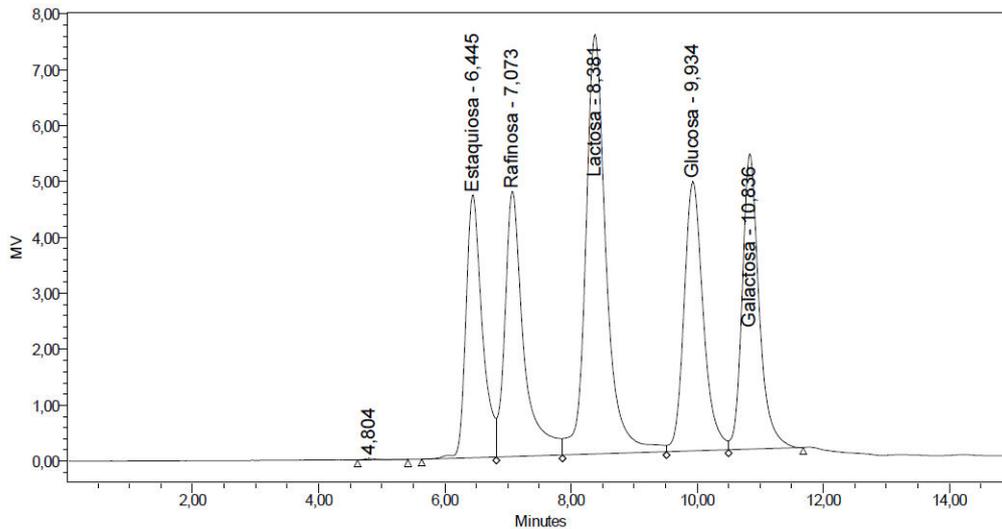


Figura 7: Perfil típico de HPLC para una solución patrón. Los tiempos de retención en minutos para cada uno de las soluciones patrón son los reflejados en la figura: Estaquiosa 6,445; Rafinosa 7,073; Lactosa 8,381; Glucosa 9,934; Galactosa 10,836. Cada componente de la solución patrón está presente a una concentración de 1 mg/ml. La mezcla patrón fue eluida a un flujo de 0,5 ml/min usando agua bidestilada ultrapura y desgasificada por sonicación como fase móvil en una columna *SugarPakI* de *Waters* a 90°C y usando un detector de índice de refracción.

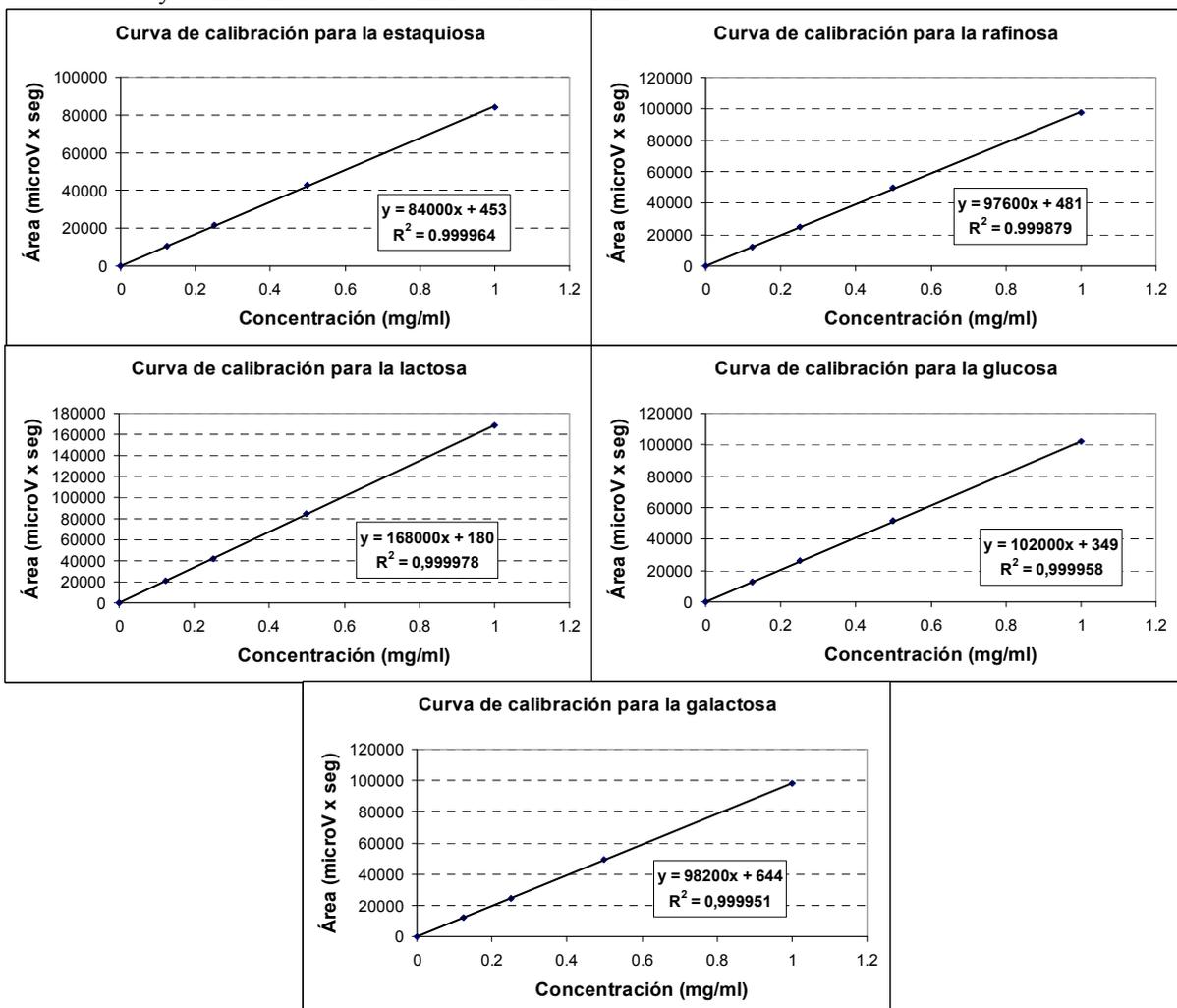


Figura 8: Curvas de calibración para los patrones de HPLC. Se muestra la línea de tendencia, la ecuación y el R² para cada uno de los patrones.

