



COMPARACIÓN DEL PODER DE HIDROLISIS DE LACTOSA DE DOS BETAGALACTOSIDAS EN LECHE ESTANDARIZADA DE CABRA

Carmen Llerena Ramírez¹

¹Docente Investigador Tiempo Completo de la Carrera Ingeniería Química de la Universidad de Guayaquil
carmen.llerena@ug.edu.ec

Raúl Díaz Torres²

²Docente Investigador Tiempo Completo de la Carrera de Química y Farmacia de la Universidad de
Guayaquil
raul.diaz@ug.edu.ec

Para citar este artículo puede utilizar el siguiente formato:

Carmen Llerena Ramírez y Raúl Díaz Torres (2017): "Comparación del poder de hidrolisis de lactosa de dos betagalactosidas en leche estandarizada de cabra", Revista Caribeña de Ciencias Sociales (junio 2017). En línea: <http://www.eumed.net/rev/caribe/2017/06/leche-cabra.html>

Resumen

Se conoce que los productos lácteos producen en algunas personas intolerancia a la lactosa, esto consiste en una reacción adversa a un carbohidrato común que afecta a personas de todas las edades, es provocado por la deficiencia de la enzima lactasa que digiera el azúcar de la leche. La lactosa que no se hidroliza y permanece intacta en el intestino grueso será fermentado por las bacterias las cuales producen ácido láctico y gases aumentando la retención de agua en el intestino ocasionando entre otras cosas la hinchazón del abdomen. Por lo que en el presente trabajo se enfocará en comparar el poder de hidrolisis de la lactosa de las betas galactosidasas, de origen de levaduras (*Kluyveromyces lactis*) y de origen bacteriano (*Bacillus lincheniforme*) en leche de cabra estandarizada. Las enzimas tienen diferente concentración la primera es de 6.500 U/l y la otra de 4.500 U/l. Se empleó leche de cabra procedente de la zona de Chongòn de Ecuador, 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, características físico químicas de

la leche cumplen con las norma INEN Ecuatorianas con una densidad de 1.037 y un pH de 6.57 sólidos totales 10.34(%) (fracción de masa), las proteínas 4.27% (fracción de masa), fosfatasa negativa, residuos de medicamentos veterinarios negativos, presencia de conservantes, adulterante, negativos y el contenido de lactosa de 4.97 la leche antes de la pasteurización tenía presencia de patógenos después de la pasteurización se evidencia ausencia de estos microorganismos demostrando que el tratamiento térmico efectuado era efectivo.. Las dos enzimas se aplicaron a las temperaturas de 10 °C y 35 °C y a las concentraciones de 0,06 % y 0,09 %; en cada muestra se midió por triplicado el punto crioscópico cada 30 min el equipo que se empleo es de marca Cryostart y se construyeron cuatro curvas de cinética de hidrólisis con sus respectivos porcentajes, las mismas que fueron analizadas mediante el software Stat Graph con la prueba de ANOVA con una probabilidad del 95% de confianza se comparó la acción de las dos enzimas se determinó comportamientos cinéticos similares ya que estadístico de prueba era mayor que 0.05 por lo tanto no hay suficiente evidencia significativa entre las curvas cinéticas generadas por las dos enzimas, por lo tanto este estudio propone que se puede usar cualquiera de las dos enzimas obteniendo el mismo porcentaje de hidrólisis si se trabajan en concentraciones de 0.09% a 35°C durante 60 min o en condiciones de bajas temperaturas con concentración de 0.09% a 180 min.

Palabras claves: leche de cabra, beta galactosidasa, *Kluyveromyces lactis*, *Bacillus lincheniforme*, crioscópico.

