

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERIA
ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACCIÓN HIDROLIZANTE
DE LAS ENZIMAS LÁCTICAS PROCEDENTES DE
KLUYVEROMYCES LACTIS Y *ASPERGILLUS ORYZAE* EN EL
DESLACTOSADO DEL SUERO DE QUESERÍA”**

**PRESENTADO POR Bach. MUÑOZ ROJAS ANDREA GISELA Y
Bach. VEGA VIERA JHONAS ABNER**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

Nuevo Chimbote – Perú

2018

DEDICATORIA

A Dios

*por sus bendiciones de salud
y vida hacia nuestra persona
permitiéndonos disfrutar
del sueño de joven cristalizado.*

Del mismo modo

*a nuestras familias
nuestros Padres y Hermanos
por su abnegada colaboración
y confianza depositada
en nuestra persona por alcanzar
el título de Ingeniero Agroindustrial.*

**Muñoz Rojas Andrea Gisela
Vega Viera Jhonas Abner**

AGRADECIMIENTO

A Dios y a nuestra familia, por darnos la fortaleza para seguir perseverantes frente a las adversidades presentadas, por mantenernos firmes con bienestar y salud durante la ejecución de nuestro trabajo de investigación.

Al Ing. Gilbert Rodríguez, Ms. Víctor Castro, por su tiempo para brindarnos consejos y transmitir sus conocimientos para enriquecer nuestra investigación

A los técnicos de laboratorio de la escuela de ingeniera agroindustrial e Instituto de Investigación Tecnológica Agroindustrial por facilitarnos los diferentes ambientes en cada uno de los laboratorios requeridos para llevar a cabo nuestro trabajo de investigación.

A la Universidad Nacional del Santa, nuestra alma máter, por habernos abierto las puertas y permitirnos crecer en conocimientos y como personas de buen provecho para el futuro.

INDICE GENERAL

RESUMEN	17
ABSTRACT.....	18
I. INTRODUCCIÓN.....	19
II. MARCO TEÓRICO	22
2.1. EL SUERO DE QUESERÍA.....	22
2.1.1. Exportaciones de queso en el Perú.	23
2.1.2. Origen, composición y aplicación del suero de leche.....	27
2.1.3. Composición química	28
2.1.4. Obtención del lactosuero	31
2.1.5. La lactosa del suero de Leche.....	31
2.1.6. Intolerancia a la lactosa.....	32
2.1.7. Proteínas del suero de Leche.	34
2.1.8. Productos Comercializados a partir del lactosuero.....	37
2.2. β - GALACTOSIDASA.....	45
2.3. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	47
2.4. FUNDAMENTACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION	48
2.4.1. Hidrólisis de lactosa con β -galactosidasa	51
2.4.2. Enzimas que hidrolizan la lactosa del suero de quesería.....	53
III. MATERIALES Y MÉTODOS	58

3.1. MATERIALES	58
3.1.1. β – Galactosidasas.....	58
3.1.2. Lactosa.....	59
3.1.3. Suero de quesería.....	59
3.1.4. Tampones.....	59
3.2. DISEÑO Y CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA.....	60
3.3. METODOS	61
3.3.1. Acondicionamiento de la materia prima y análisis.....	61
3.3.2. Determinación de la grasa mediante el método de Gerber (Instituto Adolfo Lutz, 2005).....	61
3.3.3. Determinación de los microorganismos mesófilos.....	62
3.3.4. Determinación de levaduras.....	63
3.3.5. Determinación de concentración de lactosa, glucosa, galactosa por HPLC (Correa N. & Mosquera M., 2012)	63
3.3.6. Determinación de la concentración de proteína (Método Kjeldahl- Método de la A.O.A.C., 1995).	65
3.3.7. Determinación de rango de linealidad y actividad enzimática.	66
3.3.8. Determinación de la hidrólisis de Lactosa con β – galactosidasa.....	70
b) Materiales y reactivos.....	70

3.4.	TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS.....	72
3.5.	PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS (ANEXO 4)	73
3.5.1.	Descripción breve del proceso.....	74
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
4.1.	DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	75
4.2.	ANÁLISIS FÍSICOS QUÍMICOS DEL SUERO DE QUESO	80
4.2.1.	Identificación y cuantificación de la concentración de lactosa, glucosa y galactosa.....	80
4.2.2.	Lactosa.....	82
4.2.3.	Proteína	82
4.2.4.	Grasa láctea.....	82
4.2.5.	Densidad	83
4.2.6.	pH.....	83
4.3.	RANGO DE LINEALIDAD Y PARÁMETROS CINÉTICOS de <i>Kluyveromyces lactis</i> Y <i>Aspergillus oryzae</i> A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENZIMA.....	87
4.4.	INFLUENCIA DEL pH, TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN DE ENZIMA SOBRE LA HIDROLISIS Y PRODUCTIVIDAD DEL SUERO DE QUESERÍA PARA CADA ENZIMA.	95

4.4.1. Reacción de hidrolisis de la enzima: ASTROLAC LX2000 (<i>Kluyveromices lactis</i>)	95
4.4.2. Reacción de hidrolisis de la enzima: β -Galactosidasa SIGMA-ALDRICH (<i>Aspergillus oryzae</i>).....	112
4.4.3. Resumen general.....	126
V. CONCLUSIONES	127
VI. RECOMENDACIONES.....	129
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES	130
VIII. ANEXOS.....	147

INDICE DE TABLAS

Cuadro 1: Empresas dedicadas a la elaboración de productos lácteos.....	25
Cuadro 2: Importaciones de queso en el Perú.....	26
Cuadro 3: Composición de lactosuero dulce y ácido	30
Cuadro 4: Algunas aplicaciones y beneficios del lactosuero en alimentos.....	44
Cuadro 5: Fuentes de β -galactosidasa.	46
Cuadro 6: Modelos enzimáticos considerados para la determinación de los parámetros cinéticos	56
Cuadro 7: Parámetros de trabajo para cada una de las enzimas.....	60
Cuadro 8: Condiciones Cromatográficas para la determinación de azúcares	65
Cuadro 9: Métodos de linealización para determinar parámetros cinéticos.....	68

Cuadro 10: Factores a los que serán sometidas las diferentes enzimas	72
Cuadro 11: Contenido de azúcares (Lactosa, Glucosa y Galactosa) presentes en la materia prima (suero de queso).....	84
Cuadro 12: Requisitos fisicoquímicos del suero de leche líquido	85
Cuadro 13: Requisitos microbiológicos para el suero de leche líquido	86
Cuadro 14: Caracterización del suero de quesería (materia prima)	87
Cuadro 15: Ecuaciones lineales en el tiempo de los datos obtenidos en el rango de linealidad de <i>K. lactis</i> a diferentes [E], pH = 7, T° = 45 °C y [S] = 46 g/L	89
Cuadro 16: Ecuaciones lineales en el tiempo de los datos obtenidos en el rango de linealidad de <i>A. oryzae</i> a diferentes [E], pH = 4.5, T° = 30 °C y [S] = 46 g/L	90
Cuadro 17: Actividad volumétrica de la enzima <i>K. lactis</i> a diferentes [E], pH = 7, T° = 45 °C y [S] = 46 g/L	93
Cuadro 18: Actividad volumétrica de la enzima <i>A. oryzae</i> a diferentes [E], pH = 4.5, T° = 30 °C y [S] = 46 g/L	94
Cuadro 19: Análisis de Varianza para Productividad – <i>K. lactis</i>	103
Cuadro 20: Valores de optimización de la productividad – <i>K. lactis</i>	104
Cuadro 21: Análisis de Varianza para Grado de hidrolisis – <i>K. lactis</i>	108
Cuadro 22: Valores de optimización del grado de hidrolisis – <i>K. lactis</i>	109

Cuadro 23: Resumen de los resultados obtenidos en la evaluación de la influencia de la Temperatura, pH y concentración de enzima sobre la productividad y grado de hidrolisis - <i>K. lactis</i>	111
Cuadro 24: Análisis de Varianza para la productividad – <i>A. oryzae</i>	118
Cuadro 25: Valores de Optimización para la productividad - <i>A.Oryzae</i>	119
Cuadro 26: Análisis de Varianza para el grado de hidrolisis – <i>A. oryzae</i>	123
Cuadro 27: Valores de Optimización para el grado de hidrolisis - <i>A. oryzae</i>	124
Cuadro 28: Resumen de los resultados obtenidos de la evaluación de la influencia de la Temperatura, pH y concentración de enzima sobre la productividad y grado de hidrolisis – <i>A. oryzae</i>	125
Cuadro 29: Mejor corrida experimental de cada enzima	126

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Reacción de hidrólisis de lactosa (Galan, 1999).....	32
Figura 2: Ilustración de la degradación de lactosa. (GARCÍA BELLO, 2014)	34
Figura 3: Estructura 3D de β -galactosidasa obtenida a partir de <i>K. lactis</i> . (Ángel Pereira-Rodríguez, 2012).....	45
Figura 4: Mecanismos de reacción hidrólisis de lactosa por β - galactosidasa (Enzima) Adaptado de (Zhou & Chen, 2001).	47
Figura 5: Determinación de parámetros cinéticos mediante método de inversos de Lineweaver – Burke.....	68
Figura 6: Diagrama de proceso de investigación.	73
Figura 7: Cromatograma de la mezcla de patrones, que muestra los tiempos de retención de: glucosa, galactosa y lactosa.	78
Figura 8: Curvas de calibración para los patrones de HPLC.....	79
Figura 9: Cromatograma de la mezcla de patrones HPLC de Lactosa, Glucosa y Galactosa.....	80
Figura 10: Cromatograma HPLC obtenidos en la materia prima (suero de queso) - Lactosa, Glucosa y Galactosa.	81
Figura 11: Rango de linealidad de la enzima <i>K. lactis</i> sometido a diferentes [E], pH = 7, T° = 45 °C y [S] = 46 g/L	88

Figura 12: Rango de linealidad de la enzima <i>A. oryzae</i> sometido a diferentes [E], pH = 4.5, T° = 30 °C y [S] = 46 g/L.	89
Figura 13: Evolución de los cromatogramas de HPLC durante la producción de Glucosa y Galactosa con enzima procedente de <i>K. lactis</i> (T° = 45°C, pH= 7 y [E]= 0.5 g/L).....	96
Figura 14: Perfil de concentración de Glucosa en el tiempo a pH de 6.5, 7, 7.5 y temperaturas de 25°C, 35°C, 45°C. (A) [E]: 1:2, (B) [E]: 1:4 y (C) [E]: 1:10 – <i>K. lactis</i>	99
Figura 15: Efectos principales de la temperatura, pH y concentración de enzima sobre la productividad – <i>K. lactis</i>	101
Figura 16: Superficies de respuesta para la productividad con β-Galactosidasa en lactosuero. Concentración de Enzima: (A), 0.1 g/L, (B) 0.25 g/L y (C) 0.5 g/L – <i>K. lactis</i>	102
Figura 17: Efectos principales de la temperatura, pH y concentración de enzima sobre el grado de hidrolisis – <i>K. lactis</i>	106
Figura 18: Superficies de respuesta para el Grado de hidrolisis con β-Galactosidasa en lactosuero. Concentración de Enzima: (A) 0.1 g/L, (B) 0.25 g/L y (C) 0.5 g/L – <i>K. lactis</i>	107
Figura 19: Evolución de los cromatogramas de HPLC durante la producción de Glucosa y Galactosa con enzima procedente de <i>A.Oryzae</i> (T° = 35°C, pH= 4.5 y [E]= 0.1 mg/mL)	112

Figura 20: Perfil de concentración de Glucosa en el tiempo a pH de 4, 4.5, 5 y temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C. (A) [E]: 1:2, (B) [E]: 1:4 y (C) [E]: 1:10 – <i>A. Oryzae</i>	114
Figura 21: Efectos principales de la temperatura, pH y concentración de enzima sobre la productividad – <i>A. oryzae</i>	116
Figura 22: Superficies de respuesta para la Productividad con β -Galactosidasa en lactosuero. Concentración de Enzima: (A), 0.1 g/L, (B) 0.25 g/L y (C) 0.5 g/L - <i>A. oryzae</i>	117
Figura 23: Efectos principales de la temperatura, pH y concentración de enzima sobre el grado de hidrolisis - <i>A. Oryzae</i>	121
Figura 24 Superficies de respuesta para el Grado de hidrolisis con B-Galactosidasa en lactosuero. Concentración de Enzima: (A), 0.1 g/L, (B) 0.25 g/L y (C) 0.5 g/L - <i>A. Oryzae</i>	122

INDICE DE ANEXOS

ANEXO I: Especificaciones Técnicas ASTROLACT LX 2000.....	147
ANEXO II: Especificaciones técnicas β -galactosidasa <i>A. oryzae</i>	148
ANEXO III: Parámetros modificados para la determinación de los carbohidratos....	149
ANEXO IV: Procedimientos.....	150

RESUMEN

El objeto de este trabajo fue realizar un estudio comparativo de la acción hidrolizante de dos enzimas específicas procedentes de *Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus oryzae* actuando independientemente sobre el suero de quesería a diferentes condiciones específicas. Se cuantificó el contenido de calcio, magnesio, del mismo modo se realizó un análisis microbiológico de mesófilos, levaduras y mohos en medio, la concentración de proteína se determinó por el método de Micro kjeldahl y la de lactosa, glucosa y galactosa por medio de cromatografía líquida de alta resolución. Se determinó el número de ensayos a realizar, mediante un diseño factorial de 3x3x3, para lo cual se definieron las variables independientes: Concentración de enzima, temperatura y pH de suero de quesería y las variables dependientes: Grado de hidrólisis y productividad. Se trabajó a concentraciones enzima de 0.1 – 0.5 mg/mL, temperatura de 25 – 45 °C y pH de 6.5 - 7.5 para la enzima procedente de *Kluyveromices lactis*, y temperatura de 25 – 35 °C y pH de 4 - 5 para la enzima procedente de *Aspergillus oryzae*. En el desarrollo de la hidrolisis se encontró que la influencia de los factores sobre las variables respuestas grado de hidrolisis y productividad, fueron diferentes frente a las dos enzimas. La enzima que presentó una mayor acción hidrolizante sobre el suero de quesería fue *Kluyveromices lactis*, obteniendo a una temperatura de 45 °C, pH de 7 y concentración de enzima de 0.5 mg/mL un grado de hidrolisis de 98.58 % y una productividad de 1.9266 g/L*min.

Palabras Claves: *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae*, Grado de Hidrólisis, Productividad.

ABSTRACT

The purpose of this work was to make a comparison of the hydrolyzing action of two specific enzymes from *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae* acting independently on cheese whey at different specific conditions. The content of calcium, magnesium was quantified, in the same way a microbiological analysis of mesophiles, yeasts and molds was carried out in medium, the concentration of protein was determined by the method of Micro kjeldahl and lactose, glucose and galactose by means of chromatography high resolution liquid. The number of tests to be performed was determined by means of a 3x3x3 factorial design, for which the independent variables were defined: enzyme concentration, temperature and pH of the cheese whey and the dependent variables: Degree of hydrolysis and productivity. We worked at enzyme concentrations of 0.1 - 0.5 mg / mL, temperature of 25 - 45 ° C and pH of 6.5 - 7.5 for the enzyme from *Kluyveromices lactis*, and temperature of 25 - 35 ° C and pH of 4-5 for the enzyme from *Aspergillus oryzae*. In the development of hydrolysis, it was found that the influence of the factors on the variables degree of hydrolysis and productivity, were different compared to the two enzymes. The enzyme that presented a greater hydrolyzing action on the cheese serum was *Kluyveromices lactis*, obtaining at a temperature of 45 ° C, pH of 7 and enzyme concentration of 0.5 mg/mL a degree of hydrolysis of 98.58 % and a productivity of 1.9266g/L*min.

Key words: *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae*, Degree of Hydrolysis, Productivity.

I. INTRODUCCIÓN

El suero del queso es el residuo más importante de las industrias de productos lácteos y puede causar importantes problemas de contaminación en el medio ambiente (G.W. Smithers, 2008). Los elevados valores de DBO del suero de queso o lactosuero, están en un rango de 30-60 kg/m³, resultante de sus altos contenidos de lactosa (Hatzinikolaou, y otros, 2005), Se estima que a partir de 10 litros de leche de vaca se puede producir de 1 a 2 kg de queso y un promedio de 8 a 9 kg de suero. Al representar cerca del 90% del volumen de la leche, contiene la mayor parte de los compuestos hidrosolubles, incluyendo el 95% de la lactosa, aumentando considerablemente la carga contaminante del vertido final (Valencia & Ramírez, 2009).

Aunque hay varias posibilidades de explotación de queso de suero de leche se han ensayado en los últimos 50 años, aproximadamente un cuarto de la producción mundial del suero de queso no es tratada, al contrario es desechado al medio ambiente, provocando una descomposición y robando el oxígeno de los arroyos y ríos resultantes en condiciones anaeróbicas que conducen a la destrucción de la vida acuática en zonas potencialmente grandes. Este efluente lácteo promueve el crecimiento de algas y bacterias en el sistema de agua, provocando una eliminación del oxígeno y haciendo que los peces se sofocan y mueran. Debido a esto, la eliminación del suero ha sido una gran preocupación en todo el mundo (Shete & Shinkar, 2013).

El Perú es uno de los países que fuertemente está desarrollándose en la cadena láctea pero a la vez este desarrollo está causando un incremento de este sub-producto, el suero de quesería, las pequeñas empresas en su arduo surgimiento están contaminando nuestro medio ambiente.

Para dar solución a este problema en la actualidad se está desarrollando diferentes aplicaciones para el lactosuero para solucionar el problema de su disposición. Una alternativa es el uso de lactosuero como sustrato para varios procesos fermentativos incluyendo la producción de etanol, metanol, proteína de levadura, goma xantano (Fu & Tseng, 1990) o ácidos orgánicos tales como lactato, propionato o acetato. (Huang & Yang, 1998).

Sin embargo, la lactosa es uno de los azúcares más difícilmente fermentados, el número de microorganismos fermentadores es limitado y el uso de microorganismos genéticamente modificados para su bioconversión incrementa los costos del proceso (Ramakrishnan & Hartley, 1993). Su hidrólisis da como resultado sus monosacáridos constituyentes: glucosa y galactosa, facilitando así sus procesos fermentativos (Illanes & Enzyme Biocatalysis., 2008).

La hidrólisis de la lactosa del lactosuero es una alternativa muy útil así como los productos hidrolizados los cuales son más dulces y se pueden utilizar para el desarrollo de aditivos para la dieta de los seres humanos humana y animal (Ladero M. , Santos, Garcia, & Garcia-Ochoa, 2000).

Aparte de esto, los monosacáridos formados podrían ser convertidos posteriormente en bioetanol después de la fermentación usando microorganismo adecuado (Ladero M. , Santos, Garcia, & Garcia-Ochoa, 2000).

El proceso de deslactosar, es el método mejor valorado industrialmente en los últimos tiempos, pero presenta algunas desventajas como: El tiempo requerido para la hidrolisis y el alto costo de los equipos para la producción de las enzimas. (Rodriguez, 2008).

La lactosa es menos fermentable que otros azúcares, también es uno de los principales obstáculos para el suero de leche utilizable ya que provoca la cristalización a bajas temperaturas. Estos problemas se pueden resolver si la lactosa de suero de leche se hidroliza para formar glucosa y galactosa (Matioli , Moraes , & Zanin, 2003).

La hidrólisis de la lactosa trae consigo muchos beneficios como se ha expuesto, por esa razón esta investigación se basa en hidrolizar el suero de quesería que es un desecho altamente contaminante que tiene un alto contenido en lactosa, para ello inicialmente se caracterizó el suero de quesería química y microbiológicamente. Se trabajó con dos enzimas β -Galactosidasas una procedente de *Kluyveromyces lactis* y otra de *Aspergillus oryzae* de las que se determinó el rango de linealidad, actividad enzimática y parámetros cinéticos. Su Acción hidrolizante fue evaluada por dos variables respuesta: Grado de hidrólisis (%) y Productividad (g/L*min) teniendo como factores al pH, temperatura (°C) y concentración de enzima (g/L) específicos para cada enzima. Se siguió un diseño experimental de Box-Behnken de 15 corridas experimentales por enzima.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. EL SUERO DE QUESERÍA

La leche fue sinónimo de salud, riqueza, fecundidad y pureza. Hipócrates describió efectos medicinales de la leche sola o mezclada, la biblia habla de la tierra prometida “rebosante de leche y miel”, la producción lechera en Perú está siendo de gran importancia y se encuentra en permanente crecimiento, en el 2015 el Perú produjo un millón 893,000 toneladas de leche y el 60% se registra en Cajamarca (alrededor de 350,000 toneladas), Arequipa, Moquegua y Tacna (400,000 toneladas), Lima, Ica y Junín (200,000 toneladas) (Piskulich Johnson, 2016).

Del mismo modo el autor indicó que la producción de leche llegó a incrementarse grandemente gracias a algunos factores un incremento de la productividad y un mercado seguro para la producción ya que en el año 2000 se presentó una producción de 903,000 toneladas de leche y en 2015 registró un millón 893,000 toneladas, un crecimiento de más de 100% registrando que los peruanos consumimos más del doble de la leche que hace 15 años (Sierra Exportadora, 2016).

Uno de los productos derivados de la leche que el Perú está ganando apogeo grandemente es el queso en sus diferentes presentaciones, en el año 2015 nada más el Perú cerró con un monto de US\$ 395,020, un 352% más que en el 2014 y se confía que el monto siga mejorando por la capacitación en gestión de calidad e inocuidad, mejoramiento de las instalaciones, equipamiento, acceso a certificaciones sanitarias y

asistencia técnica entre los pequeños productores, esto informó (Sierra Exportadora, 2016).

2.1.1. Exportaciones de queso en el Perú.

El Perú es uno de los países que va creciendo agroindustrialmente, en el 2012 llegaron a registrar que las entidad adscrita al Minagri, fueron un total de 160 plantas lácteas, 24 de las cuales fueron calificadas para iniciar la “Ruta de la Excelencia”, con miras a su internacionalización en el mediano plazo, en la Tabla 1. Mencionamos algunas de estas empresas peruanas productoras de queso (Minagri, Sierra Exportadora, & terradina, 2016).

Asimismo se impulsó la transferencia tecnológica, con el concurso de expertos senior de Francia, Suiza y Holanda, en 5 regiones: Arequipa, Cajamarca, Cusco, Junín y Puno. En el 2014 llegaron a priorizar la atención a 12 plantas con las que se desarrollan quesos andino y paria bajo la marca TERRANDINA, previa culminación de trabajos de adaptación de instalaciones, entre otros (Sierra Exportadora, 2016).

El trabajo de Sierra Exportadora, en el 2015 los pequeños productores de queso concretaron ventas por S/ 62 millones. De las cuales 10 empresas tienen presencia en supermercados de Lima y otras 29 en supermercados de provincia (Sierra Exportadora, 2016).

Asimismo, el formato del Fondo Nacional de Capacitación Laboral y Promoción del Empleo – Fondoempleo- plantea la implementación de una planta procesadora de quesos madurados y derivados lácteos con capacidad para procesar 5.000 litros de leche diario, en un solo turno, para lo que necesita una inversión de S/ 1,669,575 (Minagri, Sierra Exportadora, & terradina, 2016).

Y el fruto de todo esfuerzo se ve reflejado en sus variedades de quesos peruanos que se está produciendo actualmente (fresco, crema, ahumado, mozzarella y parmesano) llegaron a tres destinos extranjeros las cuales fueron, el principal fue Chile en el 2015, seguido muy de lejos por Bolivia y Aruba (Sierra Exportadora, 2016), así como Perú está creciendo en sus exportaciones la demanda de los consumidores de queso en nuestro Perú no es suplida al completo la cual lleva a la importación de una gran cantidad de queso en tabla 2. Se muestra las Importaciones de queso en el Perú (Minagri, Sierra Exportadora, & terradina, 2016).

Cuadro 1: Empresas dedicadas a la elaboración de productos lácteos.

	PLANTA	DISTRITO	PROVINCIA	REGION
1	Santísima Trinidad	Chuquibamba	Condesuyos	Arequipa
2	Granja Don Bosco	Ayaviri	Melgar	Puno
3	Agroindustrias San Francisco	pucara	Lampa	Puno
4	La Pulpera	Yanque	Caylloma	Arequipa
5	Empresa ganadera El Rosario	Santa Rosa	Melgar	Puno
6	Cal Aspam	Majes	Caylloma	Arequipa
7	Agroindustrias el Ingenio	Majes	Caylloma	Arequipa
8	Tungasuca	Tupac Amaru	Canas	Cusco
9	Industrias Lácteas Huacariz	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca
10	quesos chugur	Baños del Inca	Cajamarca	Cajamarca
11	Concelac	Concepción	Concepción	Junín
12	El Ushibambino	San José de Quero	Concepción	Junín

Fuente: Sierra Exportadora, 2015

Por la demanda de los consumidores, el Perú importó quesos en el 2015 por más de US\$ 23.8 millones vemos en Tabla 2, sin embargo (Sierra Exportadora, 2016), en el 2015 de USA se importa U\$ 9.3 millones, Chile U\$ 325 mil y España U\$ 263 mil.

Lideran las importaciones Sigdelo con U\$ 3.6 millones, sigue Corporación Peruana de Restaurantes con U\$ 1.7 millones (Koo, 2015).

Cuadro 2: Importaciones de queso en el Perú

Detalle	2014			2015		
	Cif US\$	Kilos	Prec.	Cif US\$	Kilos	Prec.
Queso Fundido	3,354,233	568,205	5.90	2,405,900	453,277	5.31
Queso los demás	584,444	53,600	10.9	27,414	2,766	9.91
Queso Fresco sin fermentar	5,693,431	1,295,346	4.40	4,479,265	1,038,749	4.31
Queso de cualquier tipo, rallado o en polvo	4,487,962	922,953	4.86	4,004,960	843,467	4.75
Totales	14,487,962	2,840,105	4.97	10,916,539	2,338,258	4.67
Incremento	13%	7%	5%	-23%	-18%	-6%

Fuente: Agrodataperu (2015)

Como anteriormente detallamos, la elaboración de queso ocupa un lugar de gran importancia en la producción Peruana de lácteos y por lo tanto grandes volúmenes de suero son generados.

El suero del queso es el residuo más importante de las industrias de productos lácteos y puede causar importantes problemas de contaminación en el medio ambiente (G.W. Smithers, 2008).

Es generado por la coagulación de las caseínas en la fabricación de queso, y corresponde a 85 a 95% del volumen de leche. El suero líquido retiene aproximadamente el 55% de los nutrientes de la leche (Mandal, et al., 2012), de los cuales la lactosa (4,55% w/v) es el más abundante.

Los elevados valores de DBO del lactosuero, están en un rango de 30-60 kg/m³, resultante de sus altos contenidos de lactosa (Hatzinikolaou, y otros, 2005) aumentando considerablemente la carga contaminante del vertido final (Valencia & Ramírez, 2009).

2.1.2. Origen, composición y aplicación del suero de leche

El lactosuero es definido como “la sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche en la elaboración de queso” (Foegeding & Luck., 2002). Es un líquido translúcido verde obtenido de la leche después de la precipitación de la caseína (Jelen, 2003). Existen varios tipos de lactosuero dependiendo principalmente de la eliminación de la caseína, el primero denominado dulce, está basado en la coagulación por la renina a pH 6,5. El segundo llamado ácido resulta del proceso de fermentación o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos (Jelen, 2003).

Los sueros lácteos, procedentes de las industrias queseras, se dividen en dos categorías:

Sueros ácidos, que se producen en su mayor parte en la fabricación de caseína por la incorporación de un ácido que produce su coagulación.

Sueros dulces, obtenidos por la elaboración de quesos de pasta prensada, utilizando para la coagulación, cuajo, quimosina, u otros tipos como pueden ser los cuajos de hongos o vegetales (Fox, 1987).

2.1.3. Composición química

La composición nutricional del lactosuero puede variar considerablemente dependiendo de las características de la leche utilizada para la elaboración del queso, el tipo de queso producido y el proceso tecnológico empleado en la elaboración del queso. A partir de estas diferencias se encuentran los tipos de lactosuero (Poveda, 2013).

Los dos tipos más comunes de suero de leche son el dulce y el ácido tabla 3. El suero dulce se obtiene de la elaboración del queso mediante el uso de enzimas proteolíticas o cuajo, las cuales actúan sobre las caseínas de la leche y las fragmentan, haciendo que éstas se desestabilicen y precipiten, todo esto bajo condiciones específicas de temperatura, aproximadamente entre 15-50 °C, con un pH levemente ácido. Por otro lado, el suero ácido se genera mediante la precipitación ácida de la caseína, la cual se logra disminuyendo el pH de la leche a un valor de 4.5 o 4.6. A este pH se alcanza el punto isoelectrico de la mayoría de

las caseínas presentes; en este punto, la carga eléctrica neta de la proteína es igual a cero, lo cual produce que la micela de caseína se desestabiliza y precipita, dejando en solución solamente las proteínas de tipo séricas (Jovanovic, Barac, & Macej, 2005). Existe un tercer tipo de suero no tan común, que se produce en Egipto; es un suero de leche con sal que se obtiene en la fabricación de queso Domiati, el principal queso fresco egipcio (Abd El-Salam, El-Shibiny, & Salem, 2009).

En términos promedio, el suero de leche contiene más de la mitad de los sólidos presentes en la leche original, incluyendo alrededor del 20% de las proteínas (lactoalbúminas y lactoglobulinas), la mayor parte de la lactosa, minerales (calcio, fósforo, sodio y magnesio) y vitaminas hidrosolubles (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina y ácido ascórbico) (Londoño M. , 2006) (Guerrero, Ramirez, & Puente, 2011).