2. Aproximación inicial a la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de *K. lactis*.

Una vez establecidas las condiciones para determinar GOS mediante HPLC, se decidió realizar una primera aproximación a la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de *K. lactis* a partir de lactosa comercial. Como fuente de β -galactosidasa de *K. lactis* se utilizó un preparado comercial, MAXILACT LX50000 (*Gist Brocades*).

Se realizaron inicialmente varios ensayos a 40°C en tampón fosfato (0.1 M, pH 6.8) variando la cantidad de enzima utilizada y la concentración inicial de lactosa y tomando muestras cada 30 minutos hasta las 7 horas. Las condiciones de los ensayos realizados están recogidas en la Tabla 3.

Tabla 3: Ensayos iniciales de síntesis de GOS

Nº Ensayo	% (v/v) β -galactosidasa	% (v/v) Lactosa
1	0.8	35
2	1.6	35
3	1.6	40
4	1.6	50
5	1.6	60
6	2.4	35

En la figura 9 se muestra un cromatograma típico obtenido para la síntesis de GOS en una de las condiciones ensayadas. Se puede observar a tiempo cero un único pico correspondiente a la lactosa, mientras que a las 5 horas de incubación se observa la disminución de este pico y la aparición de los picos correspondientes a los productos de hidrólisis de la lactosa y los GOS de tres y cuatro osas.

De las 6 condiciones ensayadas, la que produce mayores niveles de GOS al finalizar el tiempo de incubación (5 horas y media) es la condición 6 en la que se ha añadido mayor cantidad de enzima (2.4% v/v) y se partía de una concentración inicial del 35% (v/v) de lactosa (Figura 10). Los niveles de GOS en la Figura 10 son el resultado de la suma de las concentraciones obtenidas a partir del área de los picos eluidos en los tiempos de retención para la estaquiosa (correspondiente a un tetrasacárido, GOS de 4 osas) y la rafinosa (correspondiente a un trisacárido, GOS de tres osas). Analizando las condiciones 1, 2 y 6, en las que se mantiene constante el nivel de lactosa inicial (35%) pero se varía la cantidad de enzima inicial, se puede observar que los niveles de GOS aumentan cuando se aumenta la concentración de enzima (Figura 10).

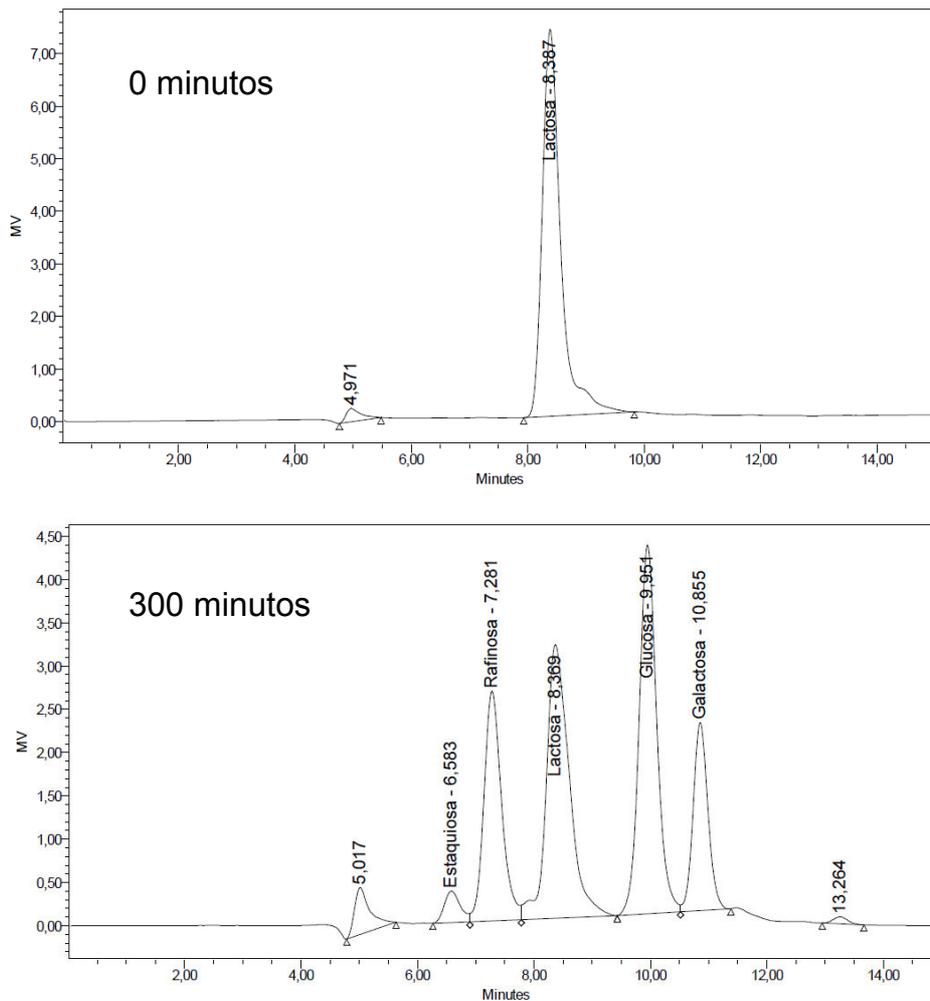


Figura 9: Cromatogramas de la síntesis de GOS a diferentes tiempos de reacción. Ensayo realizado a 40°C con 1.6% de enzima y 35% de lactosa.

