



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

“Utilización del suero de requesón para la obtención de galactooligosacáridos utilizando β -galactosidasas”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

I.A. MARÍA DE JESÚS GRANADOS MARTÍNEZ

Matrícula: 2223801930

Correo: mgranados028@gmail.com

Director:

Dr. Sergio Andrés Alatorre Santamaría

Asesores:

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Dr. Francisco Javier Guzmán Rodríguez

Jurado:

Presidenta: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Secretario: Dr. Francisco Javier Guzmán Rodríguez

Vocal: Dr. Luis Guillermo González Olivares

Vocal: Dra. Mónica Alejandra Robles Arias

Iztapalapa, Ciudad de México a 30 de octubre de 2024

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad o PNPC) del CONAHCYT, con la referencia 001465”

Este trabajo fue realizado con apoyo del CONAHCYT (Becario 838960)

Resumen

El suero de requesón es un suero secundario obtenido como subproducto en la elaboración de requesón. Teniendo en cuenta que contiene nutrientes valiosos, este podría servir como fuente de compuestos, como la lactosa. Sin embargo, en México no se tienen reportes sobre su utilización en algún proceso o producto de valor agregado, siendo uno de los subproductos de la industria láctea más contaminantes, plantea un desafío ambiental y representa un costo significativo para su correcta eliminación. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó su uso como sustrato para la obtención de galactooligosacáridos (GOS) empleando β -galactosidasas (β -GAL) de diferentes orígenes, que catalizan la reacción de transgalactosilación.

En la primera etapa del proyecto se caracterizó fisicoquímicamente el suero de requesón para conocer la composición del sustrato a emplear, obteniendo una concentración de lactosa dentro del rango reportado para lactosuero (5.23%), además de una concentración muy baja de proteínas (0.03%).

Posteriormente, se estudió la actividad de transgalactosilación de las cuatro β -GAL empleadas en un medio acuoso de lactosa al 18% (p/v), obteniendo en las primeras 6 h de reacción que las β -GAL con menor rendimiento de GOS totales fueron las provenientes de *Escherichia coli* y *Kluyveromyces lactis*, descartando su utilización en la siguiente etapa. En esta siguiente etapa, la reacción se llevó a cabo durante 36 h, trabajando solamente con las enzimas de mayor rendimiento, la recombinante GLY 001-02 y la β -GAL de *Aspergillus oryzae* mostrando un máximo de GOS totales a las 30 h de 66.64 \pm 0.020% y 47.20 \pm 0.015%, respectivamente. Teniendo a GLY 001-02 como la enzima de mayor rendimiento a las 6 y 30 h. Una vez obtenido el tiempo de máxima producción, se llevó a cabo la reacción empleando el suero de requesón concentrado a 18% de lactosa, obteniendo un rendimiento en la producción de GOS de 44 \pm 0.005% a las 24 h por parte de GLY 001-02. Por su parte la β -GAL de *A. oryzae* presentó un rendimiento de 43.28 \pm 0.024% en el mismo tiempo de reacción.

En la última etapa, se llevó a cabo la optimización de la reacción de transgalactosilación mediante la utilización del diseño central compuesto, cambiando los parámetros de temperatura y concentración de lactosa. De esta forma, los parámetros obtenidos para la síntesis óptima de GOS para GLY 001-02 fueron 23% de lactosa a 84 °C, arrojando un rendimiento del 58.41% y para la β -GAL de *A. oryzae* se obtuvo el óptimo en 22.73% de lactosa a 52.5 °C, con un rendimiento de 45.20%. Al comprobar los parámetros óptimos se logró un rendimiento real de 61.56% para GLY 001-02 y del 44.35% para la β -GAL de *A. oryzae*.

Finalmente concluimos que el suero de requesón puede ser aprovechado como sustrato para la producción de GOS, utilizando la β -GAL de *A. oryzae* o la enzima recombinante GY 001-02, destacando que se obtuvieron rendimientos arriba del 40%.

Abstract

Requeson cheese whey is a secondary whey obtained as a waste product the processing of requeson cheese. Considering its rich composition, it could serve as a source of valuable compounds, such as lactose. Despite being known as a serious pollutant from the dairy industry, there are no reports in Mexico of its recovery and processing or as an added-value product, creating an environmental challenge. Therefore, this project aimed at studying its use as a substrate for preparation of galactooligosaccharides (GOS) through enzyme catalyzed transgalactosylation reactions using β -galactosidases (β -GAL) from different origins.

In the first stage of the project, the requeson whey was physicochemically characterized to determine its composition, obtaining a lactose concentration within the range reported for whey (5.23%), along with a very low protein concentration (0.03%).

Subsequently, the four selected β -GAL were studied for their transgalactosylation activity, using an 18% (w/v) lactose aqueous medium. It was found that the β -GAL from *Escherichia coli* and *Kluyveromyces lactis* produced total GOS with the lowest yields during the first 6 h. Those β -GAL were not included in the further study. The highest transgalactosylation activity was shown by the recombinant GLY 001-02 followed by the β -GAL from *Aspergillus oryzae* with a maximum of total GOS at 30 h of $66.64 \pm 0.02\%$ and $47.20 \pm 0.01\%$, respectively, during at 36 h experiment. Once the production time was optimized, the reaction was carried out using concentrated requeson cheese whey with 18% (w/v) of lactose, and GLY 001-02 which resulted in GOS production with yield at $44 \pm 0.00\%$ at 24 h. Comparable results were obtained for β -GAL from *A. oryzae* ($43.28 \pm 0.02\%$).

Finally, the central composite design was used to optimize other parameters of the enzymatic reaction such as temperature and substrate concentration. It was found that $84\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 23% lactose yielded 58.41% GOS in transgalactosylation reaction catalyzed by GLY 001-02, while $52.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 22.73% lactose were optimum parameters for the syntesisi of GOS using β -GAL from *A. oryzae* (45.20%). Conversions obtained in wet experiments correlated well with the central design (61.56 and 44.35% yields for GLY 001-02 y *A. oryzae*, respectively).

In conclusion requesón cheese whey can be used as a substrate for the production of GOS, using β -GAL from *A. oryzae* or the recombinant enzyme GY 001-02, highlighting that yields above 40% were obtained.

Índice

Resumen	I
Abstract	II
Índice	III
Índice de figuras	V
Índice de tablas.....	VII
Abreviaturas	VIII
1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Industria láctea.....	3
2.1.1. Producción de queso	4
2.1.2. Lactosuero	5
2.1.3. Usos del lactosuero	7
2.2. Requesón.....	9
2.2.1. Producción del requesón	11
2.2.2. Suero de requesón	12
2.3. Oligosacáridos.....	15
2.3.1. Galactooligosacáridos (GOS).....	16
2.3.2. Beneficios de los galactooligosacáridos	19
2.4. Antecedentes de la producción de galactooligosacáridos.....	20
2.5. Usos de suero para la producción de GOS en los últimos 5 años	21
2.6. β -Galactosidasas.....	22
2.6.1. β -Galactosidasa de <i>Escherichia coli</i>	26
2.6.2. β -Galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i>	27
2.6.3. β -Galactosidasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	27
2.6.4. β -Galactosidasa hipertermófila.....	28
3. Justificación	30
4. Hipótesis.....	30
5. Objetivo general.....	30
6. Objetivos particulares	30
7. Plan de trabajo.....	31
7.1. Caracterización del suero de requesón	32
7.1.1. Cuantificación de carbohidratos	32
7.1.2. Cuantificación de proteínas.....	32
7.1.3. Determinación de cenizas	33

7.1.4. Determinación de calcio.....	33
7.2. Actividad hidrolítica de las β -galactosidasas.....	33
7.3. Síntesis de galactooligosacáridos empleando lactosa.....	34
7.3.1 Síntesis de galactooligosacáridos empleando suero de requesón.....	35
7.4. Seguimiento de la reacción	35
7.4.1. Cromatografía en capa fina.....	35
7.4.2. Cuantificación de productos por HPLC	36
7.5. Optimización de la reacción de transgalactosilación.....	37
8. Resultados y discusión	38
8.1. Caracterización del suero de requesón	38
8.1.1. Cuantificación de carbohidratos	39
8.1.2. Cuantificación de proteínas.....	40
8.1.3. Determinación de cenizas.....	40
8.2. Determinación de la actividad hidrolítica de las β -galactosidasas.....	42
8.3. Síntesis de galactooligosacáridos con lactosa	43
8.3.1. Determinación de GOS por cromatografía en capa fina (CCF)	43
8.3.2. Cuantificación de GOS a través de HPLC.....	46
8.3.3. Optimización de la producción de GOS con lactosa en buffer.....	52
8.3.3.1 Análisis cualitativo de la reacción de transgalactosilación por CCF.....	52
8.3.3.2 Cuantificación de GOS a través de HPLC.....	54
8.4. Síntesis de galactooligosacáridos con suero de requesón	57
8.4.1 Análisis de la síntesis de GOS por cromatografía en capa fina	57
8.4.2 Análisis cuantitativo de GOS: HPLC.	58
8.5. Optimización	62
8.5.1. Superficie de respuesta de la producción de GOS utilizando β -GAL de <i>A. oryzae</i>	62
8.5.2. Superficie de respuesta de la producción de GOS utilizando glicosidasa de GLY 001-02.....	65
9. Conclusiones	67
10. Perspectivas	68
11. Bibliografía.....	69
12. Anexos.....	85