Debido a sus propiedades nutricionales y funcionales, el lactosuero se ha convertido en una materia prima conveniente para obtener diferentes productos a nivel tecnológico. Se ha establecido que es posible transferir diversas propiedades funcionales identificadas en el suero de leche a nuevos productos alimenticios. Por tal motivo, se ha incrementado el uso de proteínas de suero de leche como ingredientes en alimentos fisiológicamente funcionales (Morr, C; Ha, E.Y,

1993). En cualquiera de los dos tipos de lactosuero obtenidos, se estima que por cada kg de queso se producen 9 kg de lactosuero, esto representa cerca del 85-90% del volumen de la leche y contiene aproximadamente el 55% de sus nutrientes (Liu, Chung, & Yousef, 2005). Entre los más abundantes de estos nutrientes están la lactosa (4,5-5% p/v) estos valores se muestran en la Tabla 3, proteínas solubles (0,6-0,8% p/v), lípidos (0,4-0,5% p/v) y sales minerales (8-10% de extracto seco) (Muñi, Paez, & Ramones., 2005); (Londoño M. , 2006); (Panesar P. J., 2007). Presenta una cantidad rica de minerales donde sobresale el potasio, seguido del calcio, fósforo, sodio y magnesio. Cuenta también con vitaminas del grupo B (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina) y ácido ascórbico (Londoño M. J., 2008).

Cuadro 3: Composición de lactosuero dulce y ácido

Componentes	Lactosuero dulce (g/L)	Lactosuero Acido (g/L)
Solidos Totales	63-70	63-70
Lactosa	46-52	44-46
Proteína	6-10	6-8
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6
Fosfatos	1-3	2-4.5
Lactato	2	6.4
Cloruros	1.1	1.1

Fuente: (Panesar P. J., 2007)

2.1.4. Obtención del lactosuero

El suero de leche se obtendrá en el proceso de elaboración del queso cuando a la leche líquida, previamente pasteurizada, se le añade el cuajo, fermento natural contenido en el estómago de los rumiantes que posee una enzima que hace coagular la leche. Se trata de un proceso que se realiza en tanques especiales a unos 30 °C aproximadamente y cuyo resultado es una masa semisólida se retira de las cubas de cuajar, lo que queda en ellas es el suero de leche: un líquido de color amarillo verdoso y de sabor ácido pero agradable. Se trata, por tanto, de la parte que no se coagula por la adición del cuajo y que permanece en estado líquido (Riera Rodríguez, 2014).

2.1.5. La lactosa del suero de Leche.

La lactosa es el componente predominante de la leche y algunos derivados, se puede decir que es un tipo de carbohidrato que se encuentra exclusivamente en la leche de los mamíferos. Es un disacárido, un azúcar formado por dos monosacáridos unidos (la glucosa y la galactosa) (NIH, 2009), podemos observar su nomenclatura en la Figura 1.

La lactosa tiene un gran número de beneficios para nuestra salud, este azúcar es utilizada por el cuerpo como energía, una vez que tu cuerpo digiere la lactosa, los azúcares de la glucosa y la galactosa entran a tus células, donde se metabolizan para obtener energía. Además, el consumo de lactosa evita que tu

proteína dietaría funcione como fuente de energía, permitiendo, en su lugar, desarrollar músculo y realizar sus otras funciones de mantenimiento (NIH, 2009), por lo que es muy necesaria en todas las etapas de la vida, sobre todo para las personas que más actividad física realizan. Otra de las propiedades de gran importancia es que puede degradarse en forma selectiva y eficiente, una buena hidrólisis de la lactosa previene la cristalización de la lactosa y su impacto negativo de percepción y estabilidad de las proteínas (Quiminet, 2005).

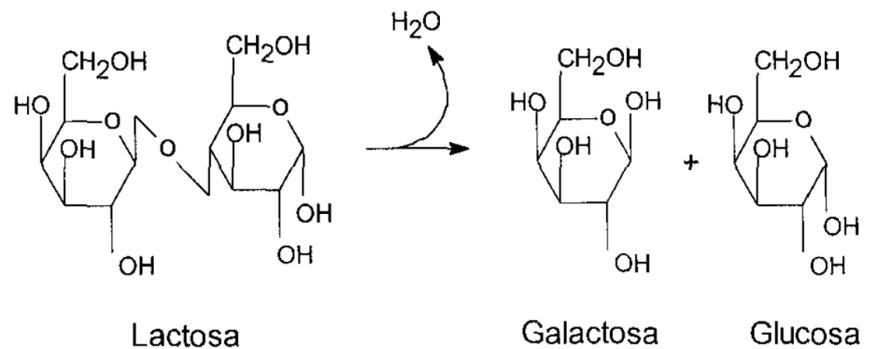


Figura 1: Reacción de hidrólisis de lactosa (Galan, 1999).

2.1.6. Intolerancia a la lactosa

La intolerancia a la lactosa fue descrita por primera vez por Hipócrates, pero esta condición se reconoció y se diagnosticó solo en los últimos 50 años (Valerina, 2008).

La causa de esta intolerancia es la incapacidad del intestino para digerirla y transformarla en sus constituyentes (glucosa y galactosa), figura 2. Esta incapacidad resulta de la escasez de un enzima (proteína) denominado lactasa, que se produce en el

intestino delgado (D. Rodríguez Martínez & Pérez Méndez, 2006).

La intolerancia a la lactosa se puede producir por causa genética. Cuando nacemos, ya tenemos programado cuándo caerá nuestro nivel de lactasa, que es indispensable para tolerar bien la lactosa (Dr. Ramón Tormo, 2011), En la figura 2 podemos notar cómo se desarrolla la tolerancia y la intolerancia a la lactosa.

a) Tolerante a la lactosa

Para que la molécula de lactosa pueda ser absorbida en el intestino delgado debe ser dividida por la enzima lactasa en sus dos monosacáridos originales: glucosa y galactosa (Dr. Suárez Crespo, 2016).

b) Intolerante a la lactosa

Cuando existe un déficit de la enzima lactasa, la lactosa no absorbida arrastra agua y pasa al colon, donde las bacterias la fermentan liberando ácidos, agua y gas (hidrógeno, metano y dióxido de carbono), produciendo los síntomas de la intolerancia (Dr. Suárez Crespo, 2016).

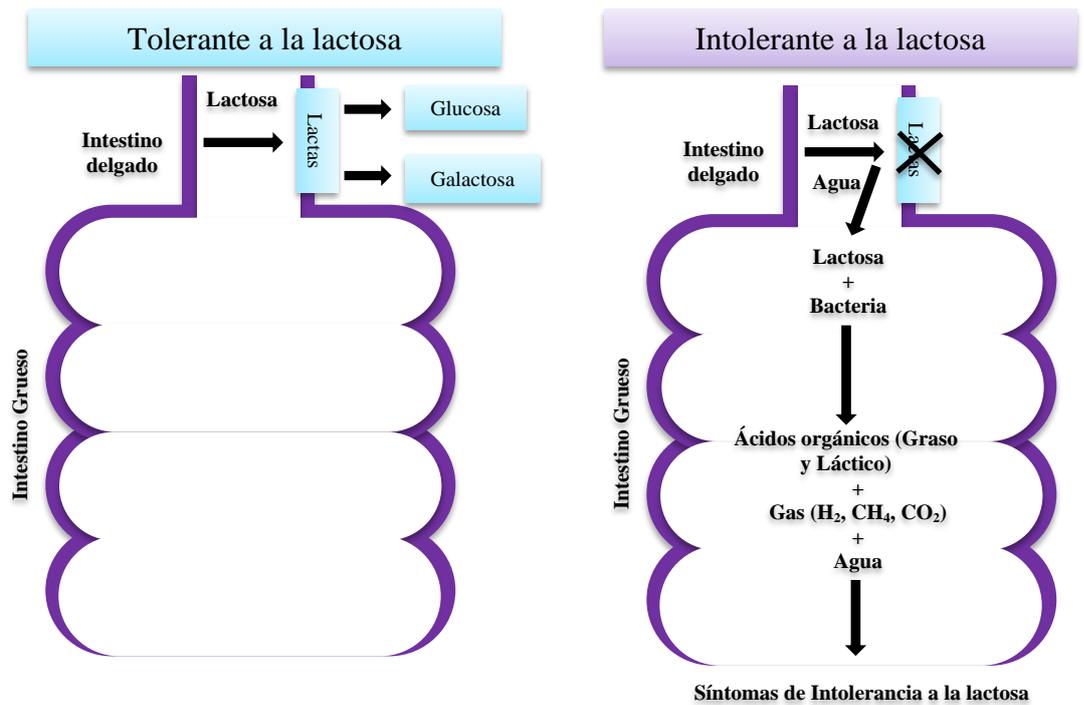


Figura 2: Ilustración de la degradación de lactosa. (GARCÍA BELLO, 2014)

2.1.7. Proteínas del suero de Leche.

Las proteínas no constituyen la fracción más abundante en el suero de leche, representa aproximadamente, el 18-20% de las proteínas totales de la leche., sin embargo, sí es la más interesante desde el punto de vista económico y nutricional (Parra, 2009). Esta fracción contiene cuatro proteínas principales: β -lactoglobulina (β -LG), α -lactoalbúmina (α -La), albúmina de suero sanguíneo (BSA) e inmunoglobulina (Lg). Los componentes menores de esta fracción son lactoferrina, transferrina, y la fracción lactolin proteosa-peptona (pp) (Jovanovic, Barac, & Macej, 2005).

La β -lactoglobulina representa, aproximadamente, la mitad de las proteínas totales del suero de leche bovino. Está compuesta por 162 aminoácidos residuales; 84 de éstos son aminoácidos esenciales (Jovanovic, Barac, & Macej, 2005). El centro de la proteína es hidrofóbico, por lo que es capaz de fijar moléculas hidrófobas como colesterol y retinol. La β -LG presenta alta resistencia a la digestión gástrica en algunos seres humanos, lo que origina intolerancia y/o alergenidad. Sin embargo, tratamientos industriales como esterilización, calentamiento o presión hidrostática alta y la hidrólisis, mejoran la digestibilidad de la β -LG presente en el lactosuero (Pescumma, E. Hérbet, Mozzi, & Font., 2008).

Las α -lactoalbúminas son de las principales proteínas que se encuentran en la leche humana y bovina. Comprenden, aproximadamente, del 20 al 25% de las proteínas de suero de leche y contienen una gran variedad de aminoácidos, incluyendo un suministro fácilmente disponible de aminoácidos de cadena ramificada y esenciales (Walzem, Dillard, & German, 2002). La proteína α -Lactoálbúmina purificada se utiliza muchas veces en fórmulas infantiles para lactantes (Marshall, 2004). También presenta una gran afinidad por el calcio y otros minerales como zinc, manganeso, cadmio, cobre y aluminio (Parra, 2009). Las albúminas de suero sanguíneo se derivan de la circulación sanguínea de la vaca, y no son sintetizadas por la glándula mamaria. La concentración de albúmina de leche aumenta

durante la mastitis y durante la involución mamaria. La función de estas proteínas en la leche es desconocida (Walzem, Dillard, & German, 2002).

Las inmunoglobulinas (Ig) son anticuerpos. Existen cinco clases de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. IgG constituye, aproximadamente, el 75% de los anticuerpos en un adulto; se transfiere de la madre al niño en el útero a través de la sangre y en la lactancia materna, sirve como una primera línea de defensas inmune para el niño, conocida como “inmunidad pasiva”. El calostro contiene concentraciones significativamente mayores de inmunoglobulinas, con respecto a la leche madura. Del mismo modo, la fracción de suero de leche contiene una cantidad significativa de inmunoglobulinas, aproximadamente, del 10 al 15 % del total de las proteínas del suero de leche (Marshall, 2004).

La lactoferrina (LF) es un agente antioxidante no enzimático, encontrado en la fracción de suero de la leche, así como en el calostro. La lactoferrina de suero de leche se compone de, aproximadamente, 700 aminoácidos residuales y de una cadena de polipéptidos individuales con dos sitios de unión para iones férricos. La concentración de lactoferrina en la leche bovina y calostro es de aproximadamente 0.2 mg/mL y 1.5 mg/mL, respectivamente. Las fuentes dietéticas principales de

lactoferrina son la leche, el yogur, el queso y otros productos lácteos (Walzem, Dillard, & German, 2002).

2.1.8. Productos Comercializados a partir del lactosuero

A continuación se les mencionara algunos productos comercializados a partir del suero de queso:

a) Concentrados.

Los concentrados de proteína de lactosuero (WPC) son elaborados por la ultrafiltración que consiste de una membrana semipermeable, la cual selectivamente permite pasar materiales de bajo peso molecular como agua, iones y lactosa, mientras retiene materiales de peso molecular alto como la proteína. El retenido es así concentrado por evaporación y liofilizado (Zadow J. , 2003) (Muñi, Paez, & Ramones., 2005).

b) Hidrolizados

La introducción dentro de la dieta de hidrolizados enzimáticos ricos en oligopéptidos, especialmente di- y tripéptidos, representan una manera de mejorar la utilización de la proteína. Estas preparaciones han sido usadas en varios países como suplementación dietética o necesidades fisiológicas, para personas de la tercera edad, bebes prematuros, atletas que controlan el peso a través de dietas y niños con diarrea. Son muy utilizadas las proteínas

hidrolizadas debido a que los aminoácidos proporcionados por los hidrolizados de proteína son rápida y completamente absorbidos a nivel digestivo en comparación con la proteína intacta sin hidrolizar (Santana, E. Rolim, Oliveira, & Pinto., 2008); (Spellman & FitzGerald., 2006)

c) Aislados

Los aislados de proteína de lactosuero (WPI) tienen como características importantes un 90% de proteína y entre 4-5,5% de agua. Por su alta pureza, los WPI son usados extensivamente en suplementación nutricional, bebidas deportivas y medicinales. (Foegeding & Luck., 2002). Han sido empleados como proteínas de alimentos funcionales en formulaciones de alimentos, por sus propiedades de hidratación, gelificación, emulsificación, y propiedades para formación de espuma de WPI (Foegeding & Luck., 2002) (Nicorescu, y otros, 2009), además, estos productos son elaborados para la aplicación de agentes complejantes específicos los cuales se enlazan con proteínas, permitiendo su eliminación de lactosuero, utilizando absorbentes como carboxy-metil celulosa u óxidos inorgánicos (Zadow, 2003).

d) Fórmulas infantiles

La elaboración está principalmente basada en leche de bovinos y sus derivados como un sustituto de la leche humana. Cuando en los años 70 aparecieron fórmulas infantiles basadas en lactosuero simulando la leche humana, la atención giró al desarrollo de estos productos. Este fue el inicio de las fórmulas infantiles mezclando igual cantidades de leche descremada, lactosuero desmineralizado (Wit, 2003) y otros componentes como vitaminas, minerales, taurina, nucleótidos entre otros (Sinha, Radha, Prakash, & Kaul., 2007).

e) Producción de etanol

La producción de una bebida alcohólica por conversión del lactosuero es una alternativa de gran interés para la utilización de este subproducto industrial (Dragone, Mussatto, Oliveira, & Teixeira, 2009). Destilerías de lactosuero están en operación en Irlanda, Nueva Zelanda, y los Estados Unidos. En la fermentación se emplea *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* o *Kluyveromyces fragilis* y lactosuero desproteinizado como sustrato (Mawson J. , 2003) (Dragone, Mussatto, Oliveira, & Teixeira, 2009). El proceso puede ser operado bajo condiciones asépticas usando lactosuero pasterizado, con temperatura de fermentación (Mawson J. , 2003).

f) Levadura para panificación.

El lactosuero en polvo es bien conocido como ingrediente en la industria de la panificación por resaltar su sabor y cualidades de calidad. Volumen, textura, corteza y retención de frescura en el pan de trigo, estas características son proporcionadas por la incorporación de una combinación de emulsificantes y lactosuero en polvo (Wit, 2003).

g) Ácidos orgánicos

Diferentes ácidos orgánicos pueden ser obtenidos a través de la fermentación de lactosuero, entre estos se tienen, butírico, propiónico y acético los cuales representan una posibilidad para la utilización de lactosuero como sustrato (Alam, Stevens, & Bajpai., 1988)).

h) Ácido acético.

Durante la fermentación del lactosuero, el etanol puede ser además metabolizado a ácido acético por *Acetobacter spp.* Este proceso ha sido seguido y comercializado por Alimentos Kraf, resultando en vinagre de lactosuero que puede ser utilizado en ensaladas de cocina y otros alimentos, sin que haya grandes diferencias con respecto al vinagre tradicional porque son procesos semejantes. La producción de ácido acético a partir de lactosuero ha sido base para la síntesis de otros químicos como el acetato, el

cual podría estar disponible en el mercado en poco tiempo (Wit, 2003).

i) Ácido propiónico

El ácido propiónico ha sido muy utilizado en industrias químicas, de alimentos y farmacéuticas (Morales, Choi, & Kim, 2006) en la industria alimenticia es añadido como un agente fungistático a productos de panadería (Mawson J. , 2003). Normalmente, casi todo el ácido propiónico es elaborado por síntesis química, sin embargo se puede obtener a través de fermentación de la lactosa del lactosuero a condiciones de fermentación de 30°C y pH 6.5-7.5 (Mawson J. , 2003).

j) Ácido láctico

El lactosuero ha sido un medio de cultivo para la producción de ácido láctico por vía biotecnológica (Ghasemi, y otros, 2009), la fermentación láctica ha sido típicamente conducida en modo batch utilizando cepas homofermentativas de *Lactobacillus delbrueckii* sbp. *bulgaricus*, y *Lactobacillus casei* donde fuentes de complejos nutricionales como licor de maíz, malta o extracto de levadura pueden ser suplementados al medio (Wit, 2003) (Serna & Rodriguez, 2005)

k) Obtención de jarabes edulcorantes.

La lactosa al hidrolizarse forma glucosa y galactosa. Este hidrolizado presenta ciertas características que lo hacen más interesante: el poder edulcorante combinado es aproximadamente el 80% del de la sacarosa, es unas 3 ó 4 veces mas soluble que la lactosa y además los monosacáridos son absorbidos fácilmente en forma directa por la mucosa digestiva (Zadow J. G., 1984).

Por lo antes mencionado, se puede decir que la hidrólisis de la lactosa resulta un proceso atractivo ya que: un porcentaje significativo de la población mundial es intolerante a la lactosa, por lo que no pueden beber leche sin sufrir problemas gastrointestinales (Barnes, 1994), (Walter-Smith, 1988); por otra parte, la lactosa es un azúcar relativamente insoluble (aproximadamente 10 veces menos que la sacarosa) y cristaliza durante su almacenamiento, especialmente si está concentrada; y por último, la producción de quesos deja como principal subproducto, como ya se mencionó, grandes cantidades de suero con alta concentración de lactosa. La hidrólisis de la lactosa contenida en el suero de quesería brinda la posibilidad de aprovechar una importante fuente de carbono.

La hidrólisis de la lactosa se puede realizar mediante ácidos fuertes, resinas de intercambio iónico o empleado enzimas,

siendo este último método el que asegura un proceso de hidrólisis sin afectar los otros componentes presentes. Teniendo en cuenta estas características en la literatura se indica al método enzimático como el más conveniente para la industria alimenticia (Ladero y otros, 2000). La enzima utilizada para la hidrólisis de lactosa se denomina β -galactosidasa o más comúnmente lactasa.

1) Quesillo

El proceso más antiguo para la utilización del lactosuero es el calentamiento para recuperar la proteína del mismo con un concentrado proteico insoluble. La proteína láctea obtenida tiene muy variadas aplicaciones entre las cuales se citan la elaboración de sopas, condimentos para ensaladas, pastas enriquecidas con proteína, helados, productos dietéticos y productos cárnicos. El aprovechamiento del lactosuero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo, es una alternativa de aplicación de este subproducto. El quesillo, un queso de pasta hilada de pH bajo es uno de los productos aceptados como exportables. (Londoño M. , 2006).

El suero de queso es un derivado que puede ser utilizado en la elaboración de muchos sub-productos como por ejemplo, en la elaboración de otros productos alimenticios que

resultan ser beneficioso para nuestra salud, algunos de ellos se muestran en la Tabla 4.

Cuadro 4: Algunas aplicaciones y beneficios del lactosuero en alimentos.

Aplicaciones	Algunos beneficios
Productos de panadería	Incrementar valor nutricional, funcionar como emulgente, reemplazar la adición de huevo, dar cuerpo a la masa.
Quesos	Incrementar valor nutricional, funcionar como emulgente, como gelificante, mejorar propiedades organolépticas, mejorar consistencia, incrementar la cohesividad.
Bebidas	Incrementar el valor nutricional, mejorar la solubilidad, mejorar la viscosidad, mejorar la estabilidad coloidal
Postres	Funcionar como emulgente, dar cuerpo y textura a los productos.
Confitería	Funcionar como emulgente y facilitar el batido.
Productos cárnicos	Funcionar como pre-emulgentes, gelificante, mejorar solubilidad.
Otros	Alimentos de mayor valor nutricional y bajo costo, alimentos para deportistas, personas de la tercera edad, fórmulas nutricionales especiales para mantener peso saludable o aumentar consumo de proteína, fórmulas infantiles, especiales para alimentación hospitalaria

Fuente: Poveda (2013).

2.2. β - GALACTOSIDASA

La β -galactosidasa es una hidrolasa que actúa sobre galactósidos hidrolizándolos a monosacáridos. Esta enzima fue una de las primeras en ser aislada y purificada a partir de diferentes fuentes naturales como plantas, animales y microorganismos (Rastall, 2010) (Yang & Bednarcik, 2001a). En la tabla 5 se presenta algunas de las fuentes de β -galactosidasa, encontradas en la naturaleza.

La estructura de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* fue analizada por (Pereira-Rodriguez, et al., 2012), encontrando cuatro subunidades idénticas, cada una con 1025 aminoácidos y peso total de 475957 Da. En la figura 3 se presenta la estructura 3D de las cuatro subunidades de la enzima, resaltadas cada una en colores diferentes.

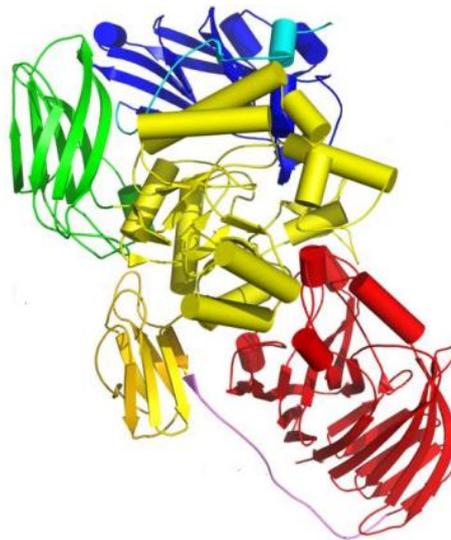


Figura 3: Estructura 3D de β -galactosidasa obtenida a partir de *K. lactis*. (Ángel Pereira-Rodríguez, 2012)

Cuadro 5: Fuentes de β -galactosidasa.

Bacterias	Hongos	Levaduras	Plantas	Órganos de animales
<i>Bacillus megaterium</i>				
<i>Clostridium acetobutylicum</i>				
<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus foetidus</i>	<i>Bullera singularis</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	Albaricoque	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Almendra	Cerebro
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Auerobasidium pullulans</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Fruto de café	Intestinos
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Melocotón	Tejido de la piel
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	<i>Penicillium canescens</i>	<i>Saccharomyces anamensis</i>	Semillas de Alfalfa	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Saccharomyces fragilis</i>		
<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Streptomyces violaceus</i>	<i>Saccharomyces lactis</i>		
<i>Streptococcus thermophilus</i>				
<i>Thermus aquaticus</i>				

Fuente: Panesar et al., 2010.

La β galactosidasa cataliza la transferencia de una unidad de galactosa presente en un β -galactósido como la lactosa, a un aceptor que contiene un grupo hidroxilo. (Zhou & Chen, 2001). Esto sucede a través de un mecanismo general de reacción propuesto en dos pasos: a) formación del complejo galactósido-enzima y liberación simultánea de glucosa y b) el complejo galactósido-enzima es transferido a un aceptor nucleofílico que contiene grupo hidroxilo; cómo podemos observar en la **figura 4**.

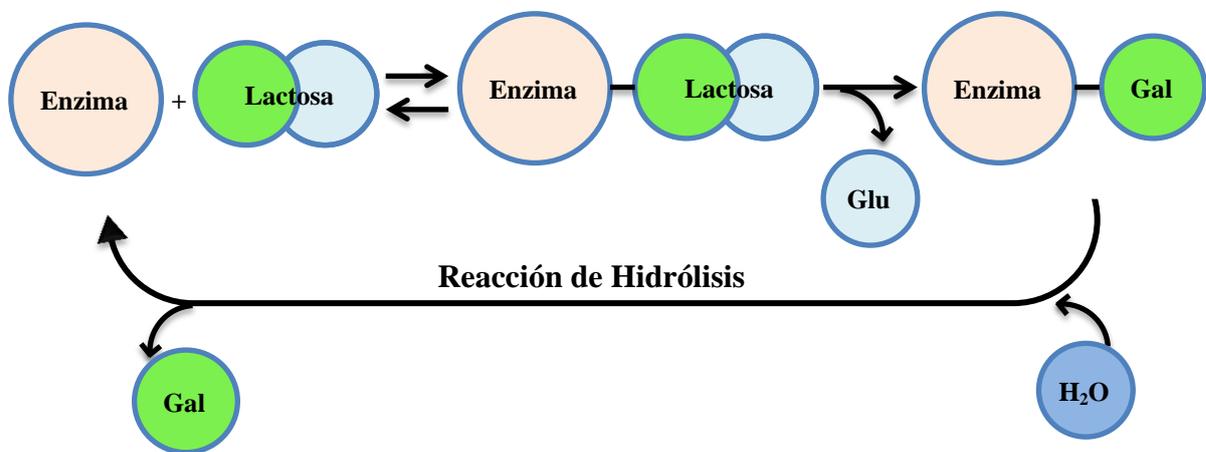


Figura 4: Mecanismos de reacción hidrólisis de lactosa por β - galactosidasa
(Enzima) Adaptado de (Zhou & Chen, 2001).

2.3. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Nuestra investigación tiene como importancia determinar la mayor acción hidrolizante en estas dos enzimas específicas procedentes de (*Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus oryzae*) actuando independientemente sobre el suero de quesería a diferentes condiciones específicas con la finalidad de obtener azúcares simples que nos proporcione una gran cantidad de energía utilizando como materia

prima residuos industriales, Y esto es muy ventajoso para la salud como para la industria, la galactosa al sintetizarse en glucosa ayudaría a generar 4,1 kilocalorías por gramo de energía, y esta sería muy similar a la sacarosa, que sea más manejable para la elaboración de nuevos productos.

2.4. FUNDAMENTACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION

La fabricación de queso, y corresponde a 85 a 95% del volumen de leche. El suero líquido retiene aproximadamente el 55% de los nutrientes de la leche (Mandal, et al., 2012), de los cuales la lactosa (4,55% w/v) es el más abundante.

Los elevados valores de DBO del lactosuero, están en un rango de 30-60 kg/m³, resultante de sus altos contenidos de lactosa (Hatzinikolaou, y otros, 2005) aumentando considerablemente la carga contaminante del vertido final (Valencia & Ramírez, 2009).

Aunque varias posibilidades de explotación de queso de suero de leche se han ensayado en los últimos 50 años, aproximadamente un cuarto de la producción mundial de queso de suero de leche no es tratada, cuando el suero de leche es desechado al medio ambiente este se descompone y la descomposición de este es tóxico para el medio ambiente, robando el oxígeno de los arroyos y ríos resultantes en condiciones anaeróbicas que conducen a la destrucción de la vida acuática en zonas potencialmente grandes. Este efluente lácteo promueve el crecimiento de algas y bacterias en el sistema de agua que utilizan, finalmente, el oxígeno haciendo que los peces para sofocar y morir. Debido a esto, la

eliminación del suero ha sido una gran preocupación en todo el mundo (Shete & Shinkar, 2013).

El Perú es uno de los países que fuertemente está desarrollándose en la cadena láctea pero a la vez este desarrollo está causando un sub-producto que es el suero de queso lo cual como pequeñas empresas en su arduo surgimiento están contaminando nuestro medio ambiente.

En la actualidad se está desarrollando diferentes aplicaciones para el lactosuero para solucionar el problema de su disposición. Una alternativa es el uso de lactosuero como sustrato para varios procesos fermentativos incluyendo la producción de etanol, metanol, proteína de levadura, goma xantano (Fu & Tseng, 1990) o ácidos orgánicos tales como lactato, propionato o acetato. (Huang & Yang, 1998).

Sin embargo, la lactosa es uno de los azúcares más difícilmente fermentados, el número de microorganismos fermentadores es limitado y el uso de microorganismos genéticamente modificados para su bioconversión incrementa los costos del proceso (Ramakrishnan & Hartley, 1993). Su hidrólisis da como resultado sus monosacáridos constituyentes: glucosa y galactosa, facilitando así sus procesos fermentativos (Illanes & Enzyme Biocatalysis., 2008).

La hidrólisis de la lactosa del lactosuero es una alternativa muy útil así como los productos hidrolizados los cuales son más dulces y se pueden utilizar para el desarrollo de aditivos para la dieta de los seres humanos humana y animal (Ladero M. , Santos, Garcia, & Garcia-Ochoa, 2000).

Aparte de esto, los monosacáridos formados podrían ser convertidos posteriormente en bioetanol después de la fermentación usando microorganismo adecuado (Ladero M. , Santos, Garcia, & Garcia-Ochoa, 2000).

El bioetanol así formado podría ser mezclado con la gasolina, después de la purificación adecuada. Por lo tanto el proceso prometedor de la hidrólisis de lactosa se ha estudiado durante las últimas dos décadas por varias razones (Jurado E. , Camacho, Luzón, & Vicaria, 2002).

El proceso de deslactosar, es el método mejor valorado industrialmente en los últimos tiempos, pero presenta algunas desventajas como: El tiempo requerido para la hidrolisis y el alto costo de los equipos para la producción de las enzimas.

La lactosa (β -galactopyranosyl-(1,4)-D-glucoopyranose), el principal azúcar de la leche, puede ser hidrolizado por β -D-galactosidase liberar D-glucose and D-galactose, haciendo posible el consumo de leche y otros productos lácteos por personas intolerantes a la lactosa (Haider & Husain, 2009).