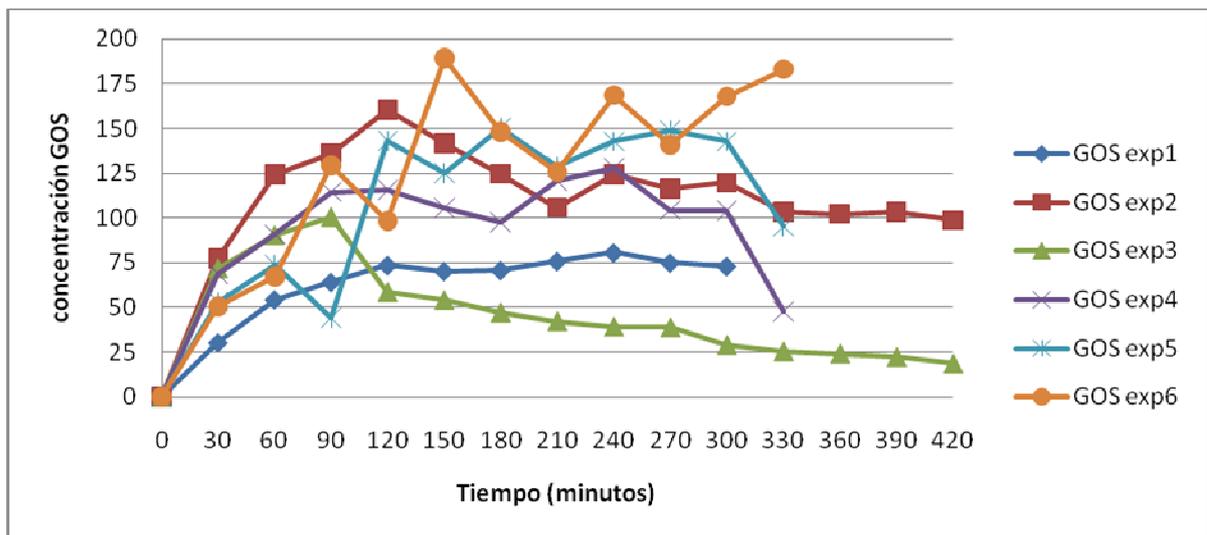


Figura 10: Concentración de GOS (mg/ml) a lo largo del tiempo en los diferentes ensayos realizados. La concentración de GOS es la suma de los GOS de tres y cuatro osas. Los números de los ensayos de la leyenda hacen mención a las condiciones experimentales descritas en la Tabla 3.

Estudiando las condiciones 2, 3, 4 y 5, en las que se mantiene la concentración de enzima constante (1.6 % v/v) pero se varían las concentraciones iniciales de lactosa (del 35% al 60%), se observa que si bien la condición 5, con mayor nivel de lactosa inicial (60%), es la que produce mayores niveles de GOS de tres a cinco horas, es la condición 2, con un 35% de lactosa inicial, la que produce mayores niveles de GOS entre los 90 y 150 minutos. Lo que parece indicar que niveles bajos de lactosa favorecen la formación rápida de GOS y niveles más altos de lactosa la aparición tardía de los GOS. De la misma manera, analizando los experimentos 3, 4 y 5, se puede deducir que para una misma concentración de enzima a medida que se aumenta la concentración de lactosa se aumenta también la concentración de GOS y se incrementa también el tiempo necesario para alcanzar el máximo de GOS.

Los resultados obtenidos están en consonancia con los descritos por otros autores (Manucchi, 2009).

Como se ha visto en estos experimentos, la síntesis de GOS se ve influida por la concentración de enzima y la concentración de lactosa, por ese motivo se intentó realizar un plan factorial que nos permitiese evaluar la influencia de estas dos variables de una manera estadística.

3. Diseño de un plan factorial completo para evaluar la síntesis de GOS

Se diseñó un plan factorial completo para evaluar la influencia de la concentración de enzima, de la concentración inicial de lactosa y de una tercera variable como es la temperatura de reacción sobre la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de *K. lactis*. Los dominios y los criterios de codificación de las variables ensayadas están en la tabla 4.

Tabla 4. Dominios experimentales y codificación de las variables

Valor codificado	Concentración Enzima (E: % v/v)	Valores naturales	
		Concentración Lactosa (L: % v/v)	Temperatura (T: °C)
-1	0.8	35	38
0	1.6	40	40
+1	2.4	45	42

Codificación: $V_c=(V_n-V_0)/\Delta V_n$; Descodificación $V_n=V_0+(\Delta V_n \times V_c)$ donde V_c =valor codificado, V_n =valor natural, V_0 =valor natural en el centro del dominio experimental, ΔV_n =incremento del valor natural correspondiente a un incremento unidad del valor codificado.

La temperatura es una variable importante a tener en cuenta en la síntesis de GOS ya que se necesitan temperaturas altas para poder mantener concentraciones de

lactosa elevadas sin precipitar, dada la baja solubilidad de la lactosa -la solubilidad máxima en agua de la lactosa es del 20% (Manucci, 2009)-, por otra parte temperaturas muy altas afectan a la estabilidad enzimática.

Para cada uno de los experimentos realizados en el plan factorial (recogidos en la tabla 5) se cogieron muestras cada hora durante las cuatro primeras horas de incubación con la enzima. Los resultados obtenidos (GOS observado) es la media a lo largo del tiempo (4 medidas en las 4 horas) de la suma de la concentración calculada para las áreas de los eluidos en los tiempos de retención correspondientes a la estaquirosa (GOS de 4 osas) y rafinosa (GOS de 3 osas).

Tabla 5. Resultados experimentales del plan factorial y valores esperados según el modelo predicho. Variables según la tabla 4.

	E	A	V	GOS observado (mg/ml)	GOS esperado (mg/ml)	Residuos
1	1	-1	1	88,74	86,7567	1,98333
2	-1	-1	1	109,42	85,8567	23,5633
3	0	0	0	96,44	107,437	-10,9967
4	1	1	-1	153,19	129,017	24,1733
5	-1	-1	-1	103,35	118,087	-14,7367
6	-1	1	-1	130,71	128,117	2,59333
7	-1	1	1	167,14	160,347	6,79333
8	1	-1	-1	61,93	54,5267	7,40333
9	0	0	0	110,67	107,437	3,23333
10	0	0	0	104,55	107,437	-2,88667
11	1	1	1	81,44	96,7867	-15,3467
12	0	0	0	81,66	107,437	-25,7767

Según los datos experimentales observados, se realizó una tabla ANOVA (Tabla 6) en la que se ve que sólo tres efectos (% de enzima, % de lactosa y la interacción de las tres variables: % enzima, % lactosa y temperatura) tienen p-valores por debajo de 0,05 y por lo tanto presentan un efecto significativo.