Índice de figuras

Figura 1. Producción mensual de leche de bovino nacional 2020-2021 (miles de litros). (SIAP, 2022).	3
Figura 2. Tasa media de crecimiento anual en la producción de lácteos y derivados a través de los últimos 10 años (2011 a 2021) (CANILEC, 2022).	5
Figura 3. Procesamiento de lactosuero por métodos fisicoquímicos y biotecnológicos. (Yadav et al., 2015).	8
Figura 4. Síntesis de GOS mediante β -Galactosidasa (modificado de Rodríguez-Colinas, 2013).	17
Figura 5. Estructura de algunos de los principales GOS sintetizados a partir de lactosa (Rodríguez-Colinas, 2013).	18
Figura 6. Mecanismo de acción de las β -GAL (modificado de Vera et al., 2022).	24
Figura 7. Plan de trabajo.	31
Figura 8. Diagrama de aplicación de muestras en placa de cromatografía en capa fina. (modificado de Cruz-Hernández, 1999).	36
Figura 9. Representación de un cromatograma típico de HPLC.	37
Figura 10. CCF de la reacción de transgalactosilación con A) GLY 001-02 a las primeras 5 h de reacción y B) GLY 001-02 a las 4, 5 y 6 h de reacción.	44
Figura 11. CCF de la reacción de transgalactosilación con <i>A. oryzae</i> a 6 h.	45
Figura 12. CCF de la reacción de transgalactosilación con <i>E. coli</i>	46
Figura 13. CCF de la reacción de transgalactosilación con <i>K. lactis</i>	46
Figura 14. Productos de transgalactosilación con 18% de lactosa con la glicosidasa GLY 001-02 ...	47
Figura 15. Productos de transgalactosilación con 18% de lactosa con la β -GAL proveniente de <i>A. oryzae</i>	48
Figura 16. Productos de transgalactosilación con 18% de lactosa con la β -GAL proveniente de <i>A. oryzae</i>	49
Figura 17. Producto de transgalactosilación, con 18% de lactosa con la β -GAL proveniente de <i>E. coli</i>	49
Figura 18. Comparación de los GOS-3 obtenidos con 18% de lactosa con las cuatro β -GAL.	52
Figura 19. CCF de la reacción extendida (24 h) de transgalactosilación con A) GLY 001-02 y B) <i>A. oryzae</i>	53
Figura 20. Productos de transgalactosilación a 36 h de reacción, con 18% de lactosa con la β -GAL proveniente de <i>A. oryzae</i>	54
Figura 21. Productos de transgalactosilación a 36 h de reacción, con 18% de lactosa con la glicosidasa GLY 001-02.	55
.....	57
Figura 22. CCF de la reacción de transgalactosilación en suero de requesón como medio, con A) GLY 001-02 y B) β -GAL de <i>A. oryzae</i> a 24 h.	57

Figura 23. Comparación de los GOS sintetizados en lactosa con buffer y en suero de requesón utilizando la β -GAL proveniente de <i>A. oryzae</i>	59
Figura 24. Comparación de los GOS sintetizados en lactosa con buffer y en suero de requesón utilizando la glicosidasa GLY 001-02.	60
Figura 25. Superficie de respuesta utilizando la β -GAL proveniente de <i>A. oryzae</i>	63
Figura 26. Superficie de respuesta para la obtención de GOS Totales, utilizando la β -GAL proveniente de <i>A. oryzae</i>	64
Figura 27. Superficie de respuesta utilizando la glicosidasa GLY 001-02.....	65
Figura 28. Superficie de respuesta para la obtención de GOS Totales utilizando la glicosidasa GLY 001-02.	66

ANEXOS

CURVAS PATRÓN

Figura 1a. Curva patrón para el método de DuBois con lactosa como estándar.....	85
Figura 2a. Curva patrón para Bradford con BSA como estándar.	85
Figura 3a. Curva patrón para la determinación de calcio.	86
Figura 4a. Curva patrón de ONP diluido en buffer de acetatos pH 4.5.....	86
Figura 5a. Curva patrón de ONP diluido en buffer de fosfatos de potasio pH 6.....	87
Figura 6a. Curva patrón de ONP diluido en buffer de fosfatos de sodio pH 6.5.....	87
Figura 7a. Curva patrón de ONP diluido en buffer de fosfatos de potasio pH 7.3.....	88

CROMATOGRAMAS

Figura 8a. Cromatograma del estándar oligomato.	88
Figura 9a. Cromatograma tipo de los estándares galactosa, glucosa, lactosa y rafinosa.....	89
Figura 10a. Análisis del suero de requesón por HPLC.....	89
Figura 11a. Cromatograma tipo de la reacción de transgalactosilación con la β -GAL de <i>K. lactis</i> a las 6 h (dilución 1/10).	90
Figura 12a. Cromatograma tipo de la reacción de transgalactosilación con la β -GAL de <i>E. coli</i> a las 6 h (dilución 1/10).	90
Figura 13a. Cromatograma tipo de la reacción de transgalactosilación con la glicosidasa GLY 001-02 a las 30 h diluida 1/25.	91
Figura 14a. Cromatograma de la reacción de transgalactosilación con la β -GAL de <i>A. oryzae</i> a las 30 h (dilución 1/25).	91
Figura 15a. Cromatograma de la reacción de transgalactosilación en suero de requesón con la β -GAL de <i>A. oryzae</i> a las 24 h (dilución 1/50).	92

Índice de tablas

Tabla 1. Composición del lactosuero dulce y ácido. (Chombo, 2022; Gómez y Sánchez, 2019 y Carvalho et al., 2013).	6
Tabla 2. Composición del requesón con diferente acidez del suero (Ruiz-Marroquín, 2006).....	10
Tabla 3. Composición del requesón con diferente tipo y concentración de sal (Ramírez-Rivas et al., 2022b).	10
Tabla 4. Composición del requesón con exopolisacáridos (Carrero-Puentes et al., 2022).....	11
Tabla 5. Composición del suero de requesón. (Guerrero-Rodríguez et al., 2010).....	12
Tabla 6. Composición y análisis fisicoquímico del suero secundario (Mares-Mares et al., 2017)....	13
Tabla 7. Análisis fisicoquímico del suero secundario (Mazorra-Manzano et al., 2019).....	14
Tabla 8. Condiciones a las que se mantienen estables los GOS (Macfarlane et al., 2008; Sangwan et al., 2011 y Lamsal, 2012).	16
Tabla 9. Características de la β -galactosidasa de <i>E. coli</i> (BRENDA, 2024).....	26
Tabla 10. Características de la β -galactosidasa de <i>K. lactis</i> (BRENDA, 2024).....	27
Tabla 11. Características de la β -galactosidasa de <i>A. oryzae</i> (BRENDA, 2024).	28
Tabla 12. Características de la β -galactosidasa hipertermófila (Cruz-Hernández, 1999).	29
Tabla 13. Condiciones de pH y temperatura a las que se llevó a cabo la reacción de transgalactosilación.....	34
Tabla 14. Diseño central compuesto para la optimización de la reacción de transgalactosilación..	38
Tabla 15. Caracterización del suero de requesón comparado con Chombo (2022) para lactosuero dulce.	42
Tabla 16. Estandarización de las actividades enzimáticas de las β -galactosidasas.....	42
Tabla 17. Comparación del rendimiento de GOS totales sintetizados en este trabajo comparado con los rendimientos reportados por otros autores.	50
Tabla 18. Rendimiento de transgalactosilación de <i>A. oryzae</i> y GLY 001-02 a 6 y 30 h de reacción. 56	
Tabla 19. Rendimiento de transgalactosilación de la β -GAL de <i>A. oryzae</i> y la glicosidasa GLY 001-02 a 24 h de reacción en suero de requesón comparado con bibliografía.....	61
Tabla 20. ANOVA de los datos obtenidos por parte de la β -GAL de <i>A. oryzae</i>	65
Tabla 21. ANOVA de los datos obtenidos por parte de la glicosidasa GLY 001-02.	67

Abreviaturas

β -GAL: β -Galactosidasas.

CCF: Cromatografía en capa fina.

DBO: Demanda biológica de oxígeno.

D-Gal: D-Galactosa.

D-Glc: D-Glucosa.

DQO: Demanda química de oxígeno.

GOS: Galactooligosacáridos.

GOS-3: Galactooligosacáridos con grado de polimerización 3.

GOS-4: Galactooligosacáridos con grado de polimerización 4.

GOS-5: Galactooligosacáridos con grado de polimerización 5.

GOS-6: Galactooligosacáridos con grado de polimerización 6.

GP: Grado de polimerización.

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

ONP: *o*-nitrofenol.

ONPG: *o*-nitrofenil- β -D-galactósido.

Rf: Factor de retención.

UE: Unidades Enzimáticas.

1. Introducción

El lactosuero se obtiene como subproducto en la producción de queso, tiene una carga orgánica alta debido a su composición: proteínas solubles, minerales, sales y carbohidratos como la lactosa. Si este subproducto no tiene un tratamiento adecuado previo a su desecho, para disminuir su carga orgánica, se convierte en uno de los efluentes industriales más contaminantes debido a la demanda biológica de oxígeno (DBO) (35-50 g/L de suero). La DBO es el oxígeno que los microorganismos utilizan para poder llevar a cabo la degradación de materia orgánica biodegradable existente en un agua residual (Osorio-González *et al.*, 2018 y Rocha y Guerra, 2020).

En consecuencia, el lactosuero ha sido ampliamente estudiado para intentar disminuir su carga orgánica, principalmente en procesos fermentativos, donde destacan la producción de etanol y metanol o ácidos orgánicos como por ejemplo el acetato, lactato, propionato, entre otros y para la producción de oligosacáridos, entre ellos los galactooligosacáridos (GOS) (Gympel, 2021). Mundialmente el principal uso del lactosuero es para la producción de concentrado de proteína de suero conocido comúnmente como WPC (Whey Protein Concentrate por sus siglas en inglés) sin embargo en México su uso más común es en la producción de requesón o alimento para ganado.

Hay dos maneras de obtener el requesón: por fermentación o acidificación del lactosuero. Posteriormente, el lactosuero se calienta para lograr la precipitación de las proteínas y formar una masa de color blanco y consistencia blanda que es el requesón. Este producto es una importante fuente proteica. Y teniendo como subproducto el suero de requesón o suero secundario (Alibekov *et al.*, 2021 y Muhammad *et al.*, 2021).

Sin embargo, en los últimos años ha aumentado el interés por el uso del lactosuero para la síntesis de GOS, ya que al ser un subproducto disminuye costos de elaboración. Los GOS tienen propiedades como baja cariogenicidad y bajo contenido calórico. Además, cuenta con funciones biológicas específicas, como la actividad prebiótica ya que estimulan selectivamente el crecimiento de las bacterias benéficas de la microbiota, además aumentan la absorción de minerales, especialmente el calcio (Figuroa-González *et al.*, 2011 y Souza *et al.*, 2022). Su síntesis se logra por la acción de enzimas β -galactosidasas (β -GAL).

Las β -GAL son glicosil hidrolasas que se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza, siendo producidas en algunos órganos de animales, plantas, bacterias, hongos y levaduras.

Las β -GAL hidrolizan el disacárido lactosa en sus monosacáridos: galactosa y glucosa. Además, pueden llevar a cabo la transgalactosilación, en donde se sintetizan GOS, pues la galactosa se puede unir a una molécula de lactosa, galactosa o un GOS ya existente. Para que esta reacción suceda las condiciones enzimáticas deben controlarse (Rocha y Guerra, 2020 y Gänzle, 2012).

En el presente proyecto se estudiará el suero de requesón como una fuente de lactosa para la síntesis de GOS empleando diferentes β -GAL, con el fin de aprovechar un subproducto que normalmente es desechado y darle un valor agregado, pues sigue siendo altamente contaminante, principalmente por la presencia de lactosa.

2. Antecedentes

2.1. Industria láctea

De acuerdo con el Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA, 2019), México se mantiene desde hace 8 años dentro de los 10 principales países productores de leche.

