

Artículo Original

Optimización de las condiciones enzimáticas para el deslactosado de leche de cabra¹

Julián Londoño Londoño^{2*}, Laura Esther López³, Evelin Raigoza³, Daniel Zapata³

RESUMEN

Introducción. La leche de cabra y sus productos derivados están ganando importancia en la alimentación y en la salud humana; sin embargo, y a pesar de su menor contenido de lactosa con respecto a la leche de vaca, se hace necesario implementar procesos enzimáticos que permitan la obtención de productos deslactosados con un mayor perfil comercial e innovador. **Objetivo.** Evaluar las condiciones de pH y temperatura para lograr la mayor actividad enzimática en el proceso de deslactosado de la leche de cabra. **Metodología.** Se midieron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de la enzima lactasa a diferentes valores de pH utilizando o-nitrofenilgalactósido (ONPG) como sustrato. Adicionalmente, se evaluó la actividad de la enzima a diferentes temperaturas en un ensayo modelo de deslactosado de leche de cabra. **Resultados.** La enzima lactasa utilizada presentó su mejor actividad a valores de pH y temperatura de 7.0 y 40 °C, respectivamente. Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} variaron con el pH, mostrando una clásica inhibición no competitiva. **Conclusiones.** El presente trabajo demostró que es posible el deslactosado de leche de cabra utilizando una formulación comercial de enzima lactasa.

Palabras clave: leche de cabra, enzima lactasa.

¹ Resultados de la investigación "Optimización de las condiciones enzimáticas para el deslactosado de leche de cabra" financiado por el semillero Innova.

² Químico Farmacéutico. Doctor en Ciencias Químicas. Director, Grupo de Investigación en Ingeniería de Alimentos - GRIAL. Corporación Universitaria Lasallista. Caldas, Antioquia-Colombia. julondono@lasallistadocentes.edu.co

³ Estudiantes de Ingeniería de Alimentos. Corporación Universitaria Lasallista. Caldas, Antioquia-Colombia. lalopez@ulasallista.edu.co, everaigoza@ulasallista.edu.co, danizapata@ulasallista.edu.co. AUTOR PARA CORRESPONDENCIA (*): Corporación Universitaria Lasallista. Carrera 51 118Sur-57. Caldas-Antioquia-Colombia. Teléfono: 574-3201999. Correo electrónico: julondono@lasallistadocentes.edu.co

Artículo recibido: 19/04/2013; Artículo aprobado: 17/06/2013.

Optimization of enzymatic conditions in order to delactose goat milk

Otimização das condições enzimáticas para o leite de cabra deslactosado

ABSTRACT

Introduction. Goat milk and the products derived from it are gaining relevance for human food and health. However, and despite its lower content of lactose in comparison to that of the cows, it is necessary to implement enzymatic processes in order to obtain delactosed products with a more commercial and innovative profile. **Objective.** To evaluate the pH and temperature conditions to achieve the highest enzymatic activity in the delactosation process for goat milk.

Methodology. The K_m and V_{max} kinetic parameters of the lactase enzyme were measured at different pH values, using o-nitrophenyl galactoside as a substratum. Additionally, the activity of the enzyme was evaluated at different temperatures in a testing model of goat milk delactosation.

Results. The lactase enzyme used reached its best activity at pH and temperature values of 7.0 and 40 °C, respectively. The K_m and V_{max} kinetic values varied with the pH, thus showing a classic non-competitive inhibition.

Conclusions. This paper demonstrated that it is possible to delactose goat milk by the use of a commercial formulation of the lactase enzyme.