Tras eliminar los efectos no significativos, se ha vuelto a realizar un ANOVA (Tabla 7) y se comprobó mediante el test de la falta de ajuste si el modelo es adecuado para describir los datos observados experimentalmente. Dado que el p-valor para la hipótesis de la falta de ajuste es mayor del 0,05 (0,2321) el modelo sería adecuado para los datos observados. El R-cuadrado explicaría el 75 % de los datos, bajando al 66% el R-cuadrado ajustado. Según el error estándar de la estimación la desviación normal de los residuos es de 12,55, siendo el promedio del valor de los residuos (error absoluto de la media) de 11,62. Dado que el p-valor para el estadístico Durbin-Watson es superior a 0,05 (0,4275) no habría indicios de correlación de serie en los residuos.

Tabla 6. Análisis de la varianza

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F calculada	Valor P
E: Enzima	1963,14	1	1963,14	12,47	0,0386
L: Lactosa	3571,82	1	3571,82	22,68	0,0176
T: Temperatura	0,7442	1	0,7442	0,00	0,9495 (NS)
EL	0,1568	1	0,1568	0,00	0,9768 (NS)
ET	955,719	1	955,719	6,07	0,0906 (NS)
LT	581,405	1	581,405	3,69	0,1504 (NS)
ELT	2077,55	1	2077,55	13,19	0,0359
Falta de ajuste	497,588	1	497,588	3,16	0,1735
Error Puro	472,425	3	157,475		
Total (Corr.)	10120,5	11			

NS = No significativo; R-cuadrado = 90,4154%; R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 73,6423%; Error estándar de est. = 12,5489; Error absoluto de la media = 6,61; Estadístico Durbin-Watson = 1,54438 (P = 0,2274); Autocorrelación residual Lag 1 = -0,125363

Tabla 7. Análisis de la varianza sin los coeficientes no significativos

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F calculada	Valor P
E: Enzima	1963,14	1	1963,14	12,47	0,0386
L: Lactosa	3571,82	1	3571,82	22,68	0,0176
ELT	2077,55	1	2077,55	13,19	0,0359
Falta de ajuste	2035,61	5	407,123	2,59	0,2321
Error Puro	472,425	3	157,475		
Total (Corr.)	10120,5	11			

R-cuadrado = 75,2183%; R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 65,9252%; Error estándar de est. = 12,5489; Error absoluto de la media = 11,6239; Estadístico Durbin-Watson = 2,01282 (P = 0,4275); Autocorrelación residual Lag 1 = -0,139655

El sistema se podría definir según la siguiente ecuación:

$$\text{GOS} = 107,437 - 15,665E + 21,13L - 16,115ELT$$

En la tabla 5, además de los datos experimentales obtenidos, están recogidos los resultados esperados para cada uno de los ensayos utilizando la ecuación anteriormente descrita y los residuos obtenidos (diferencia entre el valor observado y el esperado).

Aplicando la ecuación generada para el modelo, se pueden obtener superficies de respuestas, planos definidos por 2 variables manteniendo fija la tercera variable en el punto central, representativas (Figura 11). Se observa en la figura 11 que la respuesta, síntesis de GOS, aumentaría al disminuir el % de enzima inicial y aumentar el % de lactosa inicial y la temperatura (E= -1; L= +1; T= +1).

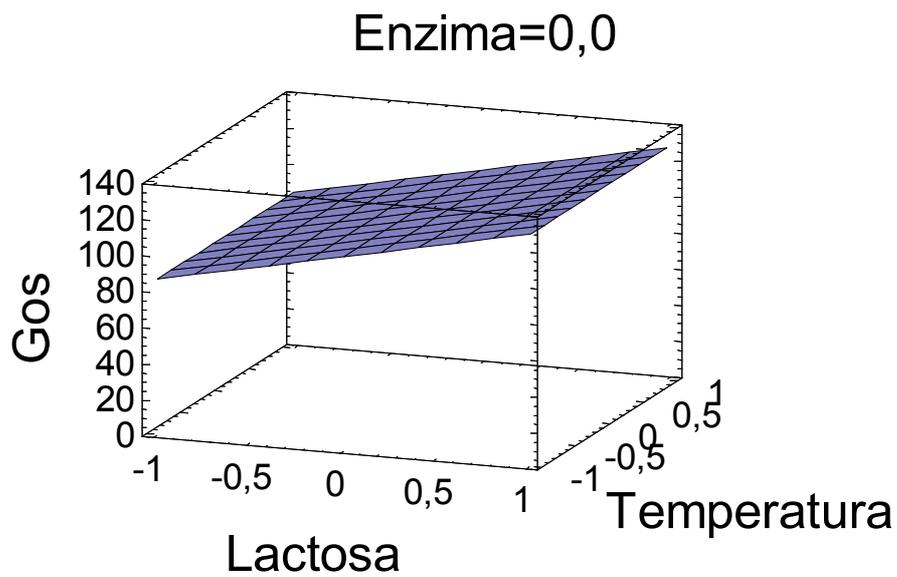
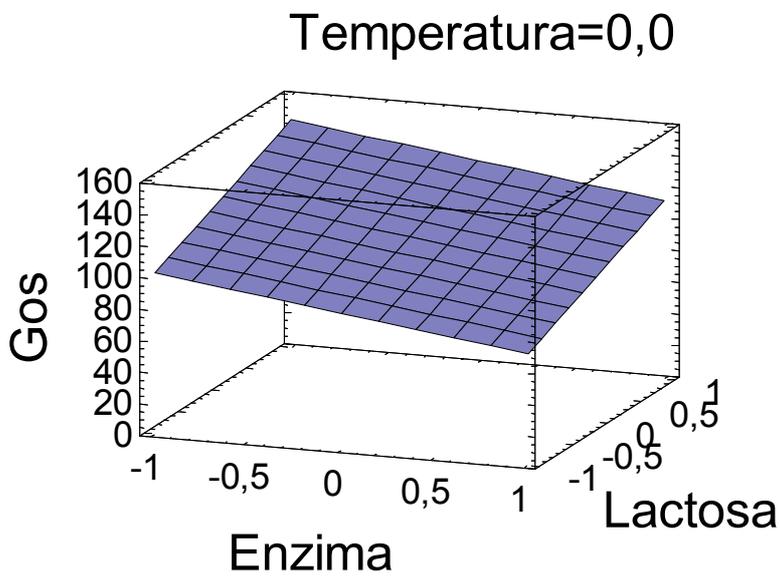
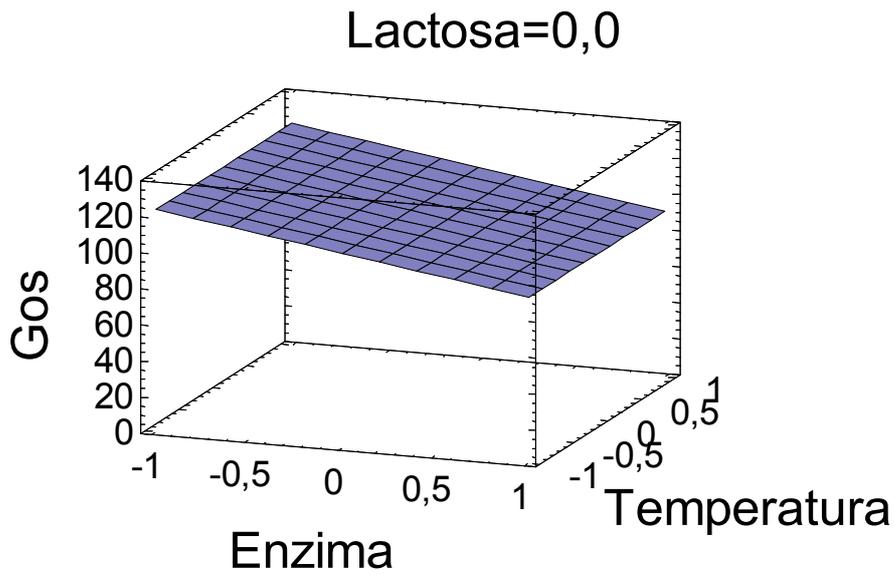


