



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE
LACTULOSA A PARTIR DE LACTOSA PRESENTE EN
LACTOSUERO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

BRENDA VERÓNICA SÁNCHEZ HERNÁNDEZ



Ciudad Universitaria, CDMX

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Bertha Julieta Sandoval Guillén

VOCAL: Aleida Mina Cetina

SECRETARIO: Juan Carlos Ramírez Orejel

1er. SUPLENTE: Hiram Fernando Ramírez Cahero

2° SUPLENTE: Janeli Solis Garfias

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA, DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL Y
BIOQUÍMICA. FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA. UNAM

ASESOR DEL TEMA:

M en C. Juan Carlos Ramírez Orejel

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.A. José Moisés Talamantes Gómez

SUSTENTANTE (S):

Brenda Verónica Sánchez Hernández

Índice general

Resumen	1
Introducción	2
Objetivo general	3
Objetivos particulares	3
Hipótesis general	4
Hipótesis particulares	4
1 Antecedentes	6
1.1. Lactosuero dulce bovino y caprino (composición).	6
1.2. Lactosa	7
1.3. Lactulosa	8
1.4. Producción química de lactulosa	9
1.5. Producción enzimática de lactulosa	11
2 Materiales y Métodos	16
2.1 Diagrama general de proceso	16
2.1.1 Primera parte	16
2.1.2 Segunda parte	17
2.1.3 Tercera Parte	17
2.2 Parámetros utilizados durante la caracterización de la materia prima.	18
2.3 Conversión de lactosa en lactulosa. Reacción Química	19
2.3.1 Reacción de isomerización con carbonato de calcio (CaCO ₃) (Montilla, et al., 2004).	19
2.3.2 Reacción de isomerización con carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃) (Yeong Hwan Seo, et al., 2015).	19
2.4 Conversión de lactosa en lactulosa. Reacción Enzimática.	20
2.4.1 Reacción de isomerización con β-galactosidasa proveniente de <i>Aspergillus orizae</i> .	20
2.5 Determinación cualitativa de lactosa y lactulosa en lactosuero y leches comerciales, por cromatografía en capa fina (Martínez y Olano, 1981, con modificaciones)	20

2.6	Determinación cuantitativa de lactosa y lactulosa en lactosuero y leches comerciales, por espectrofotometría visible (UV-VIS)	21
2.7	Determinación cuantitativa de lactosa y lactulosa en lactosuero y leches comerciales, por HPLC con detector de Índice de Refracción.	21
2.7.1	Preparación de la curva de calibración para HPLC	21
2.7.2	Preparación de las muestras	21
2.7.3	Condiciones del cromatógrafo	22
2.8	Comparación de rendimientos obtenidos de conversión de lactosa en lactulosa entre lactosueros, entre sales y entre métodos.	22
3	Resultados y Análisis	23
3.1	Caracterización fisicoquímica de la materia prima.	23
3.2	Conversión de lactosa a lactulosa	24
3.3	Determinación cualitativa de lactosa y lactulosa en lactosuero	24
3.4	Determinación cuantitativa de lactulosa	26
3.5	Comparación de rendimientos obtenidos.	29
3.6	Determinación cualitativa y cuantitativa de lactulosa y lactosa en lactosuero caprino con carbonato de sodio (Na_2CO_3)	30
3.7	Obtención de lactulosa por isomerización enzimática con β -galactosidasa de <i>Aspergillus oryzae</i> .	41
3.8	Comparación de isomerización entre el método químico y el método enzimático.	45
3.9	Determinación de lactosa y lactulosa en leches cualitativamente (cromatografía en capa fina) y cuantitativamente (espectrofotometría UV y cromatografía de líquidos HPLC).	45
4	Conclusiones	52
5	Perspectivas	53
6	Referencias	54

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Composición química de la leche de bovino y caprino g/100mL (Adaptado de Park, et al., 2007).	7
Tabla 2.1. Métodos de cuantificación utilizados en el análisis fisicoquímico.	18
Tabla 3.1. Análisis fisicoquímico de los lactosueros Bovino y Caprino.	23
Tabla 3.2. pH de lactosueros bovino y caprino después de agregar Na ₂ CO ₃ y CaCO ₃	24
Tabla 3.3. Valores de R _f de los estándares obtenidos por CCF.	26
Tabla 3.4. Comparación de los rendimientos obtenidos para los diferentes lactosueros, así como las sales empleadas.	29
Tabla 3.5. Proporción de azúcares reductores (en gramos y porcentaje) del lactosuero caprino con y sin carbonato de sodio, además de su comparación frente a los controles.	31
Tabla 3.6. Cuantificación de lactulosa por la reacción de Seliwanoff para lactosuero caprino y solución de lactosa al 5%.	33
Tabla 3.7. Cuantificación de lactosa obtenidos por HPLC.	37
Tabla 3.8. Cuantificación de lactulosa por medio de HPLC-IR.	38
Tabla 3.9. Cuantificación de lactosa por el método de DNS en lactosuero caprino con y sin β-galactosidasa.	43
Tabla 3.10. Cuantificación de lactulosa en lactosuero caprino con y sin β-galactosidasa.	44
Tabla 3.11. Cuantificación de lactosa por espectrofotometría UV-VIS y Cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC-IR.	49
Tabla 3.12. Cuantificación de lactulosa en productos lácteos comerciales por el método de Seliwanoff.	50

Índice de Figuras

Figura 1.1. Isomerización de Lactosa a Lactulosa (Montilla, et al., 2004).	9
Figura 2.1. Diagrama general de proceso 1. Isomerización química de lactosa a lactulosa.	16
Figura 2.2. Diagrama general de proceso 2. Isomerización enzimática de lactosa a lactulosa.	17
Figura 2.3. Diagrama general de proceso 3. Determinación de isomerización en leche por tratamientos térmicos.	18
Figura 3.1. CCF Lactosuero bovino con CaCO_3	25
Figura 3.2. CCF Lactosuero bovino con Na_2CO_3	25
Figura 3.3. CCF Lactosuero caprino con CaCO_3	25
Figura 3.4. CCF Lactosuero caprino con Na_2CO_3	25
Figura 3.5. Reacción de Seliwanoff para dar el compuesto colorido (Quesada, 2007)	27
Figura 3.6. Curva de calibración de lactulosa para la reacción de Seliwanoff.....	27
Figura 3.7. Comparación del contenido de lactulosa en lactosuero bovino y caprino después de la reacción de isomerización (g/100 mL).	28
Figura 3.8. CCF Lactosuero caprino con Na_2CO_3	30
Figura 3.9 CCF control de lactosa con Na_2CO_3	30
Figura 3.10. Curva de calibración de lactosa por HPLC-IR	34
Figura 3.11. Curva de calibración de lactulosa por HPLC-IR	34
Figura 3.12. Cromatograma de los controles utilizados para realizar las curvas de calibración, donde se muestran las señales de lactosa y lactulosa a una concentración de 20mg/mL.	35
Figura 3.13. Cromatograma de solución de lactosa al 5%, donde se muestra la señal de lactosa.	35
Figura 3.14. Cromatograma de solución de lactosa al 5% después de la reacción de isomerización química con carbonato de sodio.....	36
Figura 3.15. Cromatograma del lactosuero caprino sin reacción, donde se muestra la señal de lactosa.....	36

Figura 3.16. Cromatograma del lactosuero caprino después de la reacción de isomerización química con carbonato de sodio.....	37
Figura 3.17. Comparación de la cuantificación de lactosa entre el método DNS de Espectrofotometría UV-VIS y el método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución HPLC-IR.	40
Figura 3.18. Comparación en la cuantificación de lactulosa entre el método Seliwanoff de Espectrofotometría UV-VIS y el método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución HPLC-IR.	40
Figura 3.19. CCF Lactosuero caprino con B-galactosidasa	42
Figura 3.20.CCF de productos lácteos comerciales.....	46
Figura 3.21. Cromatograma de leche pasteurizada, donde se muestra la señal de lactosa.....	47
Figura 3.22. Cromatograma de leche ultrapasteurizada, donde se muestra la señal de lactosa y lactulosa.	47
Figura 3.23. Cromatograma de leche evaporada, donde se muestra la señal de lactosa y lactulosa.	48
Figura 3.24. Cromatograma de leche deshidratada, donde se muestra la señal de lactosa.....	48

Resumen

La lactulosa, es un disacárido utilizado en la industria láctea como un indicador de tratamiento térmico, además de poseer una actividad prebiótica, es decir, que estimula el crecimiento de bacterias probióticas y disminuye la prevalencia de bacterias patógenas o indeseables, por lo que es utilizado ampliamente en la industria farmacéutica. La cantidad de lactosa en el lactosuero es el 80% del contenido que inicialmente se encontraba en leche, por ello el presente proyecto tiene como objetivo utilizar esta lactosa para transformarla en lactulosa, generando así un prebiótico a partir de un residuo de la industria, reduciendo con esto el impacto ambiental generado por el lactosuero. Esto se logró mediante dos métodos: el químico que consistió en la utilización de sales que no impactan al medio ambiente como lo son el carbonato de sodio (Na_2CO_3), y el carbonato de calcio (CaCO_3) presente en el cascarón de huevo, con el fin de obtener un medio alcalino y aplicando altas temperaturas para lograr la isomerización, obteniéndose que la sal que genera una mayor cantidad de lactulosa es el carbonato de sodio, independientemente del lactosuero que se tome como materia prima (caprino o bovino), obteniendo un rendimiento de isomerización de 57.52 %. Se realizaron determinaciones cualitativas mediante cromatografía en capa fina, y cuantitativas mediante espectrofotometría UV-VIS y HPLC con detector de IR. Para realizar la isomerización por el método enzimático se utilizó la enzima β -galactosidasa proveniente de *Aspergillus orizae* con una concentración, pH y temperatura controladas, donde no se obtuvo un resultado positivo de isomerización a lactulosa, con la metodología empleada. Adicionalmente se cuantificó la cantidad de lactulosa que se genera en los productos lácteos industrializados que son sometidos a tratamientos térmicos como los son; la leche pasteurizada, leche ultrapasteurizada, leche evaporada y leche deshidratada, donde se observaron valores mínimos o nulos de lactulosa, con lo que se comprueba que para generar este prebiótico no es suficiente el tratamiento térmico a altas temperaturas, sino que se requiere además un pH alcalino. En el presente trabajo se concluyó que el mejor método de isomerización de lactosa a lactulosa, es el método químico con carbonato de sodio

debido a que es una alternativa viable y económica, que ayuda a aprovechar el lactosuero y evita la contaminación de grandes cantidades de agua por eliminación de este a través del drenaje.

Introducción

Dentro de la industria láctea se destaca la producción de quesos frescos, se sabe que si se toman 10 litros de leche se puede producir entre 1.5-2 kg de queso y aproximadamente 8.5-9 kg de suero que representa cerca del 90% del volumen de la leche. El lactosuero dulce, es la fracción líquida de la leche rica en nutrientes como lactosa, proteínas y minerales. Se obtiene después de la coagulación enzimática de las caseínas, sin embargo su composición depende del tipo de queso y la leche de la que se parte, contiene de 5-8% de sólidos, de los cuáles el 60-80% es lactosa y 10-20% proteínas. Es considerado un residuo de la industria quesera, que puede ser altamente contaminante debido a su demanda biológica de oxígeno que presenta al descomponerse, por lo que debe tratarse de manera adecuada para su desecho (Vamvakaki, *et al.*, 2010).

El suero producido en México es de cerca de 1 millón de toneladas y contiene 50 mil toneladas de lactosa y 5 mil toneladas de proteína verdadera. A pesar de esta riqueza nutricional, potencialmente utilizable, aproximadamente el 47% de lactosuero es descargado al drenaje, llegando a ríos y suelos, la descarga continua de suero en estos ecosistemas altera sus propiedades fisicoquímicas. Una industria quesera media que produzca diariamente 40,000 litros de suero sin depurar genera una contaminación diaria similar a una población de 1,250,000 habitantes. Por ello es importante que las industrias lácteas utilicen el lactosuero con el fin de no contaminar el ambiente (Carrillo, 2002).

El lactosuero ha sido utilizado con éxito para la elaboración de bebidas lácteas, así como en la fabricación de galletas, yogurt, alimentación de ganado (ovino y porcino). Además de otra alternativa, mostrando que es posible producir bioetanol a partir del

lactosuero, utilizando este residuo para obtener energía y abastecer a las mismas empresas que lo generan (Valero y Usón, 2011).

El presente trabajo se enfoca a la utilización de la lactosa presente en el lactosuero para generar un prebiótico como lo es la lactulosa, mediante un método químico y uno enzimático.

Objetivo general

Elaborar la transformación de la lactosa presente en el lactosuero dulce de bovino y caprino a lactulosa a través de una reacción química de isomerización en medio alcalino con altas temperaturas, utilizando sales amigables con el medio ambiente, como lo son el carbonato de sodio y el carbonato de calcio, y una reacción enzimática por medio de β -galactosidasa proveniente de *Aspergillus oryzae*, para determinar la metodología que da el mayor rendimiento de isomerización.

Objetivos particulares

- Diferenciar la composición química inicial entre el lactosuero dulce bovino y el lactosuero dulce caprino, para conocer si la cantidad de lactosa en ambos es determinante al momento de realizar la isomerización.
- Implementar una metodología para determinar la producción de lactulosa en el lactosuero bovino y caprino, utilizando carbonato de calcio (CaCO_3) y carbonato de sodio (Na_2CO_3), a través de Cromatografía en capa fina y Espectrofotometría UV-VIS, para poder obtener rendimientos de isomerización.
- Analizar el rendimiento de isomerización de lactosa en lactulosa entre el lactosuero bovino y caprino tratado con carbonato de calcio (CaCO_3), así como el obtenido al tratarse con carbonato de sodio (Na_2CO_3), para seleccionar el lactosuero y la sal que proporcionen un mayor rendimiento.

- Analizar la concentración de lactosa y lactulosa en el lactosuero seleccionado con el tratamiento elegido, mediante Espectrofotometría UV-VIS y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución HPLC, para comparar los métodos de cuantificación de carbohidratos y proponer si se puede utilizar el que genere un menor gasto de tiempo y recursos.
- Evaluar cualitativa y cuantitativamente la producción de lactulosa en el lactosuero seleccionado por el método enzimático con β -galactosidasa y obtener el rendimiento de isomerización, para diferenciar los rendimientos obtenidos entre el método químico y el método enzimático, y adicionalmente seleccionar el método con el que se obtenga un mayor rendimiento.
- Analizar cuatro productos lácteos comerciales tratados térmicamente (pasteurización, ultrapasteurización, evaporación y deshidratación), para demostrar si existe producción de lactulosa y concluir si el tratamiento térmico al que son sometidos es suficiente para lograr la isomerización a lactulosa.

Hipótesis general

Si el mayor componente sólido del lactosuero es la lactosa y esta se isomeriza a lactulosa por métodos químicos y enzimáticos, entonces se podrían obtener rendimientos considerables de isomerización al utilizar sales económicas y amigables con el medio ambiente, al igual que una enzima específica, para generar el prebiótico.

Hipótesis particulares

- Si la composición química del lactosuero bovino y caprino son muy parecidas, entonces la isomerización de la lactosa a lactulosa podrá realizarse en los dos lactosueros indistintamente.

- Si para el método químico se necesita un medio alcalino y altas temperaturas para isomerizar la lactosa a lactulosa, entonces se podrán utilizar carbonato de calcio (CaCO_3) y carbonato de sodio (Na_2CO_3) para realizar la isomerización, al generar rendimientos que se podrán comparar entre sí.
- Si para el método enzimático de isomerización se requiere de la enzima β -galactosidasa específica para lactosa, entonces al utilizarla en las cantidades adecuadas se obtendrá la isomerización de lactosa a lactulosa.
- Si la isomerización por los métodos químico y enzimático presentan rendimientos de isomerización similares, entonces se podrá seleccionar la metodología que genere un menor costo en relación al rendimiento de isomerización, para lograr obtener el prebiótico.

1 Antecedentes

1.1. Lactosuero dulce bovino y caprino (composición).

El lactosuero o suero de leche dulce, se obtiene después de la coagulación enzimática de las caseínas para la obtención de un queso, es la fracción líquida de la leche rica en nutrientes como lactosa, proteínas y minerales, es un líquido claro, de color amarillo verdoso translúcido, aunque el color y composición varía según el tipo de leche utilizada y el tipo de queso elaborado, el contenido de sólidos de este va de 5 a 8 %, de los cuales alrededor de 4.5 a 6.2 % es lactosa y de 0.5- 2.8 son proteínas (Vamvakaki, *et al.*, 2010).