La industria láctea es la cuarta industria más productiva en el sector alimenticio en México, aportando un 6.7% al producto Interno Bruto (PIB) en 2022. En términos de dinero, esta industria aportó al país 65 mil, 719 millones de pesos (INEGI, 2023). Este volumen de producción se debe a la gran variedad de alimentos que se producen, los cuales van desde la leche en todas sus presentaciones: entera, descremada, deslactosada, entre otras. Así como a sus derivados: queso, crema, yogurt, mantequilla, entre otros.

La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2022) informó que la producción a nivel nacional de leche de vaca en 2021 fue de 13 millones 239 mil 779 toneladas, dando como resultado un aumento de 2.3% respecto a las 12 millones 943 mil 123 toneladas del año anterior. En la Figura 1 se puede observar la producción mensual durante los años 2020 y 2021.

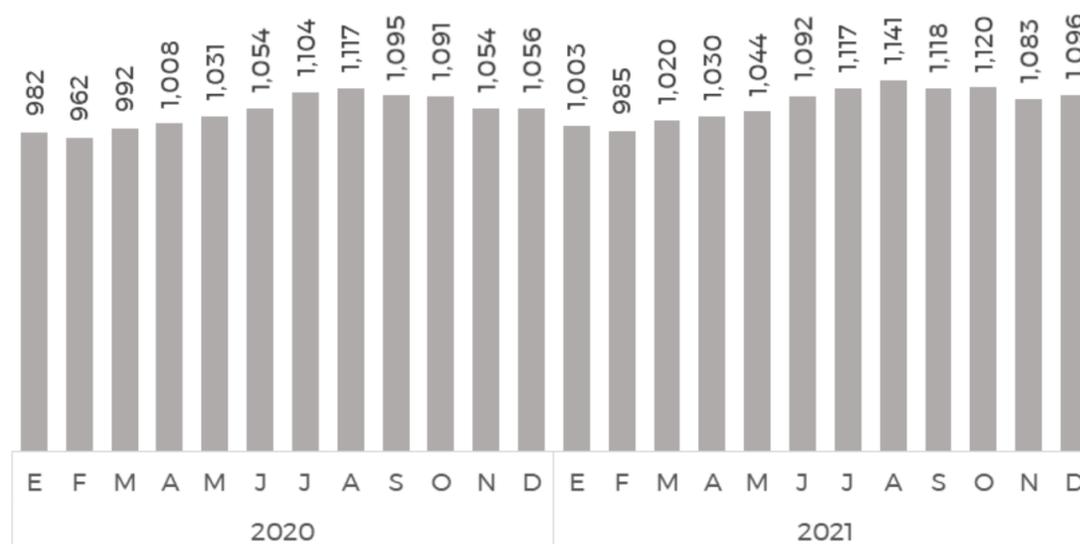


Figura 1. Producción mensual de leche de bovino nacional 2020-2021 (miles de litros). (SIAP, 2022).

Entre las principales entidades productoras destacan: Jalisco con 2 millones 780 mil toneladas; Coahuila, con un millón 514 mil toneladas; Durango, un millón 463 mil toneladas, y Chihuahua, con un millón 249 mil toneladas (SIAP, 2022).

2.1.1. Producción de queso

La NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018 y el Codex Alimentarius de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS, 2008) especifican que el queso no debe tener una proporción de caseína superior a la de la leche.

Su textura puede ser blanda, dura, extradura, entre otras, además de que puede estar madurado o no, e incluso estar recubierto. Complementando esta definición, la NOM-243-SSA1-2010 estipula que la leche debe estar estandarizada y pasteurizada, su origen no está limitado a la especie bovina.

Su obtención puede ser:

- Utilizando cuajo u otros coagulantes idóneos para conseguir la coagulación de la leche: entera, descremada o semidescremada.
- Por procesos de elaboración que conduzcan a la coagulación del sustrato: a) adición de ácidos orgánicos comestibles, b) fermentación por bacterias ácido-lácticas (BAL).

Posteriormente se realiza el escurrimiento del suero resultante de la coagulación, prensada o no.

Fisicoquímicamente, el queso posee una estructura formada básicamente por la caseína la cual se encuentra en un complejo de caseinato fosfato cálcico que, por coagulación, retiene lactosa, albúminas, minerales, grasa, vitaminas, agua y otras sustancias de la leche (Walstra, 2005).

Existe una amplia variedad de quesos clasificados de acuerdo con: a) la maduración: frescos o madurados, b) el tipo de leche utilizada: vaca, cabra, oveja, u otras, c) el contenido graso: descremado, magro, graso, entre otros, d) el porcentaje de humedad: baja, media, alta, e) otros aspectos. Se han estimado más de 2000 variedades de queso (Belitz *et al.*, 2009).

De acuerdo con datos reportados por la FAO, mundialmente se producen al año más de 18 millones de toneladas de queso. La producción en volumen es superior a la de los granos de café y cacao, tabaco, hojas de té y todos ellos juntos. Siendo Estados Unidos de América el de mayor producción de queso, teniendo un 30% de la producción mundial, seguido de Francia y Alemania con un 12% y 13%, respectivamente (Tapia e Iturrieta, 2020). Convirtiéndose con el pasar de los años en el producto derivado de la leche más comercializado internacionalmente (Chombo, 2022).

Mientras que en México la Cámara Nacional de Industriales de la Leche (CANILEC, 2022) reporta que en México se producen 40 variedades distintas de queso. Con una producción industrial de 516, 155 toneladas métricas, siendo los quesos más producidos en toneladas: doble crema con 88, 746; Chihuahua con 57,396; amarillo con 52, 520; panela con 47, 339; tipo manchego con 41, 589; crema con 40, 518 y Oaxaca con 31, 786 (Secretaría de Agricultura y desarrollo Rural, 2016).

De acuerdo con la producción nacional histórica, la categoría de los quesos es la que presenta mayor crecimiento de producción entre todos los productos derivados de leche. La Figura 2, describe la tasa media de crecimiento anual de producción desde 2011 a 2021 de diversos productos lácteos y derivados en México, donde el queso se mantiene arriba del 6%, y se pronostica que se mantenga de esta forma hasta el 2025 (CANILEC, 2022).

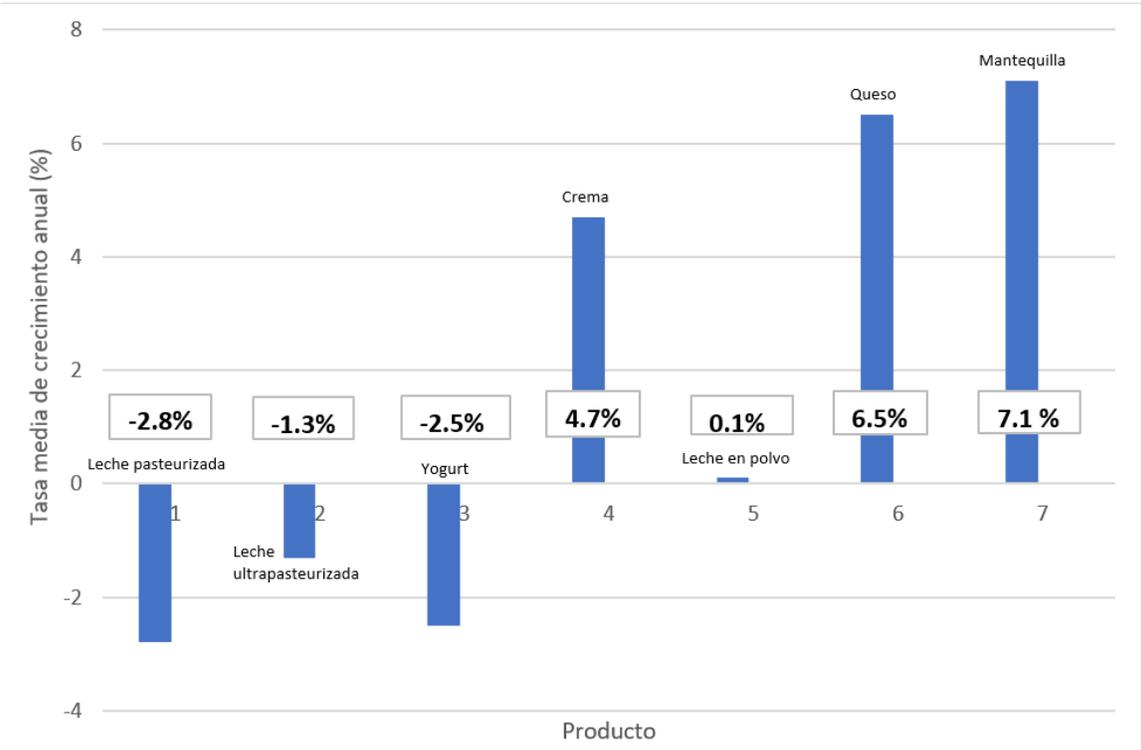


Figura2. Tasa media de crecimiento anual en la producción de lácteos y derivados a través de los últimos 10 años (2011 a 2021) (CANILEC, 2022).

2.1.2. Lactosuero

La NOM-035-SSA1-1993 define al lactosuero como “el líquido obtenido de la coagulación de la caseína de la leche, mediante acción enzimática (de origen animal, vegetal o microbiano) o por la adición de ácidos orgánicos o minerales de

grado alimenticio”. Estimándose que por cada kilogramo de queso producido se generan de 9 a 10 L de lactosuero (Padín y Díaz, 2009).

La composición química del lactosuero depende del tipo de coagulación empleada. De tal forma el lactosuero se puede clasificar en: a) dulce, cuando la coagulación es proveniente de la acción de enzimas proteolíticas, b) ácido, cuando se obtiene por la acción de un ácido orgánico o por la combinación de la acción de enzimas y ácidos orgánicos (Chombo, 2022).

El lactosuero dulce presenta un pH alrededor de 6.5, posee un contenido alto de lactosa y proteína y bajo contenido de grasa. Mientras que el suero ácido tiene un pH menor a 5 y mayor cantidad de minerales. (Mazorra-Manzano y Moreno-Hernández, 2019). En la Tabla 1 se presentan las composiciones de cada uno de estos lactosueros.

Tabla 1. Composición del lactosuero dulce y ácido. (Chombo, 2022; Gómez y Sánchez, 2019 y Carvalho *et al.*, 2013).