Key words: Goat milk, lactase enzyme

RESUMO

Introdução. O leite de cabra e os seus derivados estão se tornando cada vez mais importantes na alimentação e na saúde humana, no entanto, e apesar do seu teor de lactose mais baixo comparado ao leite de vaca, é necessário implementar processos de industrialização para confecção de produtos sem lactose para expandir tanto o perfil comercial como inovador. **Metodologia.** Os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) foram determinados para a enzima lactase, a valores de pH diferentes, utilizando o-nitrofenil galactósido (ONPG) como substrato. Além disso, avaliou-se a atividade da enzima a diferentes temperaturas, num modelo de teste do leite de cabra. **Resultados.** A enzima usada apresentou a sua melhor atividade a pH 7,0 e temperatura de 40 °C. Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} mudaram com o pH, mostrando uma inibição não competitiva clássica.

Palavras importantes: leite de cabra, enzima lactase

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, en Colombia la leche consumida ha sido proveniente de la vaca (Espinal, Covalada, & Rodríguez, 2005). Sin embargo, en los últimos años se ha incentivado la producción de leche a partir de especies no tradicionales como la cabra, uno de los animales domésticos de más amplia distribución geográfica en el mundo,

gracias a su extraordinaria capacidad de adaptación a diferentes condiciones de clima, vegetación y manejo. En Colombia, se cree que el inventario caprino está alrededor del millón de cabezas, con un alto margen de subregistro debido a las condiciones artesanales de la producción (Espinal, Covalada, & Amézquita., 2006).

La leche caprina y sus productos derivados, principalmente quesos y yogur, son de gran importancia en la alimentación y la salud humana (Haenlein, 2004), debido principalmente a las diferencias marcadas con la leche de vaca, en cuanto a la menor inmunogenicidad de sus proteínas (Ambrosoli, di Stasio, & Mazzocco, 1988), la mayor abundancia de aminoácidos esenciales (Barrionuevo, Alferez, Lopez Aliaga, Sanz Sampelayo, & Campos, 2002) y la composición diferencial de la grasa, siendo más rica la leche de cabra en ácidos grasos de cadena corta, media y ácidos grasos polinsaturados (Jenness, 1980). Al igual que en la leche de vaca, la lactosa constituye el carbohidrato más abundante de la leche de cabra. La leche de cabra contiene ligeramente menos lactosa que la leche de vaca (en promedio, 4,1 % frente a 4,7 %); por lo tanto, no puede considerarse como una solución de la dieta para personas que sufren de intolerancia a la lactosa (Silanikove, Leitner, Merin, & Prosser, 2010).

La intolerancia a la lactosa se debe a una deficiencia de β -galactosidasa o lactasa, enzima ubicada en el borde superior de las microvellosidades del intestino delgado. Esta enzima produce la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa, monosacáridos fácilmente absorbidos por transporte activo. La actividad de la lactasa permanece en niveles altos durante la primera parte de la niñez (salvo ausencia por causas

genéticas) y luego declina a valores muy bajos en la adultez. La caída de la actividad de la lactasa, que lleva a una mala digestión de la lactosa, es un patrón fisiológico común en el 75-90 % de la población adulta mundial, y produce síntomas clínicos persistentes tales como diarrea, distensión abdominal, dolor y flatulencias, lo que lleva generalmente a disminuir el consumo de productos lácteos con las consecuencias nutricionales que esto implica (Vernia, Di Camillo, & Marinaro, 2001).

La solución más efectiva y conveniente para tratar el problema de la intolerancia a la lactosa es consumir productos lácteos cuyo contenido de lactosa se ha reducido por un proceso enzimático. Uno de los procesos biotecnológicos más difundidos es la hidrólisis enzimática de la lactosa con la enzima lactasa en forma soluble o fijada a un soporte. El primero de estos métodos es el más ampliamente utilizado a escala industrial en procesos batch, debido a su fácil implementación y menor costo. En este caso, la lactasa se adiciona a la leche (o mezcla) y luego de la hidrólisis la enzima se inactiva por las condiciones de proceso aplicadas, por lo que no se la puede reutilizar. En el segundo método la enzima se localiza físicamente sobre una matriz sólida (reactor enzimático) que se incorpora a un proceso continuo, permitiendo su reutilización (Mlichova & Rosenberg, 2006; Panesar, Kumari, & Panesar, 2010). En ambos casos es necesario optimizar la temperatura y el pH óptimos de actividad de la enzima, pues estos parámetros pueden variar según el origen de la enzima y la matriz láctea a tratar.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los parámetros cinéticos de la enzima lactasa aplicada bajo diferentes condiciones de pH y temperatura en leche de cabra, con el fin

de establecer los parámetros de operación en un proceso de deslactosado de este producto.

■ MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

El reactivo ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) y las sales para preparación de los sistemas buffer fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, USA). La enzima lactasa (Quick Action Dairy) fue adquirida de Berkley & Jensen (USA).

2.2 Leche de cabra

Se adquirió leche de cabra de un productor local ubicado en el municipio de La Ceja (Antioquia). La leche fue refrigerada a 4° desde el momento del ordeño hasta los análisis, tiempo que no superó doce horas.

2.3 Determinación de la actividad enzimática dependiente de la temperatura

Se tomaron tres erlenmeyer cada uno con 100 mL de leche de cabra, los cuales se llevaron a placas de calentamiento a diferentes temperaturas (24 °C, 40 °C, 60 °C) y agitación a 1000 rpm. Cuando se alcanzaron las temperaturas antes mencionadas se adicionó 1 mL de la enzima lactasa (900 U/mL disuelta en agua destilada); inmediatamente se midió el contenido de glucosa utilizando un sistema de detección enzimática (Glucometer Accu-Chek, Roche) durante tres horas.

2.4 Determinación de la actividad enzimática dependiente del pH

Una vez determinada la temperatura de mayor actividad enzimática, se prepararon dos soluciones buffer para evaluar el efecto del pH sobre la actividad de la enzima lactasa. Para un pH 4, se utilizó el buffer acetato (0.57 mL de ácido acético (0.2M) y 1.36 g de acetato de sodio (0.2M)). Para un pH 7, se utilizó el buffer fosfato (5,64 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ y 3 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$). Se utilizó ONPG como sustrato, preparando una solución 50 mM (15,01 mg en 1 mL de cada buffer pH 4 y pH 7), a partir de la cual se prepararon disoluciones a 10, 5.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 mM en cada uno de los buffer.

Se depositaron 100 μL de cada una de las disoluciones de ONPG en platos de 96 pozos. Luego se adicionaron 100 μL de la enzima (900 U/mL disuelta en agua destilada) e inmediatamente se procedió con la lectura de la absorbancia a 420 nm cada minuto durante 60 minutos a 37 °C, utilizando un lector de placas Synergy HT (Biotek Instruments Inc, USA). Con los datos obtenidos se construyó una curva cinética (Abs420 vs tiempo) de donde se calculó la velocidad de reacción para cada concentración de sustrato a partir de la pendiente de la región lineal de la curva. Con los datos de velocidad vs concentración de sustrato se calcularon los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten.

2.5 Análisis estadístico

Los datos son presentados como media \pm Desviación Estándar. Las curvas de cinética enzimática y sus correspondientes parámetros se obtuvieron a través del

software GraphPad Prism version 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

■ RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra las estructuras químicas y las reacciones implicadas en los métodos aplicados en el estudio. En la parte superior se aprecia la reacción de hidrólisis

de la lactosa en presencia de lactasa para producir galactosa y glucosa, lo cual soporta el planteamiento del método descrito en la sesión 2.3. Por su parte, en la parte inferior se muestra la reacción de hidrólisis del análogo o-nitrofenilgalactósido (ONPG), el cual, por acción de la lactasa, se convierte en galactosa y o-nitrofenol, un compuesto altamente coloreado que absorbe radiación a 420 nm, lo cual soporta el planteamiento del método descrito en la sección 2.4.