Del mismo modo la lactosa es menos fermentable que otros azúcares, también es uno de los principales obstáculos para el suero de leche utilizable ya que provoca la cristalización a bajas temperaturas. Estos problemas se pueden resolver si la lactosa de suero de leche se hidroliza para formar glucosa y galactosa (Matioli , Moraes , & Zanin, 2003).

A medida que se avanza en la cadena agroindustrial, se incrementa el valor agregado y el grado de transformación de los productos lácteos.

2.4.1. Hidrólisis de lactosa con β -galactosidasa

La hidrólisis de lactosa, para formar glucosa y galactosa, es una reacción interesante desde diversos puntos de vista (Venkatesh, Okos, & Wankat, 1993) (Al-Muftah & Abu-Reesh, 2005).

En primer lugar, la insuficiencia intestinal de lactasa, que padece un significativo porcentaje de la población, se traduce en una incapacidad para digerir la leche y/o productos lácteos, sufriendo trastornos gastrointestinales. Por otra parte, tecnológicamente, la lactosa es fácilmente cristalizable y poco soluble, lo que dificulta ciertos procesos en la industria láctea, evitándose estos problemas con la hidrólisis enzimática (Hobman, 1984) (Shin, Park, & Yang, 1998) (Mehaia, Cheryan, & Álvarez, 1993).

Cabe recalcar que este material presenta una demanda biológica de oxígeno muy elevada y persistente, siendo costoso de tratar como residuo. Por ello, se han desarrollado numerosos procesos para aprovechar los componentes orgánicos del suero. La primera etapa en estos tratamientos consiste, usualmente, en la recuperación de los compuestos proteicos que no se utilizan después de la preparación del queso. Una vez extraída la proteína, queda una solución que contiene lactosa y sales

diversas, y que puede hidrolizarse de forma enzimática (Galan, 1999).

La lactosa se puede hidrolizar también mediante ácidos, aunque, de esta forma, da lugar a la aparición de color y a la precipitación de proteínas y de sales que ensucian las resinas ácidas cambiadoras de iones, por lo que no es adecuado el tratamiento para leche y lactosueros. Muchos de estos problemas pueden eliminarse con la hidrólisis enzimática de la lactosa con β -galactosidasa (Galan, 1999).

2.4.1.1. β - galactosidasa

La β -galactosidasa o β -D-galactósido lactohidrolasa es una enzima que forma parte del citoplasma celular de muchos microorganismos y puede ser constitutiva o inducible (Miller, 1972)

- Características

Esta molécula tetramétrica contiene cuatro cadenas idénticas y cuatro sitios activos por tetrámetro, tiene 1021 aminoácidos por cada cadena y su peso molecular es de alrededor de 100 000 Da cada subunidad. (Huber & Zabin, 1982)

2.4.1.2. Mecanismo de las β -galactosidasa

Las β -Galactosidasas catalizan la hidrólisis enzimática del enlace glucosídico entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y una molécula no-carbohidrato vía catálisis ácida general, la cual requiere dos residuos críticos: un donador de protones y una base nucleofílica. Esta hidrólisis ocurre vía retención completa de la configuración anomérica. La familia 35-glucosa-hidrolasa ha sido clasificada por contener el patrón de secuencia consenso putativo G-G-P-[LIVM](2)-x(2)-Q-x-E-N-E-[FY] en el sitio activo, donde los aminoácidos denotados son conservados, los aminoácidos [LIVM] y [FY] son sustituciones conservadas, y x es cualquier aminoácido (Henrissat, 1998). Se predice que el segundo residuo glutamato en esta secuencia actúa como el donador de protones en el mecanismo catalítico sobre la base de similitud con otras familias de glucosa hidrolasas ((Henrissat B C. I., 1995) (White A, 1997) (Henrissat B D. G., 1997) (Juers DH, 2001)

2.4.2. Enzimas que hidrolizan la lactosa del suero de quesería.

Hay varias fuentes de β -galactosidasas, no todas son aceptadas o recomendadas como seguras. La lactasa de *Escherichia coli*, aunque sea una especie bastante estudiada, no se utiliza en el

procesamiento de alimentos debido a su alto costo y provoca problemas de toxicidad cuando se usan extractos crudos de coliformes. Las producidas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Kluyveromyces sp.*, (*lactis* o *fragilis*) son consideradas fuentes seguras de utilización (Harju, Kallioinen, & Tossavainen, 2012) (Tomás, 1998).

Generalmente, las preparaciones comerciales de lactasas de origen fúngico, especialmente *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, son de gran importancia, cuando las condiciones de operación están en un rango de pH ácido (2,5-4,5), siendo apropiadas para la hidrólisis del suero ácido. Las β -galactosidasas provenientes de levaduras, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus*, tienen un pH óptimo concentrado en la región neutra, son bien aceptadas para la hidrólisis de la lactosa de la leche y del suero dulce. Entre tanto, estas últimas son fuertemente inhibidas por alta concentración de calcio en la leche y pequeñas concentraciones de sodio. Son también inhibidas por la presencia de galactosa y glucosa (N godawithana & Reed, 1993) (N unes, Roig, & Alegre, 1993).

Estas levaduras también presentan temperatura óptima de actividad entre 30°C y 40°C, lo que representa una desventaja, pues facilita la contaminación microbiana, siendo aconsejable, un periodo corto de hidrólisis, de 2 a 3 horas (Mahoney, 1997).

Un proceso eficiente y económicamente viable de la hidrólisis de la lactosa del suero depende del costo de la producción de la enzima en combinación con una cinética favorable y las propiedades de estabilidad. La cinética determina los factores que afectan la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Los factores más importantes son: la concentración de enzima, la concentración de sustratos, inhibidores y activadores, pH, fuerza iónica y temperatura.

El análisis de estos factores es importante en el conocimiento de la naturaleza de la reacción enzimática (Hatzinikolaou, y otros, 2005). Varios autores han modelado la hidrólisis de la lactosa usando enzimas de varias fuentes. Las ecuaciones y mecanismos enzimáticos para estos modelos cinéticos se describen en la tabla 6 dependiendo de la fuente de la enzima ésta seguirá un modelo cinético específico. En este trabajo, se evaluó el efecto de la temperatura, el pH y la concentración de enzima sobre el grado de hidrólisis y su productividad de la acción hidrolizante de las β -galactosidasas de *K. lactis* y *A. Oryzae*.

Cuadro 6: Modelos enzimáticos considerados para la determinación de los parámetros cinéticos

Modelo cinético	Mecanismo enzimático	Ecuación
1 Michaelis-Menten sin inhibición.	$E + S \xrightleftharpoons[K_{-1}]{K_1} ES \xrightarrow{K_2} E + P$	$V = \frac{V_{Max}C_S}{K_m + C_S}$
2 Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto.	$E + S \xrightleftharpoons[K_{-1}]{K_1} ES \xrightarrow{K_2} E + P \quad E + P \xrightleftharpoons[K_{-3}]{K_3} EP$	$V = \frac{V_{Max}C_S}{K_m(1 + \frac{C_P}{K_i}) + C_S}$
3 Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por producto.	$E + S \xrightleftharpoons[K_{-1}]{K_1} ES \xrightarrow{K_2} E + P \quad ES + P \xrightleftharpoons[K_{-4}]{K_4} ESP$	$V = \frac{V_{Max}C_S}{K_m + C_S(1 + \frac{C_P}{K_i})}$
4 Michaelis-Menten con inhibición no-competitiva por producto.	$E + S \xrightleftharpoons[K_{-1}]{K_1} ES \xrightarrow{K_2} E + P \quad E + P \xrightleftharpoons[K_{-3}]{K_3} EP \quad ES + P \xrightleftharpoons[K_{-4}]{K_4} ESP$	$V = \frac{V_{Max}C_S}{K_m(1 + \frac{C_P}{K_i}) + C_S(1 + \frac{C_P}{K_i})}$

Fuente: Nelson & Cox, 2008.

Basados en diferentes mecanismos enzimáticos para determinar los parámetros cinéticos de la enzima. La discriminación de los modelos cinéticos se hizo mediante criterios estadísticos (Papayannakos, Markas , & Kekos, 1993) (Adam, Rubio-Teixeira, & Polaina, 2004).

Existen diferentes enzimas capaces de hidrolizar la lactosa presentes en el suero de quesería, dependiendo del origen microbiológico las enzimas presentan variabilidad en su actividad hidrolizante (CHR- HANSEN, 2015).

La temperatura y el pH óptimos de las β -galactosidasas varían según el origen, aunque la especificidad es esencialmente la misma. Las de uso comercial se encuentran dentro de dos grupos: “ácidas” y “neutras”. Las “ácidas” presentan una actividad óptima a un pH entre 3 y 5 y una temperatura entre 46 y 55 °C, mientras que las condiciones para las “neutras” son un rango de pH de 6,5 y 7,3 y una temperatura entre 35 y 40 °C. Generalmente las enzimas producidas por levaduras son consideradas neutras y las obtenidas a partir de hongos, ácidas. (Rodríguez, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. β – Galactosidasas

3.1.1.1. ASTROLAC LX2000 (*Kluyveromices lactis*)

ASTROLAC LX2000 (HR-HANSEN) es una preparación de β - galactosidasa purificada a partir de *K. lactis*. (Anexo I)

El producto debe ser almacenado en su envase original, de 4 – 15 °C. Su actividad es ≥ 2000 NLU/g a condiciones de pH 6.5 y 45 °C.

3.1.1.2. β – Galactosidasa (*Aspergillus oryzae*)

Es una preparación de β - galactosidasa purificada a partir de *A. oryzae* (SIGMA ALDRICH). (Anexo II)

El producto debe ser almacenado en su envase original a -20 °C. Para su actividad tenemos que una unidad de enzima hidrolizará 1 μ mol de lactosa por minuto a condiciones de pH 4.5 y temperatura de 30 °C.

Los productos cumplen con las especificaciones de la FAO/WHO's Joint Expert Committee of Food Additives (JECFA), con el Food Chemical Codex (FCC) y con las directrices exigidas por la Food Enzymes of the Scientific

Committee of Food (SCF) en Estados Unidos para su uso en la industria alimentaria.

3.1.2. Lactosa

Se utilizó lactosa en polvo monohidratada de grado extra pura de la marca LOBA CHEMIE para la mayoría de los experimentos.

3.1.3. Suero de quesería

El suero de quesería fue obtenido de la elaboración de queso a partir de leche de vaca en la empresa “FAMILIA SANDOVAL” localizado en el valle de Santa.

Una vez traído de la fábrica, se esterilizó a 110°C por 20 minutos para su mejor conservación, luego fueron almacenados a -20°C en alícuotas de 100 - 200 mL.

3.1.4. Tampones

Los tampones empleados fueron el tampón fosfato de potasio 0.1 M para enzima de *K. lactis* y tampón acetato de sodio 0.1M para la enzima de *A. oryzae*. Presentan la siguiente composición:

3.1.4.1. Tampón fosfato de potasio 0.1 M

Se preparó a pH de 6,5; 7 y 7,5 compuesto por:

- Fosfato sódico monobásico
- Fosfato sódico dibásico

3.1.4.2. Tampón acetato de sodio 0.1 M

Se preparó a pH de 4; 4,5 y 5 compuesto por:

- Ácido acético glacial
- Acetato de sodio Trihidratado

3.2. DISEÑO Y CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

Cuadro 7: Parámetros de trabajo para cada una de las enzimas

	<i>K. lactis</i> - Astrolact LX2000 (CHR-HANSEN)			<i>A. oryzae</i> - β -Galactosidase (SIGMA-ALDRICH)		
	30	35	40	25	30	35
Temperatura (°C)	30	35	40	25	30	35
pH	6.90	7.30	7.60	4.00	4.50	5.0
Concentración de Enzima (mg/mL)	0.0125	0.0188	0.0250	0.0125	0.0188	0.0250

- En la hidrólisis se determinó la actividad enzimática y grado de hidrólisis siguiendo el procedimiento de toma de muestra en cada experiencia de 3mL en intervalos de tiempo variados, para su posterior análisis.
- La producción de glucosa en el tiempo se analizó por HPLC empleando la columna SUGAR SZ5532 de 6.0 m IDx150 mL, que es una columna de intercambio iónico diseñado para la separación de carbohidratos, fase móvil compuesta por acetonitrilo y agua ultra pura, el detector Índice de refracción: IR HP 1047^a y la actividad enzimática se determinó según el método de velocidades iniciales.

3.3. METODOS

3.3.1. Acondicionamiento de la materia prima y análisis.

Se analizó el suero de la quesería obtenido de la elaboración de queso de la familia Sandoval – la cual está ubicada cerca la panamericana norte 950 – Santa, Chimbote - Perú.

El suero obtenido en dicha elaboración posteriormente fue esterilizado a 110 °C por 20 minutos en una autoclave AVS/EV Electronica Venetta. A esta temperatura se asegura que no haya una degradación de la lactosa (Méd. Vet. Aníbal Zunino, 2006)

Luego fue almacenado en alícuotas de 100-200 mL a una temperatura de -20 °C para su posterior utilización.

3.3.2. Determinación de la grasa mediante el método de Gerber (Instituto Adolfo Lutz, 2005)

El contenido de grasas fue medido por el método de Gerber, basado en la separación y cuantificación de la grasa por medio de un tratamiento de la muestra con ácido sulfúrico y alcohol isoamílico. Se utilizó una Centrifuga: Sigma (2-16 pk) Sartorius con capacidad para 4 Tubos de centrifuga, dicha determinación del contenido de grasas se realizó por triplicado.

Se pesó los lactobutirómetros con sus respectivos tapones para comprobar si son los pesos equivalentes. Se transfirió 11 mL de la muestra de suero de quesería en cada lactobutirómetro para

luego con la ayuda de una pipeta transferir 10 mL de ácido sulfúrico en el butirómetro tratando de evitar quemaduras en contacto con el ácido y finalmente se agregó 1 mL de alcohol isoamílico.

Se revolvió hasta que estuvo completamente disuelto. Luego se colocó en la centrifuga a 1200 rpm durante 15 minutos para un baño de agua (63 ± 2) °C durante 2 a 3 minutos con el tapón hacia abajo. Se retiró el lactobutirómetro de del baño maría en posición vertical (tapón hacia abajo).

a) Material

Lactobutirómetros Gerber con tapón, pipetas y micropipetas de 10 y 1 mL, termómetro, termocentrífuga Gerber o de centrífuga, baño maría, toallas de papel y guantes esterilizados.

b) Reactivos

- Ácido Sulfúrico: 10.0 mL ($20^{\circ}\text{C}+2^{\circ}\text{C}$).
- Alcohol isoamílico: 1.0mL ($20^{\circ}\text{C}+2^{\circ}\text{C}$).
- Producto Lacteo: 10.75 mL ($20^{\circ}\text{C}+2^{\circ}\text{C}$).

3.3.3. Determinación de los microorganismos mesófilos.

Se realizó un análisis microbiológico de mesófilos en medio PCA (Plate Count Agar) según el método oficial AOAC 966.23 (AOAC International, 2011).

3.3.4. Determinación de levaduras

Realizado según método de la NTE INEN1529-10:2013, este método se basa en el cultivo entre 22 °C y 25 °C de las unidades propagadoras de mohos y levaduras, utilizando la técnica de recuento en placa por siembra en profundidad y un medio que contenga extracto de levadura, glucosa y sales minerales.

3.3.5. Determinación de concentración de lactosa, glucosa, galactosa por HPLC (Correa N. & Mosquera M., 2012)

Para la determinación de concentración de azúcares se utilizó Cromatografía Líquida de Alto Resolución (HPLC) comparando y validando los resultados con estándares de lactosa, glucosa y galactosa. Las características del equipo fueron: HPLC (Ultimate 3000 SLC nano System, THERMO SCIENTIFIC) constituido por una bomba, con desgasificador en línea, un horno de columnas, un automuestreador, con volumen de inyección de 10 µL, un detector de Índice de Refracción. Se analizaron las muestras en una columna SUGAR SZ5532 (6 mm ID x 150 mL) bajo las siguientes condiciones de operación: 65°C temperatura de columna, fase móvil agua desionizada a un flujo de 1 mL/min y 55°C temperatura en el detector de índice de refracción. Los azúcares cuantificados fueron lactosa, galactosa y glucosa.

a) Preparación de la muestra

Se tomó una muestra de 1 mL con una jeringa 5 mL la cual se filtró a través de una membrana de nailon de 0,20 μm añadiéndose sobre un injerto dentro de un vial, este procedimiento se realizó por triplicado.

b) Preparación de soluciones estándar

Los patrones de glucosa, lactosa y galactosa prepararon pesando 0.06 g de cada azúcar en un matraz aforado, enrazado con agua desionizada grado HPLC a 1 mL. Cada estándar queda a una concentración de 60 g/L.

c) Curva de Calibración

La curva de calibración se realizó preparando en un matraz aforado soluciones 10, 20, 30, 50 y 60 g/L de cada azúcar a partir de la mezcla de la solución de los azúcares que tenían concentración de 60 g/L; para obtener cada una de las soluciones se utilizó 170, 330, 500, 830 y 1000 μL de la mezcla de azúcares. Esta mezcla de patrones fue inyectada en el cromatografía, realizándose por triplicado.

Las condiciones cromatográficas a las que se trabajó se muestran en la tabla 8.

Cuadro 8: Condiciones Cromatográficas para la determinación de azúcares

Parámetros	Analito
	Azúcares
Columna	SUGAR SZ5532 (6 m ID x 150 mL)
Fase móvil	H2O desionizada: acetonitrilo 30:70
Detector	Índice de refracción:
Flujo (mL/min)	1
T° de la columna	65

La identificación se realizó por comparación de los tiempos de retención (t_R) de las soluciones de las muestras con las de los patrones y también se mezclaron los estándares puros con cantidades conocidas, para verificar si el pico evaluado correspondía al analito de interés.

3.3.6. Determinación de la concentración de proteína (Método Kjeldahl- Método de la A.O.A.C., 1995).

Para la determinación de proteínas en el suero de quesería se utilizó un equipo de micro Kjeldahl y un equipo destilador.

Se pesó aproximadamente 1 g de muestra la cual fue sometida a digestión con los siguientes reactivos: 25 mL de H_2SO_4 , 15 g de K_2SO_4 y 5 gr de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ a 420 °C aproximadamente por 90 minutos.

Se dejó enfriar para continuar con el proceso de destilación en la cual se trasvasó a un Erlenmeyer junto con 35 mL de H_3BO_3 y 2 gotas de la solución indicadora, la solución al tornarse color verde indica que ya esta lista para ser titulada.

Se tituló la muestra con 0.1N de HCL. Un color violeta indicó el punto final de la titulación.

Para los cálculos del % de proteína presente en el suero de quería se utilizó el factos para leche y lácteos de 6.38.

3.3.7. Determinación de rango de linealidad y actividad enzimática.

Para determinar los parámetros cinéticos de Michaelis - Menten, se aplicó el método de las velocidades iniciales.

Una unidad de actividad enzimática (símbolo U) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de lactosa por liberación de 1 μ mol de azucares reductores, expresados como glucosa y galactosa por minuto a temperatura y pH específicos para cada enzima. Se utiliza también en combinación con otras unidades (U/mg o U/mL) para señalar respectivamente la actividad enzimática.

3.3.7.1. Principio

La velocidad de formación de los sustratos de una reacción en los correspondientes productos en una

reacción enzimática que transcurre en condiciones de estado estacionario es dependiente tanto de las concentraciones de la enzima como de los sustratos.

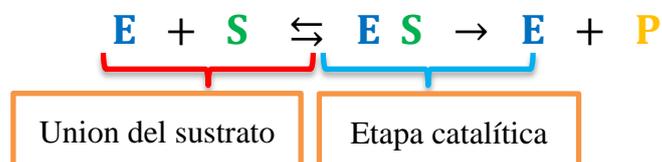
Normalmente, esa dependencia puede expresarse matemáticamente por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Se puede transformar algebraicamente en formas más útiles para representar los datos experimentales. Una transformación común se obtiene tomando simplemente los inversos en ambos lados de la ecuación de Michaelis-Menten, separando los componentes del numerador en el segundo miembro de la ecuación la cual nos daría:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]} \rightarrow \frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

La forma usual es a través de mediciones de velocidad inicial de reacciones a diferentes concentraciones de aquellas sustancias que la afectan. La manera más adecuada de obtenerlos es por linealización de las ecuaciones cinéticas.



A través de la medición de intercepto o pendiente de la recta resultante es posible evaluar los parámetros V_{max} y K_m , como indica en la siguiente imagen utilizando el método lineweaver-burke.

Cuadro 9: Métodos de linealización para determinar parámetros cinéticos

Método	Eje Y	Eje X	Intercepto Eje Y	Intercepto Eje X	Pendiente
Lineweaver – Burke	$1/v$	$1/s$	$1/v$	$-1/k$	k/V
Hames	s/v	S	k/V	$-k$	$1/v$
Eadie – Hofstee	V	v/s	V	v/k	$-k$

Fuente: (Ladero Galán, 1999).

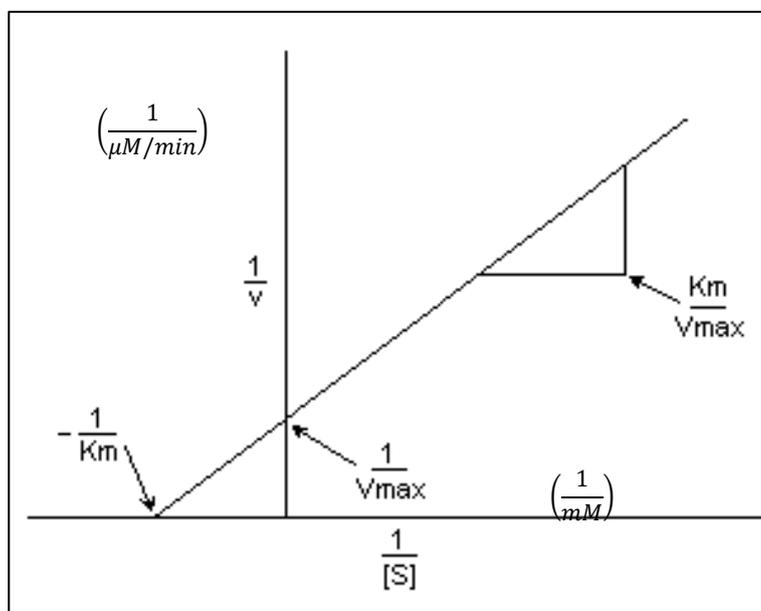


Figura 5: Determinación de parámetros cinéticos mediante método de inversos de Lineweaver – Burke.

La grafica de lineweaver-burk o representación de doble reciproco es la forma más común de mostrar los datos cinéticos. El resultado de este tipo de representación es una línea recta cuya ecuación es $y=mx+c$, siendo el punto de corte entre la recta y el eje de ordenadas equivalente a $1/V_{\max}$, y el punto de corte entre la recta y el eje de abscisas equivalente a $-1/K_m$.

3.3.7.2. Procedimiento

Se realizaron a diferentes diluciones del concentrado enzimático β -galactosidasa, 1:1; 1:2; 1:4, 1:8 y 1:10, luego se graficó la concentración de producto contra el tiempo de reacción y se expresara correctamente los valores de las actividades volumétricas (UI/mL) y específica (UI/mL):

Se prepararon 11 tubos de ensayo, agregar a cada uno 2,5 mL de solución de lactosa a la concentración definida y a pH 6.5 y colocarlos en un baño maría a 45°C durante 3 minutos.

Luego se le agregó 0,025 mL del concentrado enzimático β -galactosidasa a cada uno de los 11 tubos de ensayo y se dejó reaccionar por los tiempos requeridos para el experimento: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 28, 44 y 64 minutos respectivamente.

Simultáneamente en otros dos tubos se realizaron los blancos para el sustrato y enzima. Finalmente se hizo la determinación de Azúcares Reductores por el método DNS.

3.3.8. Determinación de la hidrólisis de Lactosa con β – galactosidasa

a) Equipos e instalaciones

- Balanza de precisión
- pH-metro
- Shaker
- Multimodal (Espectrofotómetro)

b) Materiales y reactivos.

Para las reacciones de hidrólisis enzimática de lactosa se utilizaron tampones cuya composición es específica para cada enzima ayudando a mantener un pH constante durante la hidrólisis.

Los ensayos se llevarán a cabo en Erlenmeyers de 100 mL con un volumen de 50 mL, situados en un baño maría shaker FOSS WR 1024 WATHER BATH manteniendo la temperatura y pH fijos durante el proceso. Se colocaron en los Erlenmeyer de 100 mL, 50 mL de medio de reacción (suero de quesería), previamente el pH estabilizado con tampón.

Luego se estableció la temperatura del trabajo del baño maría shaker; con una agitación constante de 95 rpm.

Las condiciones de concentración de enzima, pH y temperatura se establecieron según el diseño experimental.

Teniendo las condiciones se adicionó 1mL de enzima a los Erlenmeyers de donde luego se tomaron muestras de 2.5 mL según los tiempos establecidos. La reacción se detuvo colocando las muestras en agua hirviendo durante 3 minutos y posteriormente se enfrió en hielo durante 5 minutos para realizar los respectivos análisis.

3.4. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Para el procesamiento y análisis de datos se utilizó los siguientes programas computarizados:

- Software de diseño estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.I
- Software de diseño estadístico STATISTICA 10
- Hoja de cálculo Excel

De nuestro diseño en STATGRAPHICS tenemos:

- Clase de diseño: Superficie de respuesta (3 factor Box-Behnken design, 1 block, 15 runs)
- Base de diseño:
 - Número de factores experimentales: 3.
 - Número de corridas: 15.
 - Aleatorizado: Si.

Cuadro 10: Factores a los que serán sometidas las diferentes enzimas

	<i>Kluyveromyces lactis</i> - Astrolact LX2000 (CHR- HANSEN)			<i>Aspergillus oryzae</i> - β - Galactosidase (SIGMA- ALDRICH)		
Temperatura (°C)	25	35	45	25	30	35
pH	6.5	7	7.5	4	4.5	5
Concentración de Enzima (mg/mL)	0.1	0.25	0.5	0.1	0.25	0.5

3.5. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS (ANEXO 4)

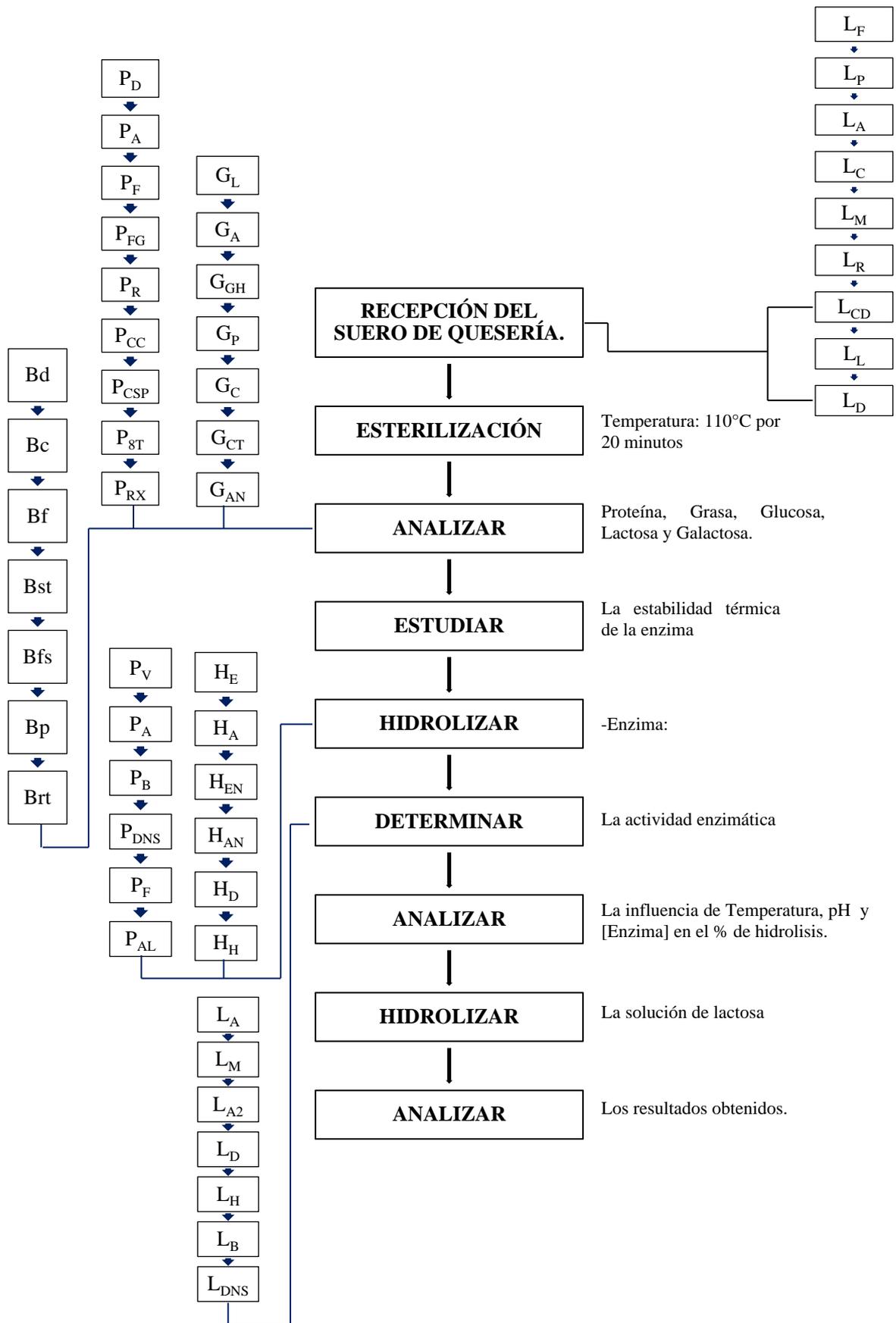


Figura 6: Diagrama de proceso de investigación.