Componente	Composición (g/L)	
	Suero dulce	Suero ácido
Sólidos totales	63.0 – 70.0	63.0 – 70.0
Lactosa	46.0 – 52.0	44.0 – 46.0
Proteína	6.0 – 10.0	6.0 – 8.0
Calcio	0.4 – 0.6	1.2 – 1.6
Fosfato	1.0 – 3.0	2.0 – 4.5
Lactato	2.0	6.4
Ceniza	5.0	8.0
Grasa	5.0	0.4
Cloruro	1.1	1.1
Vitaminas	Tiamina 0.38mg/mL; Riboflavina 1.2mg/mL; Ácido nicotínico 0.85mg/mL; Ácido Pantoténico 3.4mg/mL; Piridoxina 0.42mg/mL; Cobalamina 0.03mg/mL; Ácido ascórbico 2.2mg/mL	

Siendo así que la composición del lactosuero tiene alrededor del 55% de los nutrientes de la leche, principalmente lactosa (la cual constituye una alta proporción del total de sólidos del suero), proteína sérica, minerales y en mucho menor proporción grasa (Yadav *et al.*, 2015 y Mazorra-Manzano y Moreno-Hernández, 2019). Además, presenta una mezcla rica de proteínas de particular importancia, las cuales son: β -lactoglobulina, inmunoglobulinas, α -lactoalbúmina, albúmina de suero bovino, lactoperoxidasa, lactoferrina, fracción proteosa-peptona y el glicomacropéptido (en caso del suero dulce), éstas tienen una calidad nutricional excepcional: presentan un valor biológico (medición de la calidad de la proteína,

expresado como porcentaje de nitrógeno utilizado) superior al de las proteínas del huevo y soya (Hoffman y Falvo, 2004).

También podemos encontrar propiedades funcionales en la fracción lipídica del lactosuero, ya que contiene fosfolípidos de membrana. Debido a sus excelentes propiedades emulsificantes esta fracción es valorada como ingrediente alimentario (Jiménez-Flores y Brisson, 2008).

Aun contando en su composición con nutrientes de alto valor, históricamente ha sido considerado un flujo de desecho, independientemente del tipo (dulce o ácido). Donde aproximadamente 50% del total de lactosuero generado es desechado en cuerpos de agua o en el suelo (Aktas *et al.*, 2006 y Mollea *et al.*, 2013); utilizando métodos de descarga como: a) rociar el lactosuero en los campos, b) desechar el lactosuero en ríos, lagos y mares y c) verterlo en el alcantarillado municipal (Smithers, 2008).

La continua descarga de lactosuero sin un previo tratamiento a los cuerpos de agua y suelos causa un rápido consumo de oxígeno, debido a su alta demanda química de oxígeno (DQO), de 60 a 80 g/L y alta DBO, de 30 a 50 g/L (Spalatelu, 2012). Lo que produce en suelos una disminución en la producción de cultivos agrícolas, mientras que en el agua produce eutrofización, salinización, formación de jabón, acidificación y generación de malos olores, entre otros elementos (Prazeres *et al.*, 2013), provocando un severo problema ambiental. La eutrofización es la acumulación de residuos orgánicos en sistemas acuáticos causando la proliferación de ciertas algas, lo que provoca cambios en la diversidad del sistema y pérdida de la calidad del agua.

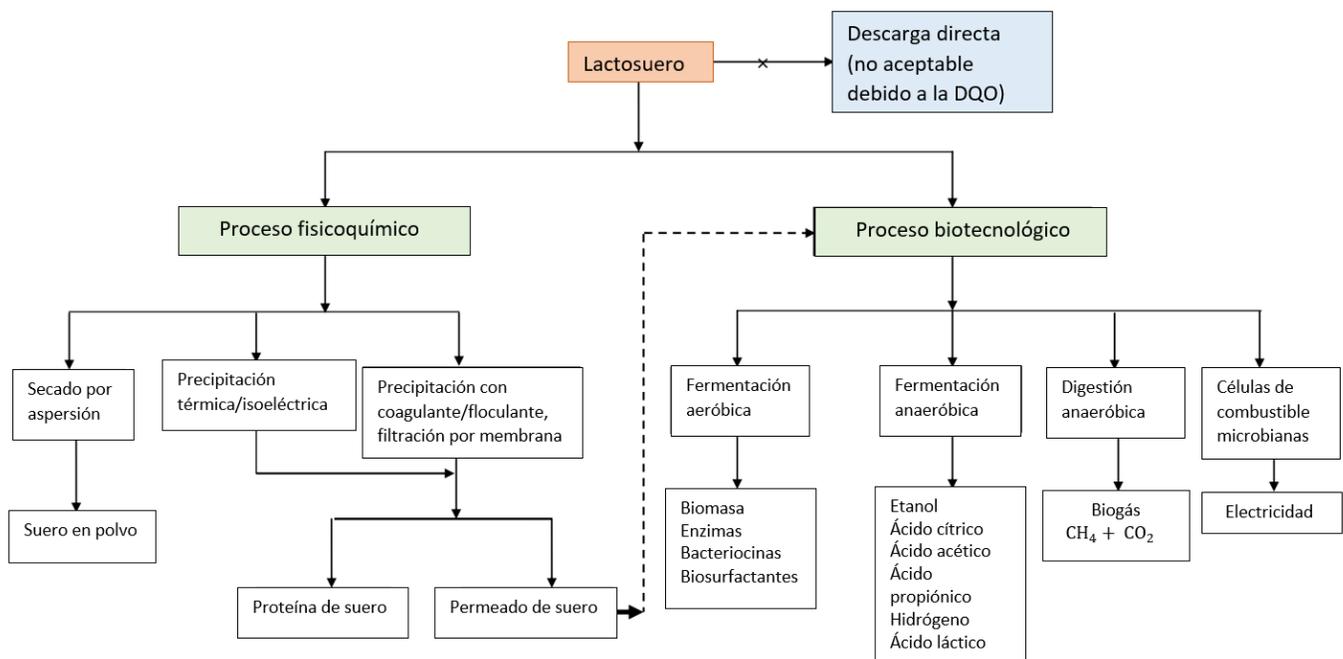
La problemática ambiental es de interés mundial, debido a que la producción mundial de lactosuero obtenido en la fabricación de queso es aproximadamente de 200 millones de toneladas métricas por año (estimada con base en la producción de queso), de la cual cerca del 50% es producido por Europa, 3% por Estados Unidos de Norteamérica y 0.6% por México (FAOSTAT, 2017).

2.1.3. Usos del lactosuero

Hoy en día existen tecnologías avanzadas donde la mayor parte del lactosuero, alrededor del 50%, se utiliza y transforma en productos valiosos. De ese 50%, alrededor del 45% es usado directamente en forma líquida, el 30% como suero de leche en polvo seco, el 15% como lactosa y subproductos y el resto como concentrado de proteína (Kosseva *et al.*, 2009).

La transformación del lactosuero se puede llevar a cabo mediante dos procedimientos.

- I) El primero es el procesamiento directo, donde hay un tratamiento físico, comúnmente son: precipitación con la ayuda de coagulantes/floculantes, precipitación térmica/isoeléctrica y la separación por membrana.
- II) El segundo es una biotransformación, que involucra el procesamiento biotecnológico, donde el suero se usa para varios procesos microbianos/enzimáticos entre ellos la fermentación aeróbica y anaeróbica, celdas de combustible microbianas y digestión anaeróbica (Mollea *et al.*, 2013 y Yadav *et al.*, 2015).



En la Figura 3 se muestran algunos de los productos que se pueden obtener mediante los procesos antes mencionados.

Figura 3. Procesamiento de lactosuero por métodos físicoquímicos y biotecnológicos. (Yadav *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que estos productos y métodos utilizados son técnicamente factibles. Sin embargo, la investigación continúa para hacer que los productos de valor agregado sean aún más económicamente viables.

Si bien el lactosuero tiene diversas aplicaciones, sus proteínas por sí solas también son de gran interés. Son generalmente reconocidas como seguras para el consumo (GRAS, por sus siglas en inglés Generally Recognized as Safe) para aplicaciones

en diversos productos alimenticios como: productos lácteos, cárnicos, alimentos congelados, y formulaciones de alimentos para bebés (Mazorra-Manzano y Moreno-Hernández, 2019 y Yadav *et al.*, 2015). También tienen varias aplicaciones en la industria farmacéutica. Hasta se han llegado a comercializar bebidas fermentadas debido a la presencia de fracciones de proteínas específicas (péptidos) que se ha demostrado tienen función antihipertensiva, disminuyen el estrés e inducen la saciedad (Korhonen, 2009).

Siendo que el lactosuero tiene diversos usos, en México no existen datos concretos de su utilización, se estima que se aprovecha sólo cerca del 10%. Su uso se limita en una pequeña parte a la fabricación de requesón, ya que, al no contar con la suficiente infraestructura para deshidratar el suero, es la forma más económica de concentrar y recuperar las proteínas del suero (Ramírez-Rivas *et al.*, 2022a). Y en la alimentación de ganado porcino y/o bovino (Mazorra-Manzano y Moreno-Hernández, 2019 y Valencia-Denicia y Ramírez-Castillo, 2009).

2.2. Requesón

El requesón es producido por la precipitación de proteínas del lactosuero principalmente β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina. Lo que lo hace un producto rico en proteínas y bajo en grasa. Con una consistencia granular, generalmente de blanda textura, cremosa y un sabor semidulce (Villarruel-López *et al.*, 2016). Caracterizándose por ser un producto que tiene un alto contenido de humedad.

En la fabricación del requesón, uno de los objetivos es el de recuperar la mayor cantidad de la proteína en el lactosuero y además tener valores de humedad, pH y calcio apto para consumo humano. La recuperación de proteínas depende de cómo este compuesto el lactosuero en un inicio, del tratamiento térmico y del perfil de pH durante el proceso (Ruiz-Marroquín, 2006).

Un estudio realizado por Ruiz-Marroquín (2006), evaluó el efecto de la acidez, para obtener el mayor rendimiento de requesón utilizando el lactosuero de queso crema. Las muestras analizadas tenían una Acidez Titulable Expresada Como Ácido Láctico (ATECAL) en el lactosuero de 0.15% y acidificado a 0.3% y otros dos lactosueros acidificados con ácido cítrico (0.5 y 1 g/L). Obteniendo la composición mostrada en la Tabla 2.

Tabla2. Composición del requesón con diferente acidez del suero (Ruiz-Marroquín, 2006).

Formulación	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Azúcares (%)	Ceniza (%)	pH	Rendimiento (kg/50 kg lactosuero) *
0.3 ATECAL	76.07	9.39	4.67	7.88	1.99	4.8	1.15 ^a
0.15 ATECAL	75.41	N.R	9	N.R	2.75	5	1.06 ^a
1 g de ácido cítrico	75.11	9.5	5.6	7.92	1.87	4.7	1.43 ^b
0.5 g de ácido cítrico	71.38	N.R	6	N.R	2.07	4.9	1.13 ^a

N.R.: No reportado.