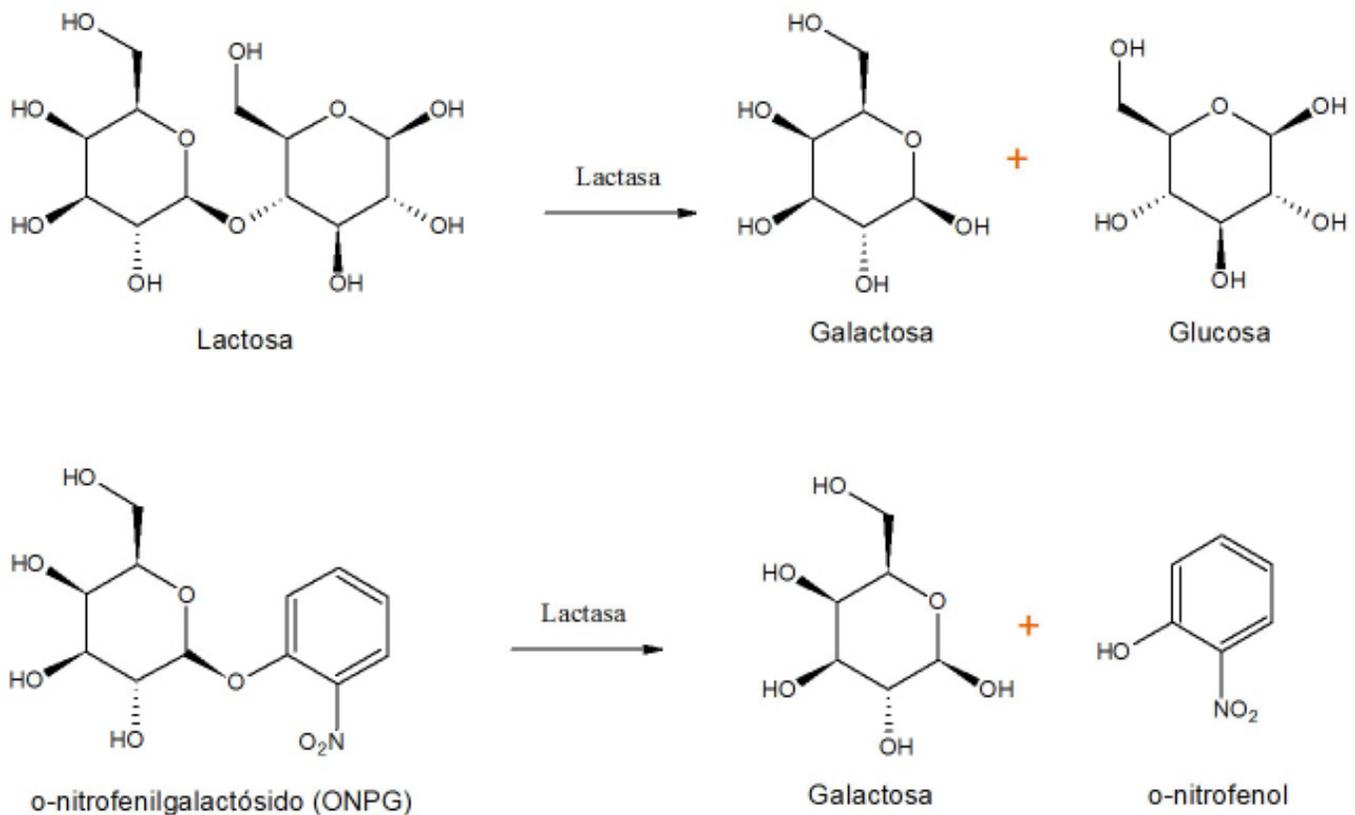


Figura 1. Estructuras y reacciones químicas implicadas en el estudio.