Su composición lo convierte en una excelente medio de cultivo, es utilizado en un gran número de procesos fermentativos como son para la obtención de bioetanol, ácidos grasos, ácidos orgánicos, entre otros. Además se utiliza en pequeñas cantidades como alimento para cerdos y terneros, trabajos recientes utilizan el lactosuero para elaboración de bebidas, biomasa, biogases y biopolímeros. Es el subproducto más abundante de la industria láctea, que tiene una difícil aceptación en el mercado, debido a que sus características no lo hacen apto para una comercialización directa como suero líquido, por lo que se considera como un residuo de la industria, y se vierte en su mayoría en los drenajes, si no se trata de manera adecuada para su desecho puede ser altamente contaminante con los suelos y el medio ambiente debido a su alta demanda biológica de oxígeno que presenta al descomponerse (Mawson, (1994), Carrillo, (2002), Valencia y Ramírez, (2009)).

La leche de cabra tiene una composición similar a la leche de vaca (**Tabla 1.1**), la concentración de la lactosa en vacas y cabras maduras incrementa en las etapas más tempranas de la lactancia pero disminuye hasta en un 70% en la etapa final de lactancia, por lo que la composición del lactosuero en la fracción soluble va a ser alrededor del 80% de la inicial en la leche (McSweeney y Fox, 2009).

Tabla 1.1. Composición química de la leche de bovino y caprino g/100mL (Adaptado de Park, et al., 2007).

Nutrientes	Leche de Vaca	Leche de Cabra
Agua	87.70	87.10
Lípidos	3.60	4.60
Lactosa	4.70	4.60
Proteína	3.30	3.30
Caseína	2.70	2.47
Proteínas del suero	0.42	0.56
Sales minerales	0.70	0.70

1.2. Lactosa

La lactosa, el llamado azúcar de la leche, es un disacárido natural con peso molecular de 342 g/mol, está formada por la unión β (1-4) de la β -D-galactopiranososa (galactosa) y la α o β -D-glucopiranososa (glucosa), por esto último existen dos formas isoméricas: α y β , que se diferencian estructuralmente sólo en la posición del -OH en el carbono monomérico de la glucosa. Sin embargo, sus propiedades físicas cambian, lo que provoca que tengan distintas aplicaciones. Para obtener el cristal de lactosa la forma más común, es cristalizando una solución sobresaturada. Cuando la cristalización se realiza a temperaturas inferiores a 93.5°C, se obtiene α -lactosa monohidratada, y a temperaturas mayores se forman exclusivamente cristales de β -lactosa, los cuales son más frágiles. La pureza isomérica es aproximadamente el 80% α -lactosa y el 20% restante β -lactosa anhidra. La lactosa se puede modificar química y enzimáticamente para obtener derivados con alto valor añadido en la industria tanto alimentaria como farmacéutica (McSweeney y Fox, 2009).

La lactosa es el carbohidrato mayoritario presente en el lactosuero, se obtiene por medio de suero concentrado, suero desproteínizado o permeado de UF a 50-60% de sólidos y enfriamiento con agitación para promover la cristalización. Los cristales de α -lactosa son recuperados por decantación, centrifugación y lavados con agua para obtener lactosa cruda, que es útil para alimentación animal y como sustrato para la fermentación, para purificarla es resuspendida, recristalizada y tratada con

carbón activado, los cristales de α -lactosa no son higroscópicos, fluyen libremente, se disuelven lentamente y son químicamente estables, presenta un punto de fusión de 202°C y una solubilidad en agua de 161g/L (Kreczmann, *et al.*, 2015).

1.3. Lactulosa

La lactulosa (4-O-b-galactopiranosil-D-fructosa) es un disacárido sintético, es un polvo cristalino blanco, inodoro, con solubilidad en agua de 764g/L, con un punto de fusión de 167-169°C, que es obtenido por isomerización de la lactosa (4-O-b-D-galactopiranosil-D-glucosa). La isomerización química se logra mediante la reacción de transformación de Lobry de Bruyn–Alberda van Ekenstein, que puede resumirse como la formación de una forma enólica intermedia de la lactosa y la epilactosa en medio alcalino con la subsiguiente transformación de la glucosa en fructosa (Figura 1), la actividad de esta reacción se ve afectada por el tiempo de reacción, temperatura de reacción, concentración y tipo de catalizador. (Montilla, *et al.*, 2005).

La lactulosa además, se utiliza como un indicador de tratamiento térmico en la leche y algunos productos lácteos, ya que puede indicar si existe alguna adulteración y es hasta cierto punto indeseable en algunos productos, sin embargo, es utilizada en la industria alimentaria como edulcorante, tiene una actividad prebiótica que estimula el crecimiento de bacterias probióticas y disminuye la prevalencia de bacterias patógenas o indeseables en los alimentos, y en la industria farmacéutica tiene aplicaciones para el estreñimiento debido a que las bacterias presentes en el colon descomponen la lactulosa en ácidos orgánicos de bajo peso molecular que disminuyen el pH del lumen colónico y por un efecto osmótico, aumentan el volumen del contenido, ambos efectos favorecen el peristaltismo del colon y normalizan la consistencia de las heces, y la encefalopatía hepática portosistémica, por supresión de las bacterias proteolíticas al aumentar la cantidad de bacterias acidófilas. (McSweeney y Fox, (2009), Parmjit y Shweta, (2011)).

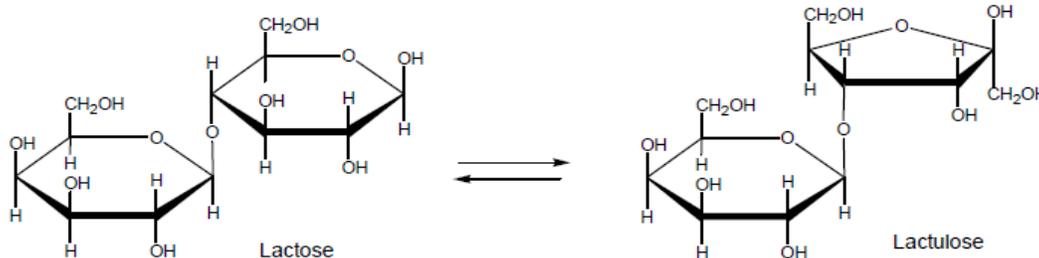


Figura 1.1. Isomerización de Lactosa a Lactulosa (Montilla, et al., 2004).

1.4. Producción química de lactulosa

Como se mencionó anteriormente la isomerización química de la lactosa requiere ciertos factores para llevarse a cabo como los son un pH alcalino y temperatura, por lo que se han estudiado diversas sales para lograr este cometido.

En 2005, Montilla A., y colaboradores, realizaron la isomerización de lactosa en lactulosa con carbonato de calcio (cascarón de huevo) en leche ultra filtrada, para crear un uso alternativo a los residuos de la industria, comparando la influencia de diferentes concentraciones de carbonato de calcio, tiempos de reacción, y pH a la misma temperatura (98°C), en el que se midieron cantidades de lactulosa, y productos secundarios formados; epilactosa, galactosa y ácidos orgánicos. Se obtuvo una producción óptima de lactulosa utilizando una concentración de carbonato de calcio de 6 mg/mL a 98°C con un tiempo de reacción de 60 min, donde se produjo la menor cantidad de productos secundarios comparado con las demás variantes, otras ventajas que encontraron con este catalizador es que después de la reacción permanece insoluble por lo que se puede remover fácilmente con centrifugación a diferencia de las sales que son solubles, y se removió eficazmente las coloraciones indeseadas con columnas de carbón activado.

En 2013, Facciano, M. y Menin, M., realizaron la isomerización de lactosa en lactulosa con carbonato de calcio (cascarón de huevo) en lactosuero dulce, donde determinaron las variables de pH inicial, temperaturas, tiempos de reacción y concentraciones de catalizador para lograr una eficiente isomerización. Obtuvieron mayor isomerización a un pH=7, con 300 mg/mL de catalizador a 100°C durante 120 min de reacción, dando como valor 2.14g de lactulosa por cada 100mL de

lactosuero dulce, esto se midió a través de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).

En 2015, Yeong Hwan Seo y colaboradores, analizaron el efecto de la isomerización de lactosa en lactulosa con carbonato de sodio (Na_2CO_3) en lactosuero como materia prima, utilizando como factores experimentales la temperatura, tiempo de reacción y concentración de sal, donde se obtuvo un rendimiento máximo de 29.6 % con un tiempo de reacción de 21.41 min a 90°C y una concentración de 0.51 % de Na_2CO_3 , para lograr romper este límite y aumentar el rendimiento se utilizó como fuente de lactosa lactosuero en polvo y un sistema de alimentación inversa gracias a la conversión de lactulosa en galactosa.

Por ultimo en el 2016 Yeong Hwan Seo y colaboradores, analizaron el uso de carbonato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) como catalizador alcalino para la isomerización de lactosa presente en el lactosuero en lactulosa, obteniendo un rendimiento de 29.6% a un tiempo de reacción de 28.44 min a 97°C con una cantidad de 0.76% de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, donde este se descompuso completamente en NH_3 y CO_2 , el CO_2 tiene una fácil reconstitución, sin embargo, para el amoniaco remanente en el lactosuero tratado se tuvo que elevar la temperatura a 60°C y realizar un aireado para su recuperación óptima.

Además de los estudios mencionados anteriormente se han utilizado diferentes sales como lo son: hidróxido de calcio (Montgomery & Hudson, 1930) hidróxido de sodio (Zokaee, et al., 2002b), hidróxido y carbonato de potasio (Nagasawa et al., 1974), oxido de magnesio (Carobbi, et al., 1985), aminas terciarias (Parrish, 1970), boratos y aluminato de sodio (Zokaee et al., 2002a, 2002b), entre otros. Sin embargo algunos de estos catalizadores producen compuestos secundarios indeseables y difíciles de remover, que pueden ocasionar daños en el organismo si se consumen, por lo que la lactulosa obtenida con estos métodos no podría tener una aplicación directa en la industria de los alimentos y fármacos.

1.5. Producción enzimática de lactulosa

Para poder realizar la isomerización enzimática de la lactosa se necesitan factores como la enzima β -galactosidasa, pH óptimo dependiendo el origen de la enzima, temperatura y tiempo de incubación.

En 2011 Vera, y colaboradores determinaron la actividad de transgalactosilación de la β -galactosidasa proveniente de *Aspergillus oryzae*, al darse cuenta que el potencial catalítico de la enzima generalmente se mide tomando en cuenta el potencial hidrolítico al utilizar sustratos tanto naturales como sintéticos, notaron que con esa metodología se determina pobremente la actividad enzimática de transgalactosilación, por lo que decidieron desarrollar una metodología específica para medir la transgalactosilación de la β -galactosidasa. Se tomaron en cuenta tres variantes para determinar la actividad de la β -galactosidasa proveniente de *Aspergillus oryzae*, el primer parámetro fue la temperatura donde se observó que la actividad de transgalactosilación aumenta en el intervalo de 40°C a 55°C esto se reflejó en el incremento de producción de lactulosa y galacto-oligosacaridos (GOS), a pesar de esto la mezcla de reacción con una concentración fija de lactosa, no se vio afectada por la temperatura, con lo que concluyeron que el balance entre la actividad de transgalactosilación e hidrólisis no se ve afectada por la temperatura y que a temperaturas mayores de 55°C la actividad empieza a decrecer esto debido a que se está inactivando la enzima.

El segundo parámetro fue el pH debido a que se sabe que la enzima trabaja en un medio preferentemente ácido y es un factor de gran relevancia para que se lleve a cabo su actividad, donde se observó un intervalo óptimo de pH de entre 3.5 y 5.5 con un descenso en la actividad a pH más altos, el tiempo que se utilizó fue únicamente para ilustrar en donde se alcanza el punto máximo de transgalactosilación que fue de aproximadamente 400min, se observó que a pH menores a 3.5 la actividad de la enzima fue menor, mostrando el efecto contrario a pH mayores donde se obtiene una estabilidad en la transgalactosilación, la concentración máxima de GOS que se obtiene es del 28% del azúcar total utilizado.

Por último se varió la concentración de glucosa y galactosa utilizada, en ambos casos la galactosa fue un fuerte inhibidor de la actividad de transgalactosilación, se observó una alta afinidad de la enzima por galactosa y una baja afinidad por lactosa lo que hace que la β -galactosidasa proveniente de *Aspergillus oryzae* tenga una cierta desventaja con respecto a otras fuentes, sin embargo tiene una mayor actividad de transgalactosilación en términos de especificidad comparada con otras. Se observó que una concentración de glucosa menor a 200mmol/kg tiene un efecto positivo para que se lleve a cabo la transgalactosilación para síntesis de lactulosa y GOS al potenciar su efecto.

En 2012 Shen, y colaboradores. Estudiaron la síntesis enzimática e identificación de oligosacáridos obtenidos a partir de la transgalactosilación de la lactosa en presencia de fructosa utilizando la β -galactosidasa proveniente de *Kluyveromyces lactis*. Para lograr esto prepararon 10 mL una solución de lactosa de 200 g/L con búfer de sodio fosfato 0.1 N de pH 6.8, con fructosa al 20 g/L, se inició la reacción adicionando la β -galactosidasa proveniente de *Kluyveromyces lactis* a una concentración final de 3 unidades/ mL, se incubó a 38°C en un agitador orbital a 200 rpm, se tomaron muestras de 200 μ L a intervalos de reacción específicos y se inactivo la enzima en agua hirviendo por 5min.

Las muestras se almacenaron a 4°C y se leyeron junto con un control de lactosa sin enzima, se leyeron por sistema de HPLC con un detector de RI y una columna de amino, las muestras se filtraron antes de inyectarse, la columna se eluyó a 35°C con acetonitrilo: agua (75:25. v/v) con un flujo de 1mL / min. Los resultados obtenidos muestran que en efecto la β -galactosidasa tiene como función hidrolizar la lactosa, sin embargo, puede catalizar los restos de galactosa de un donador a una molécula de carbohidratos bajo condiciones espaciales y han sido utilizados para la síntesis de diversos oligosacáridos.

Las moléculas de carbohidratos representan múltiples grupos hidroxilo, así la transgalactosilación catalizada por β -galactosidasa es región no específica, pero estero específica y una mezcla de región de isómeros es probablemente obtenida,

la producción de esta región depende de la fuente de la enzima, el aceptor y las condiciones de reacción. La regio selectividad de la β -galactosidasa proveniente de *Kluyveromyces lactis* ha sido investigada con varios aceptores y los grupos hidroxilo primarios fueron glicosilados preferentemente en el segundo grupo hidroxilo de todos los aceptores estudiados.

En el 2014 Guerrero, y colaboradores investigaron tanto la actividad hidrolítica como de transgalactosilación de diferentes β -galactosidasas comerciales, para la síntesis de carbohidratos prebióticos, donde se probaron once diferentes β -galactosidasas, tres provenientes de *Aspergillus oryzae*, dos de *Aspergillus niger*, uno de *Aspergillus aculeatus*, uno de *Bacillus circulans* y cuatro de *Kluyveromyces lactis*, todas de diferentes marcas y proveedores, se determinó la actividad de hidrólisis incubando las enzimas a 40°C con el pH óptimo específico para cada enzima, y en específico a la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* se le agregó extra 1.6mmol/L de $MgCl_2$ y para medir la actividad de transgalactosilación se incubaron las enzimas a 40°C con el pH óptimo específico para cada enzima, utilizando como sustratos 40 % m/m de lactosa y lactulosa. Los resultados arrojaron que la enzima que presento mayor actividad tanto de hidrólisis como de transgalactosilación fue la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* a cualquier concentración de lactosa y lactulosa como sustratos, la enzima con una menor actividad de transgalactosilación fue la β -galactosidasa de *Aspergillus niger* cuando el sustrato era lactosa y fue la β -galactosidasa de *Bacillus circulans* cuando el sustrato era lactulosa, sin embargo cuando el sustrato era lactosa fue el segundo con mejor actividad de transgalactosilación. Se obtuvo que el donador de galactosa es el reactivo limitante para la transgalactosilación, con lo que se puede favorecer la transgalactosilación sobre la hidrólisis variando su concentración.