Figura 11: Superficies de respuesta obtenidas para la síntesis de GOS. La respuesta, GOS, viene dada en mg/ml.

4. Método de la máxima pendiente

Con la intención de encontrar un óptimo fuera del dominio experimental, se aplicó el método de la máxima pendiente, incrementando los valores de las variables en la dirección del incremento de la respuesta. El incremento en los valores de las variables tiene sus limitaciones experimentales ya que es difícil conseguir % de lactosa superiores al 50% sin incrementar demasiado la temperatura y el incremento en temperatura afectaría a la estabilidad enzimática. Por otra parte, el descenso en la concentración de enzima parece contradictorio según los resultados previos, pero habría que considerar que concentraciones altas de enzima favorecen la reacción de hidrólisis frente a la transglicosilación, la síntesis de GOS. Algunos autores (Chockchaisawasdee *et al.*, 2005; Buchholz *et al.*, 2005) afirman que la concentración total de GOS no está afectada por la concentración de enzima, y esta solo influye en el tiempo de reacción necesario para alcanzar la máxima concentración de GOS. Teniendo en cuenta esas consideraciones y aplicando el método de la máxima pendiente, se realizó un nuevo ensayo fuera del dominio experimental en el que las variables tomaron los siguientes valores: E= -1,75, L= +1,65 y T= +2. Esto significó una concentración de enzima del 0,2%, subir la concentración de lactosa al 48.25% y la temperatura a 44°C. Este nuevo ensayo se realizó además de con lactosa comercial con ultrafiltrado de lactosuero concentrado. Dado que el ultrafiltrado del lactosuero tenía una concentración de lactosa del 7.8% se suplementó con lactosa comercial hasta conseguir la concentración inicial del 48.25%. El tiempo de incubación fue de 8 horas y se cogieron muestras cada hora que fueron analizadas por HPLC.

En la figura 12 se recogen los datos obtenidos para la desaparición de lactosa y aparición de los productos de hidrólisis así como de la síntesis de GOS de tres y cuatro osas para el medio con lactosa comercial y el medio con ultrafiltrado de suero de leche suplementado con lactosa. Tanto en un medio como en el otro el GOS mayoritario es el de tres oligosacáridos (GOS 3) y en menor cantidad el de 4 oligosacáridos (GOS 4). El GOS 4 es el 15-20% del conseguido para el GOS 3. Se observa (Figura 13) que los niveles de GOS totales (GOS 3 y 4) son mayores con la lactosa comercial que con el ultrafiltrado de suero.