En la figura 2 se puede apreciar el efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de la lactosa. Después de 170 minutos de actividad de la enzima sobre la leche de cabra a diferentes temperaturas, es

posible apreciar que la temperatura de mayor actividad corresponde a 40 °C, lo cual coincide con los reportes de la literatura para la enzima lactasa obtenida de levaduras, Itoh y Col reportaron valores

de temperatura óptima de 30 °C (Itoh, Suzuki, & Adachi, 1982), O'Connell y Col de 37°C (O'Connell & Walsh, 2007), mientras que Rodríguez y Col reportaron valores de 40 °C (A. Rodríguez et al., 2006).

Adicionalmente, en los últimos 60 minutos de seguimiento de la reacción no se observó un incremento en la glucosa producida por la hidrólisis enzimática a temperaturas de 24 y 40 °C; sin embargo, a 60 °C el nivel de

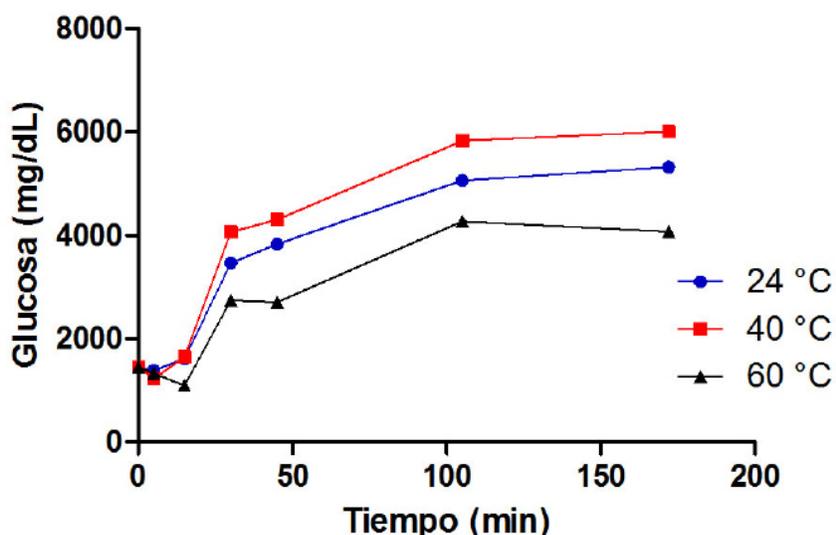


Figura 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima lactasa en leche de cabra

glucosa, incluso, disminuye, probablemente debido al consumo de esta en una reacción de pardeamiento no enzimático (Reacción de Maillard) como se ha reportado ampliamente en procesos térmicos de leche de vaca (Van Boekel, 1998)

En cuanto al porcentaje de lactosa removido, no es posible calcular este parámetro, pues en el presente trabajo no se evaluó el contenido inicial y final de lactosa. Sin embargo, Rodríguez y Col lograron un 82.6 % de hidrólisis en leche de cabra al obtener 1.1 g/L de glucosa, partiendo de valores

iniciales similares a los de este trabajo. Por lo tanto, posiblemente los 0.6 g/L de glucosa obtenidos al final del seguimiento realizado en este trabajo podrían corresponder a una eficiencia de hidrólisis cercana al 50 %.

La figura 3 muestra los parámetros cinéticos de la enzima lactasa actuando a diferentes valores de pH. En el presente trabajo, se comprueba que la lactasa utilizada proviene de levaduras, pues presenta mejor actividad a valores de pH cercanos a la neutralidad. En varios trabajos se ha reportado que la enzima lactasa