En el 2017 Guerrero, et al. estudiaron una operación de retro alimentación para la síntesis de lactulosa con β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*. Para la síntesis de lactulosa se realizó en matraz Erlenmeyer de 100 mL bajo agitación magnética a 55°C, pH 4.5, concentración total de azúcares de 50% (p/p), relaciones molares de fructosa / lactosa de: 1, 4, 6, 8, 12 y 20, y relaciones enzima/ sustrato de: 100, 200,

400, 800 y 1600 IU_H/ g de lactosa (unidad internacional de actividad hidrolítica). Los sustratos de azúcar se disolvieron en buffer de citrato-fosfato 100 mM a pH 4,5 previamente calentado a 95 ° C y luego enfriado a la temperatura de reacción. El curso del tiempo de la reacción se llevó hasta el punto de máxima concentración de lactulosa. La distribución del producto se determinó entonces analizando las cantidades de lactulosa, disacáridos, trisacáridos y tetra sacáridos producidos. Para la síntesis de lactosa en operación alimentada por lotes se llevó a cabo con las mismas condiciones antes mencionadas pero en dos etapas llevadas a cabo en las siguientes condiciones: primero durante la operación de retro alimentación de 0.7 ml/ min de solución de lactosa al 50% (p/p) se alimentaron durante 120 minutos a 200 g de mezcla de reacción inicial de fructosa al 50% y segundo se llevó a cabo una etapa de carga final durante las 5 h siguientes.

En los resultados se evaluó el efecto de enzima/ sustrato y fructosa/ lactosa sobre la reacción en lotes de lactulosa, se arrojaron resultados que muestran el efecto de ambas variables en la síntesis de lactulosa y transgalactosilación de oligosacáridos (TOS). Como se ha visto, el factor enzima/ sustrato no afectó los perfiles de síntesis de lactulosa y TOS producidos, mientras que la relación fructosa/ lactosa tuvo un fuerte impacto, lo que coincide con los informes anteriores en los que esta variable fue la que determinó la selectividad de la reacción, permitiendo controlar la relación lactosa / TOS del producto manipulando.

En la retro alimentación o alimentación por lotes, la síntesis de lactulosa fue realizado en diferentes concentraciones de enzima/ sustrato, los resultados mostraron que el aumento en enzima/ sustrato de 100 UI_H/g a 400 UI_H/g produjo un aumento en la concentración de lactulosa y una disminución en la concentración de TOS. Sin embargo, las concentraciones de ambos disminuyeron a una concentración enzima/ sustrato de 800 UI_H/g o superior, ya que son probables las reacciones hidrolíticas que prevalecen sobre la transgalactosilación cuando la cantidad de enzima es mayor que la lactosa. Por lo tanto, la concentración óptima de enzima/ sustrato es de 100 a 200 UI_H/g, siendo esta la condición más favorable para la síntesis discontinua alimentada de lactulosa ya que las concentraciones más

altas de lactulosa y TOS fueron obtenidos en este intervalo. Con lo que concluyeron que la retroalimentación para la síntesis de lactulosa es una alternativa interesante para obtener mayores cantidades.

2 Materiales y Métodos

2.1 Diagrama general de proceso

2.1.1 Primera parte

Las muestras de lactosuero bovino y caprino se recolectaron en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) en Topilejo, Ciudad de México y posteriormente se trasladó al Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (FMVZ), en donde se llevó a cabo la homogeneización de las muestras y su posterior análisis. En la Figura 2.1 se muestra el diagrama general de proceso de la primera parte.

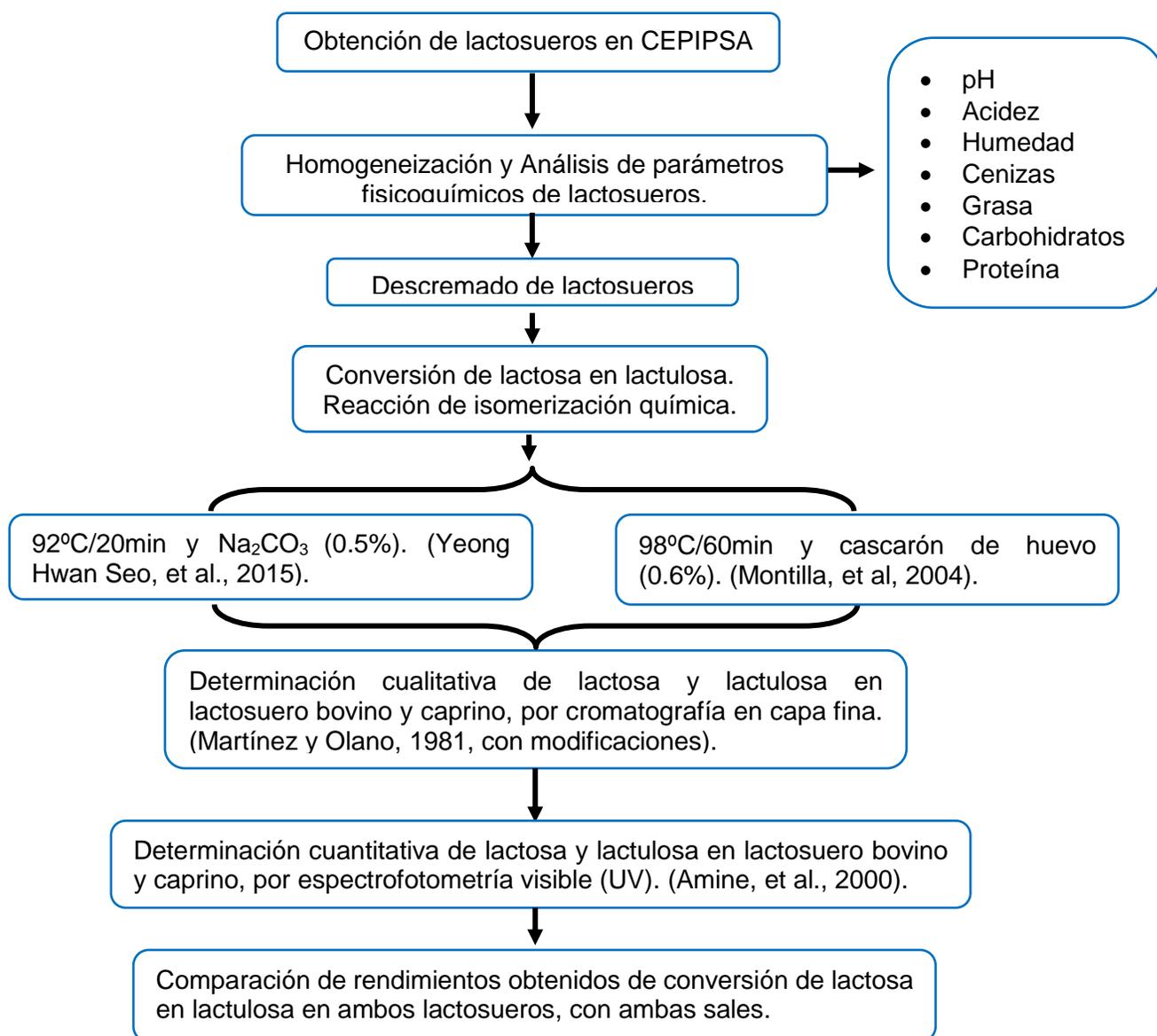


Figura 2.1. Diagrama general de proceso 1. Isomerización química de lactosa a lactulosa.

2.1.2 Segunda parte

Para la isomerización enzimática se partió de un lote diferente de lactosuero caprino recolectado nuevamente en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) en Topilejo, Ciudad de México. En la Figura 2.2 se muestra el diagrama general de los análisis realizados.

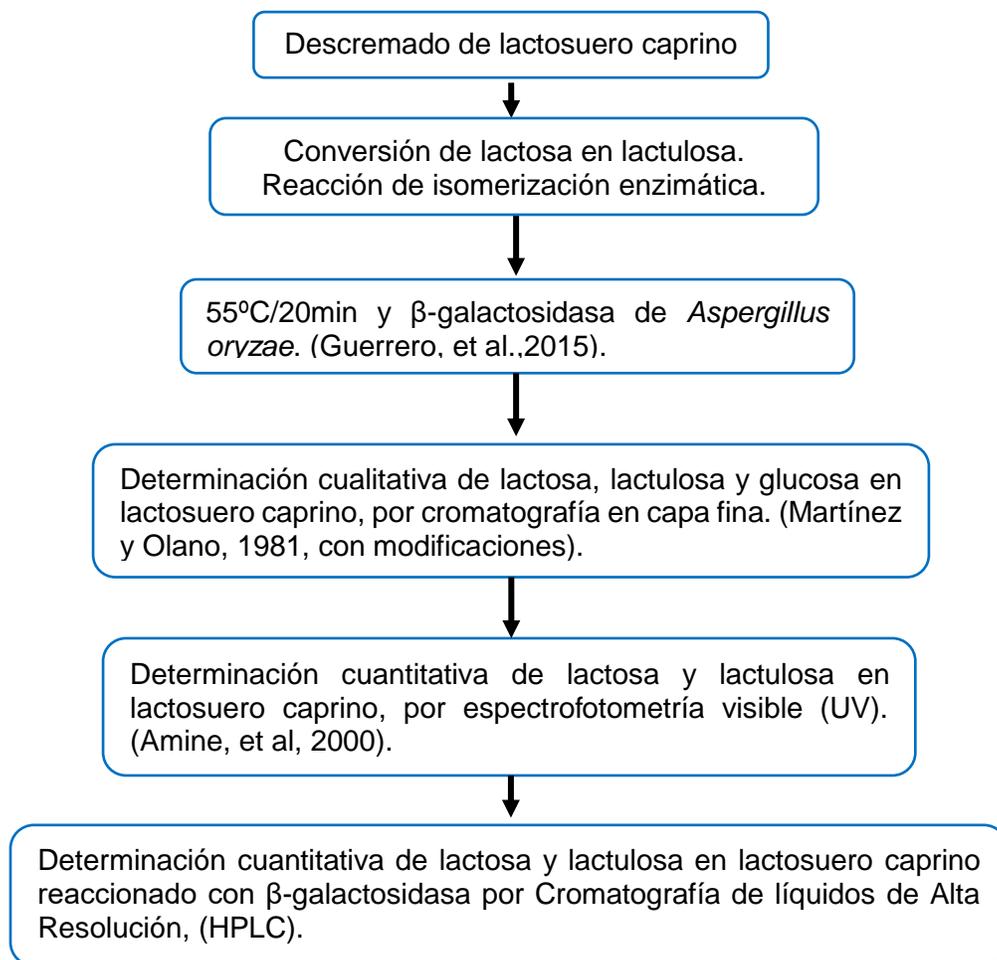


Figura 2.2. Diagrama general de proceso 2. Isomerización enzimática de lactosa a lactulosa.

2.1.3 Tercera Parte

Se determinó el contenido de lactosa y lactulosa en cuatro productos lácteos comerciales sometidos a diferentes tratamientos térmicos; leche pasteurizada,

ultrapasteurizada, evaporada y deshidratada, con el fin de determinar si el tratamiento térmico al que son sometidos promueve la isomerización de lactosa a lactulosa, en la Figura 2.3 se muestra el diagrama general al que se sometieron las muestras comerciales.

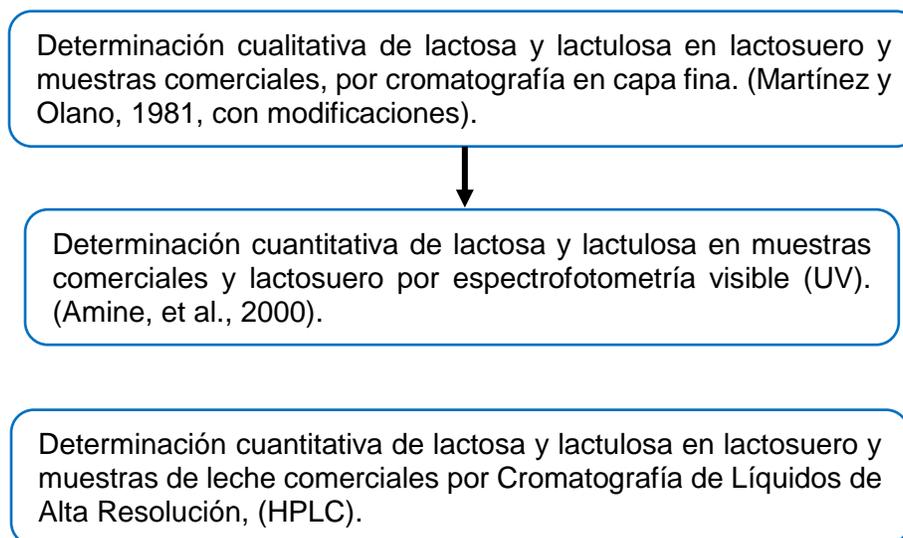


Figura 2.3. Diagrama general de proceso 3. Determinación de isomerización en leche por tratamientos térmicos.

2.2 Parámetros utilizados durante la caracterización de la materia prima.

En la Tabla 2.1 se muestra el análisis fisicoquímico del lactosuero dulce caprino y lactosuero dulce bovino.

Tabla 2.1. Métodos de cuantificación utilizados en el análisis fisicoquímico.

Determinación	Método para su cuantificación
Muestreo	Muestreo de leche y productos lácteos. AOAC 970.26
pH	Potenciómetro. NMX-F-317-S-1978
Acidez	Método volumétrico, titulación. AOAC 947.05
Humedad	Método AOAC 925.23
Cenizas totales	Método gravimétrico AOAC 945.46
Lípidos	Método de Gerber. NOM- 155, 2012
Carbohidratos	Método ácido dinitrosalicílico (DNS), (Southgate, 1991).
Proteína total	Método de Kjeldahl. AOAC 920.105

2.3 Conversión de lactosa en lactulosa. Reacción Química

2.3.1 Reacción de isomerización con carbonato de calcio (CaCO_3) (Montilla, et al., 2004).

1. Se calentaron 500 mL de lactosuero con 3 g (0.6%) de carbonato de calcio hasta ebullición (92°C en la Ciudad de México) con agitación cada 15 min.
2. Se mantuvo la temperatura durante 60 min, y se tomó una alícuota de 5 mL de lactosuero cada 15 min y se colocó en 5mL de etanol para precipitar las proteínas y se determinaron lactosa, lactulosa y glucosa de manera cualitativa con cromatografía en capa fina.
3. Se detuvo la reacción en un baño de agua fría y se almacenó el producto de la reacción en un frasco de plástico y se refrigeró hasta su uso.

2.3.2 Reacción de isomerización con carbonato de sodio (Na_2CO_3) (Yeong Hwan Seo, et al., 2015).

1. Se calentaron 500mL de lactosuero con 2.5 g (0.5%) de carbonato de sodio hasta 90°C con agitación cada 5 min.
2. Se mantuvo la temperatura durante 20 min, se tomó una alícuota de 5 mL de lactosuero cada 5 min y se colocó en 5mL de etanol para precipitar las proteínas y se determinaron lactosa, lactulosa y glucosa de manera cualitativa con cromatografía en capa fina.
3. Se detuvo la reacción en un baño de agua fría y se almacenó el producto de la reacción en un frasco de plástico y se refrigeró hasta su uso.

2.4 Conversión de lactosa en lactulosa. Reacción Enzimática.

2.4.1 Reacción de isomerización con β -galactosidasa proveniente de *Aspergillus oryzae*.

1. Se tomaron 25 mL de lactosuero descremado y se ajustó el pH a 4.5 con ácido láctico.
2. Se pesó 0.3144 g de β -galactosidasa proveniente de *Aspergillus oryzae*.
3. Se calentó el baño de agua a 55°C, se adiciono la enzima al lactosuero y se incubó por 20min.
4. Se tomaron alícuotas de 1 mL de lactosuero cada 5 min y se inactivó la enzima calentando en un baño de agua hirviendo por 3 min.

2.5 Determinación cualitativa de lactosa y lactulosa en lactosuero y leches comerciales, por cromatografía en capa fina (Martínez y Olano, 1981, con modificaciones)

1. Se eluyó la placa de silica gel de 7cm de largo y 4cm de ancho (Art. 5533, MERCK) con el ácido bórico, se secó en la estufa a 100°C, se aplicó una gota de 10 μ L de los estándares y muestras en la placa a 1 cm del borde y se secó con secadora de aire caliente.
2. Se preparó la cámara de elución con Acetonitrilo: Isopropanol: Agua (40:20:20), teniendo cuidado de que el nivel del eluyente no sobrepase el nivel de la muestra, se introduce la placa y se cierra la cámara.
3. Se eluyó la muestra 3 veces, teniendo cuidado en detener la elución a 1cm del borde superior y secando entre cada elución.
4. Se colocó la placa la campana de extracción para atomizar el revelador (1 g de difenilamina, 1mL anilina, 5mL de ácido fosfórico 85% y 50mL de acetona) en ella y se metió en la estufa durante 5-10 min.

5. Se observó la placa, notando las coloraciones, y se midió el Rf, tanto de los estándares como de las muestras.

2.6 Determinación cuantitativa de lactosa y lactulosa en lactosuero y leches comerciales, por espectrofotometría visible (UV-VIS)

1. Se agregó en cada tubo de ensayo; 2mL de reactivo de Seliwanoff (HCl 4M con 0.1% resorcinol), 1mL de estándar o muestra y 3mL de agua destilada con agitación.
2. Se incubaron los tubos a 90°C por 10 min y se enfriaron con agua de grifo.
3. Se filtró la muestra y se leyó a una longitud de 482nm, frente a un blanco de agua destilada.
4. Se realizó una curva de calibración con el estándar de lactulosa en las mismas condiciones con concentraciones de 10 a 100mg/mL, los resultados de las muestras se interpolaron con la curva de calibración para conocer su concentración.