Abstract

It is known that dairy products in some people produce lactose intolerance, this is an adverse reaction to a common carbohydrate that affects people of all ages, is caused by the deficiency of the enzyme lactase that digests milk sugar . The lactose that does not hydrolyze and remains intact in the large intestine will be fermented by bacteria which produce lactic acid and gases increasing the retention of water in the intestine causing among other things the swelling of the abdomen. (*Kluyveromyces lactis*) and bacterial origin (*Bacillus lincheniforme*) in standardized goat's milk. The enzymes have different concentrations, the first is 6,500 U / l The other of 4,500 U / l. Goat milk was

used from the Chongòn area of Ecuador, from the crossing of the Anglo Nubian breed and the Creole from Ecuador. The milk was standardized at 3% fat, pasteurized in tanks at 85 ° C for 30 min, physical chemical characteristics of the milk comply with the INEN Ecuatorianas standard with a density of 1,037 and a pH of 6.57 total solids 10.34 (%) , 4.27% (mass fraction), negative phosphatase, negative veterinary drug residues, presence of preservatives, adulterant, negative and lactose content of 4.97 milk prior to pasteurization had pathogens present after Pasteurization was evidenced absence of these microorganisms demonstrating that the heat treatment effected was effective. The two enzymes were applied at temperatures of 10 ° C and 35 ° C and at concentrations of 0.06% and 0.09%; In each sample the cryoscopic point was measured in triplicate every 30 min. The equipment used was Cryostart brand and four hydrolysis kinetics curves were constructed with their respective percentages, which were analyzed using the Stat Graph software with the test ANOVA with a 95% confidence probability was compared the action of the two enzymes were determined similar kinetic behaviors since test statistic was greater than 0.05 therefore there is not enough significant evidence between the kinetic curves generated by the two enzymes, for Thus, this study proposes that either of the two enzymes can be used, obtaining the same percentage of hydrolysis if they are worked in concentrations of 0.09% at 35 ° C for 60 min or in conditions of low temperatures with a concentration of 0.09% to 180 min.

Keyword: goat milk, beta galactosidase, *Kluyveromyces lactis*, *Bacillus lincheniforme*, cryoscopic

1. Introducció

Según la norma (NTE-INEN-2624, 2012) la leche de cabra cruda es un líquido blanco obtenido de la secreción mamaria normal de una cabra madre (*Capra spp.*) luego de no menos de 3 días posteriores al parto. La leche debe manipularse de conformidad a lo establecido en el CPE-INEN – CODEX 57. Los requisitos organolépticos de la leche de cabra destinada a posterior procesamiento debe ser de color blanco, olor y sabor característicos. Entre los requisitos físico – químicos de la leche cruda se tienen los establecidos en la

norma (NTE-INEN-2624, 2012), entre los cuales se detallan la densidad relativa, acidéz titulable, punto de congelación, sólidos totales, grasa, proteína, sólidos no grasos, estabilidad proteica, adulterantes, entre los requisitos microbiológicos se encuentran los aerobios mesófilos.

La leche pasteurizada de cabra se define en la norma (NTE-INEN-2623, 2012) como la leche cruda obtenida de la secreción mamaria normal de una cabra madre homogenizada o no, que ha sido sometida a un proceso térmico que garantice la destrucción total de los microorganismos patógenos y la casi totalidad de los microorganismos banales (saprofitos) sin alterar sensiblemente las características fisicoquímicas, nutricionales y organolépticas de la misma.

La leche de cabra es consumida principalmente como un producto fluido sin que medie una transformación de la misma en otros derivados lácteos debido a la potencialidad que tiene de sustituir en la dieta los lácteos de origen bovino. Económicamente, la leche de cabra es importante en muchas regiones, representando el 2,1 % de toda la leche comercializada a nivel mundial. La producción a nivel del Ecuador es baja, existen cuatro zonas principales de producción de leche de cabra: Ibarra, Puenbo, Chongón y Morona Santiago.

Los principales componentes son: el agua, lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales. Una característica de la grasa de la leche de cabra es el pequeño tamaño de los glóbulos grasos comparados con los de la leche de vaca (2 μm en la leche de cabra contra 3 a 5 μm en la vaca), lo cual se ha asociado a una mejor digestibilidad (Chacón, 2005), por lo que reduce el tiempo de residencia en el estómago, así como el tránsito intestinal (Guerrero & Gamarra, 2006). Contiene ácidos grasos esenciales de cadena corta, media y larga, su bajo peso molecular e hidrosolubilidad facilita la acción de las enzimas digestivas (Flores, Perez, Basurto, & Jurado, 2009).