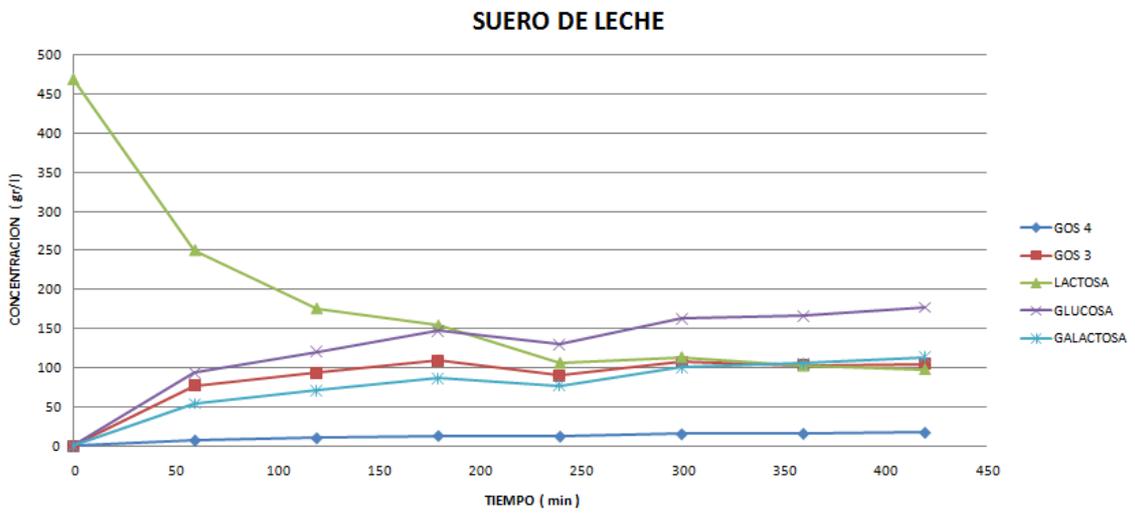
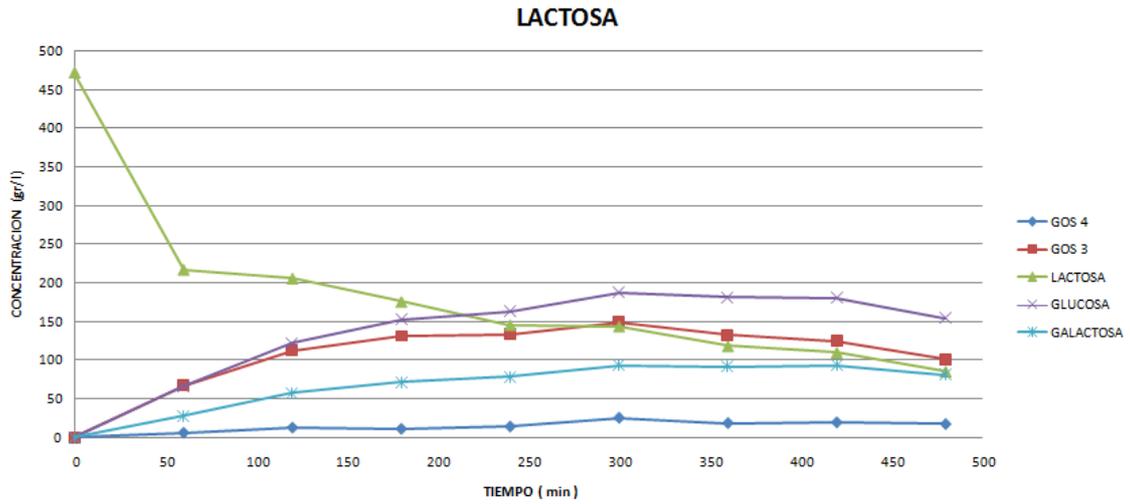


Figura 12: Síntesis de GOS en las condiciones predichas por el método de la máxima pendiente. La parte superior de la gráfica es con lactosa como medio y la inferior con ultrafiltrado de lactosuero suplementado con lactosa.

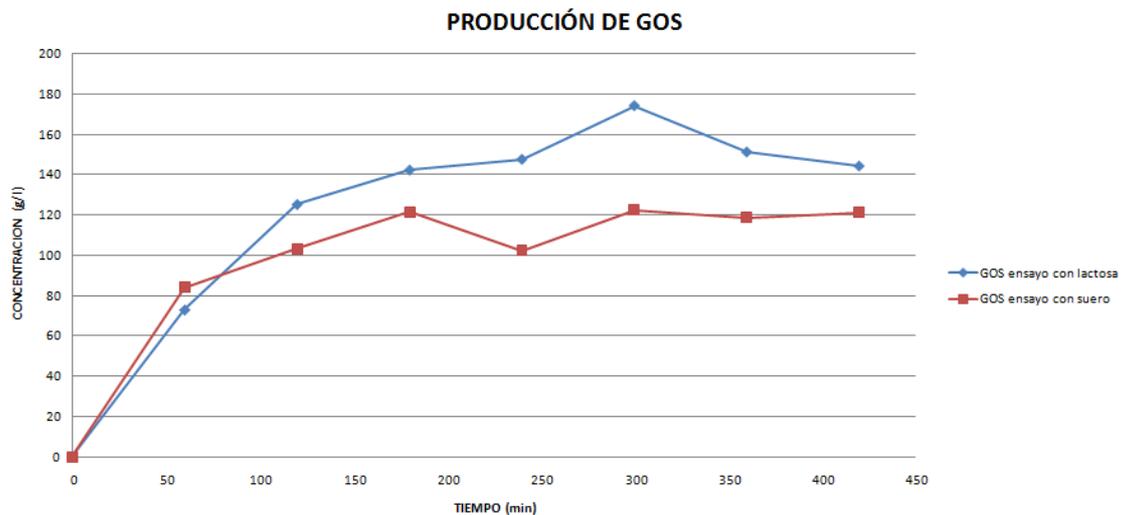


Figura 13: Producción de GOS totales para los dos medios empleados en las condiciones predichas por el método de la máxima pendiente. Los GOS son la suma de la concentración de GOS de tres osas y de GOS de cuatro osas.

El % máximo de síntesis de GOS totales obtenido con respecto a la concentración inicial de lactosa fue de un 36% para el caso del medio con lactosa comercial y del 26% para el medio con ultrafiltrado de suero de leche suplementado con lactosa. Estos resultados son superiores a los alcanzados por otros autores utilizando la misma fuente de enzima (Maxilact LX 5000) que consiguen un 13% (Curda *et al.*, 2006). También son superiores al 17% que se ha conseguido utilizando la β -galactosidasa de *K. lactis* del preparado comercial Lactozym 3000 L HP G (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2008) o al 25% conseguido utilizando el Maxilact L2000 (Chockchaisawasdee *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

De los trabajos realizados se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El método empleado para determinar la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* mediante HPLC parece ser adecuado no solo para determinar los productos de hidrólisis si no también los productos de trasglucosilación de 3 y 4 osas.
- De los primeros experimentos realizados se desprende que un aumento en la concentración de lactosa supone un aumento en la producción de GOS aunque es necesario mayor tiempo para alcanzar un máximo en la producción de GOS.
- El resultado del método estadístico aplicado (plan factorial) indica que en las condiciones experimentales utilizadas la máxima producción de GOS se alcanza al disminuir la concentración de enzima y aumentar la concentración de lactosa inicial y la temperatura.
- Aplicando el método de la máxima pendiente se ha conseguido un máximo del 36% de síntesis de GOS con respecto a la concentración inicial de lactosa para medios con lactosa comercial y un máximo del 26% para medios con ultrafiltrado de suero de leche suplementado con lactosa comercial. Datos superiores a los alcanzados por otros autores con la misma fuente de enzima.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda incondicional del Doctor Manuel Becerra, el cual ha demostrado, su vocación docente e investigadora, durante el desarrollo de este proyecto y a lo largo del Máster de Biotecnología Avanzada.

