

Condiciones de hidrólisis de las lactasas *Lactozym Pure 6500 L* y *Saphera 2600 L* para la producción de leche deslactosada de cabra

Hydrolysis conditions of the Lactozym Pure 6500 L and Saphera 2600 L lactases for the production of goat milk without lactose

MSc. Carmen Llerena Ramírez^I, Dr. C. Raúl Díaz Torres^I,
Dr. C. Aldo Hernández Monzón^{II}

carmen.llerenar@ug.edu.ec

^I *Facultad de Ingeniería Química. Universidad Estatal de Guayaquil. Ecuador*

^{II} *Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, Cuba*

Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo determinar las mejores condiciones de hidrólisis de las lactasas Lactozym Pure 6500 L y Saphera 2600 L para la producción de leche deslactosada de cabra. En el desarrollo del trabajo se utilizaron las lactasas Lactozym Pure 6500 L de origen de levaduras (*Kluyveromyces lactis*) y Saphera 2600 L de origen bacteriano (*Bacillus licheniforme*). Se empleó leche de cabra procedente del cruce de la raza Anglo nubian y criolla ecuatoriana, la leche fue estandarizada al 3 % de grasa, pasteurizada en tanques a 85 °C por 30 min. Las dos enzimas se aplicaron a las temperaturas de 4, 10 y 35 °C y a las concentraciones de 0, 06 y 0,09 g/L. En cada experimento se midió por triplicado el punto crioscópico cada 30 min y se estimó el grado de hidrólisis en porcentaje. Las dos enzimas presentaron igual comportamiento en cuanto su poder de hidrólisis a las temperaturas ensayadas. Las condiciones más favorables para el deslactosado de leche de cabra para su posterior fermentación sería la temperatura de 35 °C con una dosis de 0,06 g/L de enzima para un tiempo de reacción de aproximadamente 90 min.

Palabras clave: leche deslactosada de cabra, lactasas, *kluyveromyces lactis*, *bacillus licheniforme*.

Abstract

The objective of this work was to determine the best hydrolysis conditions of the Lactozym Pure 6500 L and Saphera 2600 L lactases for the production of goat milk without lactose. For the development of the work, the lactoses Lactozym Pure 6500 L of yeast origin (*Kluyveromyces lactis*) and Saphera 2600 L of bacterial origin (*Bacillus licheniformes*) were used. Goat milk from the crossing of the Anglo Nubian of Ecuador native breed was used, milk was standardized at 3 % fat, pasteurized in tanks at 85 °C for 30 min. The two enzymes were applied at temperatures of 4, 10 and 35 °C and at concentrations of 0, 06 and 0, 09 g / L In each experiment the cryoscopic point was measured in triplicate every 30 min and the degree of hydrolysis was estimated in percentage. The two enzymes showed the same behavior in terms of their hydrolysis power at the temperatures tested. The most favorable conditions for the hydrolysis of lactose of goat's milk for its subsequent fermentation would be the temperature of 35 °C with a dose of 0, 06 g / L of enzyme for a reaction time of approximately 90 min.

Keywords: milk without lactose, lactases, *kluyveromyces lactis*, *bacillus licheniforme*.

Introducción

Leche deslactosada

Desde la época de Galeno, hace ya más de 2 000 años, se conoce que la leche puede inducir diarrea y otros síntomas estomacales en determinadas personas. Esta mala absorción se debe a una deficiencia de las enzimas (lactasa) que desdobla la lactosa. En la actualidad se estima que las dos terceras partes de la población adulta mundial son intolerantes a la lactosa [1]. Una solución a este problema son las leches libres de lactosa mediante la hidrólisis haciendo uso de la enzima lactasa o β -galactosidasa.

La enzima lactasa, puede ser obtenida de varias fuentes como son las producidas de *Kluyveromyces spp. (lactis o fragilis)*, *Aspergillus spp (niger, oryzae)* y *Bacillus spp (circulans, lincheniformis)*, las mismas son consideradas como seguras [1].

Las preparaciones enzimáticas comerciales presentan diferentes condiciones óptimas de valores de pH y temperatura, para las obtenidas a partir de *K. fragilis* los valores de pH se encuentran entre 5 a 6 y temperatura de 32 a 43 °C, para las de *A. oryzae* los valores de pH entre 3,5 a 5 y temperatura entre 35 a 55 °C, y la de *K. lactis* tiene su máxima actividad entre valores de pH de 6,5 a 7,5 y temperatura de 31 a 45 °C [2].