Las proteínas en la leche de cabra están compuestas por un 8% de caseínas entre ellas las principales son alfa – lacto albúmina y beta – lactoglobulina, aunque el contenido de ésta última es inferior (Rivas, Jimenez, & Diaz, 2005).

Aporta minerales tales como: calcio, magnesio, fósforo, potasio, en mayor proporción que la leche de vaca (Chacón, 2005). Entre los carbohidratos esta la lactosa, que desde la época de Galeno, hace ya más de 2000 años, se conoce que puede inducir diarrea y otros síntomas estomacales en determinadas

personas. Esta mala absorción se debía a una “deficiencia de las enzimas que desdoblan los azúcares”. En la actualidad se estima que las dos terceras partes de la población adulta mundial son intolerantes a la lactosa. (Araujo Villarino & Alcedo Gonzales, 2004).

La enzima β galactosidasa permite el desdoblamiento de la lactosa en glucosa y galactosa, puede ser obtenida de varias fuentes las producidas de *Kluyveromyces spp. (lactis o fragilis)*, *Aspergillus spp (niger, oryzae)* y *Bacillus spp (circulans, lincheniformes)* son consideradas como seguras (Beltran & Acosta, 2012). Generalmente las enzimas producidas por levaduras son consideradas neutras y las obtenidas a partir de hongos ácidos (Rodríguez, Cravero, & Alonso, 2008). La acción de la lactasa promueve la síntesis de oligosacáridos a partir de la galactosa y de la glucosa (Badui, 2006).

Las preparaciones enzimáticas comerciales trabajan en distintas condiciones óptimas la *K. fragilis* trabaja bien en leche a pH a 5 a 6 y temperaturas de 32 a 43 °C, el *A. oryzae* se aplica en suero ácido por su pH óptimo de 5 a 3,5 y la temperatura óptima entre 35 y 55 °C, la lactasa de *K. lactis* y la del *B. lincheniforme* tienen su máxima actividad entre 31 a 45 °C y pH de 6,5 a 7,5 (Beltran & Acosta, 2012) .

2. Materiales y métodos

2.1 Leche de cabra

Se utilizó leche de cabras cruce Anglo-nubian con la criolla proveniente de la hacienda del Dr. Young Living ubicada en Chongón – Guayaquil - Ecuador. Se la obtuvo de hembras sanas por lotes aplicando el método de muestreo (NTE INEN 4, 2012), durante tres meses. La cual fue estandarizada y cumplió con los parámetros descritos por las normas para leche cruda de cabra (NTE-INEN-2624, 2012) y de leche pasteurizada de cabra (NTE-INEN-2623, 2012).

2.2 Enzimas

Lactozym. Pure 6500L y Safera. Pure 4500L, de la marca Novozymes.

2.3 Métodos de control para leche de cabra estandarizada al 3% de grasa y pasteurizada (NTE-INEN-2624, 2012) - (NTE-INEN-2623, 2012)

A la leche cabra estandarizada al 3% de grasa se le controló la densidad relativa a 20 °C (NTE-INEN-11, 1973), pH (NTE-INEN, 1973), acidez titulable (NTE-INEN-13, 1973), grasa (NTE-INEN-12, 1973), sólidos totales (NTE-INEN-14, 1973), proteína (NTE-INEN-16, 1973), punto de congelación (NTE-INEN-15, 1973), determinación de lactosa, residuos de medicamentos veterinarios MRL establecidos en el Codex Alimentarios CAC/MRL 2 (CODEX-STAN-243, 2003), presencia de conservantes (NTE-INEN-1500, 2002), neutralizantes (NTE-INEN-1500, 2002), adulterantes (NTE-INEN-1500, 2002)a.

Para estandarizar la leche se empleó el cuadrado de Pearson, la leche fue pasteurizada a 85 °C por 30 min, se efectuó la prueba de la fosfatasa (NTE-INEN-19, 1993). Los controles microbiológicos de recuento de microorganismos aerobios mesófilos (ufc/mL) (NTE-INEN-1529-5, 2006), recuento de Coliformes (ufc/mL) (NTE-INEN-1529-7, 1990), detección de *Listeria monocytogenes*/ 25 g (ISO-11290-1, 2008), detección de *Salmonella*/25 g (NTE-INEN-1529-15, 2006), recuento de *Escherichia coli* (ufc/mL) (NTE-INEN-1529-8, 1990).