2.7 Determinación cuantitativa de lactosa y lactulosa en lactosuero y leches comerciales, por HPLC con detector de Índice de Refracción.

2.7.1 Preparación de la curva de calibración para HPLC

- Para la curva de calibración de lactosa se tomaron 6 puntos (0.65, 4, 8, 12, 16 y 20) mg/mL disueltos en agua.
- Para la curva de calibración de lactulosa se tomaron 6 puntos (20, 40, 50, 60, 80 y 100) mg/mL disueltos en agua

2.7.2 Preparación de las muestras

1. Se tomaron 1.5mL de muestra y se agregaron 30 µL de solución de carrez I (ferrocianuro de potasio) y 30 µL de solución de carrez II (acetato de zinc).
2. Se centrifugaron las muestras a 12000 rpm a 4°C/30min.

3. Se filtró el sobrenadante en una membrana de 0.22µm.
4. Se inyectaron 5 µL de muestra en el cromatógrafo.

2.7.3 Condiciones del cromatógrafo

- ✓ Se utilizó una columna CTO-20^a, con detector de índice de refracción (RID 10A).
- ✓ La fase móvil utilizada fue de acetonitrilo : agua (75 : 25, v / v).
- ✓ El sistema utilizó un flujo de 1.1 mL/ min, una temperatura del horno de 30°C, un volumen de inyección de 5 µL, y un tiempo de funcionamiento de 20 min.
- ✓ La lactosa y la lactulosa se identificó por retención en el cromatógrafo y se cuantificaron por área de pico, basándose en la curva correspondiente.

2.8 Comparación de rendimientos obtenidos de conversión de lactosa en lactulosa entre lactosueros, entre sales y entre métodos.

1. Se realizó una comparación en los resultados obtenidos en la reacción cuantitativa con un análisis de varianza (ANOVA), para observar alguna diferencia significativa entre los lactosueros y entre las sales utilizadas.
2. Se realizó una comparación de los rendimientos obtenidos al comparar los valores de lactulosa obtenidos en la reacción cuantitativa con la cantidad de lactosa inicial con un análisis de varianza (ANOVA), para observar alguna diferencia significativa entre los lactosueros y entre las sales utilizadas.
3. Se realizó la comparación de los resultados obtenidos en los diferentes métodos y los diferentes rendimientos con un análisis de varianza (ANOVA), para determinar si existe diferencia significativa entre métodos.

3 Resultados y Análisis

3.1 Caracterización fisicoquímica de la materia prima.

Después de realizar el análisis fisicoquímico de los lactosueros se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Análisis fisicoquímico de los lactosueros Bovino y Caprino.

Parámetro	Lactosuero Bovino	Lactosuero Caprino
pH	7.05 ^b ± 0.03	6.83 ^a ± 0.02
Acidez (g de Ácido Láctico/100mL de muestra)	0.10 ^a ± 0.00	0.12 ^b ± 0.00
Humedad (%)	92.74 ^a ± 0.04	92.79 ^a ± 0.05
Cenizas (%)	0.39 ^a ± 0.01	0.47 ^a ± 0.02
Grasa (%)	0.90 ^a ± 0.00	0.90 ^a ± 0.00
Lactosa (g/100mL)	4.51 ^a ± 0.01	4.56 ^a ± 0.01
Proteína (%) (Factor 6.25)	0.97 ^a ± 0.01	1.06 ^b ± 0.01

Los resultados corresponden a las medias de las determinaciones por triplicado ± la desviación estándar, C.V < 5%.

Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre la composición de los lactosueros.

Se realizó un análisis de varianza, en cada parámetro, para comprobar si existe diferencia significativa en la composición de los lactosueros, no encontrándose diferencia en la humedad, cenizas, grasa y cantidad de lactosa, pero si en el pH, la acidez y cantidad de proteína. La diferencia en el pH y la acidez pudo deberse a que son muestras provenientes de diferentes leches que elaboraron diferentes tipos de queso y por lo tanto el tratamiento al que fueron sometidos fue distinto, y en cuanto a la cantidad de proteína, está comprobado que el lactosuero caprino contiene mayor cantidad que el lactosuero bovino como se puede observar en la Tabla 1.1.

Sin embargo para realizar la isomerización, el sustrato necesario es la lactosa, y al no presentar una diferencia significativa entre los lactosueros, se puede decir que la materia prima de la que se partirá es similar.

3.2 Conversión de lactosa a lactulosa

Se llevó a cabo la conversión a lactulosa con carbonato de calcio (CaCO_3) y carbonato de sodio (Na_2CO_3), de acuerdo con las metodologías reportadas en el punto 2.8, tomando un volumen inicial de 300mL de cada lactosuero para cada sal y se tomaron las concentraciones de las sales, tiempos y temperaturas óptimas reportados por Montilla, *et al.*, (2004) y Yeong Hwan Seo, *et al.*, (2015) para una isomerización con menos productos secundarios.

Tabla 3.2. pH de lactosueros bovino y caprino después de agregar Na_2CO_3 y CaCO_3

	Lactosuero Bovino		Lactosuero Caprino	
	Na_2CO_3	CaCO_3	Na_2CO_3	CaCO_3
pH	10.16 ^b ± 0.01	7.30 ^a ± 0.01	10.05 ^β ± 0.01	6.99 ^α ± 0.02

Los resultados corresponden a las medias de las determinaciones por duplicado ± la desviación estándar, C.V < 5%.

*Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre el pH de los lactosueros con las diferentes sales.

Como se observa en la Tabla 3.2. los pH son diferentes significativamente en todos los tratamientos, es decir, entre sales en un lactosuero y entre lactosueros con una sal, lo que indica que al añadir la misma concentración de una sal en ambos lactosueros, no es garantía de que el pH se ajuste a un mismo valor, esto debido al pka que presenta cada sal, siendo para el carbonato de sodio de 10.33 y para el carbonato de calcio 8.06, además de que el pH y la acidez inicial que presentó cada lactosuero fue distinta.

3.3 Determinación cualitativa de lactosa y lactulosa en lactosuero

Se realizó la determinación cualitativa por cromatografía en capa fina para observar la formación de lactulosa y la disminución de lactosa presente en diferentes tiempos de la reacción, basados en la metodología anteriormente descrita de Martínez y Olano, (1981) con modificaciones. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4.

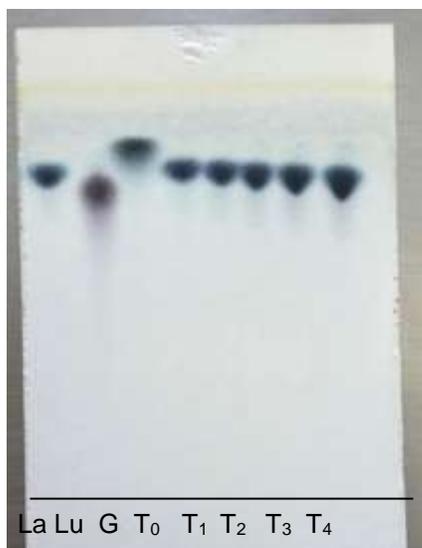


Figura 3.1. CCF Lactosero bovino con CaCO_3

Adsorbente: sílica gel- ácido bórico; solvente Acetonitrilio:Ispopropanol:Agua, 40:20:20

La=lactosa, Lu=lactulosa, G=glucosa, T₀= Lactosero sin calentamiento, T₁= 15min, T₂= 30min, T₃= 45min y T₄= 60min



Figura 3.2. CCF Lactosero bovino con Na_2CO_3

Adsorbente: sílica gel- ácido bórico; solvente Acetonitrilio:Ispopropanol:Agua, 40:20:20

La=lactosa, Lu=lactulosa, G=glucosa, T₀= Lactosero sin calentamiento, T₁= 5min, T₂= 10min, T₃= 15min y T₄= 20min.

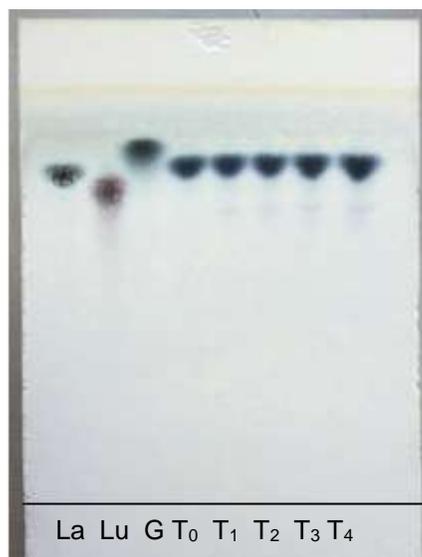


Figura 3.3. CCF Lactosero caprino con CaCO_3

Adsorbente: sílica gel- ácido bórico; solvente Acetonitrilio:Ispopropanol:Agua, 40:20:20

La=lactosa, Lu=lactulosa, G=glucosa, T₀= Lactosero sin calentamiento, T₁= 15min, T₂= 30min, T₃= 45min y T₄= 60min.



Figura 3.4. CCF Lactosero caprino con Na_2CO_3

Adsorbente: sílica gel- ácido bórico; solvente Acetonitrilio:Ispopropanol:Agua, 40:20:20

La=lactosa, Lu=lactulosa, G=glucosa, T₀= Lactosero sin calentamiento, T₁=5min, T₂= 10min, T₃= 15min y T₄= 20min.

Tabla 3.3. Valores de Rf de los estándares obtenidos por CCF.

Estándar	Rf medido	Coloración
Lactosa	0.83	Azul marino
Lactulosa	0.79	Morado
Glucosa	0.87	Gris intenso

Se observa en las Figuras 3.2 y 3.4 el tratamiento térmico con carbonato de sodio en ambos lactosueros, donde se midió el valor de Rf de los estándares (Tabla 3.3), la intensidad de la señal de lactulosa en ambos presenta un aumento en función del tiempo de reacción, mientras que la intensidad de la señal en la lactosa presenta una disminución. En el lactosuero bovino (Figura 3.2) se encuentra la señal de glucosa, que aumenta de intensidad conforme se lleva a cabo la reacción hasta el tiempo 4, mientras que en el lactosuero caprino (Figura 3.4) no se observa esta señal, indicando posiblemente que en el lactosuero bovino se está llevando a cabo una hidrólisis de la lactosa además de la isomerización. La isomerización de la lactosa con esta sal no se lleva a cabo por completo, además de que se obtienen subproductos no deseados como lo es la glucosa.

El tratamiento con carbonato de calcio como catalizador en ambos lactosueros (Figuras 3.1 y 3.3), presentan de igual manera los Rf de los estándares, sin embargo, en la muestra solo se observa presente la señal de la lactosa, que no sufre ningún cambio en función del tiempo, con lo que se puede decir que no se está llevando a cabo la isomerización al no observar la señal de lactulosa y tampoco la hidrólisis de lactosa al no presentar la señal de glucosa.

3.4 Determinación cuantitativa de lactulosa

Se determinó cuantitativamente la lactulosa (Amine, *et al.*, 2000) presente en la muestra por Espectrofotometría UV-VIS, obteniendo la curva de calibración de lactulosa (Figura 3.6), basada en la reacción de Seliwanoff mostrada en la Figura 3.5, que usualmente se utiliza para detectar las cetosas presentes en una muestra

La Figura 3.7 presenta la cantidad de cetonas medidas en lactosuero bovino y en el lactosuero caprino, expresado como lactulosa en las muestras.

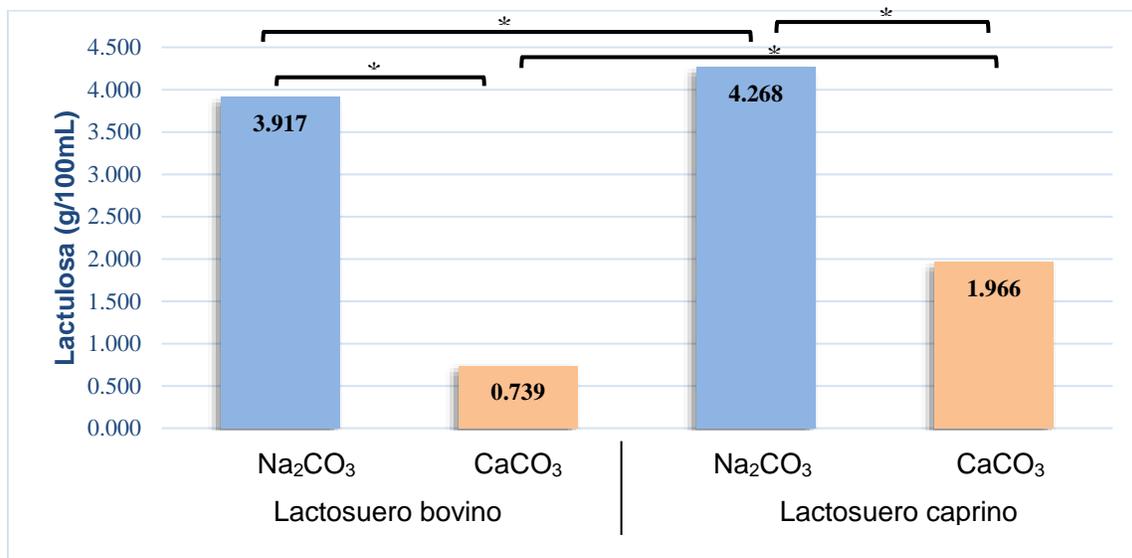


Figura 3.7. Comparación del contenido de lactulosa en lactosuero bovino y caprino después de la reacción de isomerización (g/100 mL).

Los resultados con diferencia significativa entre sí, están agrupados y representados en la tabla con un *

Se realizó un análisis de varianza de los resultados obtenidos con las dos sales en ambos lactosueros, donde se observó una diferencia significativa entre todas las variables, la menor cantidad de lactulosa obtenida fue en el tratamiento con carbonato de calcio, en especial con el lactosuero bovino. Mientras que en la reacción de isomerización con carbonato de sodio, en ambos lactosueros presentó resultados elevados, que al comparar con la cantidad inicial de lactosa (4.510 ± 0.006)g/100mL en bovino y ($4.556a \pm 0.009$)g/100mL en caprino, se asemejan sin rebasar estos valores; cabe mencionar que la reacción con esta sal presentó una coloración caramelo indeseable, que se debió a las condiciones empleadas para la isomerización ($90^{\circ}\text{C}/20\text{min}$ en medio alcalino), pues estas son óptimas para propiciar la reacción de Maillard entre las proteínas y la lactosa presentes en el lactosuero, dando como resultado un compuesto colorido denominado Hidroximetilfurfural (HMF), esto se menciona debido a la importancia que tiene la

interferencia del HMF en la cuantificación de lactulosa, al ser un intermediario en la reacción de Seliwanoff para la determinación de cetosas, como se muestra en la Figura 3.5, lo que afectó los valores obtenidos.

3.5 Comparación de rendimientos obtenidos.

En la Tabla 3.4 se observa la comparación entre los rendimientos obtenidos con las dos sales en ambos lactosueros, esto se calculó tomando en cuenta la cantidad inicial de lactosa presentada en cada lactosuero como el cien por ciento, para saber qué porcentaje representa la cantidad de lactulosa obtenida cuantitativamente mediante Espectrofotometría UV-VIS.

Tabla 3.4. Comparación de los rendimientos obtenidos para los diferentes lactosueros, así como las sales empleadas.

	Lactosuero Bovino		Lactosuero Caprino	
	Na ₂ CO ₃	CaCO ₃	Na ₂ CO ₃	CaCO ₃
Rendimiento (%)	86.85 ^b ± 0.27	16.39 ^a ± 0.09	93.67 ^β ± 0.45	43.15 ^α ± 0.18

Los resultados corresponden a las medias de las determinaciones por duplicado ± la desviación estándar, C.V < 5%.

*Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) en el rendimiento entre lactosueros y entre sales empleadas.

La sal que obtuvo mayores rendimientos fue el carbonato de sodio en ambos lactosueros, esto debido a que su pka es mayor que el pka del carbonato de calcio por lo que en medios más alcalinos la isomerización es más eficiente y el lactosuero que presentó un mayor rendimiento con ambas sales fue el caprino. Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se seleccionó el lactosuero caprino con carbonato de sodio a pesar de los compuestos secundarios que se pueden generar para realizar los experimentos posteriores.