La enzima Lactozym Pure 6500 L que tiene como nombre comercial Novozymes Lactozym Pure se produce principalmente a partir levadura *K. lactis*, que es una levadura cuyo nombre va por su capacidad de fermentar la lactosa y convertirla en ácido láctico, esta β -galactosidasa se distribuye comercialmente y es de color amarillo claro aunque su color varía según su lote y presenta una densidad aproximada de 1,15 g/mL [3].

La enzima comercial Saphera 2600 L es de origen bacteriano obtenida a partir de *B. Lincheniformes*, la misma presenta un sabor limpio por su extremada pureza, evitando la aparición de fragancias o sabores ajenos al producto lácteo durante su vida útil. Es usada para la producción de alimentos sin presencia de lactosa [4].

Este trabajo tuvo como objetivo determinar las mejores condiciones de hidrólisis de las lactasas Lactozym Pure 6500 L y Saphera 2600 L para la obtención de leche deslactosada de cabra.

Métodos utilizados y condiciones experimentales

Se utilizó leche de cabras del cruce Anglo-nubian con la criolla proveniente de la hacienda ubicada en Chongón–Guayaquil–Ecuador, proveniente de hembras sanas y fue acopiada por lotes en forma entera y descremada, el muestreo se realizó según [5].

A la leche cruda de cabra se le determinó la densidad relativa a 20 °C [6], pH [7], acidez titulable [8], sólidos grasos [9], sólidos totales [10], proteína [11], punto de congelación [12], tiempo de decoloración del azul de metileno [13], Brucelosis mediante la prueba de anillo Pal (Ring test), residuos de medicamentos veterinarios (MRL) establecidos en el Codex Alimentarios CAC/MRL 2 [14].

Para el proceso de hidrólisis de la lactosa se utilizó leche de cabra estandarizada al 3 % de grasa y pasteurizada a templa a 85 °C por 30 min. Para el control de la pasteurización de la leche se realizó la prueba de la fosfatasa [15].y los controles microbiológicos de recuento de microorganismos aerobios mesófilos (ufc/mL) [16], recuento de coliformes (ufc/mL) [17], detección de *Listeria monocytogenes*/25 g [18], detección de *Salmonella*/25g [19], recuento de *Escherichia coli* (ufc/mL) [20].

Control de la hidrólisis de la lactosa

Para el control de la hidrólisis de la lactosa se midió el punto de congelación con el crioscopio Funce Gerber Cryostar I [12] y se calculó el grado de hidrólisis según [21]. mediante la ecuaciones (1, 2 y 3)

$$H (\%) = \frac{Y-537}{2,74} \quad (1)$$

$$Y = H^{\circ} * 1000 \quad (2)$$

$$H^{\circ} = \frac{-^{\circ}C}{f} \quad (3)$$

$$f = 0,9658$$

donde

H (%) - grado de hidrólisis; H° grado Horvet; f -factor de conversión

H (%) = Porcentaje de hidrólisis de la lactosa

Experimento de la hidrólisis de la lactosa de la leche de cabra

Para el trabajo experimental se utilizaron 2 L de leche estandarizada y pasteurizada para cada ensayo y las enzimas comerciales *Lactozym* Pure 6500 L y *Saphera* 2600 L

La hidrólisis se realizó con las concentraciones de enzimas 0,06 y 0,09 g/L y a las temperaturas de 4, 10 y 35 ± 1 °C como se presenta en la tabla1, teniendo siempre como referencia una muestra sin agregado de lactasa externa, los experimentos se hicieron por triplicado. Las lecturas de crioscopía se realizaron cada 30 min hasta alcanzar un grado de hidrólisis de 99 %.

Tabla 1
Condiciones para la hidrólisis de la lactosa

Enzima		Temperatura (°C)	Concentración (g/L)
Lactozym	Safera	4	0,06
			0,09
		10	0,06
			0,09
		35	0,06
			0,09

Los resultados fueron procesados mediante el programa Curve Expert 1.3 [22] para la obtención del mejor modelo de ajuste para analizar el comportamiento de las dos enzimas a las condiciones dadas en cada experimento.