2.4 Control del deslactosado

La hidrólisis de la lactosa se efectuó mediante el monitoreo del punto de congelación de la leche de cabra (NTE-INEN-15, 1973) (la aplicación de la Norma Técnica Mexicana NMX-F-219-1972). Con el valor promedio del punto crioscópico de cada experimento se calculó el porcentaje de hidrólisis con la siguiente fórmula: (Murphy, 2002)

$$H\% = \frac{Y - 537}{2,74}$$

En donde: (NTE-INEN-2624, 2012)

$$Y = H^{\circ} * 1000$$

$$H^{\circ} = \frac{-^{\circ}C}{f}$$

$$f = 0,9658$$

f= valor constante

H°= Grados Horvet

°C= Grados centígrados (correspondiente a los valores medios del punto crioscópico)

Y= Grados Horvet

H%= Porcentaje de hidrolisis

2.5 Proceso de deslactosado de la leche de cabra

Unidad Experimental: Cada unidad experimental fue de 1 L de leche de cabra pasteurizada a temperatura de 85 °C por 30 min, estandarizada al 3 % de grasa, se empleó dos tipos enzimas: Lactozym Pure 6500 L: El origen de la enzima es de levaduras con el organismo: *Kluyveromyces lactis*. y la Saphera 4500 L: El origen de la enzima es bacteriano con el organismo *Bacillus licheniformis* en dos concentraciones de trabajo (0,06 y 0,09 g/ L), teniendo siempre como referencia una muestra sin agregado de lactasa externa, las pruebas experimentales se realizarán por triplicado y a temperatura de 10 y 35 ± 1 °C.

El control del proceso se realizará cada 30 min hasta alcanzar más del 90% de hidrolisis, mediante los controles detallados para el control de deslactosado (Roser & Lagarriga, 2004). El diseño del experimento es de bloques al azar y se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Matriz de deslactosado		
Enzima	Concentración 1 (g/L)	Concentración 2 (g/ L)
Lactozym	0,06	0,09
Saphera	0,06	0,09

Fuente: autores

3.Resultados

3.1 Control de leche de cabra cruda y pasteurizada

Se observó que los parámetros microbiológicos en la leche cruda no cumplían con la legislación vigente pues presentaba *E. coli*. Una vez pasteurizada (85°C por 30 min) se obtuvieron los resultados descritos en la Tabla 2. Por sus características físico – químicas y microbiológicas la leche de cabra estandarizada al 3% y pasteurizada cumple con la normativa ecuatoriana, notándose que en el caso del porcentaje de proteína y sólidos totales es

superior al establecido por la norma. Una vez realizado el tratamiento térmico las muestras cumplen con los requisitos microbiológicos.

Tabla 2. Control de calidad de leche cabra estandarizada y pasteurizada
Leche estandarizada y pasteurizada

Parámetro de control	Requisitos de la norma	Resultado promedio	Desviación estándar
Densidad a 20 °C	1,028 - 1,040	1,037	2,66
Ph	6,5 - 6,8	6,57	0,04
Acidez titulable	1,3 -1,6	1,5	0,04
Contenido de grasa	MIN. 3,5	3,3	0,37
Sólidos totales % (fracción de masa)	12 – 13	10,34	0,23
Proteína % (fracción de masa)	3,4 – 3,7	4,29	0,16
Punto de congelación °C	MAX. - 0,53	-0,53	8,91
Fosfatasa	Negativo	Negativo	0
Residuos de medicamentos veterinarios	Codex	Negativo para antibióticos betalactámico, tetraciclínico y sulfas	0
Presencia de conservantes	Negativo	Negativo	0
Presencia de neutralizante	Negativo	Negativo	0
Presencia de adulterantes	Negativo	Negativo	0
Lactosa		4,97	0,36