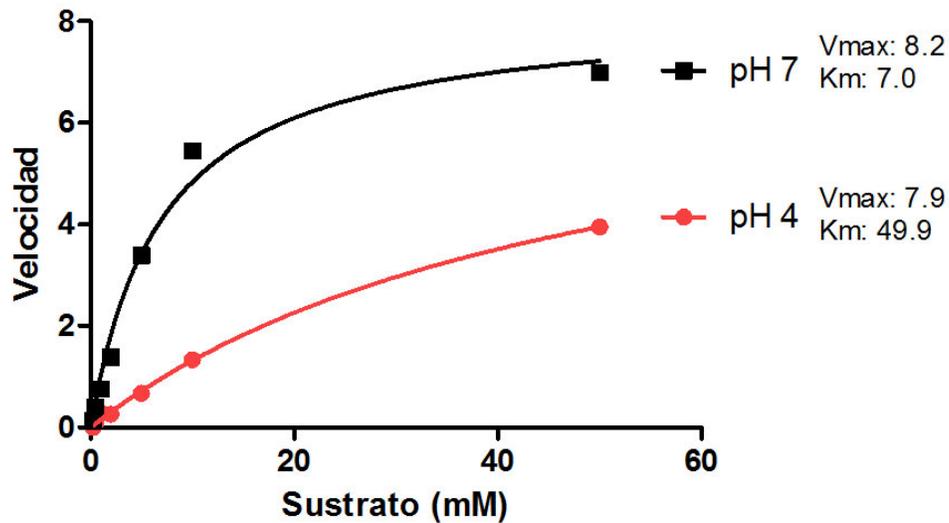


Figura 3. Ecuación de Michaelis-Menten y parámetros cinéticos para la enzima lactasa a diferentes valores de pH

obtenida de levaduras presenta valores de pH óptimos cercanos a 7 (O'Connell & Walsh, 2007; Ornelas, Silveira, Sampaio, & Passos, 2008; Park & Oh, 2010). De hecho, se sabe que 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" están en 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 (V. A. Rodríguez, Cravero, & Alonso, 2008).

El cambio en la actividad enzimática a diferentes valores de pH podría explicarse debido a alteraciones estructurales de la proteína. En este sentido, Tello-Solis y Col

han determinado la estructura secundaria de lactasa obtenida de *Kluyveromyces lactis*, describiendo que a pH 7.0 es principalmente una proteína de tipo beta, que tiene 22 % de hélices beta, 14 % de láminas paralelas, 25 % de láminas beta antiparalelas, 34 % de estructura desordenada, y solo un 5 % de hélices alfa. Sin embargo, a pH 6,5-7,0, los autores reportan que la elipticidad disminuye ligeramente, lo que sugiere poco cambio estructural, pero la actividad disminuye de manera significativa, probablemente debido a las variaciones en los residuos más críticos del sitio activo. Por otro lado, a pH por encima de 7,0 los autores encuentran un aumento notable en la elipticidad debido a los cambios estructurales, mientras que la actividad máxima se encuentra a un pH de 7,5, y concluyen que los cambios producidos en la estructura secundaria de la enzima a valores de pH entre 7,0-7,5 favorecen la interacción entre la enzima y el sustrato (Tello-Solis et al., 2005).

En el presente trabajo, el aumento significativo en la Km, sin cambio aparente de la Vmax, al cambiar el pH de 7.0 a 4.0, sugiere una clásica inhibición no competitiva (Berg JM, Tymoczko JL, & L., 2002), probablemente debido a los cambios en la conformación de la estructura secundaria de la proteína a bajos valores de pH (Tello-Solis et al., 2005).

En cuanto a los parámetros cinéticos, O'Connell y col mostraron un valor de Km de 7.1 para lactasa obtenida de *Kluyveromyces marxianus* evaluada a pH 6.8 y 37 °C, lo cual coincide con los valores reportados en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

El presente trabajo demostró que es posible el deslactosado de leche de cabra utilizando una formulación comercial de enzima lactasa. Específicamente, las condiciones de pH y temperatura que mostraron mejor actividad de la enzima fueron 7.0 y 40 °C, respectivamente.