3.5.1. Descripción breve del proceso

- El suero de quesería, después de obtenido se esterilizó a una temperatura de 110 °C por 20 minutos.
- Luego de esterilizado se realizaron los siguientes análisis: Determinación de glucosa, galactosa y lactosa mediante HPLC, determinación de proteínas mediante el método micro Kjeldhal y contenido de grasa por el método de Gerber.
- Teniendo caracterizado el suero de quesería se realizó la hidrólisis de lactosa a nivel de Erlenmeyers de 100 mL y volumen de reacción de 50 mL, utilizando un baño maría shaker, dándole las condiciones necesarias para estudiar el efecto de los parámetros siguientes: temperatura de y pH de y concentración de la enzima β -galactosidasa en el % de hidrolizado y productividad.
- Se determinó la actividad de cada enzima a condiciones de Temperatura y concentración de enzima por el método de velocidades iniciales.
- Se analizó la influencia de la concentración de enzima, temperatura y pH en % de hidrolizado obtenido y productividad.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis y desarrollo de nuestro proyecto de investigación, como primer paso se esterilizó el suero de quesería, luego se caracterizó para ser sometido a un proceso de hidrolisis usando dos enzimas específicas, del mismo modo para cuantificar del contenido de azúcares en nuestra materia prima se realizó un proceso en el cual se llegó a desarrollar el método analítico cromatográfico el cual nos permitió la separación y la cuantificación de lactosa, glucosa y galactosa, se probaron distintas condiciones hasta conseguir una máxima separación cromatográfica y detección.

4.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

En este estudio se utilizó una columna SUGAR SZ5532 de 6.0 mmIDx150mmL, que es una columna de intercambio iónico diseñado para la separación de carbohidratos (mono y disacáridos tales como fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa). Debe ser usada con una fase móvil compuesta principalmente por acetonitrilo y agua ultrapura.

Debido a que en la determinación de carbohidratos el HPLC está acoplado a un detector de índice de refracción, no se puede realizar una elución en gradientes, por lo que las preparaciones de fase móvil, se diseñaron en la utilización de sistema de elución en forma isocrática. (Ureña M. , et al., 2007), propone que la fase móvil utilizada para determinar carbohidratos, debe contener los solventes acetonitrilo y agua desionizada, este autor recomienda una proporción de acetonitrilo/agua 80/20 v/v a una temperatura de columna de 30 °C y

un flujo de 1,5 mL/min. Por otra parte, la Norma chilena, NCh 574 plantea una fase móvil de acetonitrilo/agua, 80/20 v/v, un flujo de 1,3 mL/min y una temperatura de horno columna de 30 °C, sin embargo al probar estas proporciones de fase móvil no se observó una clara separación de los picos cromatográfico por lo cual se modificaron los volúmenes así como la temperatura hasta alcanzar una proporción de ACN/H₂O ultrapura, 70/30 v/v (Anexo III).

Una vez definida la proporción de la fase móvil, se comenzó a determinar el flujo, (Ureña M. , et al., 2007), propone un flujo de 1,5 mL/min, la Norma chilena plantea un flujo de 1,3 mL/min, no obstante con el fin de ahorrar fase móvil se empleó un de 1 mL/min siendo este último recomendado en las descripciones de la columna, utilizando estos parámetros y flujos se observó mayor definición de los picos (Anexo III).

En cuanto a la temperatura hubo cambio, de 30 °C la cual nos sugiere el autor (Ureña M. , et al., 2007) y la NCh 574, (2006), al realizar algunas pruebas se llegó a determinar que a una temperatura de la columna de 65 °C se observó una mayor definición de los picos (Anexo III).

Las curvas estándar creadas para cada uno de los patrones: lactosa, glucosa y galactosa se realizaron con un rango de concentración de 10 g/L a 60 g/L tal como se muestra en la figura 7.

Mediante las condiciones de fase móvil, temperatura del horno columna y el flujo detallados anteriormente y en el (Anexo III); se determina el orden de elusión de los carbohidratos, que corresponde a:

glucosa, galactosa y finalmente lactosa, obteniéndose también los tiempos de retención. Inicialmente los estándares (glucosa, galactosa y lactosa), se analizaron por separado, se hicieron pruebas con distintas concentraciones de los mismos y una vez establecidos los parámetros para obtener una separación adecuada, para identificar los picos cromatográficos, se preparé una mezcla de patrones a distintas concentraciones, para determinar en una sola inyección los tiempos de cada azúcar. El tiempo de corrida de la muestra corresponde a un periodo de 10 minutos como máximo. En la figura 9, se puede observar una clara definición y separación de los analitos en estudio, Además se presentan los picos con sus tiempos de retención para cada carbohidrato, apareciendo en primer lugar la glucosa a los 4,315 min, seguido por galactosa 4,585 min y por último la lactosa 5.830 min. Con esta primera aproximación se determinó que este método era adecuado para la separación y cuantificación de los tres carbohidratos analizados.

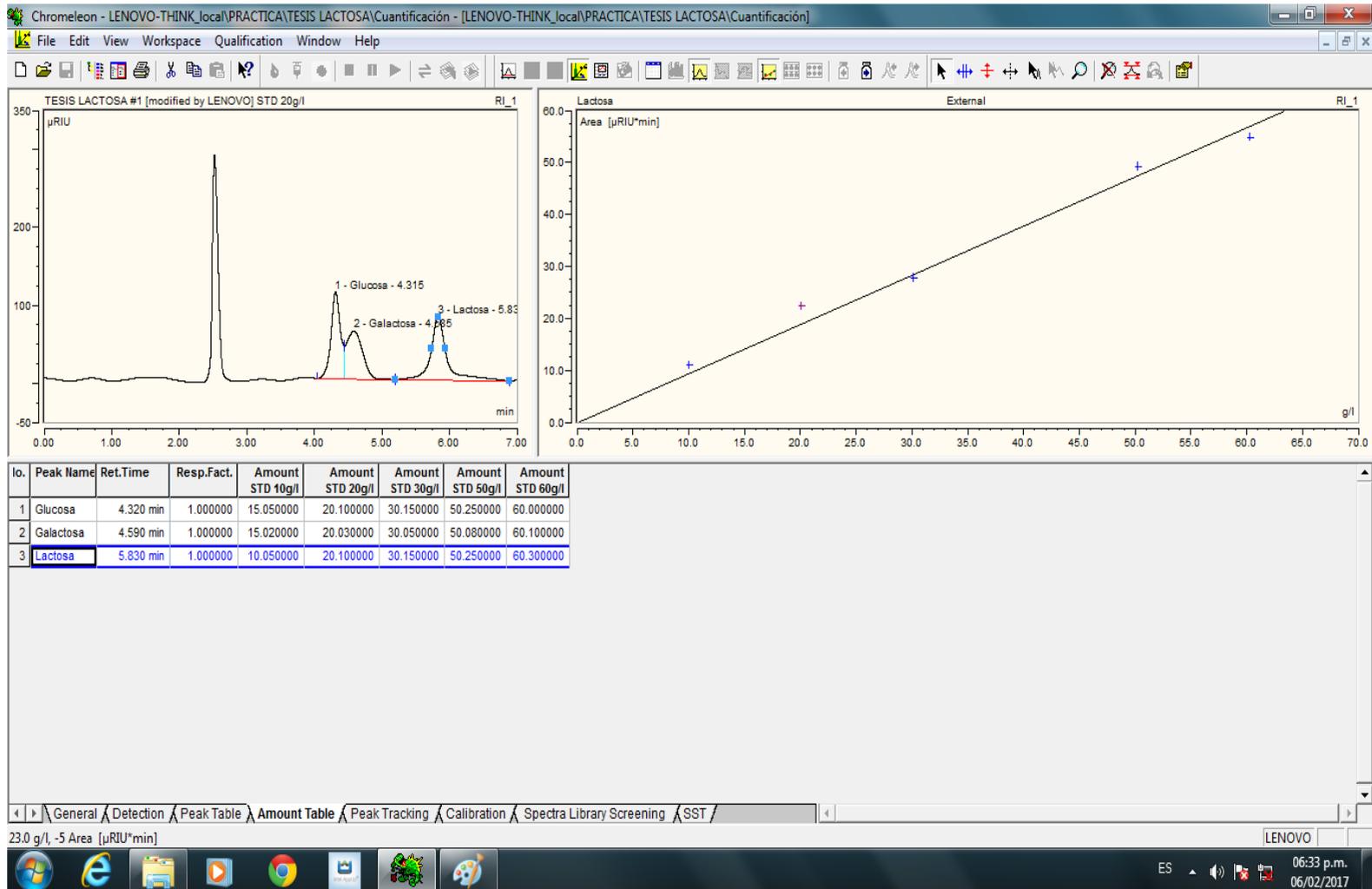
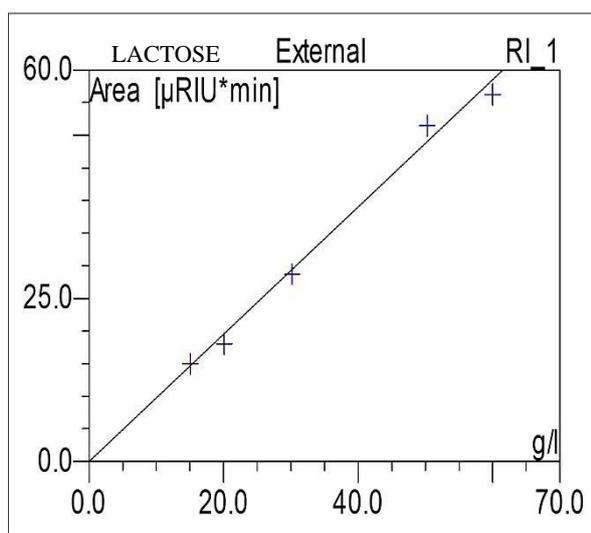
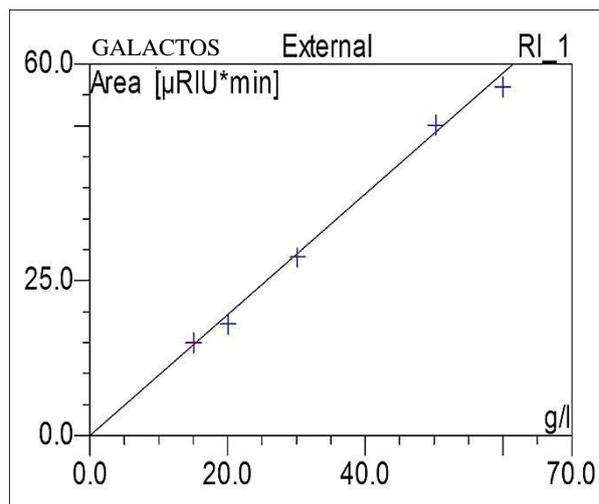
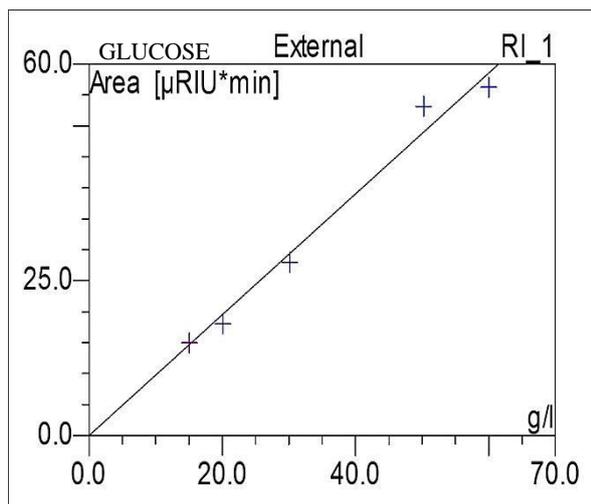


Figura 7: Cromatograma de la mezcla de patrones, que muestra los tiempos de retención de: glucosa, galactosa y lactosa.



No.	Ret.Time min	Peak Name	Cal.Type	Points	Coeff.Det. %	Offset	Slope	Curve
1	4.30	Glucosa	Lin	5	98.2160	0.0000	0.9758	0.0000
2	4.58	Galactosa	Lin	5	98.9224	0.0000	0.9137	0.0000
3	5.82	Lactosa	Lin	5	98.4603	0.0000	0.9466	0.0000
Average:					98.5329	0.0000	0.9453	0.0000

Figura 8: Curvas de calibración para los patrones de HPLC.

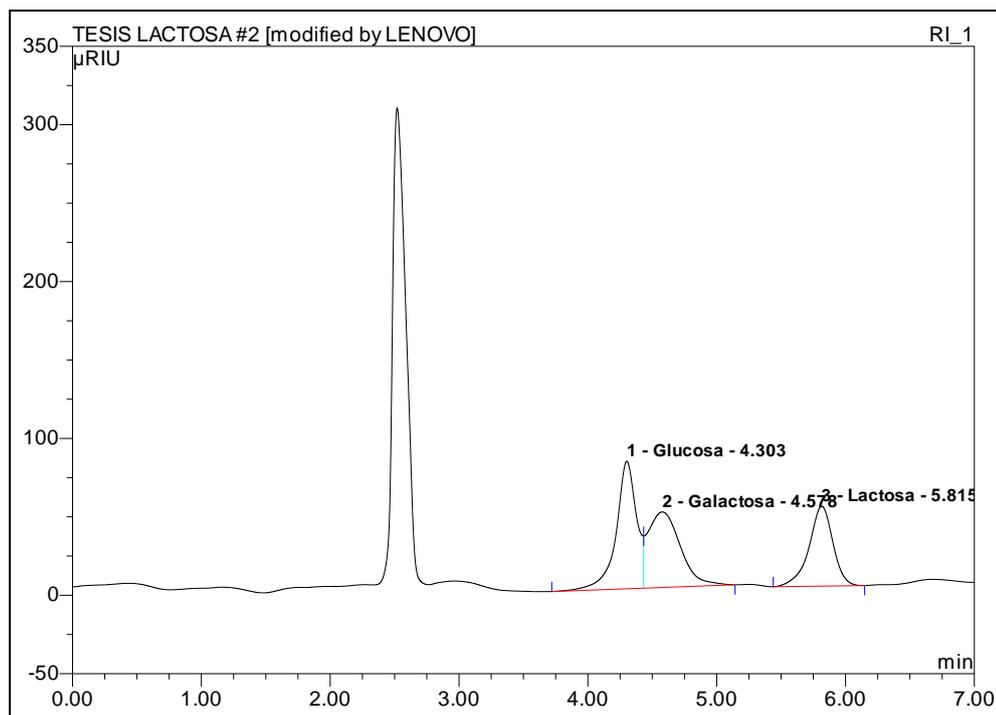


Figura 9: Cromatograma de la mezcla de patrones HPLC de Lactosa, Glucosa y Galactosa.

4.2. ANÁLISIS FÍSICOS QUÍMICOS DEL SUERO DE QUESO

4.2.1. Identificación y cuantificación de la concentración de lactosa, glucosa y galactosa.

La determinación de los niveles de lactosa, glucosa y galactosa se realizaron en un HPLC de la UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA – laboratorio de fisicoquímica empleando una columna SUGAR SZ5532 de 6.0 mmIDx150mmL con Detector de índice de refracción para HPLC RefractoMax 520. Como patrones se han empleado lactosa, glucosa y galactosa todos ellos de la casa comercial SIGMA. El software utilizado para el análisis de las cromatografías fue el Chromeleon HPLC.

En la figura 10 se presenta el cromatograma obtenido del suero de queso. Del mismo modo, se aprecia que el tiempo de retención de la lactosa, glucosa y galactosa es de 5.79, 4.23 y 4.52 minutos aproximadamente respectivamente en la figura 8.

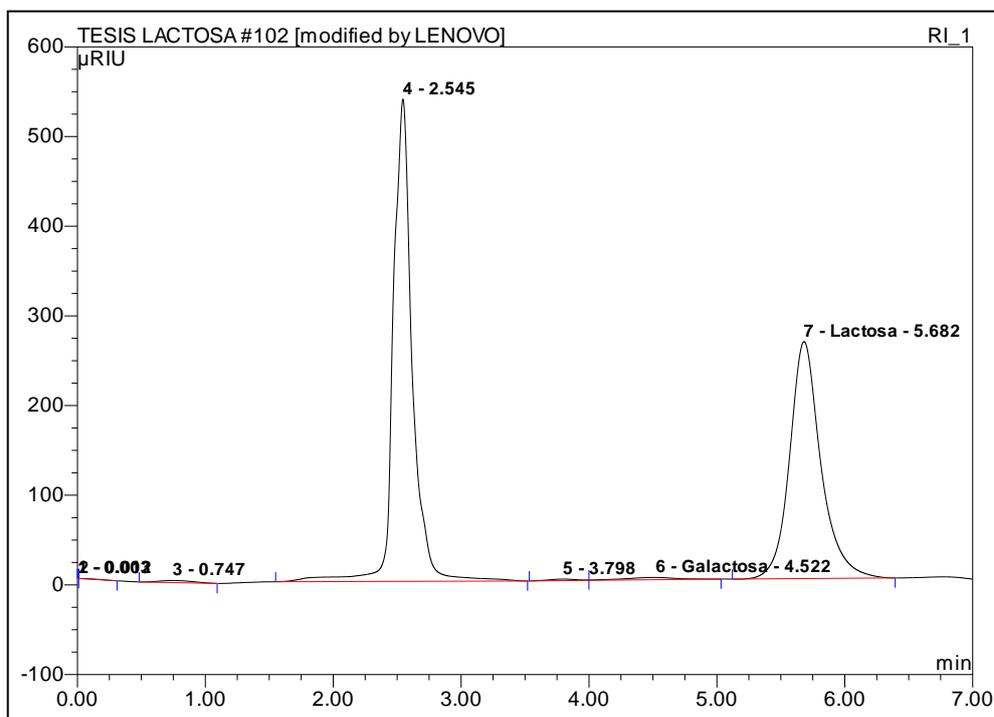


Figura 10: Cromatograma HPLC obtenidos en la materia prima (suero de queso) - Lactosa, Glucosa y Galactosa.

El objetivo de conocer la concentración de lactosa en nuestra materia prima fue realizar un análisis previo del rango de linealidad, parámetros cinéticos y concentración de enzima que se le debe añadir; este análisis fue realizado para cada enzima y del mismo modo se identificó como va actuando la enzima para ello usamos un kit colorimétrico para la determinación de glucosa (Glucosa GOD/POD 1x1000ML marca MONLAB) este análisis fue dado primero al hacer reaccionar a las enzimas en un

solución de la lactosa pura (Lactose (Monohydrate) - LOBA CHEMIE), en la cual realizamos una dilución de 46 g/L valor similar al que se determinó por HPLC en nuestra materia prima como se presenta en la tabla 11.

4.2.2. Lactosa

Datos obtenidos por (Hernández-Rojas & Vélez-Ruiz, 2014) registran un contenido de lactosa en el suero de queso que va en un rango de 46.0 - 52.0 g/L (4.0 - 5.0%), en la nuestra se obtuvo un valor de 46.5211 g/L, tabla 1 lo cual indica que el contenido de lactosa variara de acuerdo a como ha sido alimentado el ganado así como su raza y sus cuidados que se le dieron al animal.

4.2.3. Proteína

Se determinó la cantidad de proteína que contiene el suero de queso, el cual se obtuvo un valor de 1.141 ± 0.038 %, la (NTE INEN 2594:2011, 2011) señala que un suero de queso puede llegar a tener un contenido de proteína desde 0.8 % a más por ende podemos indicar que el suero analizado presenta un contenido en rango que nos indican.

4.2.4. Grasa láctea

El contenido de grasa que encontramos en el suero de queso fue de 0.29 ± 0.001 %, estos datos al comprar con (NTE INEN 2594:2011, 2011) se encuentran en el rango establecido de las

normas técnicas las cuales nos indican que el contenido de grasa láctea debe ser como máximo 0.3 % de materia grasa. En cambio (Hernández-Rojas & Vélez-Ruiz, 2014) en una de sus publicaciones señala un rango mayor de tolerancia la cual nos indica que el contenido de grasa en el suero de queso podría llegar a tener en algunos casos de 0 - 0.5 % de grasa en el suero de queso.

4.2.5. Densidad

La densidad se toma a dos temperaturas, ya sea a 15 o 20 °C según termolactodensímetro, en este caso se determinó la densidad a 20 °C teniendo un valor de 1.036 ± 0.002 g/mL. (INDECOPI, 1998) registra que el suero de queso debe tener una densidad de 1,03 g/mL.

4.2.6. pH

El suero de queso analizado, obtuvo un pH de 6.49 ± 0.006 con el cual se puede indicar que este valor se encuentra dentro de las normas establecidas para este parámetro las cuales (NTE INEN 2594:2011, 2011) indica que debe estar entre 6.8 - 6.4 para que se mantenga fresco dicha materia prima.

Cuadro 11: Contenido de azúcares (Lactosa, Glucosa y Galactosa) presentes en la materia prima (suero de queso)

No.	Peakname	Ret.Time Min	Area μ RIU*min	Amount g/L	Type	Height μ RIU	Rel.Area %	Resolution
2	Glucosa	4.233	0.0079	0.0081	Rd	0.037	0.02	n.a.
3	Galactosa	4.522	0.0200	0.0219	BMB*	0.045	0.02	4.37
4	Lactosa	5.790	45.8593	46.5211	BMB*	154.750	99.96	n.a.
Total:			45.8872	46.5511		154.832	100.00	

Fuente: HPLC Chromelon Software

En la tabla 14 se muestra la composición detallada de los sueros de queso, observándose que nuestro suero de queso tiene una muy buena concentración de lactosa, con respecto a algunos sueros de queso detallados por algunos autores como (Panesar, Kennedy, Gandhi, & Bunko, 2007).

(Parra Huertas, 2009) en uno de sus publicaciones señala que su materia prima (lactosuero de quesería) tiene un contenido de proteína de 0.8 % p/v del mismo modo (Araujo, et al., 2007) señala sobre su caracterización de su materia prima (lactosuero de quesería) 0.57 ± 0.09 % de proteína, 6.43 ± 0.21 en pH y contenido de lactosa $4.76 \pm 0.04\%$, del mismo modo (Guerrero Ramosa, Salas Valerioa, & Baldeón Chamorroa, 2015) señalan en uno de sus publicaciones el análisis que le dieron al suero de queso, mencionando que la densidad del suero es 1.03 g/mL, Acidez 1.15 ($^{\circ}$ D), pH 6.68 estos valores fueron

promedio de tres repeticiones. Estos resultados se asemejan a los nuestros y a su vez están en el rango de las NORMA TÉCNICA ECUATORIANA, las (NTE INEN 2594:2011, 2011) indica que el suero de queso debe presentar las siguientes características las cuales mencionaremos en la tabla 12 y tabla 13.

Cuadro 12: Requisitos fisicoquímicos del suero de leche líquido

Requisitos	Suero de leche dulce		Método de ensayo
	Min.	Max.	
Lactosa, % (m/m)	--	5	AOAC 984.15
Proteína Láctea, % (m/m)	0.8	--	NTE INEN 16
Grasa láctea, % (m/m)	--	0.3	NTE INEN 12
Ceniza, % (m/m)	--	0.7	NTE INEN 14
Acidez titulable, % (calculada como ácido láctico)	--	0.16	NTE INEN 13
pH	6.8	6.4	AOAC 973.41
El contenido de proteína Láctea es igual a 6.38 por el % nitrógeno total determinado			

Fuente: NTE INEN 2594:2011, 2011.

Cuadro 13: Requisitos microbiológicos para el suero de leche líquido

Requisito	n	M	M	Método de ensayo
Recuento de m.o. aerobios mesófilos ufc/g.	5	30 000	100 000	NTE INEN 1529-5
Recuento de Escherichia coli ufc/g.	5	< 10	-	NTE INEN 1529-8
Staphylococcus aureus ufc/g.	5	< 100	100	NTE INEN 1529-14
Salmonella /25g.	5	Ausencia	-	NTE INEN 1529-15
Detección de Listeria monocytogenes /25 g	5	Ausencia	-	ISO 11290-1

Fuente: NTE INEN 2594:2011, 2011.

Debido a sus propiedades nutricionales y funcionales, el lactosuero se ha convertido en una materia prima conveniente para obtener diferentes productos a nivel tecnológico. Se ha establecido que es posible transferir diversas propiedades funcionales identificadas en el suero de leche a nuevos productos alimenticios (Morr & Ha, 1993).

Cuadro 14: Caracterización del suero de quesería (materia prima)

Características	
Proteína láctea, % (m/m)	1.141±0.038
Grasa láctea, % (m/m)	0.29±0.001
Acidez titulable, % (calculada como ácido láctico)	0.1476±0.0007
pH	6.49±0.006
Densidad (g/mL)	1.036±0.002
Calcio (mg/%)	58± 0.0012
Magnesio (mg/%)	31±0.0022
Lactosa (g/L)	46.5211±0.028
Glucosa (g/L)	0.0081±0.027
Galactosa (g/L)	0.0219±0.029
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos (UFC/mL).	23x10 ³
Mohos (UFC/mL)	26x10re
Levaduras (UFC/mL).	70re

4.3. RANGO DE LINEALIDAD Y PARÁMETROS CINÉTICOS de *Kluyveromyces lactis* Y *Aspergillus oryzae* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENZIMA.

La determinación del rango de linealidad de la enzima fue realizado a través de la medición de la velocidad inicial de reacción, que es la pendiente de la curva de progreso (curva de producto formado o

sustrato transformado frente al tiempo) en el tiempo cero (Lampen, 1971).

Para la determinación del mismo y posterior cálculo de los valores de la actividad específica (UI/mg), se realizaron 5 concentraciones de enzima 1 g/L, 0.5 g/L, 0.125 g/L, 0.25 g/L y 0.1 g/L; encontrándose cinco gráficas, en las cuales la enzima se comporta de forma lineal en tiempos cercanos a cero, conforme se muestra en la figura 11 y 12.

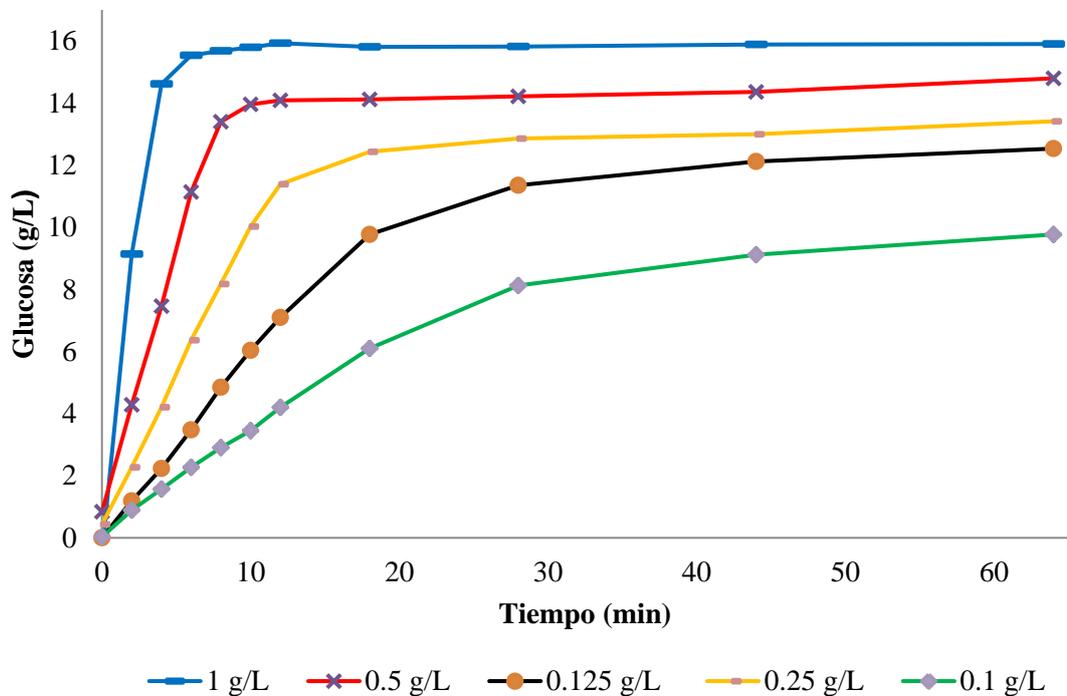


Figura 11: Rango de linealidad de la enzima *K. lactis* sometido a diferentes [E], pH = 7, T° = 45 °C y [S] = 46 g/L

Cuadro 15: Ecuaciones lineales en el tiempo de los datos obtenidos en el rango de linealidad de *K. lactis* a diferentes [E], pH = 7, T° = 45 °C y [S] = 46 g/L

Concentración de enzima	Ecuación en el tiempo lineal	R ²
1 g/L	Glucosa (g/L) = 3.778Tiempo (min) + 0.1975	0.9754
0.5 g/L	Glucosa (g/L) = 1.5983Tiempo (min) + 1.0315	0.9953
0.25 g/L	Glucosa (g/L) = 0.9345Tiempo (min) + 0.5188	0.9974
0.125 g/L	Glucosa (g/L) = 0.5565Tiempo (min) + 0.1588	0.9941
0.1 g/L	Glucosa (g/L) = 0.2917Tiempo (min) + 0.4315	0.9869

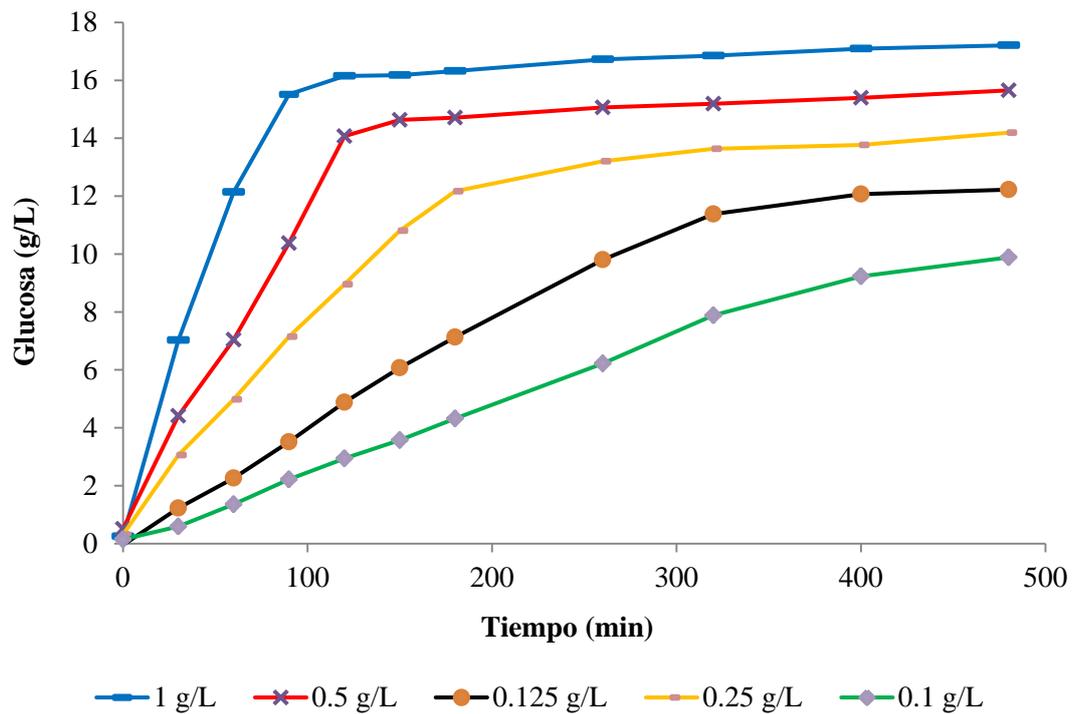


Figura 12: Rango de linealidad de la enzima *A. oryzae* sometido a diferentes [E], pH = 4.5, T° = 30 °C y [S] = 46 g/L.