Controles microbiológicos de leche estandarizada y pasteurizada

Parámetro de control	Requisitos de la norma n=5	Promedio	Desviación estándar
Recuento de microorganismos mesófilos (ufc/mL)	30.000-50.000	0	0
Recuento de coliformes (ufc/mL)	MAX 10	0	0
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	Ausencia	Ausencia	0
(ufc/mL),			
Detección de <i>Salmonella</i> /25 g	Ausencia	Ausencia	0
Recuento de <i>Escherichia coli</i> (ufc/mL)	Menor de 1	0	0

Fuente: autores

3.2 Proceso de deslactosado

En la tabla 3. se presenta la media del porcentaje de hidrolisis obtenido durante la experimentación y la desviación estándar. Se puede observar que las enzimas trabajan de forma similar en las condiciones establecidas en el

experimento pero la enzima Safera en concentración 0,06% a 35 alcanza el mayor porcentaje de hidrolisis en 90 min que la enzima Lactozym.

La Figura 1,2,3,4 muestran el comportamiento de las enzimas en concentraciones 0,06 % a 10 °C, 0,09 % a 10 °C, 0,06 % a 35 °C y a 0,09 % a 35 °C. En la figura 1 a continuación se muestra el poder de hidrolisis de las enzimas Safera y Lactozym a 0,06 % y a 35 °C, encontrándose que no existe diferencia significativa con una probabilidad del 95% a aplicarlas en leche de cabra.

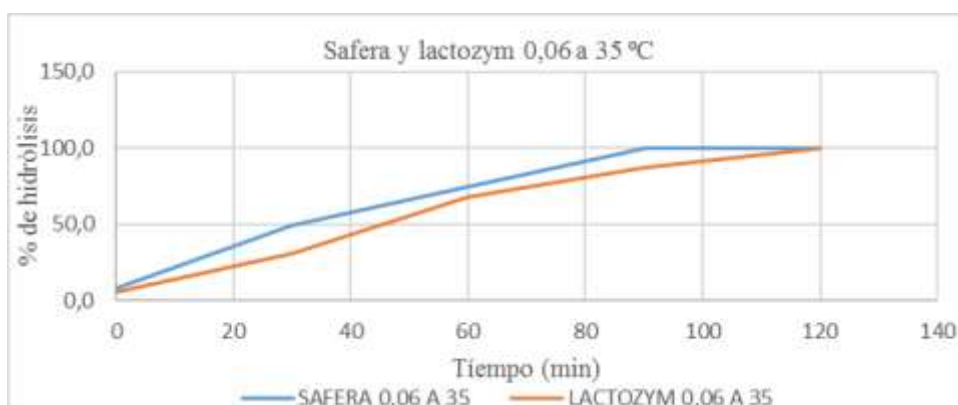


Figura 1. Comparación del proceso de hidrolisis Safera y Lactosym 0.06 a 35°C

En la Figura 2 el poder de hidrolisis empleando la concentración 0,09 % y la de 35°C es similar con una probabilidad del 95% pero alcanzan más del 90% a los 60 min.

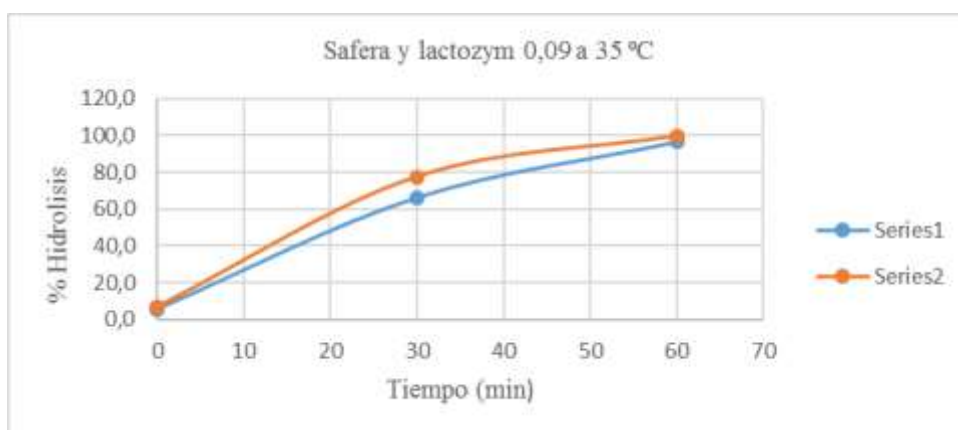


Figura 2. Comparación del proceso de hidrolisis Safera y Lactozym 0,09 a 35 °C

En la figura 3 y 4 las enzimas Safera y Lactozym trabajan de la misma forma a temperatura de 10°C en las concentraciones 0,06% y 0,09%, con una probabilidad del 95% de confianza.