3.6 Determinación cualitativa y cuantitativa de lactulosa y lactosa en lactosuero caprino con carbonato de sodio (Na_2CO_3)

Se realizó la isomerización de lactosuero caprino con carbonato de sodio, debido a que el tiempo de almacenamiento del lactosuero puede generar una disminución en la cantidad de lactosa inicial, por lo que se realizaron las pruebas cualitativas y cuantitativas nuevamente, integrándose en este último además de la determinación por Espectrofotometría UV-VIS, la determinación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detector de Índice de Refracción (HPLC-IR) para comparar los resultados obtenidos en los métodos cuantitativos.

Se optó por comparar en todas las metodologías el lactosuero sin reacción y el lactosuero con la reacción, además de dos controles; uno de solución de lactosa al 5% y otro de solución de lactosa al 5% con reacción, para lograr de verificar si los componentes extras del lactosuero (proteínas y trazas de grasa) afectan a la isomerización química.



Figura 3.8. CCF Lactosuero caprino con Na_2CO_3

Adsorbente: sílica gel- ácido bórico; solvente Acetonitrilio:Ispopropanol:Agua, 40:20:20
La=lactosa, Lu=lactulosa, G=glucosa, T₀= Lactosuero sin calentamiento, T₁= 5min, T₂= 10min, T₃= 15min y T₄= 20min.



Figura 3.9 CCF control de lactosa con Na_2CO_3

Adsorbente: sílica gel- ácido bórico; solvente Acetonitrilio:Ispopropanol:Agua, 40:20:20
La=lactosa, Lu=lactulosa, G=glucosa, T₁=tiempo a los 5min, T₂= tiempo a 10min, T₃= 15min y T₄= 20min.

En cuanto a los resultados obtenidos en la cromatografía en capa fina se observó en las Figuras 3.8 y 3.9 las señales de lactosa y lactulosa con un Rf en las muestras similar al de los controles y la coloración correspondiente a cada uno de los estándares; lactosa, lactulosa y glucosa, lo que se observó adicional en el lactosuero caprino y cabe resaltar es la presencia de una tercera señal muy tenue de color naranja, que podría corresponder a la señal de galactosa.

Se cuantificó por de Espectrofotometría UV-VIS mediante el método de DNS, el total de azúcares reductores que debería corresponder a la cantidad de lactosa, tanto en el lactosuero sin reaccionar como en el lactosuero después de la reacción, adicionalmente en los controles con el propósito de comparar la cantidad y el porcentaje correspondiente de lactosa que probablemente se isomerizó a lactulosa, los resultados se muestran en la Tabla 3.5

Tabla 3.5. Proporción de azúcares reductores (en gramos y porcentaje) del lactosuero caprino con y sin carbonato de sodio, además de su comparación frente a los controles.

Muestra	g Azúcares reductores*/ 100 mL de muestra	g Azúcares reductores perdida**/100mL	Porcentaje de disminución
Solución de lactosa al 5%	4.72 ^b ± 0.02	1.78	37.63%
Solución de lactosa al 5% con reacción	2.94 ^a ± 0.10		
Lactosuero caprino	4.13 ^a ± 0.06	-2.94	-71.19%
Lactosuero caprino con Na₂CO₃	7.07 ^b ± 0.07		

Los resultados corresponden a las medias de las determinaciones por triplicado ± la desviación estándar, C.V < 5%.

Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre la cantidad de lactosa, antes y después de reaccionar, tanto en el lactosuero como en los controles.

*Azucres reductores tomado como gramos de lactosa para este trabajo.

**Referido a los gramos de lactosa que posiblemente se isomerizaron a lactulosa.

Lo primero que se puede destacar de estos resultados (ver Tabla 3.5) es que la cantidad de lactosa en el lactosuero caprino antes de reaccionar es menor a la obtenida en las pruebas anteriores, esto debido a que se partió de un lote diferente de lactosuero caprino con una cantidad de lactosa similar; lo segundo que se observó es que existe una diferencia significativa entre la solución de lactosa al 5% y el lactosuero, tanto en la cantidad de azúcares reductores antes de la reacción, como después de la reacción, esto ya que el control fue ajustado a un 5% inicial de lactosa tomando en cuenta la cantidad que se reportó anteriormente, lo que se manifiesta en estos resultados es que en el caso de la solución de lactosa al 5% presenta una disminución del 37.63% respecto al contenido inicial de lactosa después de la reacción con carbonato de sodio, por lo que se puede decir que esta pérdida corresponde a la cantidad de lactulosa posiblemente formada, sin embargo en el lactosuero caprino no se observa una disminución, el contenido de lactosa aumenta, este resultado se vio alterado al presentarse una coloración café en el lactosuero caprino después de la reacción, por lo que no se logró cuantificar mediante este método el porcentaje de disminución de azúcares reductores.

Se procedió a medir la cantidad de lactulosa por Espectrofotometría UV-VIS mediante el método de Seliwanoff para comprobar si el porcentaje de disminución de azúcares reductores en la solución de lactosa al 5% corresponde a la cantidad de lactulosa isomerizada, mostrándose los resultados en la Tabla 3.6, para los cálculos se tomaron como blancos; en la muestra el lactosuero caprino sin reaccionar y para la solución de lactosa al 5% con reacción, la solución de lactosa sin reaccionar.

Tabla 3.6. Cuantificación de lactulosa por la reacción de Seliwanoff para lactosuero caprino y solución de lactosa al 5%.

Muestra	g Lactulosa/ 100 mL de muestra	g Lactulosa real/ 100 mL de muestra	Porcentaje de lactulosa obtenido
Solución de lactosa al 5% **	0.39 ± 0.00	3.90 ^d	82.63%
Solución de lactosa al 5% con reacción	4.28 ^b ± 0.01		
Lactosuero caprino**	1.01 ± 0.00	2.69 ^c	65.13%
Lactosuero caprino con Na₂CO₃	3.70 ^a ± 0.03		

Los resultados corresponden a las medias de las determinaciones por triplicado ± la desviación estándar, C.V < 5%.

Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre la cantidad de lactulosa entre el control y el lactosuero caprino, y la cantidad real de lactulosa obtenida.

**El resultado obtenido en estas muestras se le resta al resultado de las muestras reaccionadas.

Lo que se observa en la Tabla 3.6. es que tanto en la solución de lactosa al 5% con reacción, como en el lactosuero caprino con reacción existe una diferencia significativa y se determinó una cantidad de lactulosa que no corresponde a lo obtenido en la Tabla 3.5 de azúcares reductores perdidos, que se observa mejor en el porcentaje de lactulosa que es de 82.63%; en cambio el porcentaje de azúcares reductores perdidos fue de 37.63% en la solución de lactosa al 5% y no se pueden comparar los resultados obtenidos en el lactosuero caprino con reacción debido a que no se lograron determinar los azúcares reductores. La reacción de Seliwanoff es una determinación delicada en la que pueden llegar a existir falsos positivos, incluso un aldehído puede dar positivo si se prolonga la fase de deshidratación con HCl por más de 15min, dando paso a la formación de 5-Hidroximetilfurfural (HMF) para la posterior condensación con el resorcinol para dar una coloración rojo oscuro (Ocampo, *et al.*,2008), los resultados se cuantifican a través de una reacción colorimétrica de las muestras, y en el caso del lactosuero caprino con reacción se

dio una coloración previa a la cuantificación de Seliwanoff, por lo que se decidió hacer la determinación con cromatografía de líquidos (HPLC) para obtener un resultado real de los parámetros requeridos de las muestras y poder determinarlos de una manera más confiable.

En la determinación por HPLC-IR se obtuvieron los siguientes resultados después de hacer los cálculos correspondientes de acuerdo a las áreas en los picos obtenidos, estos resultados se calcularon con dos curvas patrón una de lactosa con una regresión lineal de 0.998 (Figura 3.10) y otra de lactulosa con una regresión lineal de 0.999 (Figura 3.11).

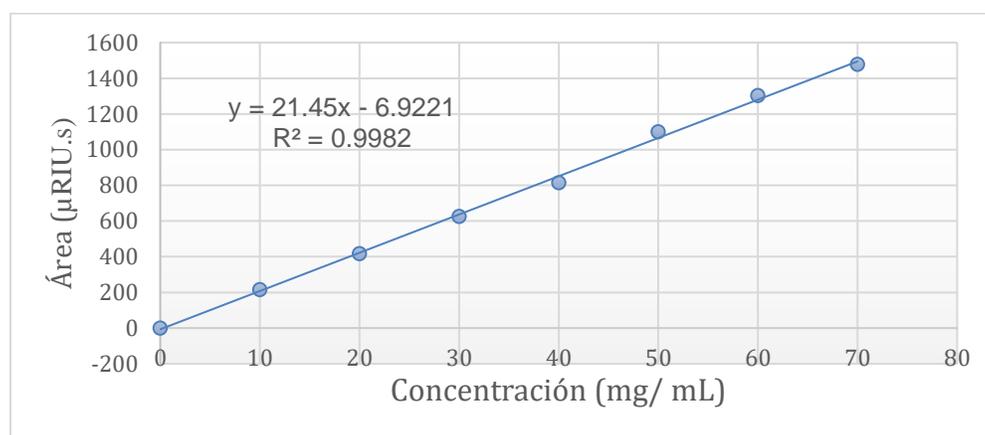


Figura 3.10. Curva de calibración de lactosa por HPLC-IR

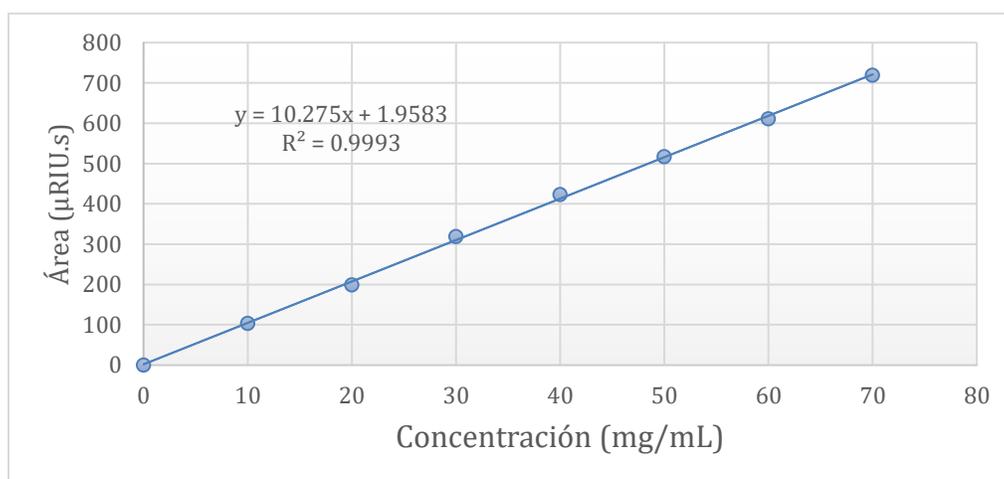


Figura 3.11. Curva de calibración de lactulosa por HPLC-IR

En las Figuras 3.12, 3.13, 3.14, 3.15 y 3.16 se muestran ejemplos de los cromatogramas obtenidos al realizar la cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-IR), donde se identifican las señales emitidas.

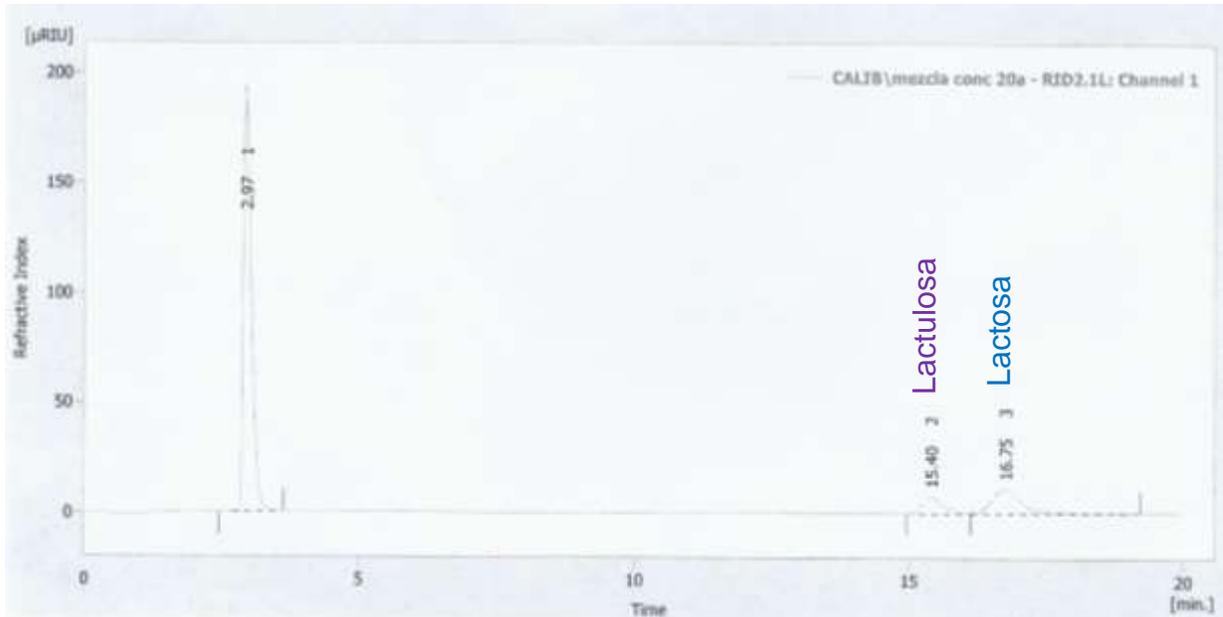


Figura 3.12. Cromatograma de los controles utilizados para realizar las curvas de calibración, donde se muestran las señales de lactosa y lactulosa a una concentración de 20mg/mL.

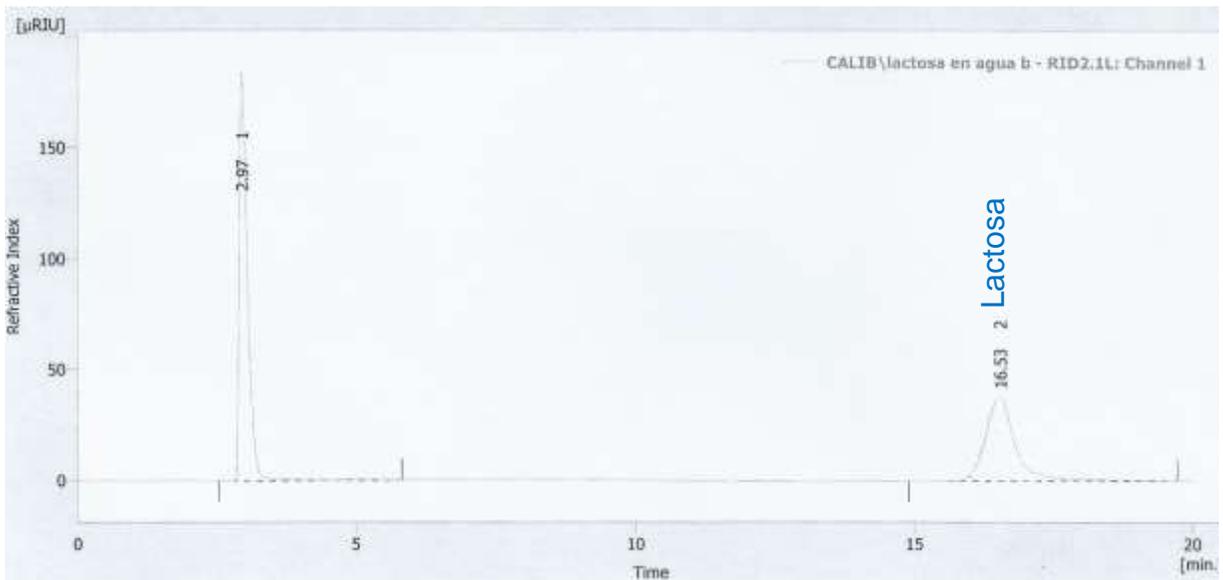


Figura 3.13. Cromatograma de solución de lactosa al 5%, donde se muestra la señal de lactosa.