Cuadro 16: Ecuaciones lineales en el tiempo de los datos obtenidos en el rango de linealidad de *A. oryzae* a diferentes [E], pH = 4.5, T° = 30 °C y [S] = 46 g/L

Concentración de enzima	Ecuación en el tiempo lineal	R ²
1 g/L	Glucosa (g/L) = 0.1697Tiempo (min) + 1.0971	0.9781
0.5 g/L	Glucosa (g/L) = 0.1103Tiempo (min) + 0.6631	0.9968
0.25 g/L	Glucosa (g/L) = 0.0655Tiempo (min) + 0.8768	0.9922
0.125 g/L	Glucosa (g/L) = 0.0385Tiempo (min) + 0.0752	0.9972
0.1 g/L	Glucosa (g/L) = 0.0244Tiempo (min) - 0.0257	0.9985

Inicialmente, las reacciones transcurren linealmente, pudiéndose tomar la pendiente de esta recta como velocidad inicial. A tiempos más largos, el progreso de la reacción se aparta de la linealidad. De esta forma podemos ver que con la dilución que deberíamos trabajar durante toda la experiencia, en el caso del concentrado enzimático de *K. lactis*, utilizando como sustrato la Lactosa Monohydrate de LOBA CHEMIE, la dilución que se eligió para poder trabajar los parámetros cinéticos y de esta manera poder adecuar nuestro diseño fue a una concentración de enzima de 0.5 g/L de enzima (ASTROLACT LX2000 de Rosa Cavero Representaciones S.R.L.) en la cual pudimos encontrar una linealidad en un tiempo de 10 minutos (figura 11), en cuanto a la enzima *A. oryzae* (β -Galactosidase) se eligió una concentración de enzima de 0.5 g/L asemejándonos a la misma concentración de la enzima *K. lactis*, pero está en comparación su velocidad de reacción fue menor, es decir requirió de mayor tiempo para poder lograr su máxima hidrólisis y está

sometida a la misma concentración de enzima, pH y temperatura, del mismo modo se logró encontrar su máxima linealidad en el tiempo 120 minutos (figura 12), el estudio de estos análisis fue principalmente para permitirnos trabajar con menos gasto de energía y protegiendo a nuestra materia prima de posibles contaminantes que podrían con el tiempo interferir en la reacción de esta manera pudimos saber hasta que concentración llego de azúcares reductores. Esta concentración de enzima será de gran ayuda para poder hallar los respectivos parámetros cinéticos.

Es necesario destacar que en una reacción enzimática se pueden diferenciar tres fases: fase de retardo, fase lineal y fase de agotamiento de sustrato. La fase de retardo tiene lugar inmediatamente después de mezclar los reactivos con la muestra biológica, es una fase de encuentro y acoplamiento de sustrato y enzima. En las curvas mostradas en la figura 11 y figura 12, no se aprecia esta fase por la duración muy variable que puede presentar. Pero al finalizar de las fases comienza la fase lineal en la que la formación de producto permanece constante, siendo la concentración de enzima de la muestra es el único factor limitante. Por último, a medida que va transcurriendo la reacción, llega un momento en que el sustrato (Lactosa Monohydrate de LOBA CHEMIE) se van agotando (fase de agotamiento de sustrato) y la velocidad de reacción disminuye hasta anularse (Tena Aldave & Jorrín, 2000).

Esta última fase de agotamiento se puede visualizar gráficamente en el estudio de ambas enzimas tanto en el de *K. lactis* y *A. oryzae* (figura 11

y figura 12) solo que ambas enzimas tienen unos tiempos diferentes de la fase de agotamiento. Por ejemplo la enzima *K. lactis* el máximo tiempo que le tomó llegar a esta fase fue de 28 minutos a una concentración de enzima menor la cual fue de 0.1 g/L, pero a una concentración de 1g/L le tomó 4 minutos para llegar a dicha fase, en el caso de la enzima *A. oryzae* le tomó un tiempo mayor en la que podemos observar que en el tiempo de 90 minutos a una concentración de 1 g/L comenzó su fase de agotamiento pero para una concentración de 0.1 g/L le toma mayor tiempo y esta se observa en la figura 12 que en el tiempo 480 minutos recién está comenzando su fase agotamiento.

Es muy importante mencionar que la determinación del rango de linealidad es necesaria para poder tener una determinación enzimática válida; y es necesaria realizarla en la fase lineal donde el único factor limitante es la concentración de la propia enzima y las condiciones de reacción son las óptimas (exceso de sustrato y otros reactivos) (Nelson D., 2004), si la concentración de enzima aumenta, la actividad de reacción aumenta, esto debido a que la enzima tendría un mayor poder catalítico, pues mientras más sustrato se tenga mayores sitios activos habrá. Ello se puede visualizar gráficamente en la figura 11 y figura 12 trabajadas en las dos enzimas, a través de las pendientes que presenta cada dilución, pues a mayor pendiente mayor capacidad catalítica y mayor concentración de enzima, y mientras este se vaya diluyendo la capacidad catalítica de la enzima disminuye.

Estos ensayos enzimáticos son métodos de ensayo químico para medir actividades enzimáticas, y son vitales para el estudio de las cinéticas

enzimáticas, la actividad enzimática es una medida de la cantidad de enzima activa presente y del nivel de actividad de la misma, por lo que la medida de la actividad es dependiente de las condiciones, que deben ser especificadas cuando se dan valores de actividad. En este caso, se trabajó a 45 °C y pH de 7.0 para la enzima *K. lactis* y 30 °C y pH de 4.5 *A. oryzae*, determinándose el valor de la actividad enzimática a diferentes concentraciones de la misma, tal como se presenta en la tabla 17 y tabla 18.

Cuadro 17: Actividad volumétrica de la enzima *K. lactis* a diferentes

[E], pH = 7, T° = 45 °C y [S] = 46 g/L

Concentración de enzima (g/L)	Concentración de sustrato (g/L)	Actividad (g/L*min)	av (UI/mL)	R ²	t (min) linealidad
1	46	3.778	11.037	0.9754	4
0.5	46	1.598	9.339	0.9953	8
0.25	46	0.934	10.920	0.9974	12
0.125	46	0.556	13.006	0.9941	18
0.1	46	0.292	8.520	0.9869	28
	Promedio		10.565		

Cuadro 18: Actividad volumétrica de la enzima *A. oryzae* a diferentes

[E], pH = 4.5, T° = 30 °C y [S] = 46 g/L

Concentración de enzima (g/L)	Concentración de sustrato (g/L)	Actividad (g/L*min)	av (UI/mL)	R²	t (min) linealidad
1	46	0.198	0.579	0.9781	90
0.5	46	0.110	0.644	0.9968	120
0.25	46	0.066	0.766	0.9922	180
0.125	46	0.038	0.899	0.9972	260
0.1	46	0.024	0.712	0.9985	320
	Promedio		0.720		

4.4. INFLUENCIA DEL pH, TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN DE ENZIMA SOBRE LA HIDROLISIS Y PRODUCTIVIDAD DEL SUERO DE QUESERÍA PARA CADA ENZIMA.

Con el objeto de analizar la influencia de los factores de pH, temperatura y concentración de enzima sobre el Grado de hidrolisis (%) y la productividad (g/L*min) frente a la acción hidrolizante de las enzimas *K. lactis* y *A. Oryzae* actuando independientemente sobre la lactosa presente en el suero de quesería, se empleó un diseño experimental de superficie de respuesta Box Behnken para cada una de las enzima como se muestra en la tabla 7.

4.4.1. Reacción de hidrolisis de la enzima: ASTROLAC LX2000 (*Kluyveromices lactis*)

En la figura 13 se muestran los cromatogramas obtenidos de los muestreos realizados durante el hidrolizado del suero de quesería con *K. lactis*, donde se identificó el disacárido lactosa y los monosacáridos glucosa y galactosa, cuyos tiempos de retención se observan en la tabla 11.

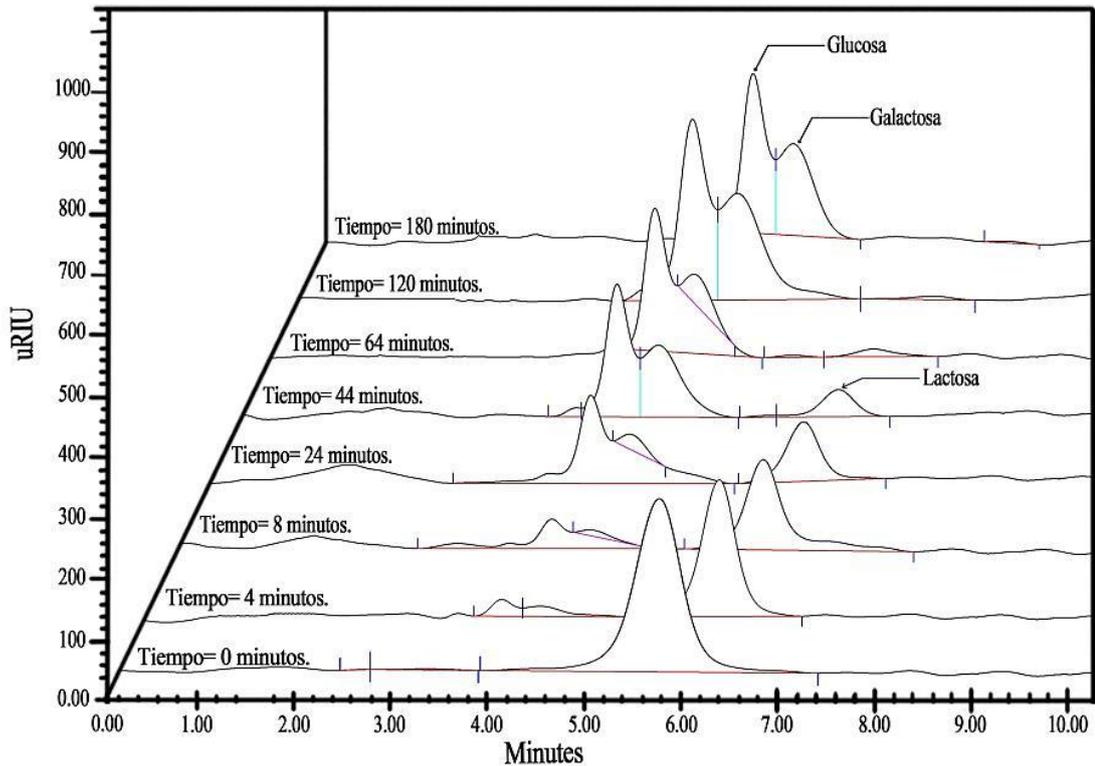


Figura 13: Evolución de los cromatogramas de HPLC durante la producción de Glucosa y Galactosa con enzima procedente de *K. lactis* ($T^{\circ} = 45^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7$ y $[\text{E}] = 0.5 \text{ g/L}$)

De igual manera podemos observar el comportamiento del disacárido y monosacáridos encontrados, la disminución de la concentración de lactosa a medida que transcurre el tiempo de reacción de la lactasa en el suero de quesería, y a su vez la formación e incremento de la concentración de monosacáridos.

A través de un balance de materia se determinó la cantidad de producto obtenido en cada tiempo de muestreo, para ello previamente se determinó la cantidad inicial de lactosa, glucosa

y galactosa presentes en el suero de quesería para luego restar con las concentraciones encontradas en los cromatogramas.

En otras investigaciones de hidrolisis de lactosa con diferente β -galactosidasas se observan similares técnicas analíticas para la determinación de lactosa, glucosa y galactosa de forma independiente o en conjunto. Algunas de las técnicas reportadas son HPLC con detector de índice de refracción (ID), claro está la utilización de diferentes columnas en los diferentes estudios (Villarreal, 2014) (Klein, y otros, 2013) , método de glucosa oxidasa (Janaína, y otros, 2012) (Bosso, Morioka, Santos, & Suguimoto, 2016), y el método de fenol sulfúrico para la determinación de lactosa (Bosso, Morioka, Santos, & Suguimoto, 2016).

4.4.1.1. Perfil de concentración de glucosa

En el perfil de concentración de glucosa figura 14-a observamos que a una concentración de enzima de 0.5 g/L, pH de 7 y temperatura de 45°C obtenemos una producción de 18 g/L de glucosa a un tiempo de 12 minutos y a su vez a una concentración de enzima de 0.1 g/L, pH de 6.5 y temperatura de 35°C obtenemos una producción mayor de 19 g/L de glucosa figura 14-c sin embargo esto se obtiene a un tiempo de 44 minutos. Esto puede deberse a la concentración de enzima, cuanto mayor sea la concentración de enzima, mayor

será la conversión (Bosso, Morioka, Santos, & Sugimoto, 2016) además del valor de pH y temperatura óptimas para *K. lactis* reportada por autores fueron pH de 7 y valores de temperatura de 40 – 45 °C (Beltran & Acosta, 2012) (Kim, Ji, & Oh, 2003).

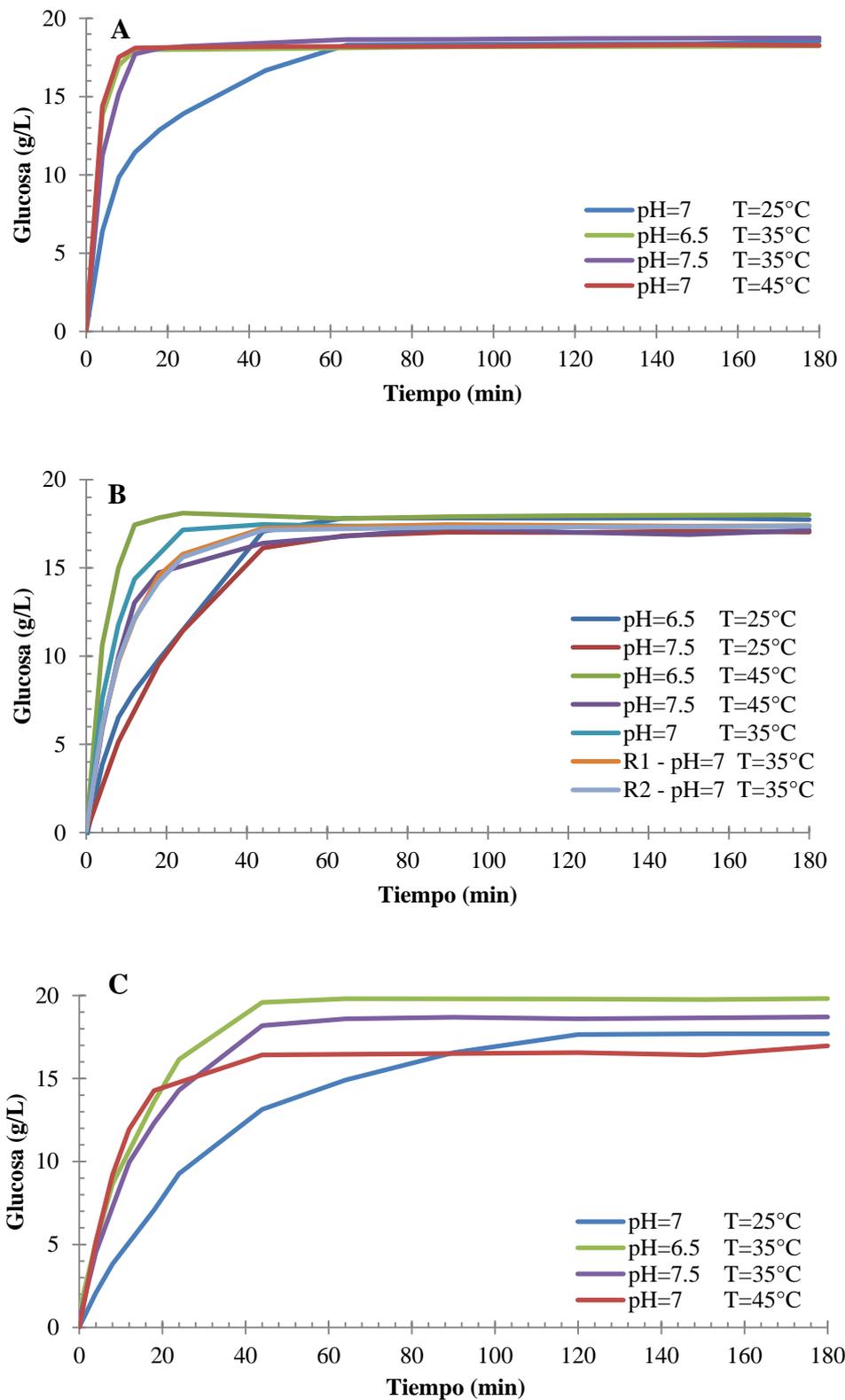


Figura 14: Perfil de concentración de Glucosa en el tiempo a pH de 6.5, 7, 7.5 y temperaturas de 25°C, 35°C, 45°C. (A) [E]: 1:2, (B) [E]: 1:4 y (C) [E]: 1:10 – K.

lactis

4.4.1.2. Productividad

a) Interacción de factores

En la figura 15 observamos los efectos de la interacción de los factores como es para el caso de la temperatura, que conforme se incrementa la temperatura incrementa la productividad hasta una temperatura aproximadamente de 40 °C a partir de la cual presenta una disminución de la productividad, para el pH tenemos que a pH básicos menor es la productividad obtenida y por último la concentración de enzima tiene una relación directa con la productividad. Varios autores afirman la cualidad de termolábil a lactasas obtenidas de una levadura además de tener su pH óptimo cercano al neutro y de ahí su denominación de lactasas neutras (Esteban, Fernanda, & Cristinaa, 2015) (Beltran & Acosta, 2012) y (Jurado E. , Camacho, Luzón, & Vicaria, 2004).

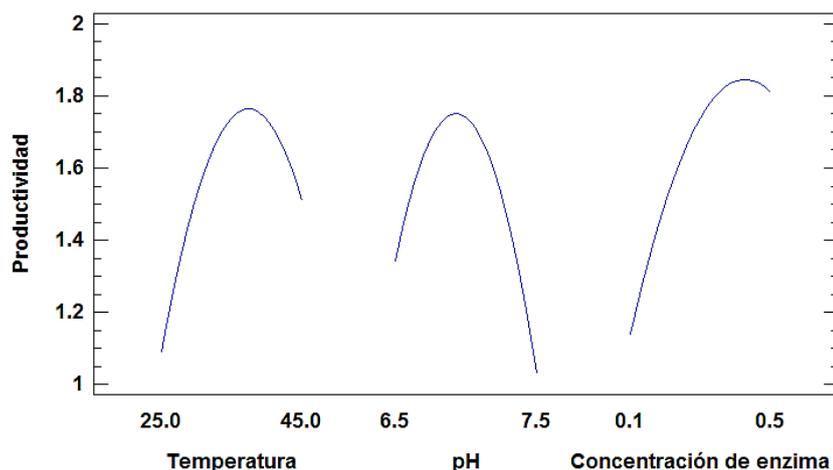


Figura 15: Efectos principales de la temperatura, pH y concentración de enzima sobre la productividad – *K. lactis*

b) Superficies de respuesta

En las gráficas de superficie de respuesta nos permite observar con mayor precisión el efecto de los factores estudiados sobre la hidrólisis de lactosa presente el suero de quesería, como podemos observar en la figura 16 tanto A, B y C presentan sus valores óptimos para la productividad a un pH cercano a 7 y a temperaturas de 30 – 44 °C, sin embargo el factor de concentración de enzima precisa una marcada diferenciación entre los diferentes casos pudiendo llegar hasta una productividad de 1.9266 g/L*min, cabe mencionar que para los caso A y B los aumentos de temperatura y disminución de valor de pH causan un efecto mínimo frente al aumento de la productividad.

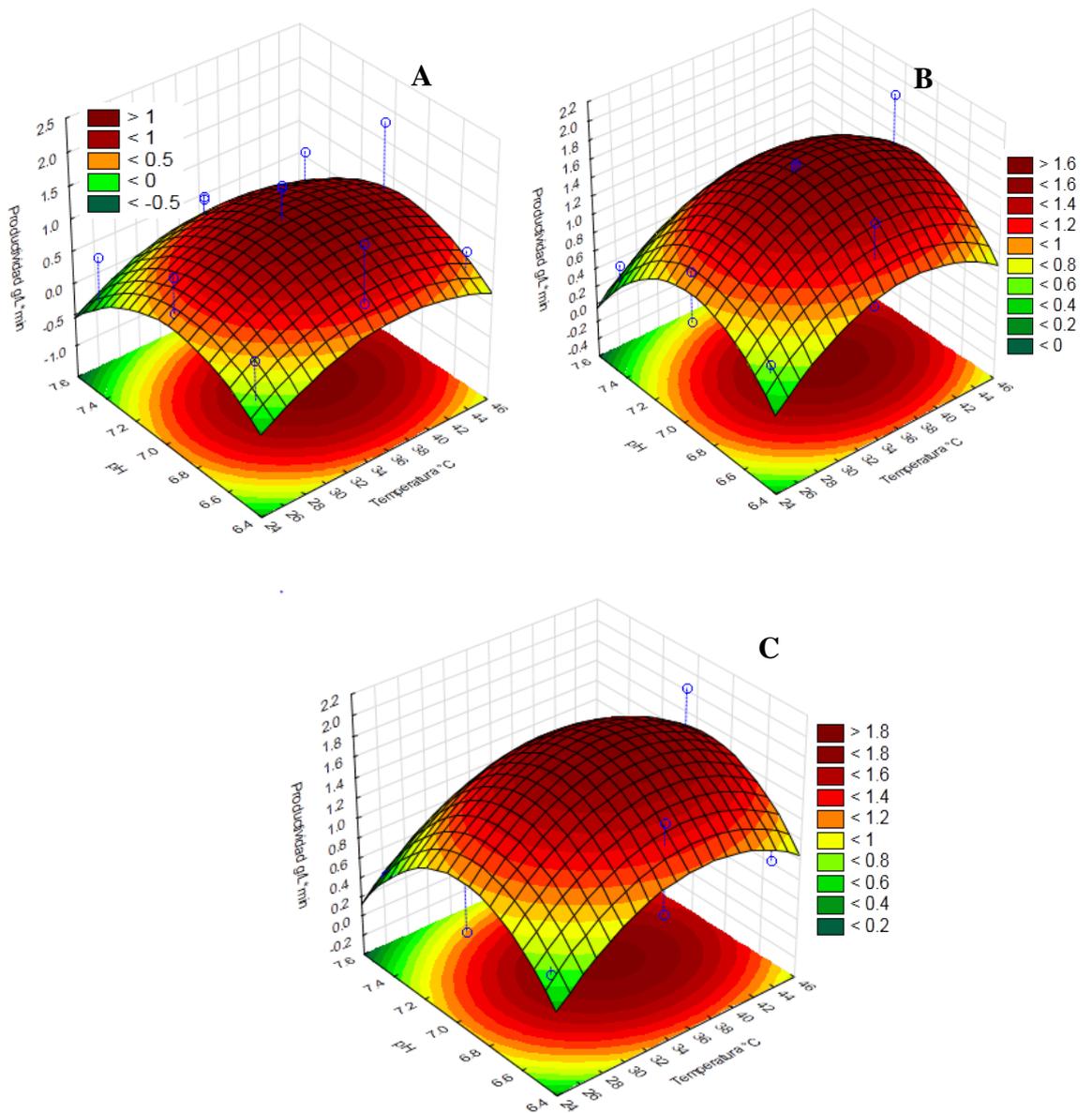


Figura 16: Superficies de respuesta para la productividad con β -Galactosidasa en lactosuero.

Concentración de Enzima: (A), 0.1 g/L, (B) 0.25 g/L y (C) 0.5 g/L – *K. lactis*

c) Análisis de varianza

El análisis de varianza (ANOVA) para la productividad mostrada en la tabla 19 nos indica que para un error del 5%, todos los factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la variable

respuesta mencionada además de los efecto AB (temperatura-pH) y BC (pH–concentración de enzima), obteniendo un R^2 de 95.1609%.

Cuadro 19: Análisis de Varianza para Productividad – K. lactis

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
A:Temperatura	0.344257	1	0.344257	9.91	0.0254
B:pH	0.193071	1	0.193071	5.56	0.0649
C:Concentración de enzima	0.903706	1	0.903706	26.02	0.0038
AA	0.710897	1	0.710897	20.47	0.0063
AB	0.0043494	1	0.0043494	0.13	0.7379
AC	0.136473	1	0.136473	3.93	0.1043
BB	1.13052	1	1.13052	32.55	0.0023
BC	0.207155	1	0.207155	5.96	0.0585
CC	0.221995	1	0.221995	6.39	0.0526
Error total	0.173656	5	0.0347311		
Total (corr.)	3.58859	14			

R-cuadrada = 95.1609 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 86.4505 por ciento

Error estándar del est. = 0.186363

Error absoluto medio = 0.0788303

Estadístico Durbin-Watson = 1.75103 (P=0.1584)

Mediante la utilización del software STATGRAPHICS Centurión XVI.I se determinó los valores óptimos de los factores para obtener el valor óptimo de la variable en

estudio productividad siendo de 1.96047 g/L*min como se muestra en la tabla 20.

Cuadro 20: Valores de optimización de la productividad – K.

lactis

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	25.0	45.0	39.164
pH	6.5	7.5	6.843
Concentración de enzima	0.1	0.5	0.482

Por otro lado el software utilizado nos brinda la ecuación del comportamiento que ejerce el efecto de los factores sobre la variable respuesta.

Productividad

$$\begin{aligned}
 &= -113.856 + 0.254759 * Temperatura \\
 &+ 31.113 * pH + 18.1636 \\
 &* Concentración de enzima - 0.00438788 \\
 &* Temperatura^2 + 0.006595 * Temperatura \\
 &* pH + 0.0909455 * Temperatura \\
 &* Concentración de enzima - 2.21335 \\
 &* pH^2 - 2.24097 * pH \\
 &* Concentración de enzima - 6.63233 \\
 &* Concentración de enzima^2
 \end{aligned}$$

4.4.1.3. Grado de hidrolisis

a) Interacción de factores

Los efectos de factores sobre la variable en estudio grado de hidrolisis como puede verse en la figura 17 tienen un comportamiento similar comparado con la otra variable en estudio, sin embargo discrepan en el factor pH, ya que se observa un menor grado de hidrolisis a un pH neutro, para el caso del factor temperatura y concentración de enzima presentan un comportamiento en su mayoría proporcional al grado de hidrolisis. Sin embargo al trabajar con una enzima termolábil debemos tener en cuenta que a una temperatura mayor a 45°C puede provocar un efecto negativo sobre el grado de hidrolisis. Resultados similares a este comportamiento fueron reportados, además se afirmó que a un temperatura de 55°C se inactiva totalmente la enzima *K. lactis* (Klein, y otros, 2013) (Bosso, Morioka, Santos, & Sugimoto, 2016).

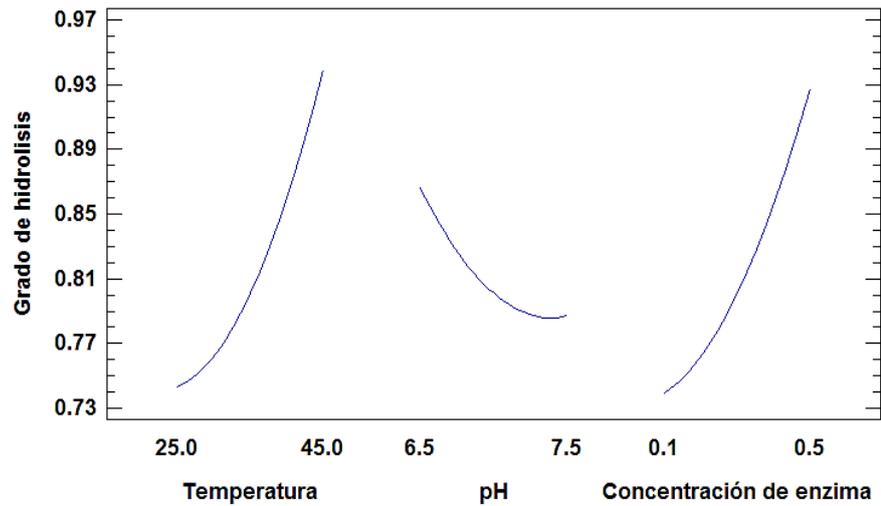


Figura 17: Efectos principales de la temperatura, pH y concentración de enzima sobre el grado de hidrólisis – *K. lactis*

b) Superficie de respuesta

Los factores de temperatura y concentración de enzima causan un fuerte efecto sobre la variable de grado de hidrólisis como podemos observar en la figura 18. Observamos que para el pH en todos los casos (A, B y C) los valores óptimos giran en torno del pH ácido abarcando un rango mínimo para la acción hidrolítica de la enzima, por otro lado la temperatura mantiene un rango de 32 – 46°C aproximadamente para los tres casos y la concentración de enzima también tiene un papel muy importante para esta variable respuesta ya que si se aumenta la concentración, aumenta el grado de hidrólisis, además de ello los valores mínimos encontrados son del 76%.