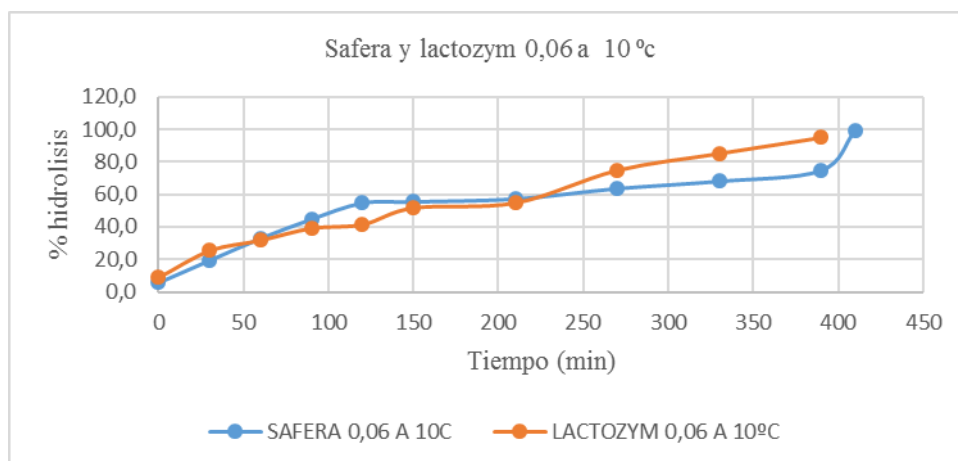


Figura 3. Comparación del proceso de hidrolisis Safera y Lactozym a 0,06 a 10 °C

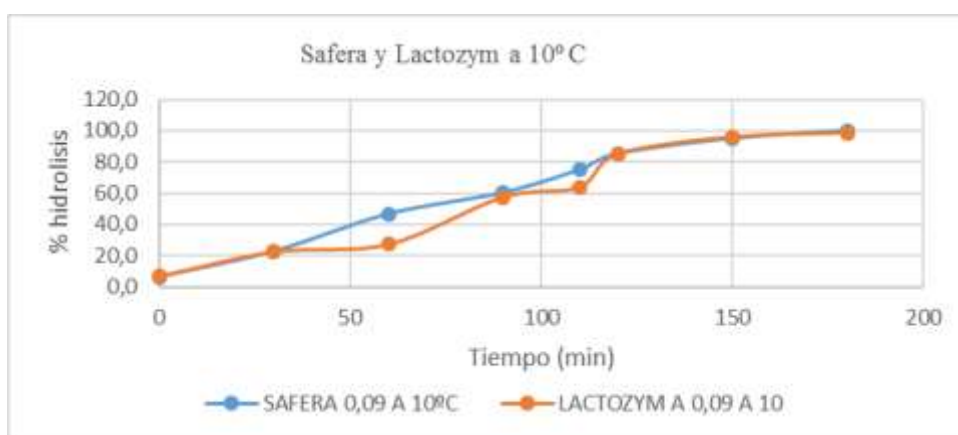


Figura 4. Comparación del proceso de hidrolisis de Safera y Lactozym a 10 °C

4. Conclusiones

La leche de cabra estandarizada y pasteurizada 85°C por 30 min que se emplea para este estudio comparativo cumple con la normativa vigente en el Ecuador, presenta valores sobre la norma en proteína y sólidos totales.