* Tratamientos seguidos de diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

En el estudio realizado por Ramírez-Rivas *et al.* (2022b), se evaluó el efecto de los diferentes tipos y concentraciones de sal: 1% NaCl, 1.5% NaCl, 1% (1:1) NaCl/KCl, 1.5% (1:1) NaCl/KCl y 0.1% CaCl₂ en el lactosuero obtenido de la elaboración de queso tipo Chihuahua, ajustando la acidez a 0.12% ATECAL, obtuvieron requesón la composición reportada en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición del requesón con diferente tipo y concentración de sal (Ramírez-Rivas *et al.*, 2022b).

Tratamiento	Rendimiento (%)	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Proteína (%)
Control	3.8±0.18	75.81 ± 0.92	1.51 ± 0.16	7.79 ± 1.82	11.69 ± 0.55
1% NaCl	4.32 ± 0.48	76.53 ± 0.68	2.33 ± 0.80	4.28 ± 1.50	10.00 ± 2.02 ^a
1.5% NaCl	4.40 ± 0.31	76.30 ± 2.59	2.58 ± 0.45	5.04 ± 2.41	9.51 ± 1.96
1% (1:1) NaCl/KCl	4.43 ± 0.17	75.26 ± 0.58	2.14 ± 0.49	5.29 ± 0.88	10.05 ± 1.60
1.5% (1:1) NaCl/KCl	4.30 ± 0.58	76.76 ± 1.24	2.48 ± 0.34	5.28 ± 1.08	9.25 ± 1.57
0.1% CaCl ₂	3.89 ± 0.48	76.30 ± 1.23	1.17 ± 0.15	5.66 ± 2.23	11.51 ± 0.56

Nota: Los resultados están expresados como media ± desviación estándar.

Así mismo, Carrero-Puentes *et al.* (2022) elaboraron un requesón a partir del lactosuero ácido y lo adicionaron con exopolisacáridos (EPS) para aumentar los rendimientos de producción, además elaboraron un requesón con EPS y probióticos y lo caracterizaron. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición del requesón con exopolisacáridos (Carrero-Puentes *et al.*, 2022).

Formulación	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Ceniza (%)	pH	Rendimiento (%)
Requesón	63.41±0.13	6.32±0.20	0.3±0.00	2.5±0.21	4.65±0.00	4.86 ± 0.13
Requesón + EPS	71.65±0.26	6.56±0.44	0.3±0.00	2.79±0.34	4.52±0.02	6.15 ± 0.09
Requesón + probióticos	62.9±0.57	6.12±0.25	0.3±0.05	2.73±0.25	4.55±0.05	4.98 ± 0.08
Requesón+probióticos+EPS	73±0.57	6.41±0.40	0.35±0.70	2.89±0.07	4.50±0.04	6.37 ± 0.11

Nota: Los resultados están expresados como su media ± desviación estándar.

Gracias a los estudios anteriores podemos observar que el requesón al ser obtenido a partir del lactosuero proveniente de diferentes tipos de quesos, su contenido de nutrientes puede variar. El tipo de lactosuero utilizado y su pH son parámetros significativos ya que el requesón con exopolisacáridos, mantuvo un pH alrededor de 4.5, teniendo un menor contenido de proteína, grasa, ceniza y humedad a diferencia de los requesones elaborados por Ruiz-Marroquín (2006) y Ramírez-Rivas *et al.* (2022b), quienes manejan un pH arriba de 4.7.

2.2.1. Producción del requesón

En México el requesón es definido por la NOM-035-SSA1-1993 como un producto obtenido a partir del lactosuero, el cual se coagula en medio ácido a través de calentamiento para favorecer la obtención de la cuajada. Complementando la definición de la NOM, el requesón se puede obtener mediante la fermentación con BAL del género *Lactobacillus*, esta fermentación sirve para acidificar el medio.

Después de acidificar el medio, el lactosuero se calienta a unos 90 °C para lograr la precipitación de las proteínas, y formar una masa de apariencia blanca y blanda, el cual es el requesón. En su origen el requesón se elaboraba con lactosuero de cabra u oveja, pero hoy en día se utiliza en su mayoría lactosuero de vaca (Alibekov *et al.*, 2021).

Un mayor rendimiento del requesón puede ser a través de la precipitación por medio de temperatura a 71 y 101 °C combinado con un ATECAL de 0.12% reajustando la acidez de 0.15% a 0.30%. Otra opción puede ser la precipitación de las proteínas por medio de un calentamiento a 90 °C por 10 minutos y acidificando el medio a un pH de 4.95-5.35. De estas metodologías en la producción industrial se lleva a cabo un precalentamiento a 70 °C y después la temperatura se eleva a 90 °C. Sin embargo, en la elaboración artesanal de este producto, en su mayoría se utiliza vinagre (una solución acuosa de ácido acético) o el jugo de frutas ácidas en volúmenes de aproximadamente 5 a 10% en relación con el volumen del lactosuero (Ruiz-Marroquín, 2006).

La producción de requesón presenta rendimientos que oscilan de 4.7 a 6.5% p/v, es decir 1 kg de requesón por 20 L de suero aproximadamente (Ramírez-Rivas y Chávez-Martínez, 2017). A pesar de ser muy consumido en México, sigue siendo un producto artesanal. Aunque recientemente se ha empezado a comercializar por algunas empresas, debido a esto, no existen informes sobre su volumen de producción (Mazorra-Manzano y Moreno-Hernández, 2019)

2.2.2. Suero de requesón

El suero de requesón es un suero secundario, que se obtiene una vez escurrido el cuajo en la producción de un queso de suero, en este caso, requesón. Estimando una producción de alrededor de 18 L por kg de requesón (Pires *et al.*, 2021). Es de color amarillento verdoso claro, pero con menos turbidez que el lactosuero con sólidos suspendidos y contiene hasta un 6% de lactosa y cantidades variables de grasas, proteínas y sales minerales ya que depende de la manera en la que se elabora (Leizaola-Calvo, 2011, Fancello *et al.*, 2024). Fancello *et al.* (2024) investigaron en la base de datos Scopus los estudios reportados sobre suero secundario, introduciendo enunciados como "Scotta", "Deproteinized cheese whey" "Second cheese whey" y "Ricotta exhausted cheese whey" encontrando solo 147 artículos científicos publicados entre 1980-2023, con Italia y Grecia como los países con más investigaciones al respecto, por lo que las aplicaciones del suero secundario son limitadas a pesar de las numerosas aplicaciones potenciales.

Los artículos obtenidos para la búsqueda de suero de requesón son los siguientes: Guerrero-Rodríguez *et al.* (2010) caracterizaron fisicoquímicamente el suero de requesón recolectado de 15 empresas diferentes en el Valle de Tulancingo, Hidalgo. Estas empresas elaboran el requesón con una mezcla de lactosuero dulce y ácido. Los resultados que obtuvieron se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición del suero de requesón. (Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2010).

Parámetro	Rango
Grasa (%)	0.18-0.33
Proteína (%)	0.48-0.69
Lactosa (%)	3.95-4.7
Sólidos Totales (%)	5.05-5.9
Sales minerales (%)	0.1-0.45
Sólidos no grasos (%)	4.79-5.64
pH	5.48-6.8

Mares-Mares *et al.* (2017) caracterizaron molecularmente las proteínas del lactosuero y suero secundario derivado de queso Oaxaca, panela y fresco obteniendo diferentes contenidos de proteína. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos de la caracterización del suero secundario. Además, observaron diferentes pesos moleculares, indicando la presencia de distintas proteínas/péptidos dependiendo del tipo de producto, tratamiento térmico y acidificación del suero. El mejor rendimiento en la elaboración de requesón lo obtuvieron con 0.5% de ATECAL a 95 °C durante 40 min.

Tabla 6. Composición y análisis fisicoquímico del suero secundario (Mares-Mares *et al.*, 2017).

Parámetro	Queso fresco	Queso panela	Queso Oaxaca
Apariencia	Líquido verde, más transparente	Líquido verde, más transparente	Líquido verde, transparente
pH	3.81 ± 0.05	4.02 ± 0.23	4.01 ± 0.04
Acidez (%)	0.61 ± 0.50	0.62 ± 0.50	0.57 ± 0.66
Humedad (%)	97.73 ± 0.33	97.96 ± 0.34	98.14 ± 0.23
Sólidos totales (%)	2.27 ± 0.14	2.04 ± 0.13	1.86 ± 0.09
Sólidos totales (sin grasas) (%)	1.93 ± 0.23	1.67 ± 0.23	1.64 ± 0.34
Proteína (%) *	0.77 ± 0.45	0.56 ± 0.03	0.36 ± 0.02
Grasa (%)	0.34 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.22 ± 0.04
Minerales (%)	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.02
Carbohidratos (Lactosa) (%)**	1.07 ± 0.03	1.06 ± 0.23	1.24 ± 0.76

*Factor de conversión 6.38, específico para leche.

**El porcentaje de lactosa se determinó por diferencia de peso.

Dos años después, Mares-Mares *et al.* (2019) estudiaron la inhibición de la dipeptidil peptidasa IV por hidrolizados enzimáticos utilizando pepsina y tripsina en lactosuero y suero secundario proveniente de quesos frescos y queso Oaxaca. Los quesos, fresco y Oaxaca se elaboraron con leche obtenida de vacas Holstein de la granja de la Universidad de Guanajuato. Teniendo como resultado un potencial de los hidrolizados enzimáticos como agentes antidiabéticos.

Por otro lado, Mazorra-Manzano *et al.* (2019) recolectaron de una quesería en San Pedro El Saucito en Hermosillo, Sonora el lactosuero obtenido del queso asadero y el suero de requesón para su caracterización. La elaboración del queso asadero es

llevada a cabo con leche bronca y la adición de lactosuero ácido, los resultados que obtuvieron de la caracterización del suero de requesón se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Análisis fisicoquímico del suero secundario (Mazorra-Manzano *et al.*, 2019).

Parámetro	Grasa (%)	Proteína (%)	Sólidos Totales (%)	Minerales (%)	pH
Rango	3.0-5.5	0.8-1.1	8.38-11.06	0.6-0.62	5.2-5.3

Al no tener datos de la utilización del suero de requesón en algún proceso o producto, se consideraron las aplicaciones del suero de ricotta (scotta), ya que este es muy parecido al requesón. El ricotta es un queso italiano de alta humedad obtenido de la coagulación por calentamiento y acidificación directa de la leche o el lactosuero o la combinación de ambas, conteniendo así mayor proporción de grasa en su composición, entre 15–20%, en comparación al requesón (menor a 9%) (Mazorra-Manzano *et al.*, 2019 y Ortiz-Araque *et al.*, 2018).