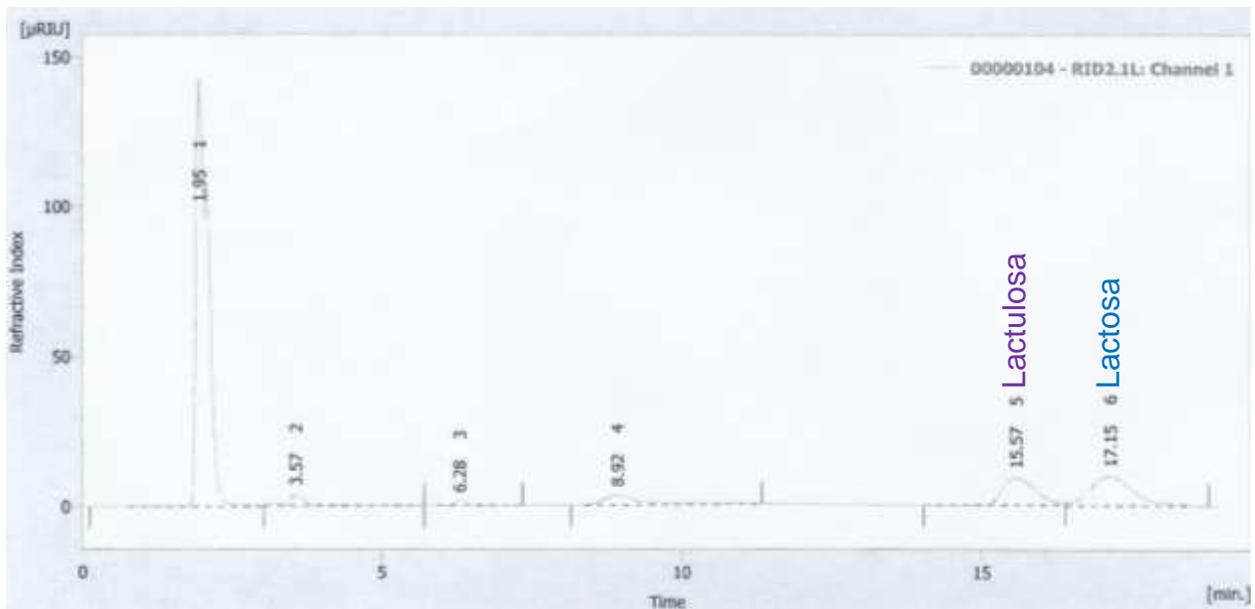


Figura 3.14. Cromatograma de solución de lactosa al 5% después de la reacción de isomerización química con carbonato de sodio.

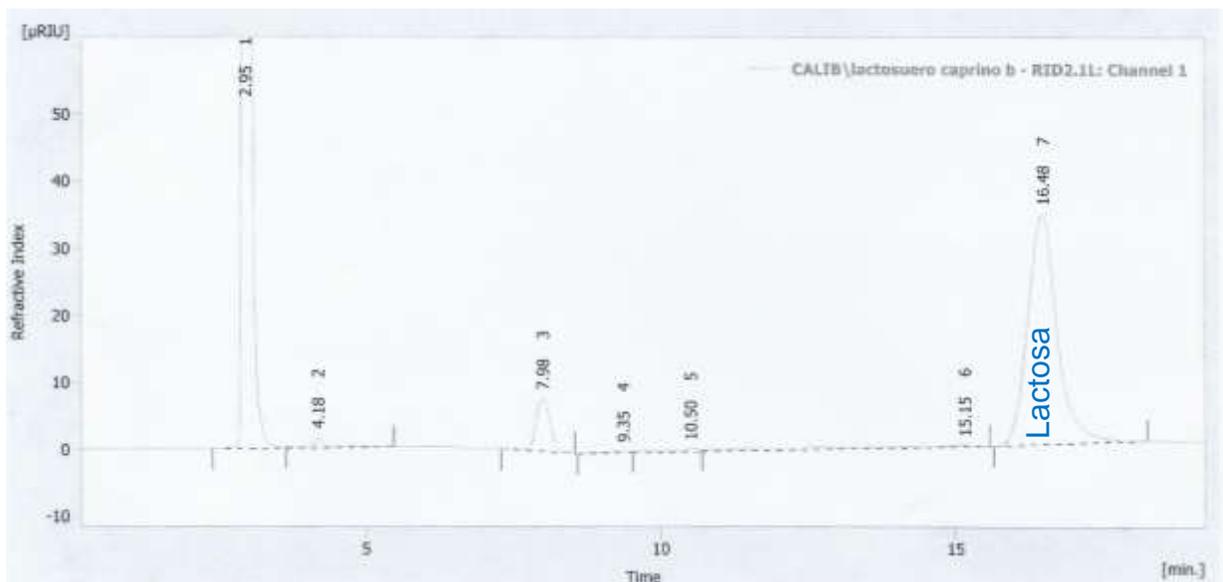


Figura 3.15. Cromatograma del lactosuero caprino sin reacción, donde se muestra la señal de lactosa.

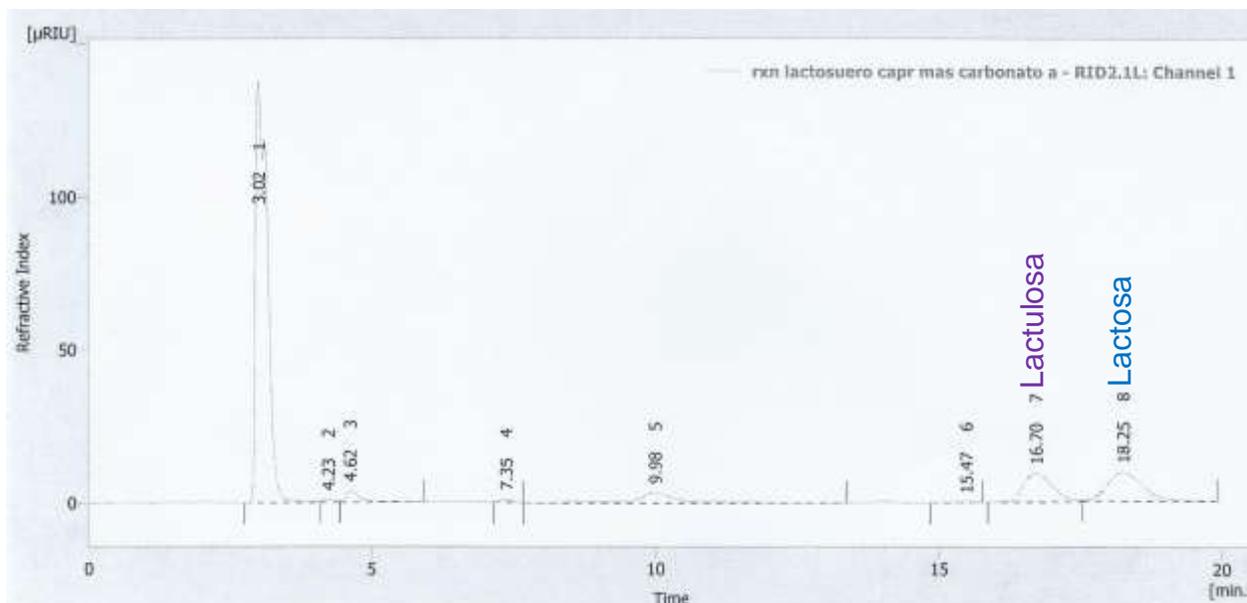


Figura 3.16. Cromatograma del lactosuero caprino después de la reacción de isomerización química con carbonato de sodio.

Tabla 3.7. Cuantificación de lactosa obtenidos por HPLC.

Muestra	g Lactosa/ 100 mL de muestra	g Lactosa perdida**/ 100 mL de muestra	Porcentaje de disminución de lactosa.
Solución de lactosa al 5%	5.73 ^a ± 0.07	3.40 ^d	59.34%
Solución de lactosa al 5% con reacción	2.33 ^c ± 0.02		
Lactosuero caprino	5.65 ^a ± 0.05	3.53 ^d	62.48%
Lactosuero caprino con reacción	2.12 ^b ± 0.00		

Los resultados corresponden a las medias de las determinaciones por duplicado ± la desviación estándar, C.V < 5%.

Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre la cantidad de lactosa inicial y la cantidad de lactosa perdida en la muestra.

** Referido a los gramos de lactosa que posiblemente se isomerizaron a lactulosa, calculados a partir de la diferencia de la lactosa en las muestras sin reacción con la lactosa en las muestras con reacción.

Lo que se observa en la Tabla 3.7. es que no existe diferencia significativa de cantidad de lactosa entre la solución de lactosa al 5% y el lactosuero caprino, pero existe una diferencia significativa en la cantidad de lactosa remanente en el lactosuero caprino con reacción y la solución de lactosa al 5% con reacción, sin embargo al realizar el cálculo de la lactosa perdida tanto en el control como en el lactosuero se puede observar que no existe diferencia, por lo que se puede decir que los componentes extras del lactosuero como son las proteínas del lactosuero y la poca cantidad remanente de grasa, no afectan a la lactosa que puede reaccionar para propiciar la isomerización.

La cuantificación de lactulosa se realizó en las muestras del lactosuero caprino sin reacción y con reacción, así como en la solución de lactosa al 5% con y sin reacción, sin embargo como se muestra en las Figuras 3.13 y 3.15 no existe la señal de lactulosa en las muestras que no se sometieron a una reacción de isomerización.

Tabla 3.8. Cuantificación de lactulosa por medio de HPLC-IR.

Muestra	g Lactulosa/ 100 mL de muestra	Porcentaje de lactulosa obtenido*	Porcentaje de muestra total** medido
Control con reacción	3.23 ^a ± 0.02	56.37% ^a	97.03%
Lactosuero caprino con Na₂CO₃	3.25 ^a ± 0.04	57.52% ^a	95.04%

Los resultados corresponden a las medias de las determinaciones por duplicado ± la desviación estándar, C.V < 5%.

Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre la cantidad de lactulosa entre el control y el lactosuero caprino, y la cantidad real de lactulosa obtenida.

*Calculado tomando en cuenta la lactosa inicial como el 100 % y corresponde al porcentaje de isomerización.

**Calculado tomando en cuenta la lactosa en las muestras sin reacción como el 100%, la cantidad de lactosa en el lactosuero con reacción como el 40.66% y el 37.52% en la solución de lactosa al 5% con reacción.

Los resultados reportados en la Tabla 3.8 de porcentaje de isomerización, no corresponden a las cantidades de lactosa perdida (posiblemente isomerizada) reportados en la Tabla 3.7 para el lactosuero caprino y para la solución de lactosa al 5%, que son mayores, por lo que se presume que el porcentaje de disminución de lactosa corresponde al porcentaje de lactulosa obtenido aunque no en su totalidad, pues el restante de los compuestos secundarios en el caso del lactosuero caprino sin reacción y estos se observan en la Figura 3.15 que podrían corresponder a glucosa y galactosa por una hidrólisis ocurrida antes de la reacción, que como se observa en la Figura 3.16 disminuyen reaccionando para formar lactulosa, sin embargo quedan remanentes, en la solución de lactosa al 5% solamente se observaron compuestos secundarios en la Figura 3.14 que corresponde a la muestra después de la reacción, que de igual manera podrían corresponder a glucosa y galactosa.

No se determinó el 100% de lactosa en el lactosuero caprino, lo que es normal al tratarse de una cuantificación experimental y esto se le puede atribuir a la interacción que hubo entre las proteínas del lactosuero con esa pequeña fracción de lactosa y a la elevada temperatura que se utilizó para la isomerización, lo que ocasionó una deshidratación en el carbohidrato o a que se presentó una coloración café oscuro, sospechándose de la presencia de HMF en la muestra.

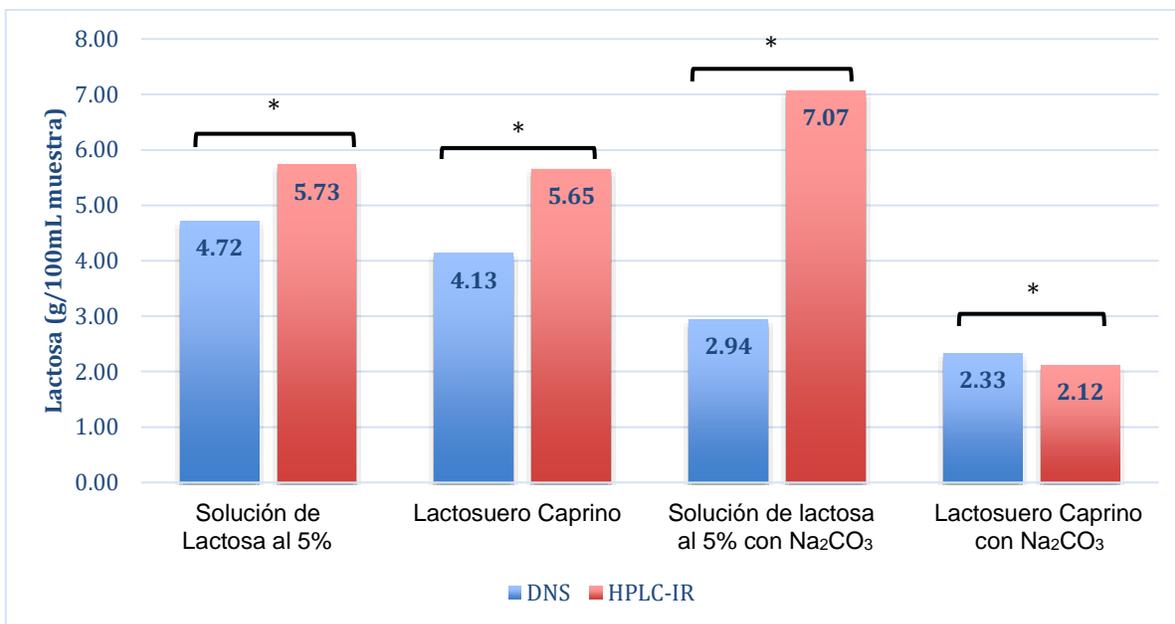


Figura 3.17. Comparación de la cuantificación de lactosa entre el método DNS de Espectrofotometría UV-VIS y el método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución HPLC-IR.

Los resultados con diferencia significativa entre sí, están agrupados y representados en la tabla con un *

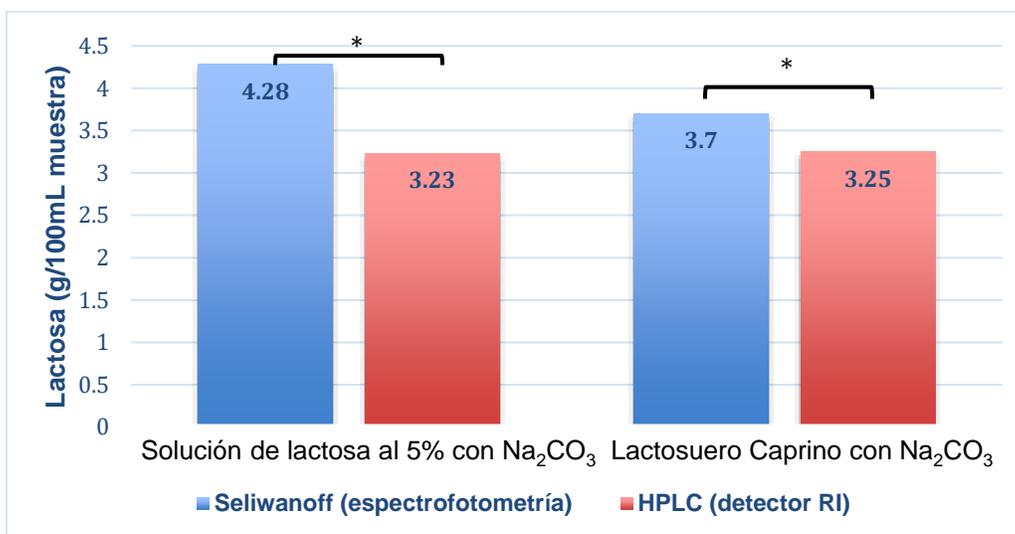


Figura 3.18. Comparación en la cuantificación de lactulosa entre el método Seliwanoff de Espectrofotometría UV-VIS y el método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución HPLC-IR.

Los resultados con diferencia significativa entre sí, están agrupados y representados en la tabla con un *

Al compararse el método de espectrofotometría UV-VIS (DNS y Seliwanoff) con el método de HPLC, se determinó como se muestra en las Figuras 3.17 y 3.18 que existe diferencia significativa en todas las determinaciones entre métodos, debido a que la coloración en la muestra de lactosuero caprino presenta una interferencia en los resultados, como se sabe el método más exacto para medir carbohidratos en muestras complejas es el HPLC-IR, debido a que es un método más sensible que arroja resultados más confiables, por lo que los datos que se tomaron para reportar los rendimientos fueron los obtenidos en esta metodología.

3.7 Obtención de lactulosa por isomerización enzimática con β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*.

Se confirmó que no existe un buen rendimiento en la isomerización de lactosa a lactulosa en el método químico, ya que el rendimiento que se obtuvo es de 57.52%; por ello se decidió probar con la isomerización enzimática en el lactosuero caprino con β -galactosidasa proveniente de *Aspergillus oryzae* debido a que existen antecedentes científicos en los que se demostró una mayor isomerización con esta enzima en comparación con otras; sin embargo no hay que perder de vista que este tipo de enzimas son utilizadas principalmente para realizar una hidrólisis de carbohidratos, pero se pretende reafirmar los resultados reportados (Guerrero, *et al.*, 2015).