Agradecer también a todo el Departamento de Bioquímica de la Universidad de la Coruña el trato recibido, haciéndome sentir como uno más durante estos meses, en especial a Agustín Rico el cual ha puesto gran interés en mi aprendizaje.

Por último y no por ello menos importante agradecer a mi compañero Álvaro su apoyo durante toda mi carrera universitaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Bakken, A. P., Hil, C. G., & Amundson, C. H. (1992). Hydrolysis of Lactose in Skim Milk by Immobilized β -Galactosidase (*Bacillus circulans*). *Biotechnology and Bioengineering*, 39: 408-417.
- Bakken, A. P., Hil, C. G., & Amundson, C. H. (1992). Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized β -Galactosidase (*Bacillus circulans*). *Biotechnol. And Bioeng.*, 39:408-417.
- Bauman, D. E., Mather, I. H., Wall, R. J., & Lock A. L. (2006). Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. *Journal of Dairy Science*, 89: 1235-1243.
- Bellisle, F., Diplock, A. T., Hornstrata, G., Koletzko, B., Robertfroid, M., Salminen, & Saris, W. H. M. (1998). *Functional Food Science in Europe*, 80: 1728-1734.
- Bernfeld, P. (1951). Enzymes of starch degradation and synthesis. *Adv. Enzymol.*, 12: 379-427.
- Boehm, G., Marini, A., & Jelinek, J. (2000). Bifidogenic oligosaccharides in a Preterm Formula. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 31: 26;

- Buchholz K., Kasche V., & Bornscheuer U.T. (2005). Biocatalysts and Enzyme Technology.
- Champ, M., Langkilde, A. M., Brouns, F., Kettlitz, B., & Le Bail Collet, Y. (2003). Definition of Dietary Fibre, Physiological Relevance, Health Benefits and Analytical Aspects. *Advances in Dietary Fibre Characterization*, 1: 71-82.
- Chockchaisawasdee, S., Athanasopoulos, V.I., Niranjana, K., & Rastall, R.A. (2005). Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 89: 434-443.
- Chonan, O., Matsumoto, K., & Watanuki, M., (1995). Effect of Galactooligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59:236-239.
- Colinas, B. (2013). Obtención enzimática, caracterización y propiedades prebióticas de oligosacáridos empleados en leches infantiles. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Collins, D. M., & Gibson, G. R. (1999). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Approaches for Modulating the Microbial Ecology of the Gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69: 1052-1057.
- Crittenden, R. G., & Playne, M. J. (1996). Production, Properties and Applications of Food-Grade Oligosaccharides *Trends in Food Sci. & Tech.*, 11:353-361
- Čurda, L., Rudolfová, J., Štětina, J., and Dryák, B. (2006). Dried Buttermilk Containing Galacto-Oligosaccharides Process Layout and its Verification. *J. of Food Eng.*, 77: 468-471.
- Deguchi, Y., Matsumoto, K., Ito, T., & Watanuki, M. (1997). Effects of β 1–4-Galactooligosaccharides Administration on Defecation of Healthy Volunteers with a Tendency to Constipation. *Jap. J. of Nutrit.*, 55:13-22.
- Fowler, A. V., & Zabin, I. (1970). The Amino Acid Sequence of β - Galactosidase. I. Isolation and Composition of Tryptic Peptides. *J. Biol. Chem.*, 245:5032-5041.

- Gibson, G. R., & Roberfroid M. B. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125: 1401- 1412.
- Gilliland, S. E., & Walker D. K. (1990). Factors to Consider When Selecting a Culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J. Dairy Sci.*, 73: 905-11.
- Gomes, A. M. P., & Malcata X. F. (1999). *Bifidobacterium ssp.* And *Lactobacillus acidophilus*: Biological, Biochemical, Technological and Therapeutical Properties Relevant for Use as Probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 139-157.
- Gyorgy, P. (1973). Effect of Carbohydrates on Intestinal Flora, Sugars in *Nutrition*, 1:101-154.
- Hansson, T., & Adlercreutz, P. (2001). Optimization of galacto-oligosaccharide production from lactose using β -glycosidases from hyperthermophiles. *Food Biotechnology*, 15: 79-97.
- Hidaka, H., Eida, T., Tarizawa, T., Tokunaga, T., & Tashiro, Y. (1986). Effects of Fructooligosaccharides on Intestinal Flora and Human Health. *Bifidobact. Microflora*, 5: 37-50.
- Hidaka, H., Hirayama, H., & Sumi, N., (1988). A Fructooligosaccharide-Producing Enzyme from *Aspergillus niger* ATCC20611. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1181-1187.
- Ito, M., & Kimura, M. (1993). Influence of Lactose of Faecal Microflora in Lactose Maldigestion. *Microb. Ecol. in Health and Disease*, 6: 73-76.
- Kanamori, Y., Hashizume, K., Kitano, Y., Tanaka, Y., Morotomi, M., Yuki, N., & Tanaka, R. (2003). Anaerobic Dominant Flora was Reconstructed by Synbiotics in an Infant with MRSA Enteritis. *International Journal of Pediatrics*, 45: 359-362.
- Kanbe, M. (1992). *Cancer Control and Fermented Milk*. Tokyo: Nakazawa & Hosono.

- Kunz, C., & Rudloff, S. (1993). Biological Functions of Oligosaccharides in Human Milk. *Acta Paediatrica*, 82: 903-912.

- Lee, Y.J., Kim, C.S., & Oh, D.K. (2004). Lactulose production by beta-galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 787-793.

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

- Mahoney, R. R. (1998). Galactosyl-Oligosaccharide Formation During Lactose Hydrolysis: a Review. *Food Chemistry*. 63: 147-154.

- Mannucci, F. (2009) Enzymatic Synthesis of Galactooligosaccharides from whey permeate. M.Phil Thesis. Dublin Institute of Technology.

- Marriott, B. M. (2000). Functional Foods: an Ecologic Perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 106-110.