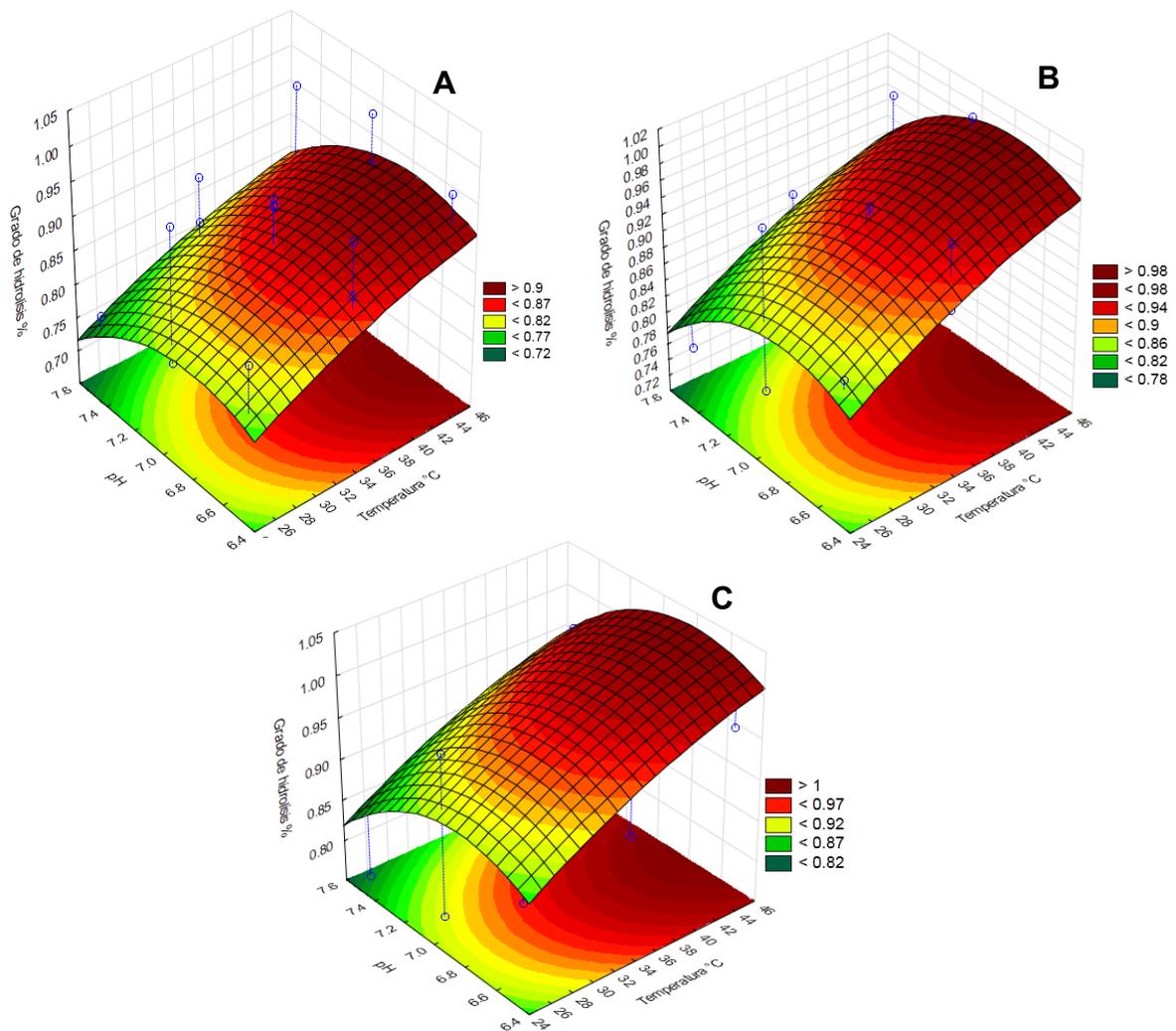


Figura 18: Superficies de respuesta para el Grado de hidrolisis con β -Galactosidasa en lactosuero. Concentración de Enzima: (A) 0.1 g/L, (B) 0.25 g/L y (C) 0.5 g/L – *K. lactis*

c) Análisis de Varianza

El ANOVA para el grado de hidrolisis mostrada en la tabla 21 nos indica que para un error del 5%, los factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la variable respuesta son la temperatura y concentración de enzima además del efecto AA (temperatura²), con un R² de 95.126 %.

Cuadro 21: Análisis de Varianza para Grado de hidrolisis – K. lactis

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
A:Temperatura	0.02115	1	0.02115	31.65	0.0025
B:pH	0.00586	1	0.00586	8.77	0.0314
C:Concentración de enzima	0.02110	1	0.02110	31.58	0.0025
AA	0.00053	1	0.00053	0.8	0.4122
AB	0.00285	1	0.00285	4.27	0.0938
AC	0.00460	1	0.00460	6.88	0.0469
BB	0.00502	1	0.00502	7.5	0.0408
BC	0.00005	1	0.00005	0.08	0.7869
CC	0.00125	1	0.00125	1.87	0.2295
Error total	0.00334	5	0.00067		
Total (corr.)	0.06856	14			

R-cuadrada = 95.126 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 86.3529 por ciento

Error estándar del est. = 0.0258515

Error absoluto medio = 0.0125792

Estadístico Durbin-Watson = 2.34103 (P=0.5456)

Mediante la utilización del software mencionado anteriormente se determinó los valores óptimos de los factores para obtener el

valor óptimo de la variable en estudio grado de hidrolisis siendo de 99.33 % como se muestra en la tabla 22.

Cuadro 22: Valores de optimización del grado de hidrolisis –
K. lactis

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	25.0	45.0	45.0
pH	6.5	7.5	6.983
Concentración de enzima	0.1	0.5	0.391

El grado de hidrolisis se rige por la siguiente ecuación:

Grado de Hidrolisis

$$\begin{aligned}
 &= 09.02979 - 0.0495283 * Temperatura \\
 &- 1.94334 * pH - 3.50127 \\
 &* Concentración de enzima + 0.000402833 \\
 &* Temperatura^2 + 0.005995 * Temperatura \\
 &* pH - 0.0361864 * Temperatura \\
 &* Concentración de enzima + 0.103633 \\
 &* pH^2 + 0.678364 * pH \\
 &* Concentración de enzima + 0.816972 \\
 &* Concentración de enzima^2
 \end{aligned}$$

El resumen de la acción hidrolítica de la enzima procedente de *K. lactis* se muestra en la tabla 23, donde podemos observar todas las corridas realizadas con las condiciones de trabajo

utilizadas (factores) y las variables respuestas, a partir de la cual podemos inferir que la corrida experimental numero 8 a condiciones de temperatura de 45 °C, pH de 7 y a una concentración de enzima de 0.5 mg/mL logramos obtener una productividad de 1.9266 g/L*min y un grado de hidrolisis del 98.58%. Los valores de los factores y variables respuesta estudiados son similares e incluso coinciden con lo reportado por varios autores. (Beltran & Acosta, 2012).

Cuadro 23: Resumen de los resultados obtenidos en la evaluación de la influencia de la Temperatura, pH y concentración de enzima sobre la productividad y grado de hidrolisis - *K. lactis*

Bloque	Temperatura (°C)	pH	Concentración de Enzima (g/L)	Productividad (g/L*min)	Grado de Hidrólisis (%)
1	25	6.5	0.25	0.6317	0.8639
2	45	6.5	0.25	0.7338	0.9561
3	25	7.5	0.25	0.4930	0.7628
4	45	7.5	0.25	0.7270	0.9618
5	25	7	0.10	0.3667	0.7799
6	45	7	0.10	0.7267	0.9084
7	25	7	0.50	1.0201	0.9746
8	45	7	0.50	1.9266	0.9938
9	35	6.5	0.10	0.7018	0.8839
10	35	7.5	0.10	0.6714	0.8294
11	35	6.5	0.50	1.5851	0.9612
12	35	7.5	0.50	0.7236	0.8949
13	35	7	0.25	1.6587	0.9422
14	35	7	0.25	1.6227	0.9316
15	35	7	0.25	1.6341	0.9313

4.4.2. Reacción de hidrólisis de la enzima: β -Galactosidasa SIGMA-ALDRICH (*Aspergillus oryzae*)

En la figura 19 se muestran los cromatogramas obtenidos de los muestreos realizados durante el hidrolizado del suero de quesería con β – galactosidasa procedente de *A. Oryzae*, donde se identificó el disacárido lactosa y los monosacáridos glucosa y galactosa, cuyos tiempos de retención se observan en la tabla 11.

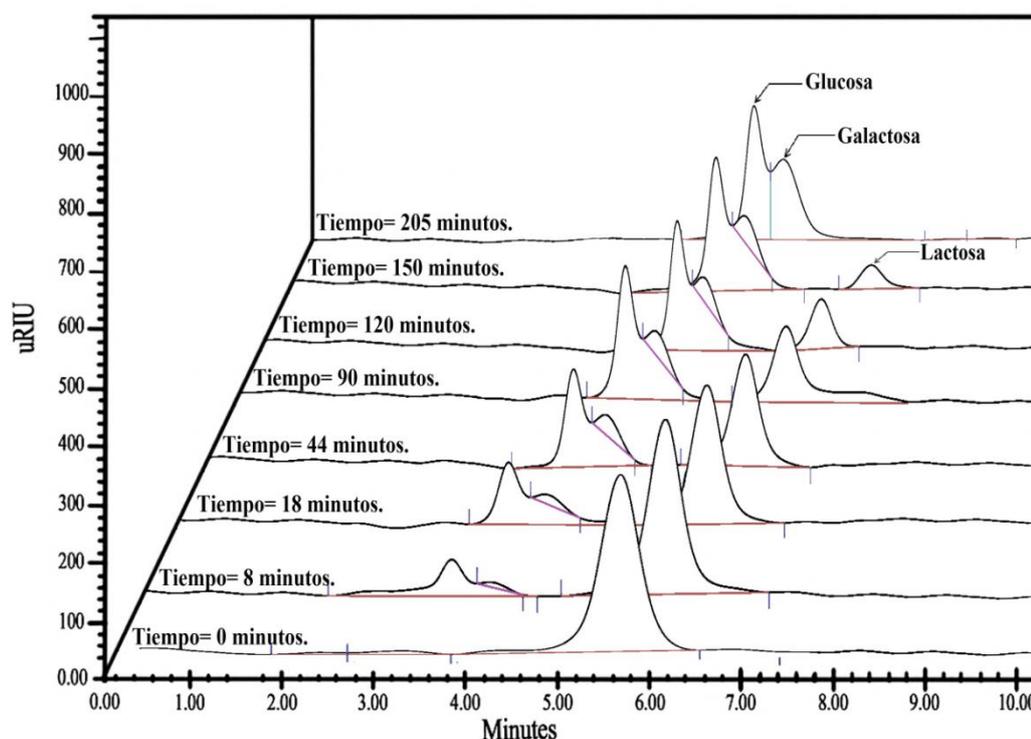


Figura 19: Evolución de los cromatogramas de HPLC durante la producción de Glucosa y Galactosa con enzima procedente de *A.Oryzae* ($T^{\circ} = 35^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4.5$ y $[\text{E}] = 0.1 \text{ mg/mL}$)

De igual manera podemos observar el comportamiento del disacárido y monosacáridos encontrados, la disminución de la concentración de lactosa a medida que transcurre el tiempo de

reacción de la lactasa en el suero de quesería, y a su vez la formación e incremento de la concentración de monosacáridos.

A diferencia con la enzima procedente de *K. lactis*, esta presenta una menor velocidad de reacción llegando a tiempo tan largos pasados los 200 minutos de reacción.

4.4.2.1. Perfil de Concentración de glucosa

En el perfil de concentración de glucosa en la figura 20 observamos que no existe una correlación definida entre productividad y temperatura a diferencia de pH, se obtiene mayor formación de glucosa a valores de pH de 4 y 4.5. Con respecto a la concentración de enzima no existe una marcada variación en la formación de glucosa, se ha llegado a producciones mayores de 18 mg/mL de glucosa, sin embargo el tiempo de reacción es muy alto, a su vez observamos que puede continuar hidrolizando por un tiempo prolongado. Esto puede deberse a la formación de galactosa que puede actuar como inhibidor competitivo para la lactasa *A. oryzae* como lo reportan varios autores (Klein, y otros, 2013) (Janaína, y otros, 2012), también mencionan el contenido de Magnesio el cual puede afectar al comportamiento de la enzima pero en concentraciones altas, sin embargo nuestra materia prima no presentó concentraciones altas de magnesio al ser analizada.

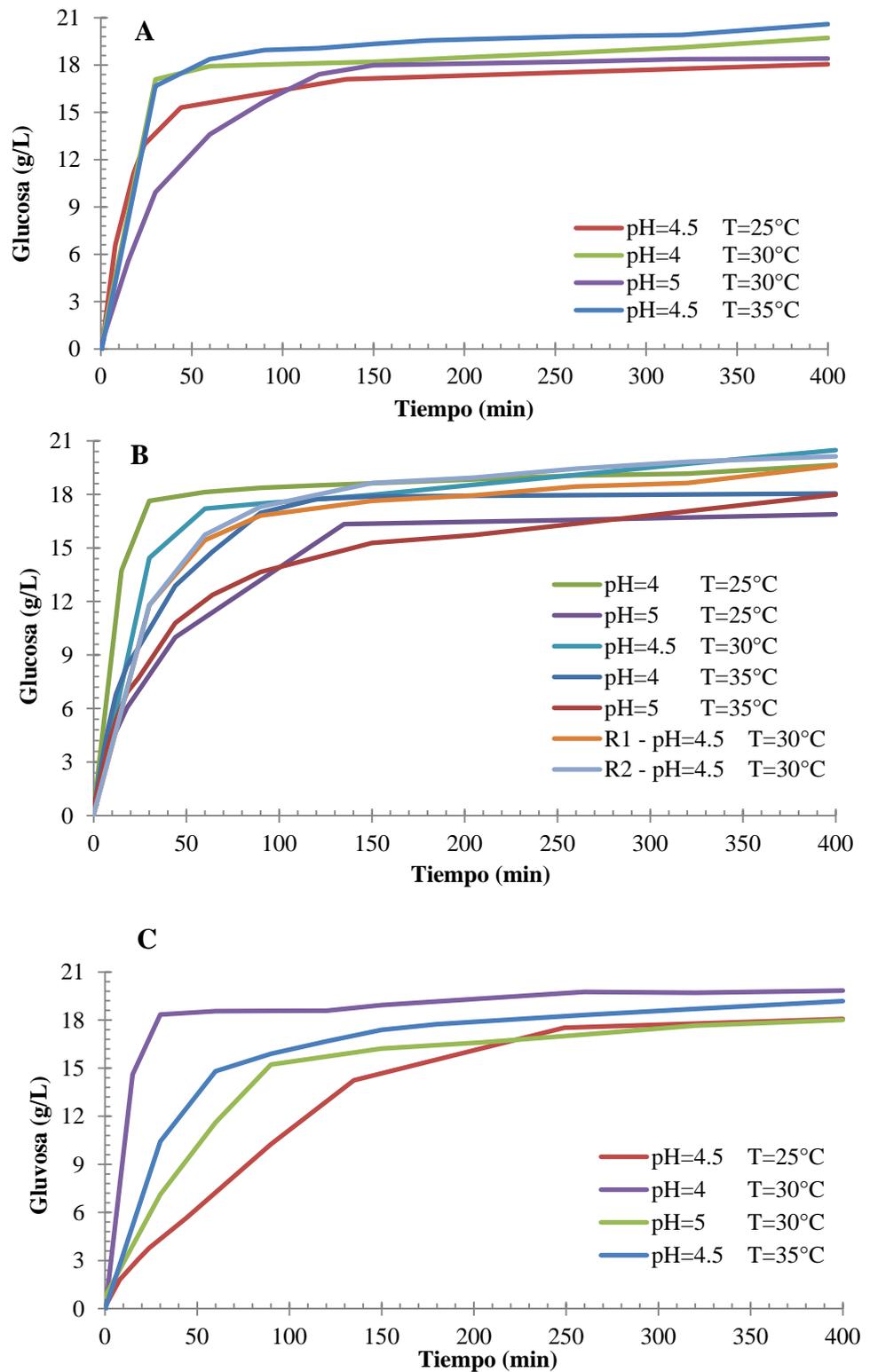


Figura 20: Perfil de concentración de Glucosa en el tiempo a pH de 4, 4.5, 5 y temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C. (A) [E]: 1:2, (B) [E]: 1:4 y (C) [E]: 1:10 – *A. Oryzae*

4.4.2.2. Productividad

a) Interacción de factores

En la figura 21 observamos los efectos de la interacción de los factores de acuerdo a las corridas experimentales realizadas se obtuvo en el factor de temperatura, los valores de productividad aumentan a 25 y 35 °C, presentando una caída a la 30 °C, para el factor pH presenta una alta inestabilidad frente a la variación de los valores, se trabajó en condiciones de pH ácidos obteniendo que el valor de 4.5 es el óptimo ya que valores mayores o menores a este producen una caída en la productividad. En cuanto a la concentración de enzima se observó que tiene una relación directa con la productividad al aumentar la concentración de enzima se obtiene un incremento considerable de la productividad en distintos estudios se reportan la termo resistencia de lactasas provenientes de *A. oryzae* además de una sensibilidad a las variaciones de (Bosso, Morioka, Santos, & Sugimoto, 2016) (Rhimi, y otros, 2010) (Janaína, y otros, 2012)

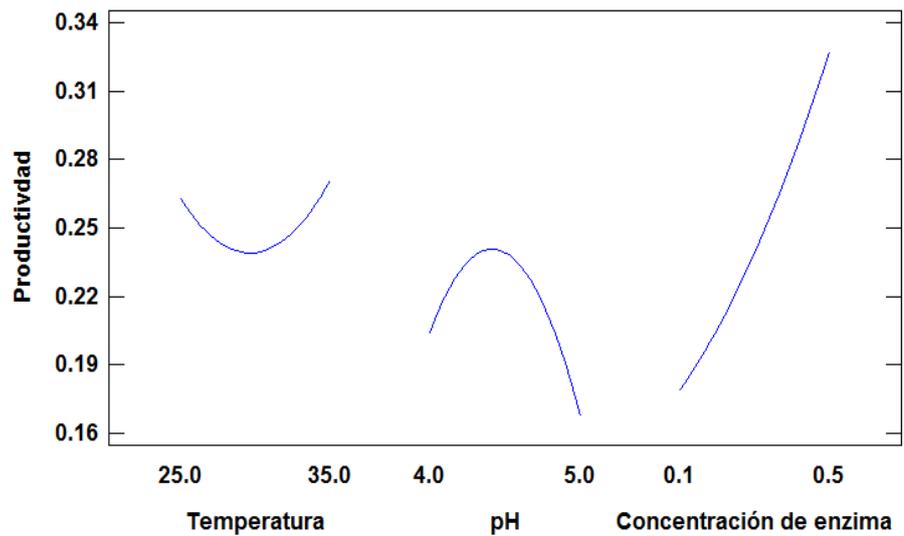


Figura 21: Efectos principales de la temperatura, pH y concentración de enzima sobre la productividad – *A. oryzae*

b) Superficies de respuesta

En las gráficas de superficie de respuesta presentadas en la figura 22 se observó que existe un amplio rango de valores tanto para pH como para temperatura, ya que para valores óptimos de productividad se tiene un rango de valores de pH desde 4 a 4.8 y para temperatura la productividad es mayor a temperaturas menores de 28 °C y mayores de 32 °C esto se debe a la termo resistencia que presenta la lactasa proveniente de *A. oryzae* en cuanto al factor de concentración de enzima se observa una leve influencia en el aumento de la productividad llegando hasta valores de 0.38 g/L*min.

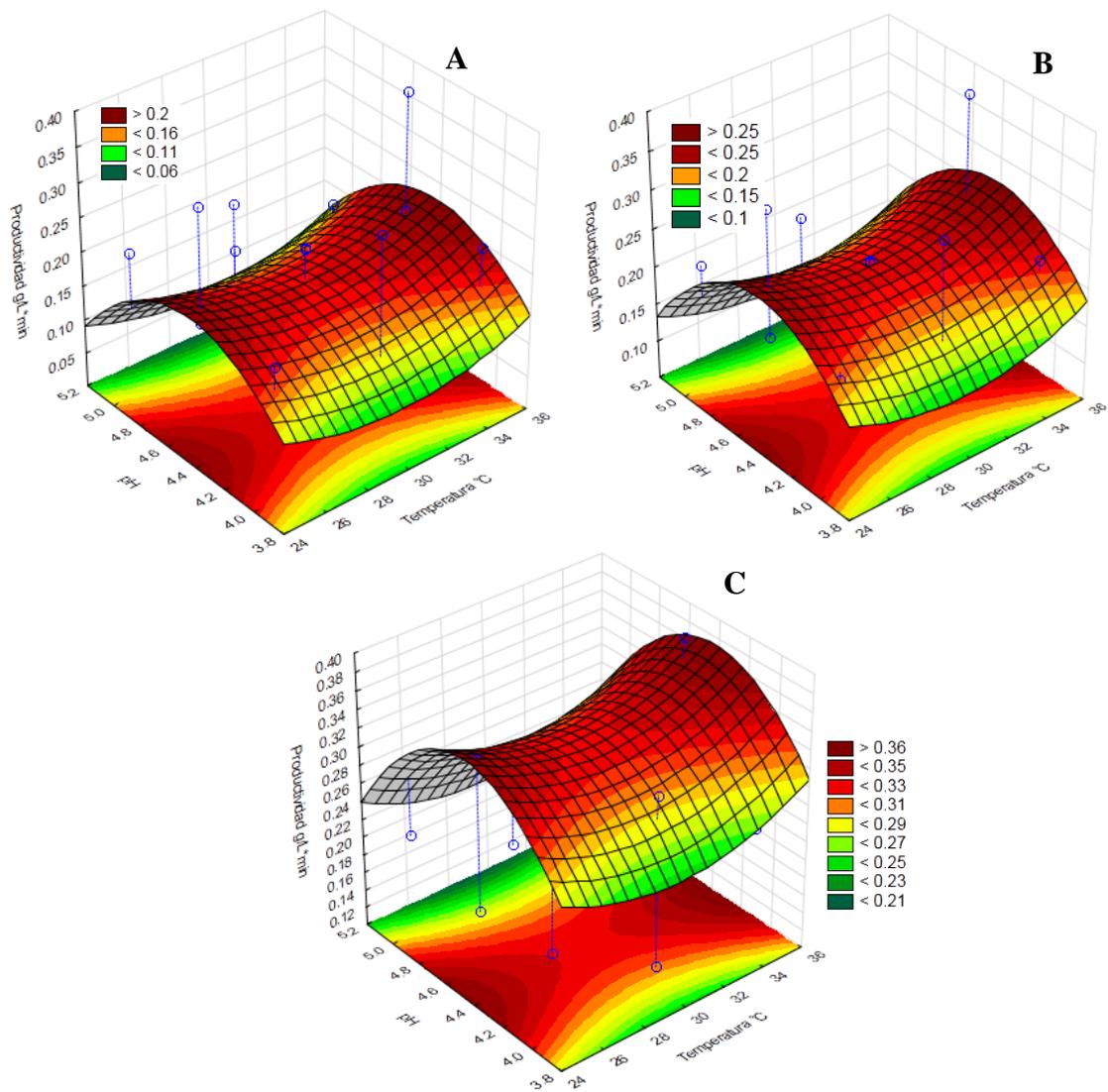


Figura 22: Superficies de respuesta para la Productividad con β -Galactosidasa en lactosuero.

Concentración de Enzima: (A), 0.1 g/L, (B) 0.25 g/L y (C) 0.5 g/L - *A. oryzae*

c) Análisis de varianza

En la tabla de ANOVA tenemos que con un error del 5% los factores de pH y concentración de enzima tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la variable respuesta mencionada además del factor BB (pH^2), obteniendo un R^2 de 97.4024%.

Cuadro 24: Análisis de Varianza para la productividad – *A. oryzae*

Fuente	Suma de Cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
A:Temperatura	0.0001399	1	0.0001399	0.38	0.5659
B:pH	0.00259236	1	0.00259236	6.99	0.0457
C:Concentración de enzima	0.0437192	1	0.0437192	117.91	0.0001
AA	0.00283648	1	0.00283648	7.65	0.0396
AB	0.00206116	1	0.00206116	5.56	0.0649
AC	0.00007477	1	0.000074773	0.20	0.6722
BB	0.0103652	1	0.0103652	27.95	0.0032
BC	0.00353541	1	0.00353541	9.53	0.0272
CC	0.00062629	1	0.000626297	1.69	0.2504
Error total	0.00185397	5	0.000370793		
Total (corr.)	0.0713712	14			

R-cuadrada = 97.4024 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 92.7266 por ciento

Error estándar del est. = 0.019256

Error absoluto medio = 0.00908758

Estadístico Durbin-Watson = 1.80252 (P=0.1833)

Mediante la utilización del software mencionado anteriormente se determinó los valores óptimos de los factores para obtener el valor óptimo de la variable en estudio productividad siendo de 0.386555 g/L*min como se muestra en la tabla 25.

Cuadro 25: Valores de Optimización para la productividad -

A.Oryzae

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	25.0	35.0	35.0
pH E	4.0	5.0	4.181
Concentración de enzima	0.1	0.5	0.5

El comportamiento de la productividad frente al efecto de los factores es definido por la siguiente ecuación.

Productividad

$$\begin{aligned} &= -4.57769 - 0.0260883 \\ & * Temperatura + 2.23108 * pH \\ & + 1.34794 * Concentración de enzima \\ & + 0.00110867 * Temperatura^2 \\ & - 0.00908 * Temperatura * pH \\ & + 0.00425758 * Temperatura \\ & * Concentración de enzima \\ & - 0.211933 * pH^2 - 0.292758 * pH \\ & * Concentración de enzima \\ & + 0.352278 \\ & * Concentración de enzima^2 \end{aligned}$$

4.4.2.3. Grado de hidrolisis

a) Interacción de factores

En la figura 23 observamos los efectos de la interacción de los factores para el grado de hidrolisis de acuerdo a las corridas experimentales realizadas se obtuvo en el factor de temperatura, que a mayor temperatura mayor es la productividad, para el factor pH presenta una alta inestabilidad frente a la variación de los valores, se trabajó en condiciones de pH ácidos obteniendo que el valor de 4.5 es el óptimo al igual que para la otra variable en estudio Productividad ya que valores mayores o menores al valor mencionado producen una caída en la productividad. Por otro lado el factor de concentración de enzima se observó que mantiene una relación directa con el grado de hidrolisis. En distintos estudios se reportan la termo resistencia de lactasas provenientes de *A. oryzae* además de una sensibilidad a las variaciones de pH (Bosso, Morioka, Santos, & Sugimoto, 2016) (Rhim, y otros, 2010) (Janaína, y otros, 2012). Es por esta razón que otros autores optan por realizar una inmovilización de la enzima para poder mayor estabilidad frente a los factores que es sometido su acción hidrolítica (Janaína, y otros, 2012).