El queso ricotta se ha hecho muy popular en todo el mundo (Pizillo *et al.*, 2005), por lo que la utilización del scotta ha sido más estudiada. Por ejemplo, De Giorgi *et al.* (2018), hicieron una investigación preliminar del uso potencial del suero de queso ricotta (RCW, por sus siglas en inglés: Ricotta Cheese Whey) como sustrato para el crecimiento bacteriano y producción de ácido lactobiónico con cepas de *Pseudomonas taetrolens*. Teniendo un rendimiento de conversión de hasta $85 \pm 7.0\%$, tras 48 h de fermentación discontinua en un tanque con agitación de 3 L.

Meneses *et al.* (2021) estudiaron el uso de RCW como sustituto de leche en helado y analizaron sensorialmente los efectos de esta sustitución, encontrando que hasta el 75% de RCW en el helado no afecta la aceptación del producto. Sin embargo, si aumentó la percepción del sabor a chocolate y la velocidad de fusión. Los autores concluyeron que el RCW representa un potencial sustituto lácteo para ser utilizado por la industria láctea, disminuyendo el impacto medioambiental de este subproducto.

Además, se ha producido ácido láctico obtenido por fermentación de RCW utilizando *Lactobacillus casei* DSM 20011 (ATCC 393), una bacteria homofermentativa, obteniéndose rendimientos del $27.0 \pm 0.3\%$ al $46.0 \pm 0.7\%$ (Costa *et al.*, 2021).

Un año después Casá *et al.* (2022), evaluaron el uso de RCW para la producción por lotes de *Chlorella vulgaris*. Teniendo tres métodos diferentes de pretratamiento: centrifugación, tratamiento térmico y microfiltración tangencial (TFMF). Todos los métodos de pretratamiento produjeron una mejora de los parámetros cinéticos de

crecimiento de *C. vulgaris*, presentando mejor rendimiento la tecnología TFMF. La concentración final de biomasa fue de 2.5 ± 0.05 /h. Obtuvieron una concentración final de biomasa de 2.28 g/L, además, disminuyeron la DQO del RCW a $26 \pm 1\%$.

Por su parte, en un estudio reciente de Silva *et al.* (2023), se elaboraron bebidas isotónicas formuladas con RCW y maracuyá. Mostrando una elevada bioaccesibilidad de los minerales K^+ , Na^+ y Mg^{2+} (37-70%). Las bebidas que desarrollaron son alternativas innovadoras para el mercado de suplementos para deportistas, combinando el uso de un subproducto de la industria láctea y una nueva variedad de maracuyá hasta la fecha poco explorada económicamente.

Todas estas aplicaciones detallan las posibles vías de valorización biotecnológica y la viabilidad de los procesos. Teniendo en cuenta que el proceso de producción de ricotta y requesón son similares, se podrían considerar las mismas aplicaciones para el suero de requesón. Por el momento, no se han registrado usos del suero de ricotta para la producción de GOS.

2.3. Oligosacáridos

Los oligosacáridos son moléculas formadas por la polimerización de monosacáridos, que van desde 2 hasta un máximo de 10 unidades de estos. Pueden estar formados por el mismo tipo de monosacáridos (homooligosacáridos) o diferente tipo de monosacáridos (heterooligosacáridos). Los más abundantes son los disacáridos (Pardo-Rojas, 2014). Físicoquímicamente son sólidos cristalinos, de sabor dulce, color blanco y solubles en agua.

Los métodos para la síntesis de oligosacáridos incluyen:

- 1) Síntesis química, un enfoque limitado por secuencias sintéticas complejas que utilizan la protección de los grupos hidroxilo para lograr regio y estereoselectividad, además de las grandes cantidades de reactivos tóxicos y las duras condiciones de reacción requeridas (Sears y Wong, 2001).
- 2) Síntesis enzimática altamente selectiva utilizando glicosiltransferasas o glicosidasas de procariontas y eucariontas, un enfoque económicamente amigable (Sears y Wong, 2001 y Seibel y Buchholz, 2010).

Los oligosacáridos derivados de la síntesis enzimática de la lactosa, en particular GOS y lactulosa representan una parte importante, alrededor del 40% de la producción de oligosacáridos (Seibel y Buchholz, 2010). En los últimos años el interés por la producción de otros oligosacáridos como los fructooligosacáridos ha crecido debido a su propiedad prebiótica (Corzo *et al.*, 2015).

2.3.1. Galactooligosacáridos (GOS)

Los galactooligosacáridos son oligosacáridos los cuales son una clase de carbohidrato, también conocidos como oligosacáridos transgalactosilados, oligogalactosilactosa, entre otros. Están compuestos por monómeros de galactosa y una unidad terminal de glucosa, unidos por enlace β -glicosídico, poseen un grado de polimerización (GP) de 2 a 9 (Gänzle, 2012 y Vera e Illanes, 2016).

Los GOS han sido reconocidos como GRAS y están clasificados como carbohidratos no digeribles (NDO por sus siglas en inglés; Non Digestible Oligosaccharides), debido a la resistencia en los procesos digestivos del intestino delgado y el estómago, pues tienen una configuración β diferente a la lactosa. De forma que alrededor del 90% de lo que se consume llega hasta el colon sin alguna modificación (Rastall, 2006). Tienen una dulzura ligera (aproximadamente 40% en relación con la sacarosa), excelente sabor y son bastante estables, incluso a pH ácido y altas temperaturas (Lamsal, 2012). Permanecen sin cambios a períodos largos de almacenamiento y en las condiciones descritas en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones a las que se mantienen estables los GOS (Macfarlane *et al.*, 2008; Sangwan *et al.*, 2011 y Lamsal, 2012).

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	pH
10	160	7
10	120	3
10	100	10

Los GOS pueden ser sintetizados química o enzimáticamente, siendo ésta última la opción más amigable con el medio ambiente ya que no requiere de grandes cantidades de reactivos tóxicos. La síntesis enzimática de GOS puede llevarse a cabo mediante β -galactosidasas, estas glicosidasas catalizan la hidrólisis de la lactosa, aunque en condiciones de alta concentración de lactosa, pueden sintetizar GOS a través de la transgalactosilación (Figura 4). Debido a ello, las condiciones enzimáticas deben controlarse para evitar la hidrólisis completa de los GOS formados y, por lo tanto, permitir que se produzcan altas concentraciones de GOS (Sears y Wong, 2001 y Lamsal, 2012).

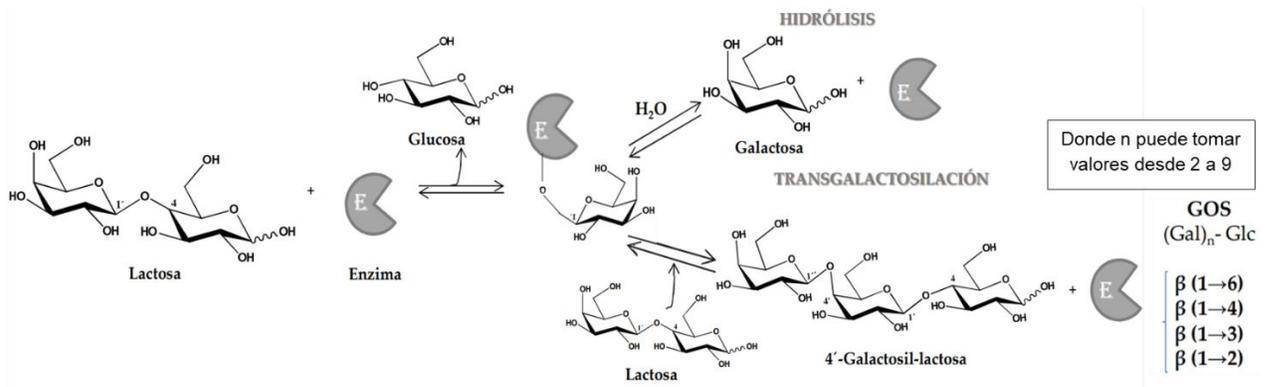


Figura 4. Síntesis de GOS mediante β -Galactosidasa (modificado de Rodríguez-Colinas, 2013).

Dependiendo de las condiciones de reacción y las enzimas utilizadas se consiguen mezclas de di-, tri-, tetra- o pentasacáridos con enlaces $\beta(1-2)$, $\beta(1-3)$, $\beta(1-4)$ y $\beta(1-6)$ (Barreateau *et al.*, 2006 y Lamsal, 2012). Algunas estructuras de los principales GOS sintetizados se muestran en la Figura 5.