Resultados y discusión

La tabla 2 muestra los resultados de la evaluación de los indicadores de la leche de cabra estandarizada y pasteurizada y los requisitos establecidos. ^(23,24)

En las pruebas de calidad microbiológica y de residuos de medicamentos la evaluación de la leche cruda presentó un tiempo de reducción del azul de metileno de 4 h, brucelosis negativa y las pruebas de medicamentos veterinarios que incluyen los antibióticos beta lactánicos, tetraciclinicos y las sulfas dieron negativa. La presencia de conservantes, neutralizantes y adulterantes en la leche durante el muestreo fueron negativos. La pasteurización de la leche fue eficiente de acuerdo a los resultados negativos de fosfatasa [15].

Los indicadores microbiológicos para la evaluación de la inocuidad de la leche pasteurizada (tabla 3) cumplieron con lo establecido en la normativa ecuatoriana vigente [24].

Tabla 2
Indicadores físico químicos controlados en leche cabra estandarizada y pasteurizada

Indicador	Valor medio	Requisitos de la norma
Densidad relativa a 20 °C	1,037 (0,003)	1,028 - 1,040
pH	6,57 (0,04)	6,5 - 6,8
Acidez titulable (%)	1,5 (0,0)	1,3 - 1,6
Grasa (%)	2,82 (0,37)	Min. 3,5
Sólidos totales (%)	10,34 (0,23)	12 - 13
Proteína (%)	4,29 (0,16)	3,4 - 3,7
Punto de congelación(°C)	-0,53 (0,012)	Max. - 0,53
Lactosa (g/100 g)	7,00 (0,03)	

Valores () indica desviación estándar

Tabla 3
Indicadores microbiológicos de leche estandarizada pasteurizada

Parámetro de control	Valor medio	Requisitos de la norma (n=5)
Recuento de microorganismos mesófilos (ufc/mL)	Menor a 1	30 000 a 50 000
Recuento de coliformes (ufc/mL)	Menor a 1	Max 10
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> (ausencia/25 g)	Ausencia	Ausencia
Detección de <i>Salmonella</i> (ausencia/25 g)	Ausencia	Ausencia
Recuento de <i>E. coli</i> (ufc/mL)	Menor a 1	Menor de 1

Los resultados de la hidrólisis de la lactosa para las diferentes condiciones se presentan de forma gráfica.

Las figuras 1 y 2 presentan los resultados a 4 °C para las diferentes concentraciones utilizadas. La enzima Lactozym presentó mayor velocidad de hidrólisis que la Safera al inicio cuando la concentración del sustrato fue alta, pero el comportamiento para alcanzar el máximo grado de hidrólisis fue similar con un tiempo de reacción de 720 min.

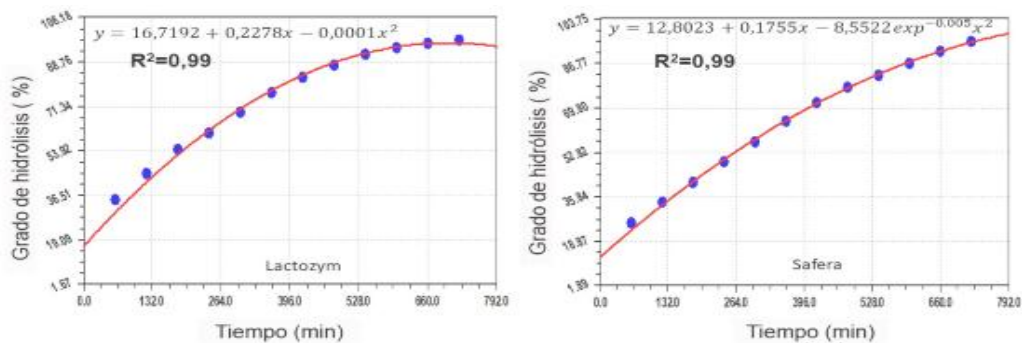


Fig. 1- Comparación del grado de hidrólisis de Lactozym y Safera a 4 °C y concentración de 0,06 g/L.