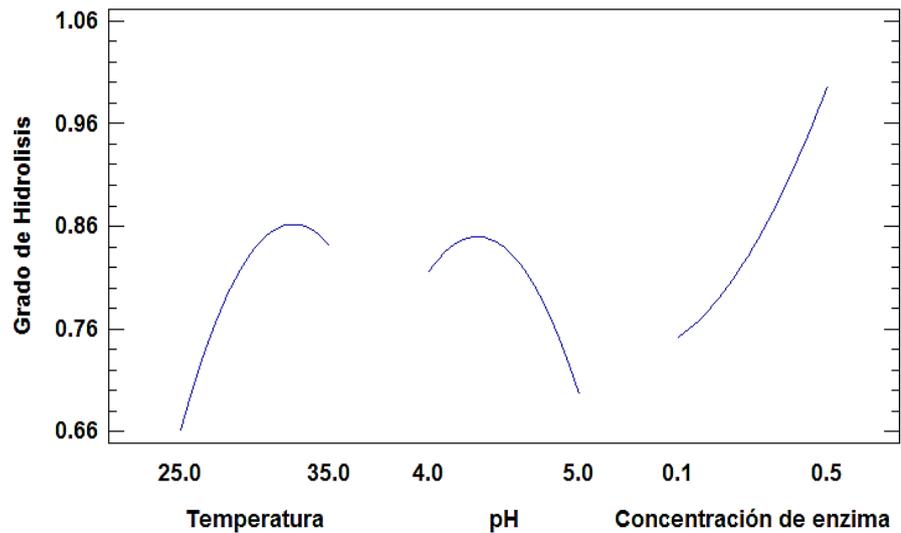


Figura 23: Efectos principales de la temperatura, pH y concentración de enzima sobre el grado de hidrolisis - *A. Oryzae*

b) Superficie de respuesta

En las gráficas de superficie de respuesta presentadas en la figura 24 se observó que existe un rango de valores óptimos de pH que van desde 4 a 4.6 al igual que la temperatura se observa un rango pequeño que va 30 a 36 °C en cuanto al factor de concentración de enzima se observa una leve influencia en sobre el grado de hidrolisis llegando únicamente hasta valores de 60%, esto se debe la inestabilidad que presenta esta enzima frente a los factores expuestos en las condiciones de trabajo además del inhibidor principal que es la galactosa, este monosacárido está presente en recientes investigación por su afinidad al sitio activo que da lugar a la hidrolisis de la lactosa. (Pereira-Rodríguez, y otros, 2012)

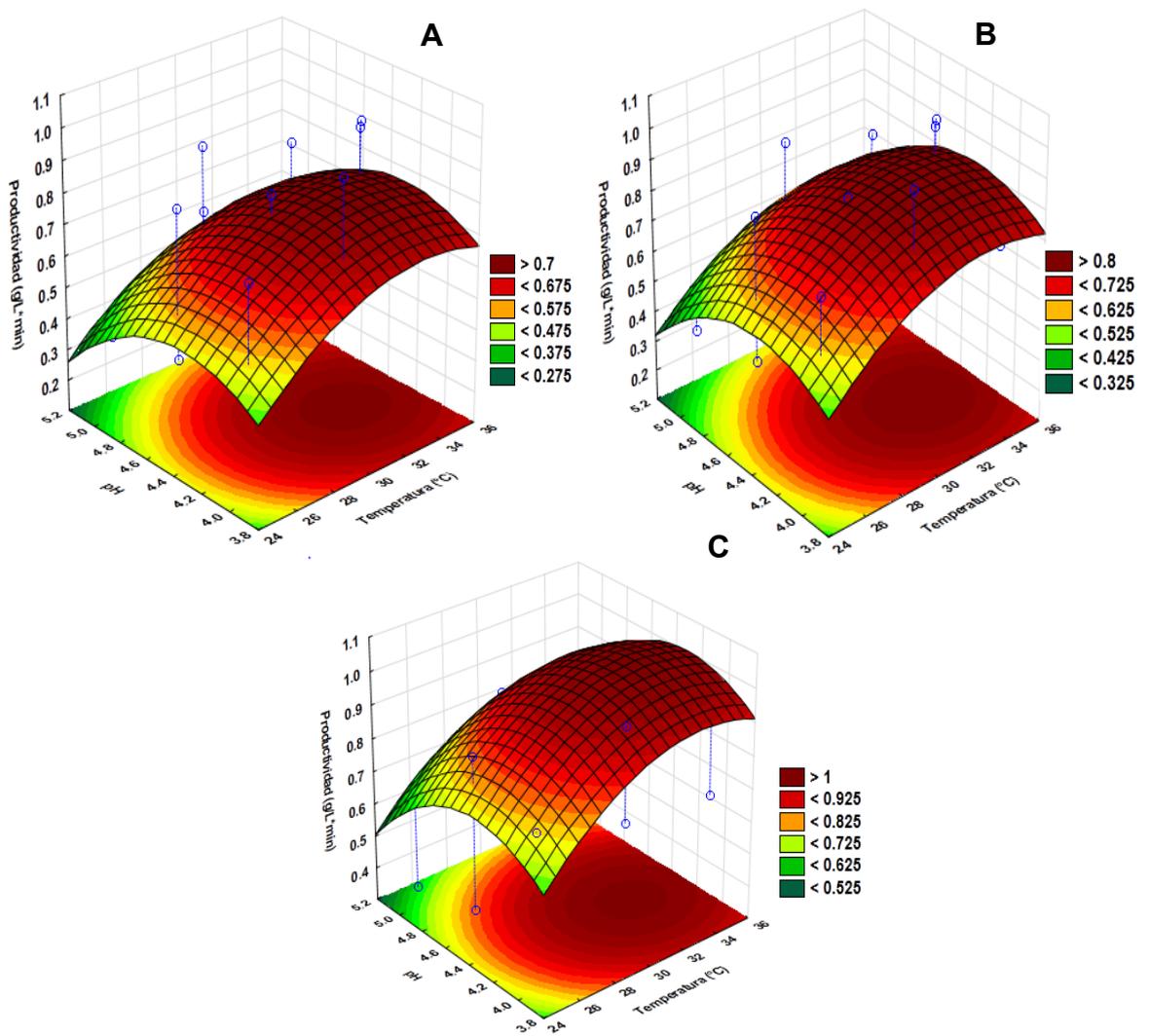


Figura 24 Superficies de respuesta para el Grado de hidrolisis con B-Galactosidasa en lactosuero. Concentración de Enzima: (A), 0.1 g/L, (B) 0.25 g/L y (C) 0.5 g/L - A. *Oryzae*

c) Análisis de Varianza

El (ANOVA) para el grado de hidrolisis mostrada en la tabla 26 nos indica que para un error del 5%, los factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la

variable respuesta mencionada son la temperatura y concentración de enzima obteniendo un R^2 de 95.0439%.

Cuadro 26: Análisis de Varianza para el grado de hidrolisis – *A. oryzae*

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
A:Temperatura	0.062692	1	0.062692	14.73	0.0121
B:pH	0.0277887	1	0.0277887	6.53	0.0509
C:Concentracion de enzima	0.120835	1	0.120835	28.40	0.0031
AA	0.0285905	1	0.0285905	6.72	0.0487
AB	0.0640343	1	0.0640343	15.05	0.0117
AC	0.0400686	1	0.0400686	9.42	0.0278
BB	0.0255565	1	0.0255565	6.01	0.0579
BC	0.000830346	1	0.00083034	0.20	0.6771
CC	0.00387962	1	0.00387962	0.91	0.3835
Error total	0.0212754	5	0.00425508		
Total (corr.)	0.429275	14			

R-cuadrada = 95.0439 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 86.1228 por ciento

Error estándar del est. = 0.065231

Error absoluto medio = 0.0302723

Mediante la utilización del software mencionado anteriormente se determinó los valores óptimos de los factores para obtener el valor óptimo de la variable en estudio grado de hidrolisis siendo de 103.974% como se muestra en la tabla 27.

Cuadro 27: Valores de Optimización para el grado de hidrolisis - *A. oryzae*

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	25.0	35.0	26.159
Ph	4.0	5.0	4.000
Concentración de enzima	0.1	0.5	0.5

El comportamiento de la variable respuesta frente a los efectos de los factores está definido por la siguiente ecuación:

Grado de Hidrolisis

$$\begin{aligned}
 &= -3.42008 + 0.0309833 \\
 &\times \textit{Temperatura} + 1.39967 \times \textit{pH} \\
 &+ 3.68362 \times \textit{Concentracion de enzima} \\
 &- 0.00351983 \times \textit{Temperatura}^2 \\
 &- 0.05061 \times \textit{Temperatura} \times \textit{pH} \\
 &+ 0.0985576 \times \textit{Temperatura} \\
 &\times \textit{Concentracion de enzima} - 0.332783 \\
 &\times \textit{pH}^2 + 0.141879 \times \textit{pH} \\
 &\times \textit{Concentracion de enzima} + 0.876778 \\
 &\times \textit{Concentracion de enzima}^2
 \end{aligned}$$

Cuadro 28: Resumen de los resultados obtenidos de la evaluación de la influencia de la Temperatura, pH y concentración de enzima sobre la productividad y grado de hidrólisis

– *A. oryzae*

Bloque	Temperatura (°C)	pH	Concentración de Enzima (g/L)	Productividad (g/L*min)	Grado de Hidrólisis (%)
1	25	4	0.25	0.1944	0.775
2	35	4	0.25	0.2239	0.6588
3	25	5	0.25	0.2139	0.3667
4	35	5	0.25	0.1526	0.7566
5	25	4.5	0.10	0.1831	0.418
6	35	4.5	0.10	0.2109	0.91
7	25	4.5	0.50	0.3479	0.8823
8	35	4.5	0.50	0.3816	0.934
9	30	4	0.10	0.1227	0.6861
10	30	5	0.10	0.1497	0.6482
11	30	4	0.50	0.3102	0.9726
12	30	5	0.50	0.2181	0.8566
13	30	4.5	0.25	0.2236	0.8105
14	30	4.5	0.25	0.2207	0.8105
15	30	4.5	0.25	0.2201	0.8104

4.4.3. Resumen general

A partir de las corridas experimentales desarrolladas de cada enzima, para cada variable respuesta se obtuvieron valores óptimos mencionados en las tablas 20, 22, 25 y 27 las que fueron extraídas del software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.I.

Para poder seleccionar la corrida experimental en la que obtenga el mayor valor en productividad y grado de hidrólisis, se calculó el valor promedio entre los valores óptimos de ambas variables respuesta para cada, obteniéndose de tal forma las corridas experimentales expuestas en la tabla 29.

Cuadro 29: Mejor corrida experimental de cada enzima

Enzima	Temperatura (°C)	pH	Concentración de Enzima (g/L)	Productividad (g/L*min)	Grado de Hidrólisis (%)
<i>K. lactis</i>	45	7	0.50	1.9266	98.58
<i>A. oryzae</i>	30	4	0.50	0.3816	93.40

La influencia de los factores sobre las variables respuesta para cada enzima fue muy variada, teniendo únicamente a la concentración de enzima con una relación proporcional con cada una de las variables respuesta.

V. CONCLUSIONES

- En la caracterización del suero de quesería a nivel microbiológico se encontró 23×10^3 UFC/mL en aerobios mesófilos, 26×10^6 UFC/mL en mohos y 70×10^6 UFC/mL en levaduras, estando comprendidos dentro de los límites permisibles para un suero fresco.
- La composición química proximal del suero de quesería a utilizarse en la hidrólisis fue: Proteína láctea $1.141\% (m/m) \pm 0.038$, grasa láctea $0.29\% (m/m) \pm 0.001$ indicando la autenticidad del suero, en calcio $58 \text{ mg}/\% \pm 0.0012$, magnesio $31 \text{ mg}/\% \pm 0.0022$, cantidades que no representaron como factores de inhibición para ambas enzimas, en lactosa $46.5211 \pm 0.028 \text{ g/L}$, glucosa $0.0081 \pm 0.0027 \text{ g/L}$ y galactosa $0.0219 \pm 0.0027 \text{ g/L}$. De las características fisicoquímicas se obtuvo: acidez titulable $0.147\% \pm 0.0007$, pH 6.49 ± 0.006 y densidad $1.036 \text{ g/mL} \pm 0.002$ indicando la frescura del suero.
- Del de rango de linealidad y determinación parámetros cinéticos se obtuvo para la enzima procedente de *K. lactis* una actividad volumétrica de 10.565 UI/ml , Km y Vmax de 181.831 g/L y 0.847 g/L*min respectivamente. En cuanto a la enzima precedente de *A. oryzae* una actividad volumétrica de 0.720 UI/ml , Km y Vmax de 149.519 g/L y 0.086 g/L*min respectivamente
- La influencia de los factores sobre las variables respuestas estudiadas: grado de hidrólisis y productividad, fueron diferentes frente a las dos enzimas, encontrando que la enzima procedente de *A. oryzae* tiene una baja influencia frente al factor temperatura, caso contrario con la enzima procedente de *K.lactis*, sin embargo para el factor de pH ambas fueron influenciadas por este factor en una proporción considerable, en cuanto a la concentración de enzima tiene una

influencia directamente proporcional frente al grado de hidrolisis y productividad con ambas enzimas.

- De las enzimas estudiadas la que presentó la mayor acción hidrolizante sobre el suero de quesería fue la enzima procedente de *K. lactis*, obteniendo a una temperatura de 45 °C, pH de 7 y concentración de enzima de 0.5 mg/mL un grado de hidrolisis de 98.58 % y una productividad de 1.9266 g/L*min.

VI. RECOMENDACIONES

- Estudiar el efecto de otros factores sobre la hidrólisis de lactosa presente en el lactosuero tales como la presencia de galactosa, calcio, iones y entre otros que están involucrados en la reacción.
- Estudiar el proceso de hidrólisis de lactosa en suero de quesería utilizando métodos de inmovilización de enzima con los valores óptimos y comenzar con un proceso en escala.
- Estudiar la aplicabilidad del proceso de hidrólisis de lactosa en las industrias queseras de menor escala en nuestra localidad tratando de reducir su costo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES

- Riera Rodriguez, D. A. (2014). *Aislamiento de peptidos Biologicamente activos a partir de BSA*. España.
- Abd El-Salam, M., El-Shibiny, S., & Salem, A. (2009). Factors affecting the functional properties of whey protein products: a review. *Food Reviews International*, 25(3), 251-270.
- Adam, A., Rubio-Teixeira, M., & Polaina, J. (2004). Lactose: The milk sugar from a biotechnological perspective. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44(7-8): 553-7.
- Alam, S., Stevens, D., & Bajpai., R. (1988). Production of butyric acid by batch fermentation of cheese whey with *Clostridium beijerinckii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 359-364.
- Al-Muftah, A., & Abu-Reesh, I. (2005). Effects of internal mass transfer and product inhibition on a simulated immobilized enzyme-catalyzed reactor for lactose hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 23(2):139-153.
- Ángel Pereira-Rodríguez, R. F.-L.-S.-A. (2012). Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* B-galactosidase. *Journal of Structural Biology*, 392-401.
- AOAC International. (2011). *Official Methods of Analysis*. USA.
- Araujo, K., Páez, G., Mármol, Z., Ferrer, J., Ramones, E., Aiello Mazzarri, C., & Rincón, M. (2007). Effect of lactose concentration on the grow kinetics of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* and production of b-D-galactosidase

- (E.C. 3.2.1.23). *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*.
- Barnes, L. (1994). *Manual de nutrición en pediatría* (Vol. 3ra). (E. M. Panamericana, Ed.) Buenos Aires, Argentina.
- Beltran, L., & Acosta, A. (2012). Empleo de una β -galactosidasa comercial de *Kluyveromyces lactis* en la hidrólisis de lactosuero. *Hechos Microbiologicos*, 25-35.
- Birgit Hickstein, & Urs Alexander Peuker J. Appl. Polym. (2009). Modular process for the flexible synthesis of magnetic beads-Process and product validation Birgit Hickstein¹, and Urs Alexander Peuker J. Appl. Polym. Sci. 112, 2366-2373.
- Bosso, A., Morioka, L. R., Santos, L. F., & Sugimoto, H. H. (2016). Lactose hydrolysis potential and thermal stability of commercial β -galactosidase in UHT and skimmed milk. *Food Science and Technology*.
- Bozanic, R., Barukcic, I., Lisak Jakopovic, K., & Tratnik, L. (2014). Possibilities of wheyutilisation. *Austrin J. Nutr. Food Sci*.
- Chile, Instituto Nacional de Normalización (INN). (2007). Norma chilena. Miel de abejas- Determinación del contenido de fructosa, glucosa, sacarosa, turanosa y maltosa- Método HPLC con detector IR. NCh574cR2006. Santiago, Chile.
- CHR- HANSEN, I. e. (2015). Lactasa en la industria láctea. *FOOD INGREDIENTS BRASIL*.(32), 21.
- Correa N., Y. M., & Mosquera M., Ó. M. (2012). Cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia. *Tumbaga*, 115-129.

- D. Rodríguez Martínez , & Pérez Méndez, L. F. (2006). Intolerancia a la lactosa. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*.
- De Moreno, M., Smith, J., & Smith, R. (1986). Mechanism studies of coomassie blue and silver staining of proteins. *J. Pharm. Sci.*, 75, 907–911.
- Dr. Ramón Tormo. (Diciembre de 2011). Especialista en enfermedades del aparato digestivo y pediatría. (e. Sanidad, Entrevistador) Vanguardia.
- Dr. Suárez Crespo, J. F. (14 de Noviembre de 2016). *Exploraciones Digestivas Funcionales*. Recuperado el 30 de Noviembre de 2016, de <http://funcionales.es/monografias/intolerancia-a-la-lactosa/>
- Dragone, G., Mussatto, S., Oliveira, J., & Teixeira, J. (2009). Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*, 929-935.
- Esteban, S. J., Fernanda, R. M., & Cristinaa, B. G. (2015). Modelo de hidrólisis de lactosa para fermentación láctica en una base probiótica y simbiótica. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, 53-68.
- F., L. J., & C., A. A. (2012). Empleo de una β -galactosidasa comercial de *Kluyveromyces lactis* en la hidrólisis de lactosuero. *Hechos Microbiológicos*, 25-25.
- Foegeding, E., & Luck., P. (2002). Whey protein products. En B. L. Caballero, *Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition* (págs. 1957-1960). New York: Academic Press.

- Fountoulakis, M., Juranville, J., & Manneberg. (1992). Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowry quantitation assays, using nonglycosylated and glycosylated proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 24, 265–274.
- Fox, P. F. (1987). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Vol. I). London and New York.
- Fu, J., & Tseng, Y. (1990). Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. *Environ Microbiol*, 56: 919-923.
- G.W. Smithers. (2008). Whey and whey proteins—from ‘gutter-to-gold’. *Int. Dairy J.* 18, 695-704.
- Galan, M. (1999). *Hidrólisis de lactosa con [beta]-galactosidasas de Kluyveromyces fragilis y de Escherichia coli* (Tesis de Ph.D. Departamento de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid ed.). Madrid.
- GARCÍA BELLO, D. (3 de Noviembre de 2014). *dimetilsulfuro*. Recuperado el Octubre de 2016, de <http://dimetilsulfuro.es>
- Ghasemi, M., Najafpour, G., Rahimnejad, M., Aeineh, P., Sedighi, M., & Hashemiyeh., B. (2009). Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus*. *African Journal of Biotechnology* , 81-84.
- Guerrero Ramosa, C., Salas Valerioa, W., & Baldeón Chamorroa, E. (2015). EVALUACIÓN INSTRUMENTAL DE LA TEXTURA DEL QUESO ELABORADO CON SUERO CONCENTRADO POR ULTRAFILTRACIÓN. *Rev Soc Quím Perú.* , 81(3) 2015.

- Guerrero, J., Ramirez, A., & Puente, W. (2011). Caracterización del suero de queso blanco del combinado lácteo santiago. *Tecnología Química*, 31(3), 93-100.
- Guimarães, P., Teixeira, J., & Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey, *Biotechnol. Adv.* 28, 375-384.
- Haider, T., & Husain, Q. (2009). *Biochem. Eng. J.* 43-307.
- Harju, M., Kallioinen, H., & Tossavainen. (2012). Lactose Hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*, 22:104-109.
- Hatzinikolaou, D., Katsifas, E., Mamma, D., Karagouni, A., Christakopoulos, P., & Kekos, D. (2005). Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal.*, 24: 161-172.
- Henrissat B, C. I. (1995). conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92, 7090-7094.
- Henrissat B, D. G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Op. Struct. Biol.* 7, 637-644.
- Henrissat, B. (1998). Glycosidase families. *Biochem. Soc. Trans.*, 153-156.
- Hernández-Rojas, M., & Vélez-Ruiz, J. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Programa de Maestría en Ciencia de Alimentos*, Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 8 -2 (2014): 13-22.

- Hobman, P. (1984). Review of processes and products for utilization of lactose in deproteinated milk serum. *Journal of Dairy Science*, 67(11):2630-2653.
- Holsinger, V., & Kligerman, A. (1991). Applications of lactase in dairy foods and other foods containing lactose. *Food Technology*, 93-95.
- Huang, Y., & Yang, S. (1998). Acetate production from whey lactose using co-immobilized cells of homolactic and homoacetic bacteria in a fibrous-bed bioreactor, *Biotechnol. Bioeng*, 60: 498-507.
- Huber, R. E., & Zabin, A. e. (1982). Inactivation of B-galactosidase by iodination of tyrosine-253. *Biochemistry* 21, 5052-5055.
- Illanes, A., & Enzyme Biocatalysis. (2008). *Valparaiso: Springer*. 1a ed. .
- Illanes, A. (2011). Whey upgrading by enzyme biocatalysis. *Electronic Journal of Biotechnology*.
- Instituto Adolfo Lutz. (2005). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. Ministerio da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, Brasil: 4ª edición, 1018 p.
- James, E., Noble, Mark, J., & Bailey. (2009). Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 463: 73-95.
- Janaína, F., Zanella, G. C., Soares, S. L., de, R. M., Luiz, C. V., & Júlio, R. E. (2012). Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized B-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 178-186.

- Jelen, P. (2003). Whey processing. Utilization and products. 2739-2745. En J. F. H. Roginski, *Encyclopedia of Dairy Science* (págs. 2739-2745). London, UK: Academic, Press.
- Jovanovic, S., Barac, M., & Macej, O. (2005). Whey proteins-Properties and Possibility of Application. *Mljekarstvo*, 55(3), 215-233.
- Jovanovic, S., Barac, M., & Macej, O. (2005). Whey proteins-Properties and Possibility of Application. *Mljekarstvo*, 55(3), 215-233.
- Juurs DH, H. T. (2001). A structural view of the action of Escherichia coli (lacZ) β -galactosidase. *Biochemistry* 40, 14781-14794.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., & Vicaria, J. (2002). A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb.Technol.*31, 300-309.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., & Vicaria, J. (2004). Kinetic models of activity for B-galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme and Microbial Technology*, 33-40.
- Kaplan, A., Glucose, & Kaplan, A. (1984). Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. *Princeton*, 1032-1036.
- Kim, C., Ji, E., & Oh, D. (2003). Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* b-galactosidase in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, 1769-1774.
- Klein, M. P., Fallavena, L. P., Schöffner, J. d., Ayub, M. A., Rodrigues, R. C., Ninow, J. L., & Hertz, P. F. (2013). High stability of immobilized B-D-galactosidase for

lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers*, 465-470.

Koo, W. (6 de Octubre de 2015). *Agrodataperu*. Recuperado el 17 de Junio de 2016, de <http://www.agrodataperu.com/2015/10/quesos-peru-importacion-septiembre-2015.html>

Ladero Galán, M. (1999). Hidrólisis de lactosa con beta-galactosidasas de *Kluyveromyces fragilis* y de *Escherichia coli*. Madrid.

Ladero, M., Santos, A., Garcia, J., & Garcia-Ochoa, F. (2000). Kinetic modelling of lactose hydrolysis with a beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 583–592.

Ladero, M., Santos, A., Garcia, J., & Garcia-Ochoa, F. (2000). Kinetic modelling of lactose hydrolysis with a beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 583-592.

Lampen. (1971). La levadura invertasa y *Neurospora*. "Las enzimas". *Academic Press*, 3^o Edición. Nueva York. EE.UU., 291-305.

Liu, X. K., Chung, S. Y., & Yousef, A. (2005). Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Journal Process Biochemistry* 40, 13-24.

Londoño, M. (2006). Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. Perspectivas en nutrición humana. *Revista*

Perspectivas en Nutrición Humana-Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia, 11-20.

Londoño, M. J. (2008). Bebida fermenteada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus caesi*. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín*, 4409-4421.

Ltda. Chr. Hansen Indústria e Comércio. (2015). Lactasa en la industria láctea. *FOOD INGREDIENTS BRASIL*.(32), 21.

Mahoney, R. (1997). Lactose: Enzymatic Modification. In: *Advanced Dairy Chemistry*. London: Fox PF. and P. McSweeney, Eds; . 77-125.

Mandal, S., Puniya, M., Sangu, K., Dagar, S., Singh, R., Puniya, A., . . . wastes, o. r. (2012). the shifting perception after valorization,in: M. Chandrasekaran (Ed.), *Valorization of Food Processing By-products. CRC Press Taylor & Francis Group*, pp. 617–648.

Marcela Panaro Mariotti, Hideko Yamanaka, Angela Regina Araujo, & Henrique Celso Trevisan Braz. (2008). Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -Galactosidase. *Arch. Biol. Tech. 6 th ed.*, 51.

Marshall, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, 9(2), 136-156.

Matioli , G., Moraes , F., & Zanin, G. (2003). Operational stability and kinetics of lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *ActaSci. Health Sci.*25, 7–12.

Mawson, A. J. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Biores. Technol*, 47,195-203.

- Mawson, J. (2003). Fermentation of Whey. En B. Caballero, *Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition, Second Edition* (págs. 6157-6163). London: Academic Press.
- Méd. Vet. Aníbal Zunino. (2006). DULCE DE LECHE: Aspectos básicos para su adecuada elaboración. *Ministerio de Asuntos Agrarios y Producción*.
- Mehaia, M., Cheryan, M., & Álvarez, J. (1993). Hydrolysis of whey permeate lactose in a continuous stirred tank membrane reactor. *International Dairy Journal*, 3(2):179-192.
- Miller, H. (1972). Experiments in Molecular Biology. *Cold Spring Harbor Lab*, 398-403.
- Minagri, Sierra Exportadora, & terradina. (15 de Marzo de 2016). *Gestión.pe*. Recuperado el 21 de Octubre de 2017, de <https://gestion.pe/economia/exportaciones-queso-peruano-crecieron-352-2015-114344>
- Morales, J., Choi, J., & Kim, D. (2006). Production rate of propionic acid in fermentation of cheese whey with enzyme inhibitors. *Environmental Progress*, 228-234.
- Morr, C., & Ha, E. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 431-439.

- Morr, C; Ha, E.Y. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 431-439.
- Muñi, A. G., Paez, J. F., & Ramones., J. F. (2005). Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica* 15, 361-367.
- N godawithana, T., & Reed, G. (1993). *Enzymes in Food Processing*. 3rd ed.: San Diego: Academic Press.
- N unes, M., Roig, S., & Alegre, R. (1993). Produção e propriedade de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*- NRRLY-2415. *Revista de Farmácia e Bioquímica USP.*, 29(1): 25-30.
- Nelson D. (2004). Principios de Bioquímica. *Freeman and Company*, 4° Edición, pág. 202-233.
- Nelson, D., & Cox, M. (2008). *Lehninger Principios de Bioquímica*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Nicorescu, I., C. Loisel, A., Riaublanc, C., Vial, G., Djelveh, G., & Cuvelier, J. L. (2009). Effect of dynamic heat treatment on the physical properties of whey protein foams. *Food Hydrocolloids*, 1209-1219.
- NIH. (Junio de 2009). *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; Intolerancia a la lactosa*. Recuperado el 30 de Noviembre de 2016, de <https://www.niddk.nih.gov/health-information/health-topics/digestive-diseases/lactose-intolerance/Pages/facts.aspx>

- Novo. (1977). Determination of *K fragilis* lactase. *Método analítico no AF 171/1-GB*.
- NTE INEN 2594:2011. (2011). *Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos, otros productos lácteos, suero de leche líquido, requisitos*. Quito - Ecuador: FLUID WHEY. REQUIREMENTS.
- Panesar, P. J. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105, 1-14.
- Panesar, P., Kennedy, D., Gandhi, D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105(1), 1-14.
- Papayannakos, N., Markas , G., & Kekos, D. (1993). Studies on modeling and simulation of lactose hydrolysis by free and immobilized β -galactosidase from *Aspergillus niger*. *ChemEng J*, 52: 1-12.
- Parra Huertas, R. A. (16 de Abril de 2009). WHEY: IMPORTANCE IN THE FOOD INDUSTRY. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 62(1): 4967-4982. 2009.
- Parra, R. (2009). Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos. *Revista de la Facultad Nacional de Agricultura de Medellín*, 62(1), 4967-4982.
- Pereira-Rodríguez, Á., Fernández-Leiro, R., González-Siso, M. I., Cerdán, M. E., Becerra, M., & Sanz-Aparicio, J. (2012). Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Journal of Structural Biology*, 392-401.
- Pereira-Rodríguez, A., Fernandez-Leiro, R., Gonzalez-Siso, M., Cerdan, M., Becerra, M., & Sanz-Aparicio, J. (2012). *Structural basis of specificity in tetrameric Kluyveromyces lactis beta-galactosidase* (177(2) ed.).

- Pescumma, M., E. Hérbet, F., Mozzi, & Font., G. (2008). Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*, 25(3), 442-51.
- Pilar Usme, D. J. (2013). Microencapsulación de la lactasa como estrategia para mejorarla estabilidad y aplicación en la industria de los alimentos. *Corporación Universitaria Lasallista*.
- Piskulich Johnson, R. (01 de Junio de 2016). *Agraria.pe (Agencia agraria de noticias)*. Recuperado el 19 de Noviembre de 2016, de <http://infolactea.com>
- Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(4), 397-403.
- Quiminet. (05 de Diciembre de 2005). *Artículos: La Lactosa, Beneficios y usos en alimentos*. Recuperado el 30 de Noviembre de 2016, de Quiminet informacion y negocios segundo a segundo: www.quiminet.com
- Ramakrishnan, S., & Hartley, B. (1993). Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase. *Microbiol*, 59: 4230-4235.
- Rastall, R. (2010). *Functional Oligosaccharides: Application and Manufacture, Annual Review of Food Science and Technology* (1 ed.).
- Rhimi, M., Boisson, A., Dejob, M., Boudebouze, S., Maguin, E., Haser, R., & Aghajari, N. (2010). Efficient bioconversion of lactose in milk and whey: immobilization and biochemical characterization of a b-galactosidase from the dairy *Streptococcus thermophilus* LMD9 strain. *Research in Microbiology*, 515-525.

- Rodriguez, V. C. (2008). Proceso de elaboración de yogur deslactosar de leche de cabra. En *Ciencia Tecnologia de Alimentos* (págs. 109-115).
- Santana, M., E. Rolim, R., Oliveira, C. W., & Pinto., V. M. (2008). Obtaining oligopeptides from whey: Use of subtilisin and pancreatin. *American Journal of Food Technology. Americann Jurnal of Food Technology*, 315-324.
- Santos, A., Ladero, M., & Garcia-Ochoa. (1998). Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *kluuveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 558-567.
- Serna, L., & Rodriguez, A. (2005). Produccion biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 54-65.
- Shete, B., & Shinkar, N. (2013). Dairy industry waste water sources, characteristics & its effects on environment. *Int.J.Curr.Eng.Technol.*, 3,1611–1615.
- Shin, H., Park, J., & Yang, J. (1998). Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads. *Process Biochemistry*, 33(8):787-792.
- Sienkiewicz, T., & Riedel, C. L. (1990). Whey and Whey Utilization. *Th. Mann, Germany*.
- Sierra Exportadora. (2015). *Sierra exportadora*. Recuperado el 23 de Mayo de 2016, de <http://www.sierraexportadora.gob.pe>
- Sierra Exportadora. (15 de Marzo de 2016). *Sierra Exportadora*. Recuperado el 17 de Junio de 2016, de [http://www.sierraexportadora.gob.pe/perspectivas-para-la-](http://www.sierraexportadora.gob.pe/perspectivas-para-la)

exportacion-de-quesos-son-las-mejores-por-el-trabajo-de-fortalecimiento-de-la-cadena-productiva/

Sinha, R., Radha, C., Prakash, J., & Kaul., P. (2007). Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation . *Food Chemistry*, 1484-1491.