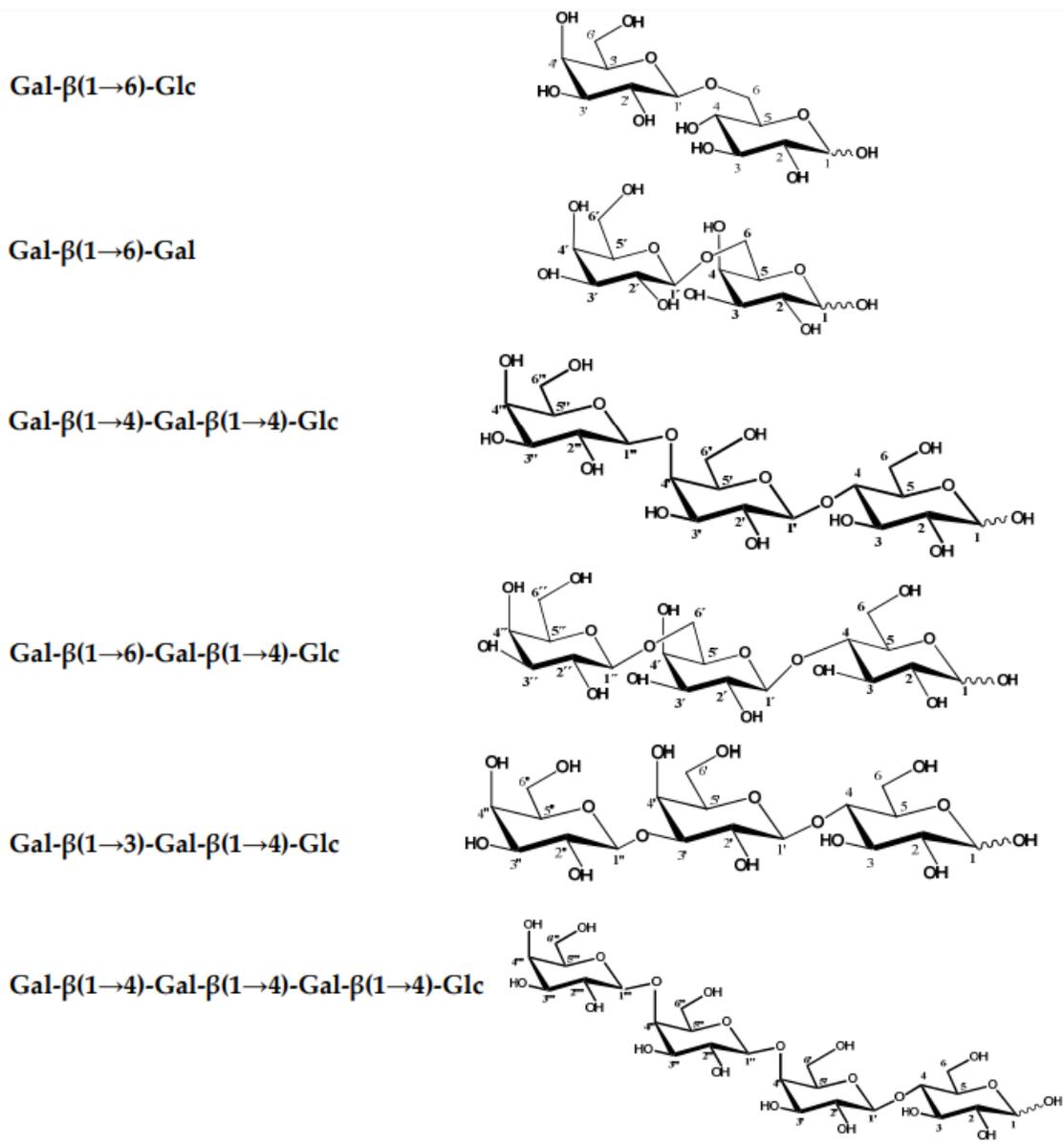


Figura 5. Estructura de algunos de los principales GOS sintetizados a partir de lactosa (Rodríguez-Colinas, 2013).

2.3.2. Beneficios de los galactooligosacáridos

Existe una cantidad numerosa de estudios científicos que avalan los beneficios del consumo de GOS en la salud humana (Roberfroid *et al.*, 2010 y Lamsal, 2012):

- Su función como prebióticos, debido a que las enzimas del intestino no pueden digerir la configuración β de los GOS, estimulando el crecimiento de bacterias benéficas en el colon, tales como bifidobacterias y lactobacilos (Barile y Rastal, 2013 y Rastall, 2010).
- Aumenta la absorción y biodisponibilidad de minerales, en especial el calcio y en menor proporción el magnesio, zinc y hierro (Sangwan *et al.*, 2011 y Tomal *et al.*, 2015).
- La disminución de los niveles de amoniaco, aminos y fenoles, sustancias potencialmente dañinas para los recién nacidos y la reducción del número de infecciones gracias a la multiplicación de bifidobacterias en los recién nacidos (Macfarlane *et al.*, 2008 y Sangwan *et al.*, 2011).
- Es un producto de baja cariogenicidad y bajo contenido calórico (aproximadamente 1.73-2 kcal/g) (Lamsal, 2012).
- Actúan como un señuelo del receptor ayudando a inhibir la adhesión de ciertas bacterias consideradas como patógenos a las células que recubren el intestino grueso. En particular los GOS tiene la más alta capacidad antiadherente de los prebióticos (Shoaf *et al.*, 2006).
- Previenen la colonización en el intestino humano por microorganismos considerados como patógenos ya que estimulan el crecimiento de bacterias benéficas de la microbiota (Macfarlane *et al.*, 2008).
- Recientemente se han observado mejoras en la ansiedad preclínica en mujeres jóvenes (18 – 25 años), mostrando la compleja interacción entre la microbiota intestinal, la función cerebral y el comportamiento (Johnstone *et al.*, 2021).
- Los GOS tienen una amplia gama de aplicaciones en el cuidado de la piel al inhibir la pigmentación de la piel, mejorar la hidratación y reducir las arrugas (Suh *et al.*, 2019).
- Tienen efectos benéficos potenciales sobre la cicatrización de heridas debido a su actividad como ligandos de receptores tipo Toll, se detectó una mayor expresión de los marcadores de diferenciación inducidos por GOS. Los productos que contienen GOS pueden cerrar heridas y la piel por actividad directa sobre las funciones de los queratinocitos. Varios pasos de la cicatrización de heridas pueden beneficiarse de la administración directa de GOS a los queratinocitos. De hecho, los GOS estimulan los eventos inflamatorios, migratorios y de diferenciación que son necesarios para restaurar la barrera cutánea (Bergandi *et al.*, 2022).

2.4. Antecedentes de la producción de galactooligosacáridos

Aunque los GOS son relativamente fáciles de obtener a partir de productos de desecho industrial, como el lactosuero, no se ha logrado prepararlos en cantidades que sean industrialmente aceptables. De tal forma, en los últimos años se han buscado aumentar el rendimiento de la síntesis de GOS empleando diversas estrategias, que se expondrán a continuación.

Cruz-Guerrero *et al.* (2005), utilizaron una glicosidasa hipertermófila (GLY-001-02) para estudiar la influencia de la actividad de agua (a_w), y la concentración de lactosa en la síntesis de GOS en un sistema orgánico. Obteniendo que la producción de GOS aumentó gradualmente a medida que la a_w disminuía en el sistema de reacción. Se obtuvieron GOS con diferente GP dependiendo de la a_w en el sistema de reacción. La síntesis máxima de GOS con GP-3 (GOS-3), se alcanzó en un intervalo de a_w de 0.44-0.57 con concentraciones de lactosa de 0.06%-0.1%, mientras que los máximos de GOS con GP-4 (GOS-4) y GOS con GP-5 (GOS-5) se alcanzaron con concentraciones de lactosa de 0.06%-0.1% e intervalos de a_w de 0.47-0.57 y 0.49-0.60, respectivamente. Los autores demostraron que se requiere una mayor a_w para sintetizar GOS de mayor longitud, ya que su síntesis también depende de la flexibilidad de la enzima, que, a su vez, depende de la actividad acuosa de la reacción.

Por su parte Wang *et al.* (2020), realizaron un estudio para optimizar los parámetros de procesamiento para la síntesis de GOS utilizando suero de leche en polvo y una β -GAL de *A. oryzae*. Los parámetros optimizados fueron: a) concentración inicial de lactosa, b) pH, c) tiempo de reacción, d) temperatura y e) relación enzima/sustrato (E/S). Obtuvieron un rendimiento óptimo de 25.1% con un tiempo de reacción de 25 min, una temperatura de 50 °C, un pH de 4.5, una concentración de lactosa inicial de 50% y una relación E/S de 20 Unidades Enzimáticas/g. Las Unidades Enzimáticas (UE) se refieren a la cantidad de enzima que se requiere para poder hidrolizar 1 μ mol de *o*-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) en *o*-nitrofenol (ONP) y D-galactosa por minuto. Siendo el tiempo de reacción el parámetro que más influyo, seguido por la temperatura.

Con los estudios anteriores se corrobora que existen condiciones óptimas para la síntesis de GOS, aunque éstas dependerán mayormente de la fuente y tipo de enzima, pues cada una tendrá parámetros donde su actividad sea óptima. Adicionalmente, otra de las alternativas ha sido la inmovilización de enzimas, lo cual resulta indispensable para su potencial uso a escala industrial.

Sass y Jördening (2020), desarrollaron dos métodos sencillos y fácilmente reproducibles para la inmovilización de β -GAL de *A. oryzae* en esteras de nanofibras de gelatina electrohiladas: 1) inmovilizada covalentemente en esteras de nanofibras de gelatina activadas con hexametildiamina como enlazador bifuncional y, 2) atrapamiento en las nanofibras de gelatina durante el proceso de electrohilado (electrohilado en suspensión). Los valores óptimos de pH y temperatura de β -GAL inmovilizada pasaron de 30 °C y pH 4.5 de la enzima libre a 1) pH 3.5 y 50 °C de la inmovilización covalente y 2) pH 3.5 y 40 °C del electrohilado en suspensión. Obtuvieron diferencias significativas en la K_M de la β -GAL inmovilizada con una reducción de hasta el 50% en comparación con la enzima libre. La velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) de la inmovilización por electrohilado en suspensión fue casi 20 veces superior a la de la enzima inmovilizada covalente. El rendimiento máximo de GOS para β -GAL libre resultó ser del 27.7% y del 31% para la inmovilizada.

Por su parte Alnadari *et al.* (2021) inmovilizaron una β -glucosidasa (BglA) de *Thermotoga maritima* en nanopartículas magnéticas (NMPs) funcionalizadas con quitosano, para mejorar la conversión de lactosa y la producción de GOS, utilizando un método por lotes. La eficiencia y el rendimiento de la inmovilización fueron del 79% y la BglA la reciclaron de manera efectiva a través de un procedimiento de separación magnética sin que la enzima presentara disminución en su actividad. La metodología de inmovilización que propusieron muestra una aplicación potencial. La producción de GOS alcanzó un rendimiento de 28.76% en el sexto lote producido, mientras que el rendimiento de la BglA libre fue sólo del 24% tras 12 h. Finalmente reportan que las BglA inmovilizadas conservaron el 40.44% de su actividad nativa al final de su sexto uso.

Con los trabajos anteriores se demuestra que la utilización de una enzima inmovilizada aumenta los rendimientos de producción en la síntesis de GOS, sin importar el tipo de inmovilización. Y como consecuencia de la recuperación y reutilización de la enzima los costos de producción disminuyen.

2.5. Usos de suero para la producción de GOS en los últimos 5 años

Como se mencionó anteriormente (Tabla 1), el lactosuero contiene una gran cantidad de lactosa (44-52 g/L) y es por esta razón que es el sustrato más utilizado en la producción enzimática de GOS. A continuación, se enumerarán algunos trabajos destacados de los últimos cinco años en la producción enzimática de estos sacáridos.

Con los avances en las técnicas de biología molecular, se han descubierto nuevas β -GAL. Zerva *et al.* (2021), quienes informan de la producción heteróloga en *Pichia*

pastoris de una β -GAL del hongo *Thermothielavioides terrestres* nombrada TrbGall. Esta enzima se purificó y caracterizó teniendo una actividad óptima a 60 °C y pH 4, es termoestable y que conserva el 95% de su actividad a 50 °C durante 24 h. Se utilizó para la producción de GOS a partir de lactosuero ácido proveniente de la industria del yogurt tipo griego, alcanzando un rendimiento de 14.8% (sin reporte alguno del porcentaje de conversión), y la producción de GOS-4 en su mayoría, pero sin reporte del tipo de enlace que obtuvieron.