Este trabajo podría servir como base para establecer procesos que mejoren el perfil comercial y saludable de la leche de cabra. De hecho, la industria láctea ha trabajado incesantemente para brindar productos en los cuales el contenido de lactosa se reduce antes de su empaque y venta, lo cual es frecuente en leche de vaca; sin embargo, la baja industrialización de la leche de cabra no ha permitido que se desarrollen procesos y productos de este tipo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Centro de Laboratorios de la Corporación Universitaria

Lasallista por disponer de los equipos y materiales necesarios para la realización de esta investigación. A la Vicerrectoría de Investigación de la Corporación Universitaria Lasallista por la financiación del proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambrosoli, R., di Stasio, L., & Mazzocco, P. (1988). Content of α -1-Casein and Coagulation Properties in Goat Milk. *Journal of dairy science*, 71(1), 24-28.

Barrionuevo, M., Alferez, M. J. M., Lopez Aliaga, I., Sanz Sampelayo, M. R., & Campos, M. S. (2002). Beneficial Effect of Goat Milk on Nutritive Utilization of Iron and Copper in Malabsorption Syndrome. *Journal of dairy science*, 85(3), 657-664.

Berg JM, Tymoczko JL, & L., S. (2002). Chapter 8. Enzymes: Basic Concepts and Kinetics. In W. H. Freeman (Ed.), *Biochemistry* (5th edition ed.). New York.

Espinal, C. F., Covalada, H. M., & Amézquita., J. E. (2006). *La cadena de ovinos y caprinos en Colombia*. Bogotá: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia.

Espinal, C. F., Covalada, H. M., & Rodríguez, F. G. (2005). *La cadena láctea en Colombia*. Bogotá: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia.

Haenlein, G. F. W. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51(2), 155-163.

Itoh, T., Suzuki, M., & Adachi, S. (1982). Production and characterization of beta-galactosidase from lactose-fermenting

yeasts. *Agricultural and biological chemistry*, 46(4), 899-904.

Jenness, R. (1980). Composition and Characteristics of Goat Milk: Review. *Journal of dairy science*, 63(10), 1605-1630.

Mlichova, Z., & Rosenberg, M. (2006). Current trends of β -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45(2), 47-54.

O'Connell, S., & Walsh, G. (2007). Purification and properties of a beta-galactosidase with potential application as a digestive supplement. *Applied biochemistry and biotechnology*, 141(1), 1-14.

Ornelas, A. P., Silveira, W. B., Sampaio, F. C., & Passos, F. M. L. (2008). The activity of β -galactosidase and lactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* cultured in cheese whey as a function of growth rate. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4), 1008-1013.

Panesar, P. S., Kumari, S., & Panesar, R. (2010). Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. *Enzyme research*, 2010, 473137.

Park, A.-R., & Oh, D.-K. (2010). Galactooligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1279-1286.

Rodríguez, A., Leiro, R., Trillo, M. C., Cerdán, M. E., Siso, M. I., & Becerra, M. (2006). Secretion and properties of a hybrid *Kluyveromyces lactis*-*Aspergillus niger* beta-galactosidase. *Microbial Cell Factories*, 5(1), 41.

Rodríguez, V. A., Cravero, B. F., & Alonso, A. (2008). Proceso de elaboración de yogur deslactosado de leche de cabra. *Food Science and Technology* (Campinas), 28, 109-115.

Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U., & Prosser, C. G. (2010). Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research*, 89(2-3), 110-124.

Tello-Solís, S. R., Jiménez-Guzmán, J., Sarabia-Leos, C., Gómez-Ruiz, L., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano, G. M., et al. (2005). Determination of the Secondary Structure of *Kluyveromyces lactis* β -Galactosidase by Circular Dichroism and Its Structure-Activity Relationship as a Function of the pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 10200-10204.

Van Boekel, M. A. J. S. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry*, 62(4), 403-414.

Vernia, P., Di Camillo, M., & Marinaro, V. (2001). Lactose malabsorption, irritable bowel syndrome and self-reported milk intolerance. *Digestive and Liver Disease*, 33(3), 234-239.