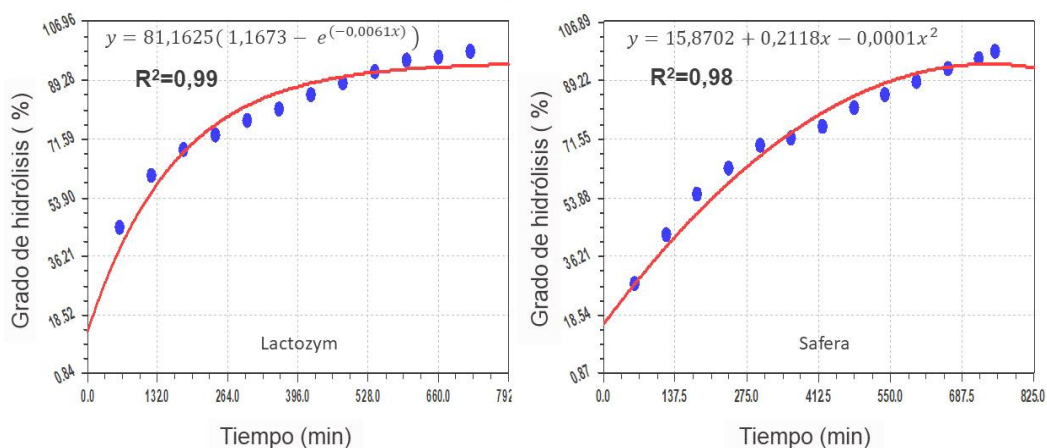


Fig. 2- Comparación del grado de hidrólisis Lactozym y Safera a 4 °C y concentración de 0,09 g/L.

El comportamiento de ambas enzimas a 4 °C y concentración de 0,09 g/L fue muy similar, pero el tiempo de reacción para el máximo grado de hidrólisis sí presentó diferencias, para la Lactozym fue 720 min y para Safera de 750 min. Las figuras 3 y 4 representan el comportamiento de las enzimas a 10 °C.

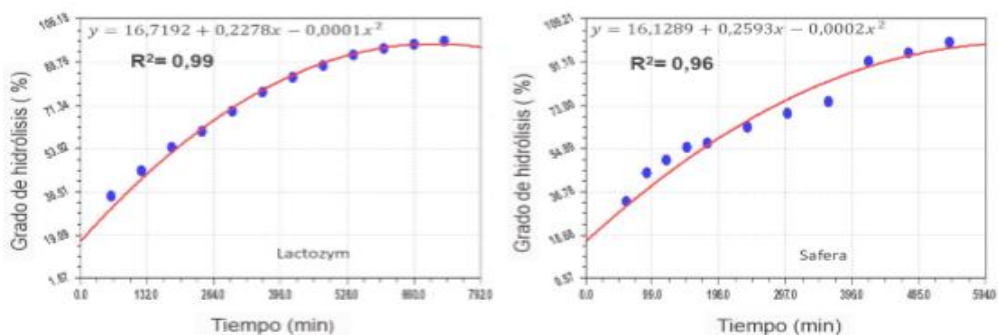


Fig. 3- Comparación del proceso de hidrólisis Lactozym y Safera a 10 °C y 0,06 g/L.

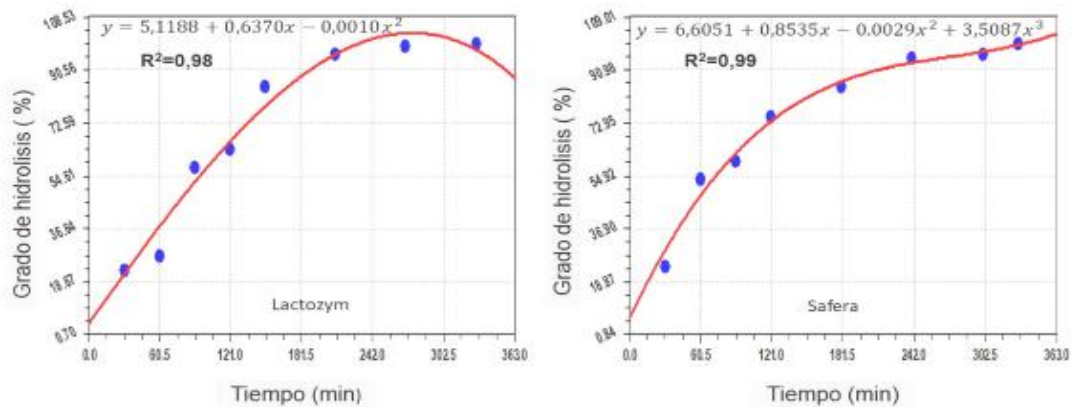


Fig. 4- Comparación del proceso de hidrólisis de Lactozym y Safera a 10 °C y concentración de 0,09 g/L.

Para la concentración de 0,06 g/L ambas enzimas presentaron prácticamente la misma velocidad de reacción, pero para alcanzar el máximo grado de hidrólisis la Safera presentó cierto retraso para un tiempo de reacción de 540 min, mientras que para la Lactozym fue de 420 min. Situación similar ocurrió para la concentración de 0,09 g/L a 10 °C donde el tiempo de reacción para Lactozym fue menor que para Safera, 300 y 330 min respectivamente.