- Martinez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A., & Villamiel, M. (2008). Optimization of conditions for galacto-oligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chemistry*, 107: 258-264.

- Matsumoto, K., Kobayashi, K., Ueyama, Y., Watanabe, S., Tanaka, T., & Kan, R., T. (1993). Galactooligosaccharides. Oligosaccharides. Production, properties and applications. *The Japanese Society for Food Science and Technology*, 4:67-87.

- Nakakuki, T. (1993). Oligosaccharides. Production, Properties and Applications. *Journal of Japan Society of Nutrition and Food Sciences*, 3: 2.

- Narimaya, M., Yokoi, K., Tajima, N., Sakai, O., Ikeda, Y. & Takayama, H. (1996). The Effect of β -1-4-Galactooligosaccharides on Faecal Flora in Non Insulin Dependent Diabetic Patients with Constipation. *Jap. J. of Clin. Nutr.*, 18:44-50.

- Neri, D. F. M., Balcão, V. M., Costa, R. S., Rocha, I. C. A. P., Ferreira, E. M. F.C., Torres, D. P. M., Rodrigues, L. R. M., Carvalho, Jr. L. B., & Teixeira, J. A. (2009). Galacto-Oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane- polyvinyl Alcohol. *Food Chem.*, 1, 92-99.
- Pereira-Rodriguez, A., Fernández-Leiro, R., González-Siso, M.I., Cerdán, M.E., Becerra, M. & Sanz-Aparicio, J. (2012). Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Journal of Structural Biology*, 177: 392-401.
- Perugino, G., Trincone, A., Rossi, M., & Moracci, M. (2004). Oligosaccharide Synthesis by Glycosynthases. *Trends in Biotechnol*, 22: 31-37.
- Playne M.J. & Crittenden R.J. (2009). Galacto-oligosaccharides and other products derived from lactose. *Springer*, 3: 121–201.
- Playne, M. J. (2002). Glycoscience: Oligosaccharides as Drugs, Functional Foods and Receptors in the Gut. *Australasian Biotechnol*, 3: 35-37.
- Portaccio, M., Stellato, S., Rossi, S., Bencivenga, U., Eldin, M. S., Gaeta, F. S., & Mita, D. G. (1998). Galactose Competitive Inhibition of β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*) Immobilized on Chitosan and Nylon Supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 23: 101-106.
- Richmond, M. L., Gray, J. I., & Stine, C. M. (1981). β -Galactosidase: Review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. *J. Dairy Sci.*, 64:1759-1771.
- Roberfroid, M. B. (1996). Functional Effects of Food Components and the Gastrointestinal System: Chicory Fructooligosaccharides. *Nutrition Reviews*, 54: 38-42.
- Roberfroid, M. B., Gibson, G. R., & Delzenne, N. (2000). Biochemistry of Oligofructose, a Non-Digestible Fructo-Oligosaccharide: an Approach to Estimate its Caloric Value. *Nutrit. Rev.*, 51, pp. 137-146;

- Roberts, H. R., & Pettinati, J. D. (1957). Oligosaccharide production, concentration effects in the enzymatic conversion of lactose to oligosaccharides. *Agric. Food Chem.*, 5: 130.
- Sako, T., Matsumoto, K., & Tanaka, R. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 9: 69–80.
- Scholz-Ahrens, K., Van Loo, J., & Schrezenmeir, J. (1998). Effect of Oligosaccharides on Gut Flora Metabolism in Rat Associated With a Human Faecal Microflora. *J. of Appl. Bacter.*, 74: 667-674.
- Shortt, C. (1999). The Probiotic Century: Historical and Current Perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 411– 417.
- Shukla, H., & Chaplin, M. (1993). Non Competitive Inhibition of β - Galactosidase (*A. oryzae*) by Galactose. *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 297–299.
- Siso, M. I. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores. Technol.*, 57: 1-11.
- Sloan, A. E. (1999). The New Market: Foods for the Not-So-Healthy. *Food Technology*, 53: 2.
- Tamai, S., Ohtsuka, K., Ozawa, O. & Uchida, T. (1992). Effect of a Small Amount of Galactooligosaccharides on Faecal Bifidobacterium. *Journal of Japan Society of Nutrition and Food Sciences*, 45: 456-460.
- Tanaka, R., Takayama, H., Morotomi, M. Kuroshima, T., Ueyama, S., Matsumoto, K., Kurota, A., & Mutai, M. (1983). Effects of Administration of TOS and Bifidobacterium breve 4006 on the Human Faecal Flora. *Bifidobacteria and Microflora*, 2: 17-24.
- Tomomatsu, H. (1994). Health Effects of Oligosaccharides. *Food Technol*, 48: 61-65.

- Van den Heuvel, E. G., Muys, T., Van Dokkum, W., and Schaafsma, G. (1999). Oligofructose Stimulates Calcium Absorption in Adolescents. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69: 544-8.
- Van Dokkum, W., Wezendonk, B., Srikumar, T. S., & Van den Heuvel, E. G. H. M. (1999). Effect of Non Digestible Oligosaccharides on Large-Bowel Functions, Blood Lipid Concentrations and Glucose Absorption in Young Healthy Male Subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53: 1-7.
- Van Loo J, Cummings J, Delzenne N, Englyst H, Franck A, Hopkins M, Kok N, Macfarlane G, Newton D, Quigley M, Roberfroid M, van Vliet T & van den Heuvel E (1999) Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRIICT94-1095). *British Journal of Nutrition* 81, 121–132.
- Voragen, A. G. J. (1998). Technological aspects of functional food related carbohydrates. *Trends in Food Sci. and Technol.*, 9:328-335.
- Watanuki, M., Wada, Y., & Matsumoto, K. (1996). Digestibility and Physiological Heat of Combustions of β -1-4 and β -1-6 Galacto-Oligosaccharides in Vitro. *Ann. Reports of the Yakult Central Inst. for Microbiol*, 16: 1-12.
- Wolever, T.M., Spadafora, P., & Eshuis, H. (1991). Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 681-687.
- Zárate, S., & López-Leiva, M. H. (1990). Oligosaccharide Formation During Enzymatic Lactose Hydrolysis. *Journal of Food Protection* , 53: 262- 268.