El proceso de hidrolisis de la lactosa fue evaluado mediante crioscopia empleando las enzimas Lactozym Pure 6500 L: El origen de la enzima es de levaduras con el organismo: *Kluyveromyces lactis* y la Saphera 4500 L: El origen de la enzima es bacteriano con el organismo *Bacillus licheniformis* en las concentraciones 0,06 y 0,09 g/ L y a las temperaturas de 10 °C y 35 °C, se puede observar que a pesar que la enzima Safera comercialmente presente menor concentración tiene el mismo poder de hidrolisis que la enzima Lactozym.

Bibliografía

- Araujo Villarino, M., & Alcedo Gonzales, J. (Enero de 2004). Intolerancia ala lactosa: diagnóstico y tratamiento. *Medicina de hoy, I.XVI No 112*, 19 - 25.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. México: Pearson Educación.
- Beltran, L., & Acosta, A. (2012). *Empleo de una beta galactoxidasa comercial de Kluyveromyces fragilis en la hidrólisis de lactosuero*. Antioquia: Universidad de Antioquia.
- Chacón, A. (2005). Aspectos nutricionales de la leche de cabra y sus variaciones en el proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana*, 16(2)(ISSN: 1021- 7444), 239 -252.
- CODEX-STAN-243. (2003). *Norma del Codex para leches fermentadas*. Codex Alimentarius.
- Flores, M., Perez, R., Basurto, M., & Jurado, M. (Mayo - Agosto de 2009). La leche de cabra y su importancia en la nutrición. *Tecnociencia Chihuahua, III*, 107 - 113.
- Guerrero, D., & Gamarra, G. (2006). Producción de leche fermentada utilizando bacterias probióticas (*L. acidophilus*, *B. Lactis* y *S. thermophilus*) con leche de cabra y de vaca. *Ciencia e Investigación* 9, 15 a 25.
- ISO-11290-1. (2008). *Detección de Listeria monocytogenes en alimentos*. ISO Internacional.
- Murphy, M. M. (2002). *Aplicación de la crioscopia a la medición de la hidrólisis enzimática de la lactosa* . Universidad de palermo 4º Jornadas de Desarrollo e innovación., Desarrollo e innovación. Argentina: Universidad de Palermos.
- NTE INEN 2334. (2012). *Presencia de conservantes*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- NTE INEN 4. (2012). *Método de muestreo de leche*. Quito: Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización.

- NTE-INEN. (1973). *Determinación de pH en alimentos*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- NTE-INEN-11. (1973). *Determinación de densidad relativa*. Quito: Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización.
- NTE-INEN-12. (1973). *Leche determinación del contenido de grasa*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- NTE-INEN-13. (1973). *Determinación de acidéz tituable*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- NTE-INEN-14. (1973). *Determinación de sólidos totales en leche*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- NTE-INEN-15. (1973). *Determinación de punto de congelación en leche*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- NTE-INEN-1500. (2002). *Presencia de conservantes, netralizantes y adulterantes en leche*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- NTE-INEN-1529-15. (2006). *Detección de Salmonella*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- NTE-INEN-1529-5. (2006). *Control microbiológico de los alimentos determinación de la cantidad de microorganismo aerobios mesófilos REP*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- NTE-INEN-1529-7. (1990). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes, por la técnica de recuento de colonias*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- NTE-INEN-1529-8. (1990). *Control microbiológico de los alimentos determinación de Coliformes Fecales y E. coli*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- NTE-INEN-16. (1973). *Determinación de proteína en leche*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- NTE-INEN-18. (1973). *Determinación de reductasa en leche*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.

- NTE-INEN-19. (1993). *Determinación de fosfatasa en leche*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- NTE-INEN-2623. (2012). *Leche pasteurizada de cabra*. Quito: Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización.
- NTE-INEN-2624. (2012). *Leche cruda de cabra*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- Rivas, F., Jimenez, R., & Diaz, L. (2005). Aspectos nutricionales de la leche de cabra y sus posibles efectos en la salud humana. *Nutrición Hospitalaria* 20, 20.
- Rodriguez, V., Cravero, B., & Alonso, A. (2008). Proceso de elaboración de yogur deslactosado de leche de cabra. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 28, 109 - 115.
- Roser, S., & Lagarriga, J. (2004). Productos lácteos tecnología. *Universidad Politècnica de Catalunya*, 93.