En las figuras 5 y 6 puede apreciarse el comportamiento del grado de hidrólisis de ambas enzimas a la temperatura de 35 °C para las concentraciones estudiadas.

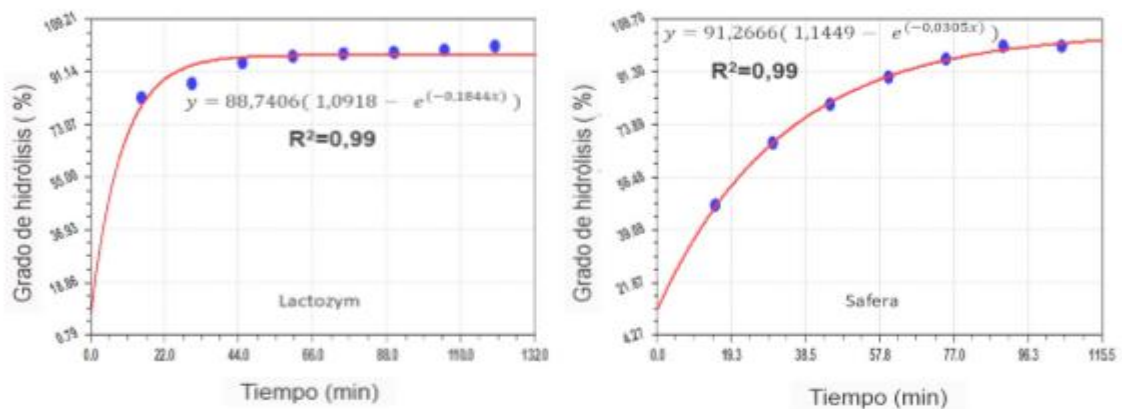


Fig. 5- Comparación del proceso de hidrólisis de Lactozym y Safera a 35 °C y concentración de 0,06 g/L.

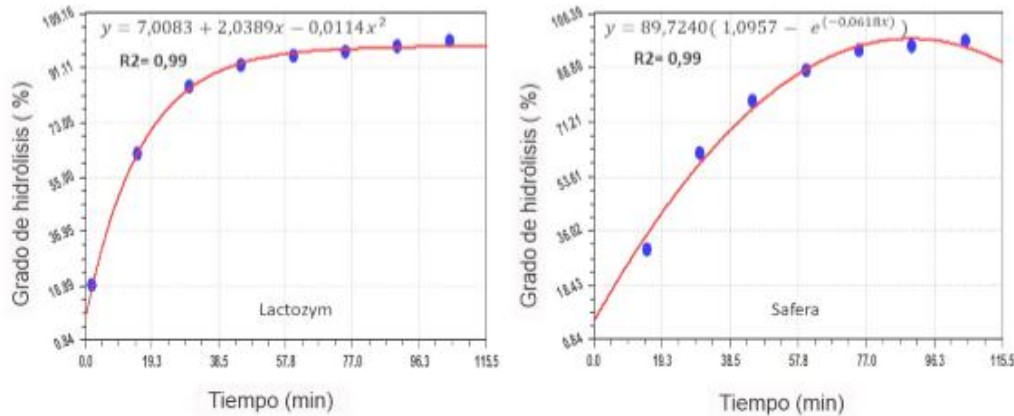


Fig. 6- Comparación del proceso de hidrólisis de Lactozym y Safera a 35 °C y concentración de 0,09 g/L.

La Lactozym a esta temperatura presentó al inicio una mayor velocidad de hidrólisis con respecto a la Safera, sin embargo los tiempos de reacción para el máximo grado de hidrólisis no presentaron diferencias, para 0,06 g/L fue de 90 min y para 0,09 g/L 105 min.

La enzima Lactozim presentó la tendencia a presentar mayor velocidad de hidrólisis al inicio con la mayor concentración del sustrato con respecto a la enzima Safera, sin embargo las diferencias en el tiempo de reacción para el máximo grado de hidrólisis fueron mínimas.

De los resultados de estos experimentos puede concluirse que cualquiera de las dos enzimas puede ser utilizada para el proceso de deslactosado de la leche de cabra.