Siso, M. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey:areview. *Bioresour. Technol*, 57,1-11.

Spellman, D., & FitzGerald., G. O. (2006). Bitterness in Bacillus proteinase hydrolysates of whey proteins. *Food Chemistry*, 440-446.

Tena Aldave, M., & Jorrín, J. V. (2000). Estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales. Córdoba, España.

Tomás, C. (1998). Estudo da hidrólise da lactose por β -galactosidase na forma livre e imobilizada. 67.

Ureña, M., Varela, E., Arrieta, D., Umaña, E., Zamora, L., & Arias, M. (2007). *Evaluación de las posibles adulteraciones en miel de abeja comerciales de origen costarricense al compararlas con mieles artesanales provenientes de apiarios específicos*. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 57(12007). 68.

Ureña, M., Varela, E., Arrieta, D., Umaña, E., Zamora, L., & Arias, M. (2007). Evaluación de las posibles adulteraciones en miel de abeja comerciales de origen costarricense al compararlas con mieles artesanales provenientes de apiarios específicos. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 57(12007). 68.

- Valencia, E., & Ramírez, M. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos: Ciencia y cultura.*, 16(73): 27-31.
- Valerina, A. (2008). Patron genético de la hipolactasa de tipo adulto y adolescentes de Galicia. Mexico: MAD.
- Venkatesh, K., Okos, M., & Wankat, P. (1993). Kinetic model of growth and lactic acid production from lactose by *Lactobacillus bulgaricus*. *Process Biochemistry*, 28(4):231-241.
- Villarreal, F. A. (2014). Evaluación de la producción de galactoligosacáridos a partir de materias primas lácteas con B-galactosidasa inmovilizada. *Universidad Nacional de Colombia*.
- Walter-Smith, J. (1988). *Diseases of small intestine in childhood*. Butterworths. Londres, Reino Unido.
- Walzem, R., Dillard, C., & German, J. (2002). Whey components millenina of evolution create functionalities for mammalian nutrition what we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(4), 353-375.
- White A, R. D. (1997). Mechanism of catalysis by retaining beta-glycosyl hydrolases. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 7, 645-651.
- Wit, J. (2003). Dairy ingredients in non-dairy foods. *Encyclopedia of Food Science and Technology*, 718-727.
- Yang, S.-T., & Bednarcik, J. (2001a). *Production of Galacto-Oligosaccharides from Lactose by Immobilized β -Galactosidase, in Applied Biocatalysis in Specialty*

Chemicals and Pharmaceuticals. edited by B. D. Saha, D., American Chemical Society, Washington D.C.

Zadow, J. (2003). Protein concentrates and fractions. *Encyclopedia of Food Science and Technology*, 6152-6156.

Zadow, J. G. (1984). *Lactose: Properties and uses*. J. Dairy Sci.

Zhou, Q. Z., & Chen, X. D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, 33-40.

VIII. ANEXOS

ANEXO I: Especificaciones Técnicas ASTROLACT LX 2000



ESPECIFICACIONES TECNICAS ASTROLACT LX2000

Physical Properties

Description	Astrolact LX2000 is a purified liquid lactase preparation derived from the dairy yeast <i>Kluyveromyces Lactis</i> . The product has Kosher status.
Colour	Yellow to brown.
Clarity	Clear to opalescent.

Chemical Properties

Activity	≥ 2000 NLU/g
Heavy Metals	≤ 30 ppm (as Pb)
Lead	≤ 5 ppm
Arsenic	≤ 3 ppm
Mercury	$\leq 0,50$ ppm
Cadmium	$\leq 0,5$ ppm
pH	6,9 – 7,6
Glycerol	$\geq 47\%$ (w/w)

Microbiological properties

Standard plate count	≤ 100 en 1 ml
Coliforms	≤ 1 en 1 ml
Salmonella	ausente en 25 ml
Staphylococcus aureus	ausente en 1 ml
Escherichia coli	ausente en 25 ml
Listeria monocytogenes	ausente en 25 ml
Yeasts	≤ 10 en 1 ml
Moulds	≤ 10 en 1 ml
Antibiotic activity	ausente en ensayo
Mycotoxins	ausente en ensayo
Anaer, sulphite reducing bacteria	≤ 30 en 1 ml

The product complies with the purity specifications of the FAO/WHO's Joint Expert Committee of Food Additives (JECFA), with the Food Chemical Codex (FCC) and with the guidelines for Food Enzymes of the Scientific Committee for Food (SCF) of the EU.

Storage and stability

The product must be stored in the original sealed containers. The recommended storage temperature is 4 – 15 °C. If kept under these conditions the shelf-life is 24 months and the loss of activity is less than 5% per year.

Calle Miranga 160 Urb. Miranga, San Miguel
Lima-Peru
Telf. 511 5787598, Fax 511 5787532 Nextel: 422*2661
Rpm: +536320 Rpm: +537344
rosa.cervero@rosacervero.com.pe

ANEXO II: Especificaciones técnicas β -galactosidasa *A. oryzae*

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Product Specification

Product Name:
 β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae* - ≥ 8.0 units/mg solid

Product Number: G5160
CAS Number: 9031-11-2
MDL: MFCD00130623

Storage Temperature: -20 °C

TEST	Specification
units/mg solid	≥ 8.0
Activity with Lactose: One unit will hydrolyze 1.0 micromole of lactose per minute at pH 4.5 at 30 deg C.	
units/mg solid	≥ 8.0
Activity with o-nitro-phenyl-B-D-galactoside: One unit will hydrolyze 1.0 micromole of o-nitrophenyl-B-D-galactopyranoside per minute at pH 4.5 at 30 deg C.	
Note	
Product sold based on activity using lactose as substrate.	
Specification: PRD.1.ZQ5.10000006552	

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

ANEXO III: Parámetros modificados para la determinación de los carbohidratos el HPLC (lactosa, glucosa y galactosa).

Program File: Program Commands, Page 1 of 1
 Operator: LENOVO Printed: 06/02/2017 03:45:44 p.m.

Title: DETERMINACIÓN DE GLUCOSA, LACTOSA Y GALACTOSA
 Datasource: LENOVO-THINK_local
 Location: PRACTICA\TESIS LACTOSA.SEQ Created: 03/10/2016 11:10:52 a.m. by LENOVO
 Timebase: LENOVO-THINK_1 Changed: 19/12/2016 08:10:30 p.m. by LENOVO

```

Sampler.TempCtrl = Off
RI.Temperature.Nominal = 55
ColumnOven.TempCtrl = On
ColumnOven.Temperature.Nominal = 65 [°C]
Column_A.ActiveColumn = No
Column_B.ActiveColumn = No
Pressure.LowerLimit = 0 [psi]
Pressure.UpperLimit = 4200 [psi]
MaximumFlowRampDown = 1.997 [ml/min²]
MaximumFlowRampUp = 2.501 [ml/min²]
%A.Equate = "%A"
%B.Equate = "%B"
%C.Equate = "%C"
%D.Equate = "%D"
DrawSpeed = 10.000 [µl/s]
DrawDelay = 3000 [ms]
DispSpeed = 15.000 [µl/s]
DispenseDelay = 0 [ms]
WasteSpeed = 32.000 [µl/s]
SampleHeight = 2.000 [mm]
InjectWash = Both
WashVolume = 100.000 [µl]
WashSpeed = 25.000 [µl/s]
LoopWashFactor = 2.000
PunctureOffset = 0.0 [mm]
PumpDevice = "Pump"
InjectMode = Normal
RI_1.Step = 0.01 [s]
RI_1.Average = Off
Flow = 1.000 [ml/min]
%B = 0.0 [%]
%C = 70.0 [%]
%D = 0.0 [%]
Curve = 5

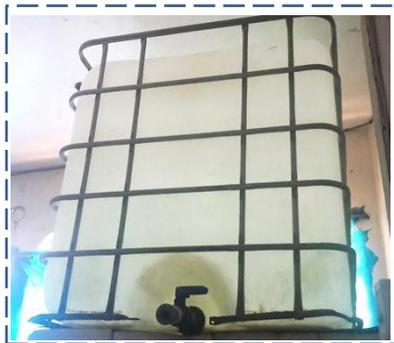
0.000 RI.Autozero
      Wait RI.Ready
      Inject
      RI_1.AcqOn

7.00 RI_1.AcqOff
     End
  
```

ANEXO IV: Procedimientos

Anexo 4.1: Elaboración de queso (Familia Sandoval)

- **LF** = Recepcionar la leche fresca - “LA GRANJA” con las siguientes condiciones: (Acidez: 16 - 18 °D, pH: 6.6 - 6.7, Grasa: 2.5 – 4 %).
- **LP** = Pasteurizar la leche a 63°C por 20 - 30 minutos.
- **LA** = Acondicionar (bajar la temperatura a 35-40 °C).
- **LC** = Añadir el cultivo Lácteo y dejar reposar por 20 min.
- **LM** = Añadir Cloruro de Calcio (0.2g/L) y el cuajo pastilla (0.0075g/L)
- **LR** = Dejar reposar de 30-45 minutos.
- **LD** = Realizar un corte con la finalidad de sacar 1/3 del suero.
- **LL** = Realizar un lavado de cuajo con agua a 60°C.
- **LD** = Retirar todo el suero.



Recepción de materia prima



Pasteurización



Extracción del suero

**Anexo 4.2: Determinación de la cantidad de proteína (Método Micro Kjeldahl-
Método de la A.O.A.C., 1995)**

- **PrP** = Pesar un gramo de muestra
- **PrC** = Colocar en el balón Kjeldahl y añadir 25 ml de H₂SO₄, 15 g de K₂SO₄ y 5 gr de CuSO₄·5H₂O
- **PrT** = Calentar a una temperatura de 420 °C aproximadamente por 90 minutos.
- **PrD** = Dejar enfriar hasta 80 °C aproximadamente para iniciar el proceso de destilación junto con 35 ml de H₃BO₃ y 2 gotas de la solución indicadora.
- **PrL** = Al tornarse verde el matraz recolector de la destilación se iniciar la titulación con 0.1 N HCl. Un color violeta indicó el punto final de la titulación.

Cálculos:

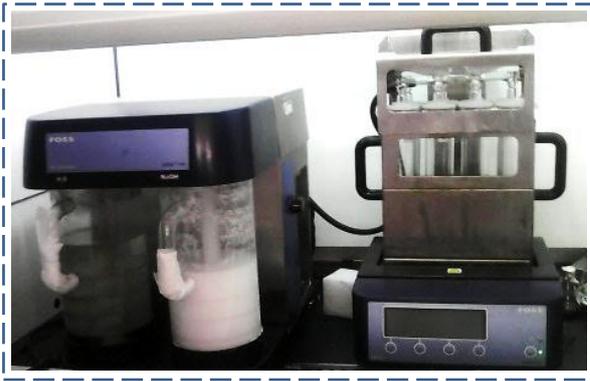
$$\text{Nitrógeno (\%)} = \frac{(HCl_{ml} - B) N_{HCl}}{W_{muestra}} \times 14.007 \times 100$$

Dónde:

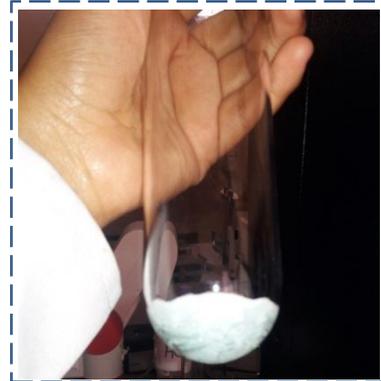
B = ml de HCl del blanco

N_{HCl} = Normalidad del HCl

W_{muestra} = Peso de la muestra (g)



Proceso de digestión



Muestra sacada del digestor



Proceso de destilación



Proceso de titulación



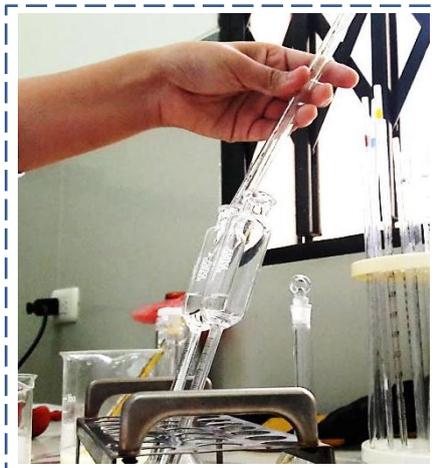
Finalización de la titulación



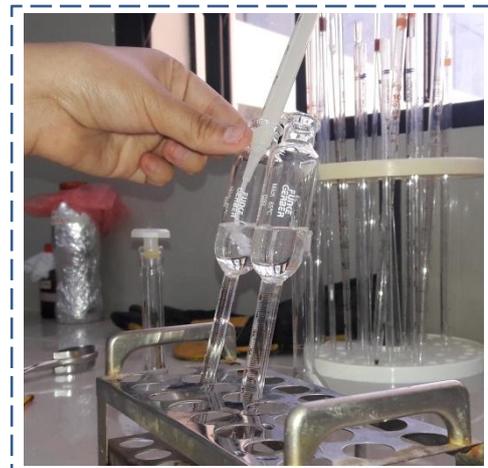
Muestras tituladas

Anexo 4.3: Determinación de la grasa (Gerber).

- **GL** = Acondicionar el Lactobutirometro (seco y limpio) y lo pesamos.
- **GA** = Añadir 10ml de ácido sulfúrico en el lactobutirometro y 11ml de la muestra evitando que se queme con el ácido.
- **GOH** = Añadir 1ml de alcohol isoamilico.
- **GP** = Pesar el lactobutirometro con cuidado y agitamos hasta que esté completamente disuelto.
- **GC** = Centrifugar a 1200 rpm durante 15 minutos.
- **GCT** = Calentar a 63 °C por 3 minutos.
- **GAN** = Analizar en la escala graduada del lactobutirometro (el valor corresponderá con los parámetros de grasa).



Adición de ácido sulfúrico



Adición de suero de quesería



Sellado de lactobutiometro



Centrifugación de muestras a 1200 rpm



Baño maría a 63 °C por 3 minutos



Lectura del lactobutiometro



Muestras analizadas

Anexo 4.4: Determinación Glucosa, Lactosa y Galactosa por método HPLC

- **Bf** = Tomar 3 ml de muestra y filtrar en una membrana de nailon de 0,20 μ m.
- **Bst** = Preparar soluciones estándar de glucosa, lactosa y galactosa de 60 g/L en agua desionizada.
- **Bp** = Preparar patrones a diferentes concentraciones para ser inyectados por triplicado.
- **Brt** = Comparar los tiempo de retención obtenidos en las muestra con los de los obtenidos en los patrones.



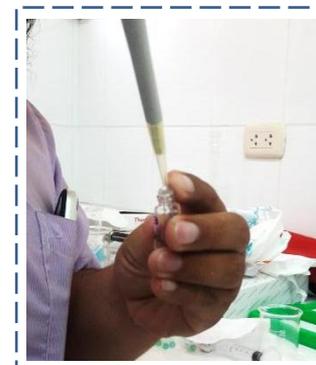
Pesado de estándares



Viales para patrones



Filtración de muestra



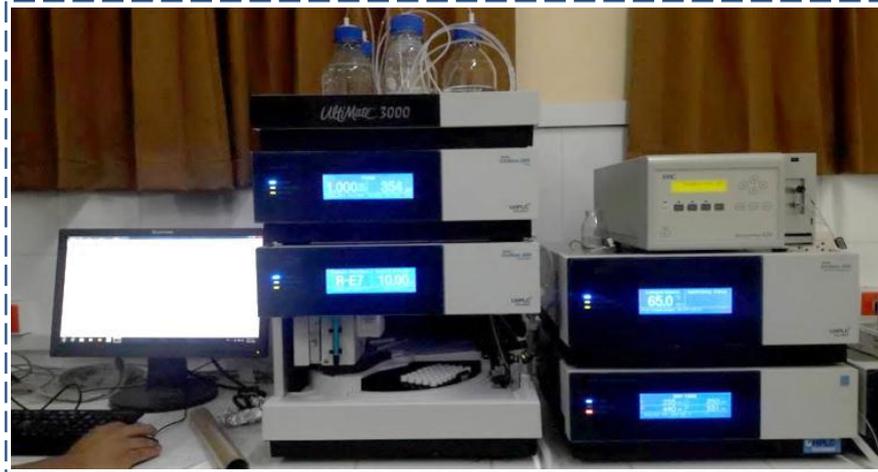
Inyección de muestra a vial



Preparación de porta viales



Lectura de muestras en HPLC



Equipo HPLC – *UltiMate 3000*

Anexo 4.5: Hidrolisis de Lactosa con β – galactosidasa

- **HE** = Agregar en un Erlenmeyer 50ml de suero y acondicionar a los pH establecidos en el diseño experimental para cada enzima.
- **HA** = Acondicionar al Shaker a la temperatura requerida para cada corrida experimental conforme al diseño realizado para cada enzima.
- **HEN** = Teniendo las condiciones anteriores se añadirá la enzima a concentraciones de 0.1, 0.25 y 0.5 mg/mL de acuerdo al diseño.
- **HD** = Para detener la hidrolisis se colocara las muestras en agua hirviendo por 3 minutos.
- **HH** = Posteriormente se enfriara en hielo durante 5 minutos y se analizara.



Enzima *A. oryzae* y *K. lactis*



Preparación de medio de reacción



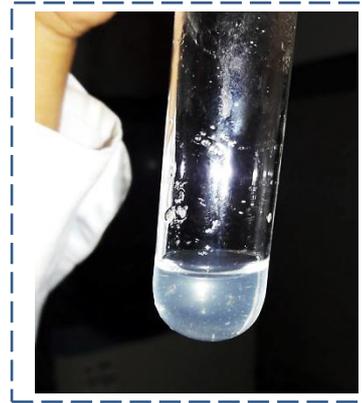
Acondicionamiento de muestras



Equipo FOSS en funcionamiento



Acondicionamiento de muestras

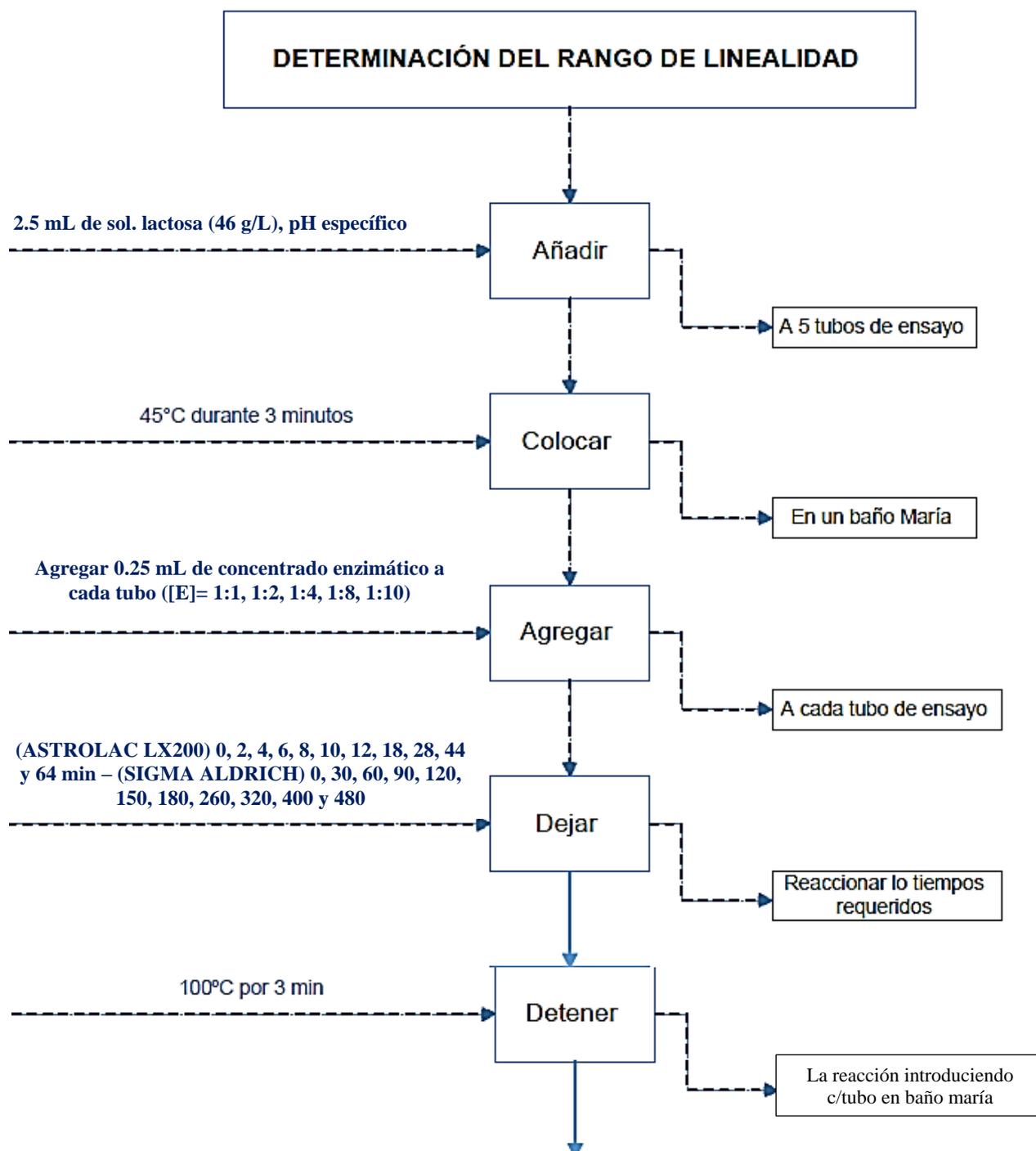


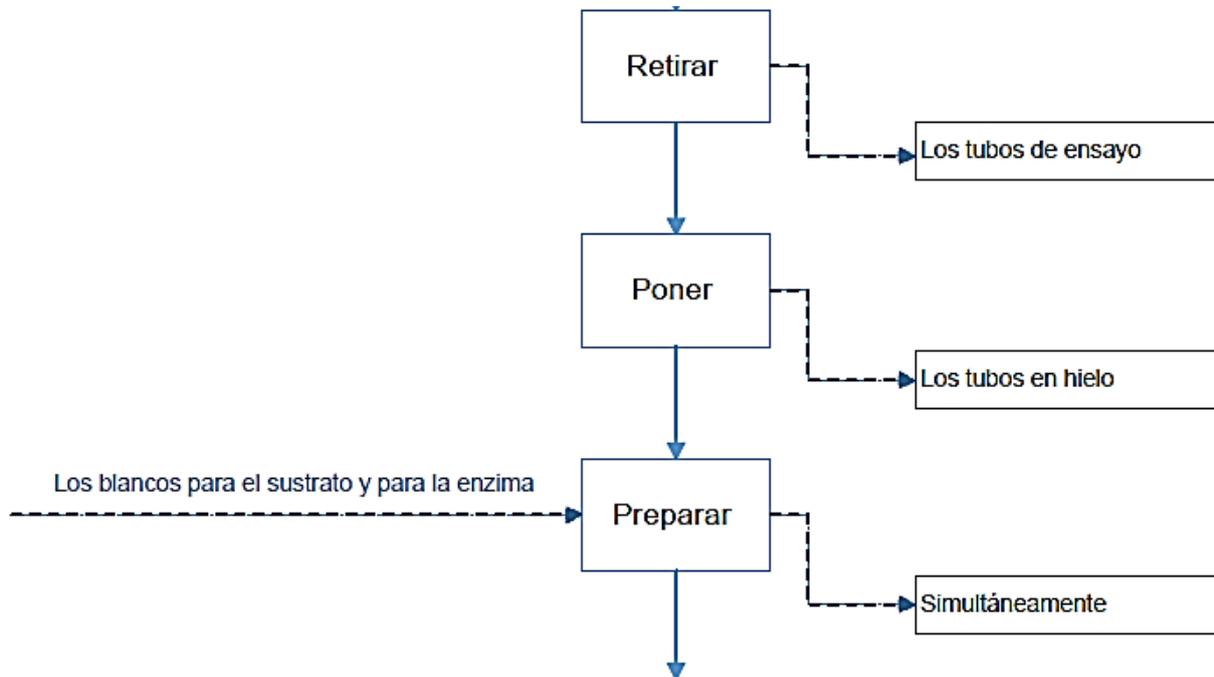
Muestra hidrolizada



Equipo Shaker FOSS WR 1024 WATER BATH

Anexo 4.6: Determinación de rango de linealidad y actividad enzimática





- LA= Agregar 2.5ml de suero lactosa en 5 tubos de ensayo con tapa a concentraciones definidas y pH establecidos de acuerdo a la enzima.
- LM= Colocar en un baño maría a 40°C (Astrolact LX2000) y 35°C (SIGMA-ALDRICH) por 3 minutos.
- LA= Agregar 0.25ml de concentrado enzimático a los 5 tubos y dejamos reaccionar a tiempos de 0.5, 10, 15 y 20 minutos.
- LD=Detener la reacción en agua hirviendo por 3 minutos.
- LH= Posteriormente colocar en hielo por 5 minutos.
- LB= Preparar blanco para el sustrato y enzima.
- LDNS= Determinar azúcares reductores por DNS.



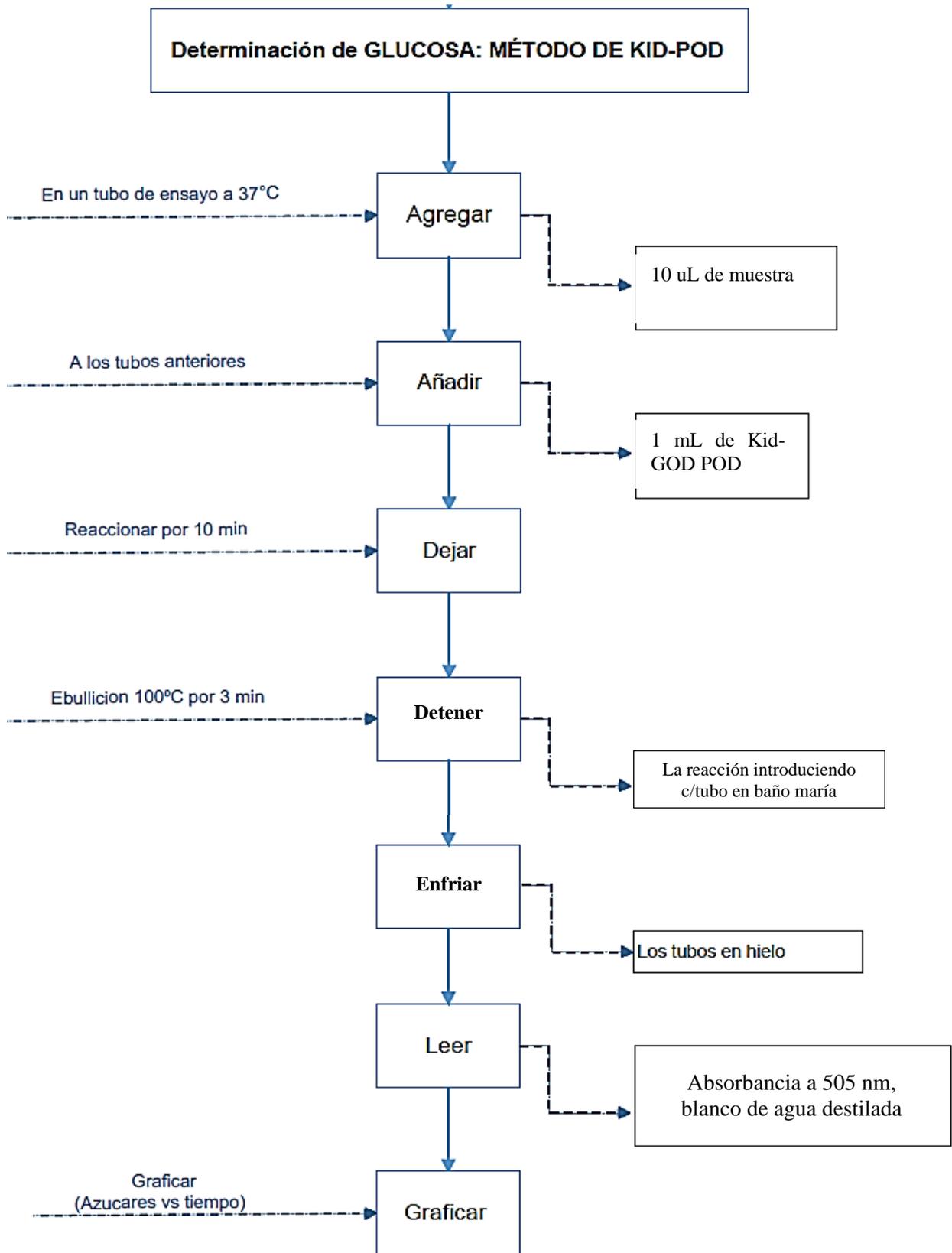
Acondicionamiento de muestras



Muestra a 100°C y muestra a 5°C



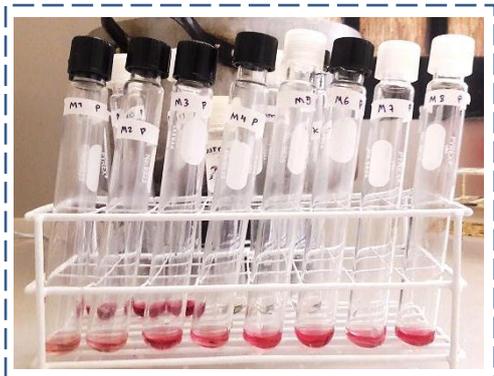
Esquema para la determinación de rango de linealidad



Determinación de glucosa por método GOD-POD



Esquema para determinación de glucosa



Tubos de muestras reaccionadas



Colocación de muestras en placa



Placa en equipo Multimodal -SYNERGY



Recopilación de base de datos

Determinación de actividad enzimática