En el caso particular de esta metodología se optó por no utilizar una solución de lactosa al 5% como control debido a que como se sabe las enzimas requieren cofactores que les ayuden a realizar su función, en el caso de esta enzima son Na^{1+} y Mg^{2+} (Juers, *et al.*, 2012) que se encuentran naturalmente en el lactosuero caprino, además de que el sustrato de esta enzima es la lactosa. Los resultados se obtuvieron tomando el lactosuero caprino como blanco de reacción.

Inicialmente se realizó un análisis cualitativo utilizando la cromatografía en capa fina, de la cual se tomaron alícuotas a diferentes tiempos con el fin de observar en la placa como fue actuando la enzima y si había un tiempo en el que se encontrara un límite a la isomerización o a la hidrólisis de lactosa en el lactosuero.

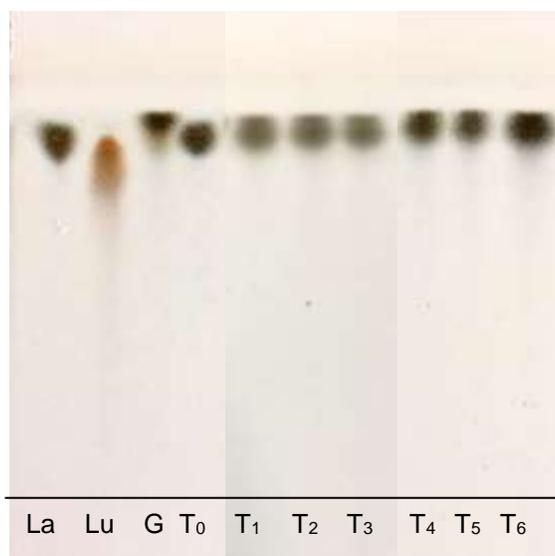


Figura 3.19. CCF Lactosuero caprino con B-galactosidasa

Adsorbente: sílica gel- ácido bórico; solvente
Acetonitrilo:Isoopropanol:Agua, 40:20:20

**La=lactosa, Lu=lactulosa, G=glucosa, T₀= Lactosuero sin enzima,
T₁= 5min, T₂= 10min, T₃= 15min, T₄= 20min, T₅= 25min y T₆=30min.**

Como se observa en la Figura 3.19, únicamente hay presencia de lactosa en el tiempo cero, después de este tiempo se nota la presencia de la señal de glucosa, indicando que desde el inicio de la reacción existe hidrólisis de lactosa y a pesar de que la señal de lactosa prevalece hasta el tiempo 3, después de este ya no se observa la separación de la lactosa y la glucosa, además de que no existe señal de lactulosa en ningún tiempo, por lo que se concluyó que no hay isomerización con esta enzima, al igual que se observó que la señal de glucosa va incrementando su intensidad hasta el tiempo 6 donde se detuvo la reacción al cumplirse el tiempo reportado para una óptima isomerización (Guerrero, *et al.*, 2015).

Tabla 3.9. Cuantificación de lactosa por el método de DNS en lactosuero caprino con y sin β -galactosidasa.

Muestra	g Azúcares reductores/ 100 mL de muestra	g Azúcares reductores perdidos**/ 100mL de muestra	Porcentaje de azúcares reductores
Lactosuero caprino	3.47 ^a \pm 0.07	-1.47	142%
Lactosuero caprino con β-galactosidasa	4.94 ^b \pm 0.04		

Los resultados corresponden a las medias de las determinaciones por triplicado \pm la desviación estándar, C.V < 5%.

Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre los resultados de lactosa obtenidos entre el lactosuero sin enzima y con enzima.

** Referido a los gramos de azúcares reductores que posiblemente se isomerizaron a lactulosa.

Como se observa en la Tabla 3.9, en primer lugar la cantidad de azúcares reductores en lactosuero caprino sufrió una disminución de lactosa inicial, esto debido al tiempo de almacenamiento en congelación lo que provocó que una parte de éstos se cristalizaran y no fuera posible recuperarlos, segundo la cuantificación de azúcares reductores en el lactosuero caprino tratado con β -galactosidasa fue mayor al reportado en el lactosuero sin tratamiento enzimático por lo que se demuestra que existió una hidrólisis de lactosa aunque no total como se observó, al obtener únicamente un 142% de azúcares reductores, esto se sabe porque la lactosa al ser un disacárido si se hidroliza libera la misma cantidad de glucosa que de galactosa obteniendo así un 200% total de azúcares reductores, esto se confirma en la Figura 3.19 donde la lactosa del tiempo cero se convierte en glucosa a partir del tiempo 1 y a pesar de que no se observa la señal de galactosa en la Cromatoplaca se sabe que al existir glucosa por consecuencia hay liberación de galactosa en la hidrólisis.

Una vez determinado esto, se procedió a verificar si se había logrado isomerizar aunque fuera una parte mínima de la lactosa por Espectrofotometría UV-VIS con la reacción de Seliwanoff tomando en cuenta el lactosuero caprino sin la enzima como blanco de reacción, es decir, si se llegaba a obtener alguna medición, ésta se

restaría al resultado obtenido del lactosuero con β -galactosidasa y en la Tabla 3.10 concentra los resultados obtenidos.

Tabla 3.10. Cuantificación de lactulosa en lactosuero caprino con y sin β -galactosidasa.

Muestra	g Lactulosa/ 100 mL de muestra	g Lactulosa real/ 100 mL de muestra	Porcentaje de lactulosa obtenida
Lactosuero caprino	0.94 ^b \pm 0.04	-0.12	0.00%
Lactosuero caprino con β -galactosidasa	0.82 ^a \pm 0.02		

Los resultados corresponden a las medias de las determinaciones por triplicado \pm la desviación estándar, C.V < 5%.

*Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre los resultados.

Se obtuvo una menor cantidad de lactulosa en el lactosuero caprino con β -galactosidasa en comparación al reportado en el lactosuero caprino por lo que el resultado es negativo y se denomina como cero, al analizar este resultado se concluye que no existió una isomerización a lactulosa al utilizar esta enzima, lo que contradice lo que se había reportado en trabajos anteriores (Vera *et al.*, (2011), Guerrero *et al.*, (2015) y Guerrero *et al.*, (2017)), se debe tomar en cuenta que para este trabajo se utilizó como materia prima lactosuero caprino sin adición de algún sustrato extra, por lo que los resultados variaron.

Al obtener resultados negativos de isomerización enzimática con β -galactosidasa, tanto en el método cualitativo como lo es la cromatografía en capa fina, como en los métodos espectrofotométricos como lo son la reacción de DNS y la reacción de Seliwanoff, se decidió no realizar el análisis de las muestras por HPLC-IR, debido a que implicaba un gasto prescindible de reactivos, al saber que la β -galactosidasa únicamente hidrolizó la lactosa en glucosa y galactosa.

3.8 Comparación de isomerización entre el método químico y el método enzimático.

De acuerdo a todos los resultados obtenidos en el punto 3.7 no se pudo realizar una comparación adecuada entre el método químico y el método enzimático, debido a que en el método químico se obtuvo un rendimiento de 57.52 % en comparación del rendimiento obtenido en el método enzimático que fue del 0 %.

3.9 Determinación de lactosa y lactulosa en leches cualitativamente (cromatografía en capa fina) y cuantativamente (espectrofotometría UV y cromatografía de líquidos HPLC).

Después de analizarse los resultados obtenidos en los lactosueros, tomando en cuenta que para que exista una isomerización de la lactosa a lactulosa se requiere de temperaturas elevadas, y sabiendo que la lactulosa también se utiliza en lácteos como un indicador de que fue utilizada alta temperatura, se procedió a realizar la determinación de lactosa inicial y lactulosa en cuatro diferentes muestras de leches comerciales, iniciando con muestras que no son sometidas a altas temperaturas como la leche pasteurizada (63°C/30min, 75°C/15s u 85°C/12-15s), siguiendo con leches que fueron tratadas con mayores temperaturas como la Ultra pasteurizada (temperaturas no mayores a 140°C/8-2s) continuando con leches que son sometidas a procesos de evaporación de agua a altas temperaturas , como lo son la leche evaporada (140°C a presión reducida 45 MPa / 15s aproximadamente) y la leche en polvo (120-135°C/1-2min) (Olano *et al.*, (1988) y Romero y Mestres, (2004)).

Se realizó la cromatografía en capa fina, para observar los carbohidratos que contenían inicialmente, esperando que si hubiera presencia de lactulosa se lograra observar.

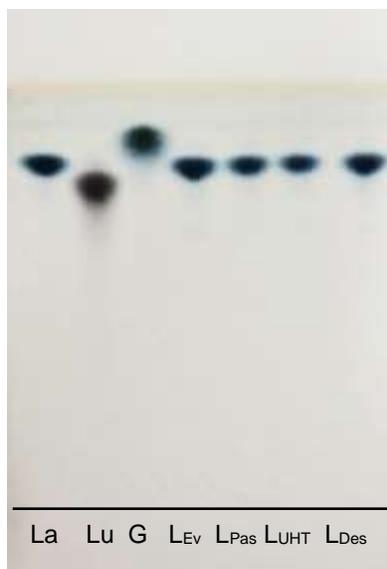


Figura 3.20.CCF de productos lácteos comerciales

Adsorbente: silica gel- ácido bórico; solvente Acetonitrilio:Isoopropanol:Agua, 40:20:20

La= Lactosa, Lu= Lactulosa, G= Glucosa, LEv= Leche evaporada, LPas= Leche pasteurizada, LUHT=Leche ultra pasteurizada y LDes= Leche deshidratada.

Lo que se observó en la Figura 3.20, es únicamente la señal de lactosa en todos los productos lácteos, con un Rf igual al del estándar de lactosa para todos, sin embargo las señales más intensas son de la leche evaporada y la leche deshidratada reconstituida a un 5 % de lactosa, lo que podría ser un indicio de que tienen mayor cantidad de lactosa. En ninguna de las muestras se observa la señal de lactulosa ni de glucosa, por lo que se puede decir que estos tratamientos térmicos no ocasionan una isomerización ni una hidrólisis de lactosa.

Se procedió a hacer la determinación cuantitativa por espectrofotometría UV-VIS, iniciando con la determinación de azúcares reductores mediante la reacción de DNS, para la posterior determinación de lactosa por cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC-IR donde se obtuvieron los cromatogramas mostrados en las Figuras 3.21, 3.22, 3.23 y 3.24.



Figura 3.21. Cromatograma de leche pasteurizada, donde se muestra la señal de lactosa.

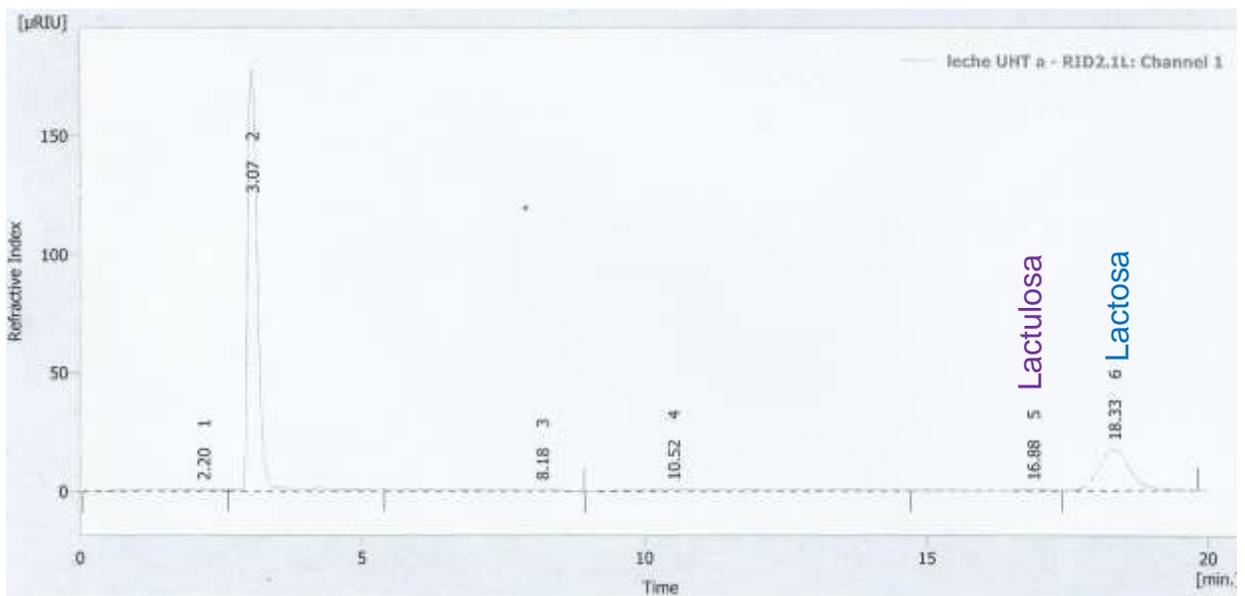


Figura 3.22. Cromatograma de leche ultrapasteurizada, donde se muestra la señal de lactosa y lactulosa.

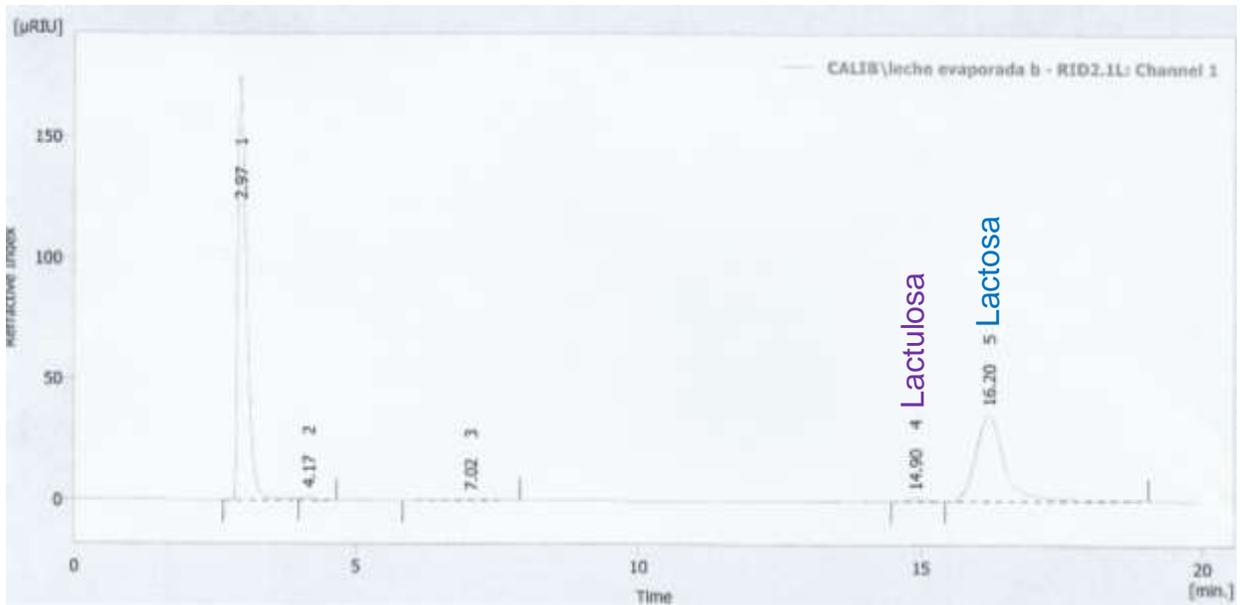


Figura 3.23. Cromatograma de leche evaporada, donde se muestra la señal de lactosa y lactulosa.