Las condiciones para realizar el proceso estarían en función de los objetivos, para el caso de obtención de leche libre de lactosa pudiera utilizarse la hidrólisis a 4 °C con dosis de enzima de 0,06 g/L con cualquiera de las dos enzimas para un tiempo de reacción de 12 h que es la práctica usual de la industria. A 10 °C la concentración más adecuada sería la de 0,09 g/L para un tiempo de reacción de 5 a 5,5 h. Sin embargo estos tiempos no son prácticos para el deslactosado de la leche para su posterior fermentación, ya que el tiempo de proceso sería demasiado extenso; de ahí la conveniencia de realizar la hidrólisis a 35 °C a concentración de enzima de 0,06 g/L para un tiempo de reacción de 1,5 h, lo que permitiría la obtención de una leche deslactosada y fermentada entre 4 a 5 h. La hidrólisis a esa temperatura y en ese tiempo no

pone en riesgo a la leche de una posible contaminación por problemas microbiológicos.

Conclusiones

Para el deslactosado de leche de cabra se pudiera utilizar cualquiera de las dos enzimas, ya que presentaron igual comportamiento en cuanto su poder de hidrólisis. Las condiciones más favorables para el deslactosado de leche de cabra para su posterior fermentación serían temperatura de 35 °C con una dosis de 0,06 g/L de enzima para un tiempo de reacción de 90 min.

Referencias bibliográficas

1. ARAUJO, M. y ALCEDO, J. Intolerancia a la lactosa: diagnóstico y tratamiento. *Medicina de hoy*, 2004, 16 (1), pp. 19-25.
2. BELTRÁN, L. y ACOSTA, A. Empleo de una beta galactosidasa comercial de *Kluveromyces lactis* en la hidrólisis de lactosuero. Antioquia: Universidad de Antioquia, 2012. pp. 25-35.
3. NOVOZYMES. Lactozym Pure 6500I. [En línea][07 de enero de 2016]. <http://www.novozymes.com/en/solutions/food-and-beverages/dairy/lactose-free/lactozym-pure>.
4. NOVOZYMES. Novozymes Saphera®. [En línea] [1 de Abril de 2016]. <http://www.novozymes.com/en/solutions/food-and-beverages/dairy/lactose-free/novozymes-saphera>.
5. INSTITUTO NACIONAL ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Método de muestreo de leche*. NTE INEN 4. Quito. 2012.
6. INSTITUTO NACIONAL ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Determinación de densidad relativa*. NTE-INEN-11. Quito. 1973.
7. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Determinación de pH en alimentos*. NTE-INEN. Quito. 1973.
8. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Determinación de acidez titulable*. NTE-INEN-13. Quito. 1973.
9. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Leche determinación del contenido de grasa*. NTE-INEN-12. Quito. 1973.

10. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Determinación de sólidos totales en leche*. NTE-INEN-14. Quito. 1973.
11. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Determinación de proteína en leche*. NTE-INEN-16. Quito. 1973.
12. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Determinación de punto de congelación en leche*. NTE-INEN-15. Quito. 1973.
13. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Determinación de reductasa en leche*. NTE-INEN-18. Quito. 1973.
14. CODEX ALIMENTARIUS. *Norma del Codex para leches fermentadas*. CODEX-STAN-243. 2003.
15. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Determinación de fosfatasa en leche*. NTE-INEN-19. Quito. 1993.
16. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Control microbiológico de los alimentos determinación de la cantidad de microorganismo aerobios mesófilos*. NTE-INEN-1529-5. Quito. 2006.
17. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes, por la técnica de recuento de colonias*. NTE-INEN-1529-7. Quito. 1990.
18. ISO INTERNACIONAL. *Detección de Listeria monocytogenes en alimentos*. ISO-11290-1. 2008.
19. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Detección de Salmonella*. NTE-INEN-1529-15. Quito. 2006.
20. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Control microbiológico de los alimentos determinación de Coliformes Fecales y E. coli*. NTE-INEN-1529-8. Quito. 1990.
21. MURPHY, M. MUSET, G y RODRÍGUEZ, G. Aplicación de la crioscopia a la medición de la hidrólisis enzimática de la lactosa. *Universidad de Palermo 4º Jornadas de Desarrollo e innovación*. Universidad de Palermo, 2002. pp. 32.
22. Hyams, D. *Curve Expert 1.3*. 1997.

23. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Leche cruda de cabra*. NTE-INEN-2624. Quito. 2012.

24. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. *Leche pasteurizada de cabra*. NTE-INEN-2623. Quito. 2012.