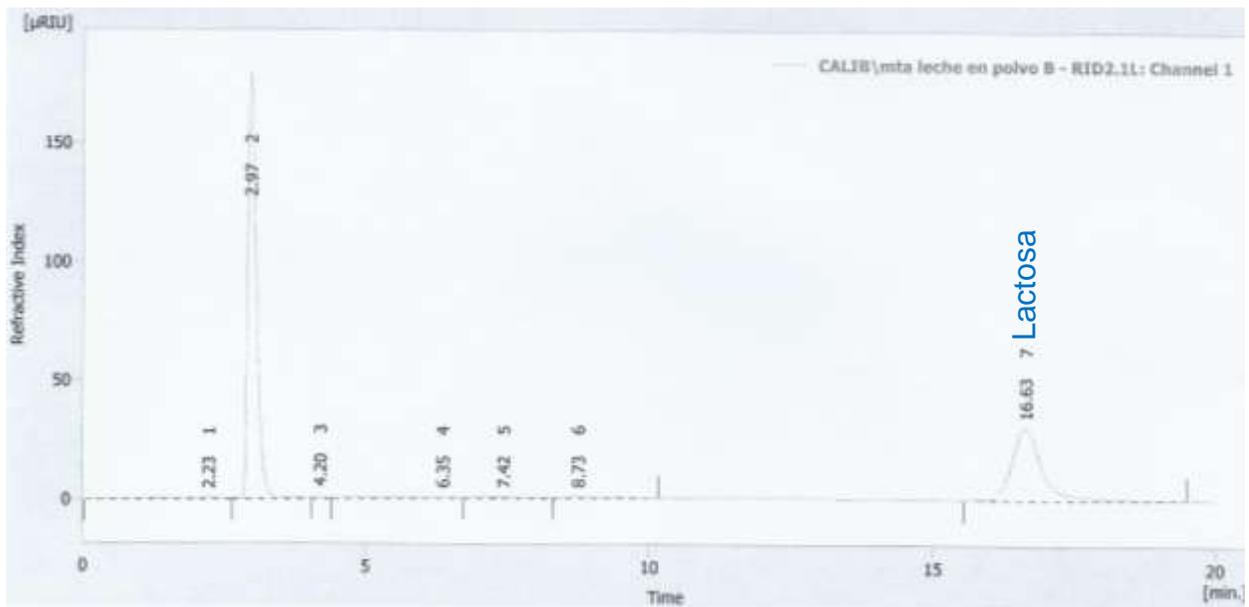


Figura 3.24. Cromatograma de leche deshidratada, donde se muestra la señal de lactosa.

Se logró observar en los cromatogramas la señal de lactosa en todos los productos lácteos comerciales, sin embargo en las Figuras 3.22 y 3.23 que corresponden a leche ultrapasteurizada y leche evaporada, existió una pequeña señal correspondiente a lactulosa, para la cuantificación de lactosa se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Cuantificación de lactosa por espectrofotometría UV-VIS y Cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC-IR.

Muestra	g Lactosa/ 100 mL de muestra Espectrofotometría UV-VIS (DNS)	g Lactosa/ 100 mL de muestra HPLC-IR
Leche pasteurizada	4.39 ^a ± 0.03	2.82 ^a ± 0.06
Leche Ultra pasteurizada	5.19 ^b ± 0.05	3.15 ^b ± 0.01
Leche evaporada	11.40 ^c ± 0.03	6.08 ^c ± 0.11
Leche deshidratada reconstituida al 5% de lactosa	5.27 ^d ± 0.05	5.11 ^d ± 0.17

Los resultados corresponden a las medias de las determinaciones por triplicado ± la desviación estándar, C.V < 5%.

*Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre los resultados.

La cuantificación de lactosa en los productos lácteos comerciales confirman lo que se observó en la CCF (Figura 3.20), que tanto la leche evaporada como la leche deshidratada reconstituida presentan una mayor cantidad de lactosa comparada con la leche pasteurizada y la leche ultrapasteurizada en los dos métodos.

Al analizar los resultados de la Tabla 3.11 se estableció que existe una diferencia significativa entre los métodos de cuantificación en los productos lácteos comerciales de leche pasteurizada, leche ultrapasteurizada y leche evaporada, sin embargo en la muestra de leche deshidratada reconstituida al 5% de lactosa no existe diferencia entre los métodos. Estos resultados pueden deberse a que el tratamiento térmico altera la concentración real de lactosa, debido a que puede haber una interferencia química como; deshidratación en la leche, hidrólisis de

lactosa o reacciones de las proteínas con lactosa para generar una coloración, desarrollar sabor a cocido y aroma específico en cada una de las muestras lácteas comerciales.

Se propuso medir cuantitativamente la lactulosa en las muestras, para determinar si existía presencia de esta en los productos lácteos comerciales debido al tratamiento térmico al que son sometidos, los resultados de espectrofotometría UV-VIS por Seliwanoff se muestran en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. Cuantificación de lactulosa en productos lácteos comerciales por el método de Seliwanoff.

Muestra	g Lactulosa**/ 100 mL de muestra
Leche pasteurizada	1.09 ^a ± 0.03
Leche Ultra pasteurizada	1.56 ^b ± 0.03
Leche evaporada	32.04 ^c ± 0.01
Leche deshidratada reconstituida al 5% de lactosa	1.65 ^d ± 0.00

Los resultados corresponden a las medias de las determinaciones por triplicado ± la desviación estándar, C.V < 5%.

Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre los resultados de lactulosa obtenidos.

**Referido a la cantidad de cetosas medidas en las muestras.

Los resultados obtenidos por espectrofotometría (ver tabla 3.12) arrojaron que existe la presencia de cetosas en todas las muestras de leche, sin embargo, al saber que no es un método muy sensible, se procedió a determinarse por HPLC la cantidad de lactulosa en los productos lácteos, donde únicamente se obtuvo la señal de lactulosa en las Figuras 3.22 y 3.23; sin embargo al obtenerse un área pequeña de lactulosa la cuantificación no se logró, por lo que no existió algún parámetro para comparar los resultados entre métodos, y se confirman los resultados obtenidos en la cromatografía en capa fina donde solo se observa la presencia de lactosa en las muestras, una vez resuelto esto, se puede decir que en cuanto a la muestra de leche

pasteurizada los resultados son correctos debido a que al ser sometido a un tratamiento térmico no tan agresivo no es posible la isomerización de lactosa a lactulosa, en la leche ultrapasteurizada y evaporada basándonos en los cromatogramas (Figuras 3.22 y 3.23 respectivamente) existe la presencia de lactulosa en una cantidad diminuta que no se puede cuantificar, sin embargo al ser productos lácteos que son sometidos a una temperatura agresiva por diferentes tiempos y con diferentes tecnologías, se concluye que altas temperaturas pueden inducir a una isomerización de lactulosa en mínimas cantidades, por último en donde se hubiera esperado un resultado positivo sería en la leche deshidratada reconstituida debido al tratamiento agresivo al que se somete, sin embargo, las tecnologías utilizadas para los tratamientos térmicos que reciben los productos lácteos comerciales influyen en la cantidad y el tipo de reacciones que se llevaran a cabo en cada muestra, en algunas se busca que cambien de coloración, de aroma y de textura como lo es en la leche evaporada y la leche deshidratada, pero esto no garantiza que se realice la isomerización en las muestras, además de que como se determinó con los lactosueros bovino y caprino, se requiere de un medio básico para lograr la isomerización química de la lactosa.

4 Conclusiones

- No existe diferencia estadísticamente significativa en la concentración de lactosa entre lactosuero de bovino y caprino, por lo tanto no es un determinante para la reacción de isomerización.
- Se logró implementar una metodología para realizar la de isomerización a lactulosa con carbonato de sodio y carbonato de calcio, donde se obtuvo que la mejor sal para isomerizar es el Na_2CO_3 , además de observar cualitativamente los productos obtenidos posteriores a la reacción.
- Se analizaron las reacciones de isomerización, concluyendo que la que obtuvo un rendimiento mayor al 50 % fue en el lactosuero caprino con carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- Se analizó la cuantificación de lactosa y lactulosa por espectrofotometría UV-VIS y cromatografía en líquidos de alta resolución HPLC-IR, donde se obtuvo una diferencia significativa entre los métodos, por lo que no se puede recurrir de manera eficaz al que genera un menor gasto de recursos y tiempo.
- No se logró comparar la isomerización entre el método químico y el método enzimático, debió a que en el método enzimático con β - galactosidasa proveniente de *Aspergillus oryzae* únicamente se realizó la hidrolisis de lactosa y no existió isomerización.
- Se concluyó que existe presencia de lactulosa en una mínima cantidad en la leche ultrapasteurizada y la leche evaporada, por lo que el tratamiento térmico al que son sometidas estas promueve una isomerización química, mientras que en la leche pasteurizada y deshidratada no hay presencia de lactulosa.
- Se logró realizar la isomerización de la lactosa presente en el lactosuero dulce bovino y caprino a lactulosa generando un prebiótico, del que se obtuvo un rendimiento de 57.52% utilizando sales amigables al medio ambiente, sin embargo, no se logró la isomerización enzimática.

5 Perspectivas

Buscar una metodología empleando diferentes sales a las utilizadas en el presente estudio, que sean amigables con el medio ambiente y que tengan un alto poder de alcalinización del medio con la intención de obtener mejores rendimientos de isomerización de lactosa a lactulosa.

Buscar al emplear la β - galactosidasa proveniente de *Aspergillus oryzae*, diferentes sustratos y condiciones de reacción a las utilizadas en este trabajo de investigación, para poder realizar de manera eficiente la isomerización de la lactosa y con esto realizar la cuantificación por HPLC-IR sin tener un gasto innecesario de reactivos.

Lograr la cristalización, purificación e identificación por métodos fisicoquímicos de la lactulosa, para poder ser utilizada como prebiótico adicionado en pequeñas cantidades a los productos lácteos en un nivel industrial.

6 Referencias

1. Aider, M. Halleux, D. (2007). Isomerization of lactose and lactulose production: review. *Trends in Food Science & Technology* 18, 356-364.
2. Amine A., Moscone D., Palleschi G. (2000). Rapid Determination of Lactulose in Milk Using Seliwanoff's Reaction. *Analytical Letters*, 33:1, 125-135.
3. Carobbi, R., Franci, V., Miletti, S. (1985). Process for preparing lactulose from lactose in the form of a syrup or a crystalline product. Us patent 4,536,221,20.
4. Carrillo AJL. (2002). Tratamiento y reutilización del suero de leche. *Revista Conversus* 10, IPN, México. pp 27-30
5. Facciano, M. Menin, M. Evaluación de la incidencia de las variables del proceso de transformación de lactosa en lactulosa. *Jornadas Jóvenes Investigadores Tecnológicos*. Recuperado de http://www.edutecne.utn.edu.ar/publicaciones/jit2013/FR-ROSARIO/RO_10_evaluaci%C3%B3n_lactosa.pdf
6. Guerrero, C. Vera, C. Acevedo, F. Illanes, A. (2015). Simultaneous synthesis of mixtures of lactulose and galacto-oligosaccharides and their selective fermentation. *Journal of Biotechnology*, 209. 31-40.
7. Guerrero, C. Vera, C. Araya, E. Conejeros, R. Illanes, A. (2015). Repeated-batch operation for the synthesis of lactulose with β -galactosidase immobilized by aggregation and crosslinking. *Bioresource Technology*, 190. 122-131.
8. Guerrero, C. Vera, C. Conejeros, R. Illanes, A. (2015). Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 70. 9-17.

9. Guerrero, C. Vera, C. Illanes, A. (2017). Fed-batch operation for the synthesis of lactulosa with β -galactosidase of *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology*, 237. 126-134.
10. Juers, D., Matthews, B., Huber, R., (2012). LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science*, 21(12):1792-1807.
11. Kreczmann, B., Alonso, A., Liloia, M., Zamboni, E., Cerutti, R., Baroni, D., Poluján, D. (2015). Procesamiento del lactosuero: elaboración de lactosa y aprovechamiento de proteínas. *Tecnología láctea latinoamericana*, 87. Argentina. pp 44-45.
12. Li, Y. Zhang, Wang, W. (2012). Formation of Aldehyde and Ketone Compounds during Production and Storage of Milk Powder. *Molecules* 17, 9900-9911.
13. Martinez, I., Olano, I. (1981). Ready Detection of Small Amounts of Lactulose in Dairy Products by Thin-Layer Chromatography. *Instituto de Química Orgánica General/Instituto de Fermentaciones Industriales C.S.I.C. Vol. 14. No. 11. 621-622.*
14. Mawson, A.J. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology* 47, 195-203.
15. McSweeney, P.L.H. Fox, P.F. (2009) *Advanced Dairy Chemistry Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*. Springer Science, 1-13, 148, 156, 165, 168.
16. Mendoza M., Rojas S., Salazar M. (sin año). Determinación de 4-O- β -D-Galactopiranosil-D-Fructofuranosa (lactulosa) y 5-(Hidroximetil)-2-Furfuraldehído (HMF) en leches UHT comerciales colombianas por espectrofotometría ultravioleta-visible. *Revista interna del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Cauca, Colombia.*

17. Montgomery, E. M., & Hudson, C. S. (1930). Relation between rotary power and structure in the sugar group. XXVII. Synthesis of a new disaccharide ketose (lactulose) from lactose. *Journal of America Chemical Society*, 52, 2101–2106.
18. Montilla A., Del Castillo M. D., Sanz M. L., Olano A., (2005). Egg Shell as catalyst of lactose isomerisation to lactulose. *Food Chemistry*, 90, 883-890.
19. Nagasawa, T., Tomita, M., Tamura, Y., Obayashi, T., & Mizota, T. (1974). Process for preparing a lactulose syrup. US Patent 3814174.
20. Norma Oficial Mexicana, NOM-155-SCFI-2012, Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Dirección General de Normas. Métodos de Prueba. 8.9 Grasa butírica.
21. Ocampo, R. Ríos, L. Betancur, L. Ocampo D. (2008). Curso práctico de Química Orgánica, enfocada en biología y alimentos. Editorial Universidad de Caldas, primera edición. pp. 99-100
22. Official Methods Of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). Virginia; 15th Edition.
23. Olano, A. Calvo, M. Corzo, N. (1988). Changes in the carbohydrate fraction of milk during heating processes. *Food Chemistry* 31, 259-265
24. Park, Y., Juárez, M. Ramos, M. Haenlein, G. (2007). Phisico-Chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88-113.
25. Parmjit S., Shweta, K. (2011). Lactulose: Production, purification and potential applications; Research review paper. *Biotechnology Advances*, 29, 940-948.
26. Parrish, F.W. (1970). Isomerisation of glucose, maltose and lactose with amino compounds. US patent 3514327.
27. Quesada, S. (2007). Manual de experimentos de laboratorio para bioquímica. San José, Costa Rica. Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED). pp 92.

28. Ramírez, J. (2011). Industrial Use of Whey by Fermentation Processes. *Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*, 69-83.
29. Romero, R. Mestres, J. (2004). *Productos lácteos: tecnología*. Universidad politecnica de Cataluña. pp 71-77
30. Seki, N. Saito, H. (2012). Lactose as a source for lactulose and other functional lactose derivatives. *International Dairy Journal* 22, 110-115.
31. Shen, Q. Yang, R. Hua, X. Ye, F. Wang, H. Zhao, W. Wang, K. (2012). Enzymatic synthesis and identification of oligosaccharides obtained by transgalactosylation of lactose in the presence of fructose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Food Chemistry*, 135. 1547-1554.
32. Sitanggang, A. Drews, A. Kraume, M. (2016). Recent advances on prebiotic lactulose production. *Springer Science*. 32:154.
33. Southgate, D.A.T. (1991). *Determination of Food Carbohydrates Second Edition*; Elsevier Applied Science, London and New York.
34. Valencia, E., Ramírez, M. L. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Revista elementos ciencia y cultura*, No. 73. Vol. 3. pp 27- 31. [Documento electrónico] disponible en: <http://www.elementos.buap.mx/num73/pdf/27.pdf>
35. Valero, A. Usón, S. (2011). *Ecología industrial: cerrando el ciclo de materiales*. Zaragoza: Prensas Universitarias de Zaragoza. pp 123.
36. Vamvakaki, A. N., Kandarakis, I., Kaminarides, S., Komaitis, M., & Papanikolaou, S. (2010). Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by Zygomycetes. *Engineering in Life Sciences*, 10, 348–360.
37. Vera, C. Guerrero, C. Illanes, A. (2011). Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: effect of pH, temperature and galactose and glucose concentrations. *Carbohydrate research*, 346. 745-752.

38. Villamiel, M. Corzo, N. Foda, M. Montes, F. Olano, A. (2002). Lactulose formation catalyzed by alkaline-substituted sepiolites in milk permeate. *Food Chemistry* 76, 7-11.
39. Yeong Hwan Seo., Gwon Woo Park., Jong-In Han., (2015). Efficient lactulose production from cheese whey using sodium carbonate. *Food chemistry*, 173, 1167-1171.
40. Yeong Hwan Seo., Mina Sung., Jong-In, Han. (2016). Lactulose production from cheese whey using recyclable catalyst ammonium carbonate. *Food Chemistry*, 197. 664-669.
41. Zadow, J.G. Harper, W. (1992). *Whey and lactose processing*. Springer Science & Business Media. pp 142-143.
42. Zokaee, F., Kaghazchi, T., Soleimani, M., & Zare, A. (2002a). Isomerisation of lactose to lactulose using sweet cheese whey ultrafiltrate. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 33, 307–313.
43. Zokaee, F., Kaghazchi, T., Zare, A., & Soleimani, M. (2002b). Isomerisation of lactose to lactulose – Study and comparison of three catalytic systems. *Process Biochemistry*, 37, 629–635.