Además del descubrimiento de nuevas enzimas, también ha aumentado la producción de enzimas recombinantes. Yañez-Ñeco *et al.* (2021) utilizaron una enzima recombinante de *Pantoea anthophila* aislada del tejuino (bebida fermentada de maíz tradicional y típica de México) nombrada B-gal42, la cual es perteneciente a la familia de las glicosil hidrolasas GH42. Tiene una fuerte tendencia por formar GOS con enlaces $\beta(1-6)$ y $\beta(1-3)$. La síntesis de GOS a partir de lactosuero concentrado (hasta 40% de lactosa), dio lugar a un rendimiento del 38% (60% de conversión de lactosa), mostrando una elevada transgalactosilación comparable a la de algunas enzimas industriales, como la β -GAL de *Bacillus circulans*.

Bolognesi *et al.* (2022) utilizaron lactosuero de queso porungo (un queso típico de Sao Paulo, Brasil) concentrado en un rango de 20 a 40% de lactosa para la síntesis de GOS utilizando una β -GAL de *Kluyveromyces lactis* inmovilizada, en un sistema por lotes. Para la inmovilización utilizaron dos estrategias: 1) soporte de alginato de calcio y 2) soporte de calcio-Concanavalina. Seleccionaron el soporte de alginato de calcio porque dio mejor producción de GOS a 40% de lactosa inicial, pH y temperatura óptima, teniendo un rendimiento del 63.2% y una conversión de lactosa de 61.4%.

Además de que las condiciones de reacción son importantes, con los estudios anteriores podemos observar que un aspecto importante a considerar es la utilización de nuevas enzimas, ya que últimamente ha ido en auge el descubrimiento de nuevas enzimas y la producción de enzimas recombinantes, para seguir aprovechando el lactosuero y que estas alternativas sean económicamente factibles, pues las micro y pequeñas empresas no tienen el presupuesto para la biotransformación del lactosuero en GOS.

2.6. β -Galactosidasas

La β -GAL (β -D-galactósido galactohidrolasas, EC 3.2.1.23) es mayormente conocida como lactasa y se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza y son producidas en: a) algunos órganos de animales: como en la piel, intestino y tejidos cerebrales, b) plantas: como alfalfa, almendra, té, granos de café, entre otros

y c) microorganismos: hongos, levaduras y bacterias. De acuerdo con su fuente las propiedades varían enormemente (Gekas y Lopez-Leyva, 1985 y Cavaille y Combes, 1995). Además, ha sido ampliamente estudiada esta glicosidasa (Chen *et al.*, 1992 y Whitaker, 1994).

Esta enzima cataliza la hidrólisis de β -D-galactósidos, siendo altamente específica por el enlace β en β -galactósidos (Tanaka y Suzuki, 1975 y Castillo, 1990). En general muestran una alta especificidad (pero no absoluta) tanto por el resto glucósido como por la naturaleza del enlace glucosídico, pero poca o ninguna especificidad por el componente aglicona que actúa como grupo saliente (Faber, 2018).

De entre los sustratos naturales existentes la más estudiada ha sido la lactosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa). Al hidrolizar este disacárido, mediante el rompimiento del enlace glicosídico $\beta(1-4)$ que une a los monosacáridos D-glucosa y D-galactosa y por medio de la inclusión de una molécula de agua, la reacción resulta en los respectivos monosacáridos antes mencionados (Whitaker, 1994 y García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996).

Es necesario conocer las principales características del mecanismo catalítico de las β -GAL, para entender cómo una misma enzima es capaz de catalizar reacciones degradativas (hidrólisis) y la síntesis de moléculas valiosas. Siguen un mecanismo de doble desplazamiento, que comprende un paso inicial de galactosilación de la enzima (complejo enzima-sustrato) y un paso posterior de desgalactosilación que regenera el sitio activo (Figura 6). Todas las β -GAL incorporadas en la base de datos CAZy tienen un sitio activo formado por un plegamiento estructural en barril (β/α)₈, formada por ocho hojas β paralelas, que forman la cara interna del barril y se alternan con ocho α -hélices que cubren la cara externa del barril. Las β -GAL se clasifican en el clan GH-A. En estas enzimas, los residuos catalíticos corresponden a dos ácidos glutámicos, donde uno actúa como ácido/base y el otro como nucleófilo.

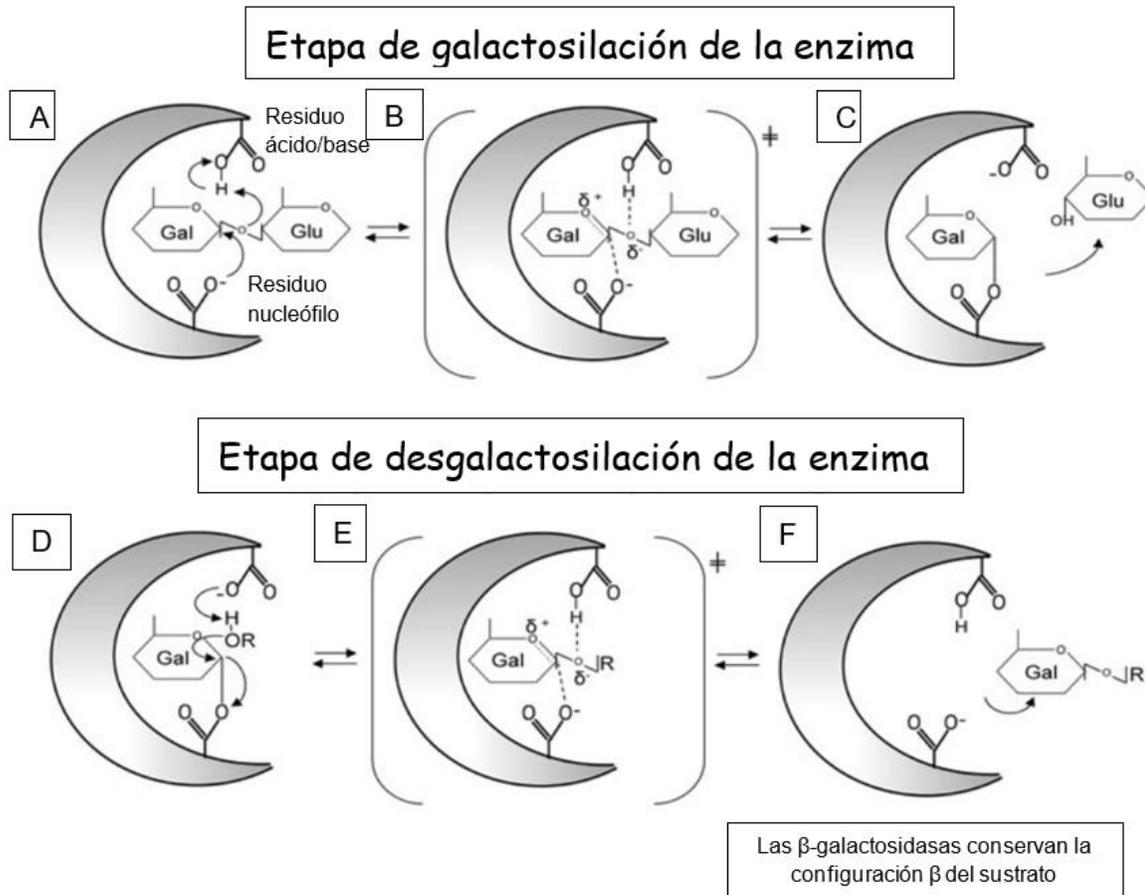


Figura 6. Mecanismo de acción de las β -GAL (modificado de Vera *et al.*, 2022).

Durante la etapa de galactosilación, el grupo carboxilato del nucleófilo ataca el centro anomérico de la fracción de galactosa, produciendo el complejo galactosil-enzima (Figura 6A). Este intermedio se rompe cuando el residuo ácido/base protona el átomo de oxígeno en el enlace glucosídico para activar la aglicona como grupo saliente (Figura 6B). Liberando así una molécula de glucosa (Figura 6C). En la etapa de desgactosilación, el nucleófilo (que puede ser una molécula de agua u otro compuesto hidroxilado) sirve como aceptor de la fracción de galactosa. El residuo ácido/base, ahora desprotonado, recupera el protón tomándolo del grupo hidroxilo del aceptor. A continuación, el nucleófilo activado ataca el centro anomérico de la fracción de galactosa por el mismo lado por el que se liberó la glucosa, lo que da lugar a la retención de la configuración anomérica (Figuras 6D y 6E). Finalmente, con el nuevo enlace glicosídico formado entre la fracción de galactosa y el aceptor, es liberando del sitio activo de la enzima (Figura 6F) (The CAZypedia Consortium 2018 y Kötzler *et al.*, 2014). Cuando el aceptor del grupo glúcido es agua, se forma la galactosa, llevándose a cabo la hidrólisis; sin embargo, como otras glicosidasas la transferencia de este glúcido puede llevarse a cabo con otros aceptores, como

los azúcares (transgalactosilación), dando lugar a la síntesis de oligosacáridos (Cruz-Guerrero, 2005).

Durante la hidrólisis de la lactosa se han identificado más de 10 oligosacáridos diferentes formados por transgalactosilación, siendo los principales: alolactosa, constituida por β -D-galactosa (1-6) D-glucosa (β -D-Gal (1-6) D-Glc), galactobiosa constituida por 2 β -D-Gal unidas por el enlace 1-6, β -D-Gal (1-6) lactosa, β -D-Gal (1-6) galactobiosa y β -D-Gal (1-6) alolactosa, sintetizándose en mayor proporción la alolactosa. La formación de GOS se ve ampliamente influenciada por la concentración inicial de lactosa. Debido a que la concentración de agua va aumentando a medida que la concentración de lactosa va disminuyendo, prevaleciendo así la reacción de hidrólisis (Cruz-Guerrero, 2005). Por otro lado, la concentración y naturaleza de los GOS sintetizados se ven afectados por factores tales como: a) el origen de la enzima (enzimas provenientes de bacterias, levaduras y hongos en la bibliografía se han reportado reacciones de hidrólisis y transgalactosilación), b) algunas condiciones de reacción tales como: temperatura, pH, tiempo de reacción e iones (Zheng *et al.*, 2006; Martínez-Villaluenga *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2010 y Huerta *et al.*, 2011).

Otro factor para tomar en cuenta es la fuente de la enzima, aunque mayormente se utilizan fuentes fúngicas y bacterianas pues en comparación con las fuentes animales y vegetales, las enzimas sintetizadas por microbios proporcionan mayores rendimientos, lo que puede disminuir su coste de producción.

Aunque las β -GAL de fuentes bacterianas poseen mayor actividad y estabilidad las especies fúngicas se prefieren a otras fuentes microbianas debido a su alta productividad y resistencia a altas temperaturas y pH. Las fuentes fúngicas de β -galactosidasa incluyen hongos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* y *Neurospora crassa*. Sin embargo, se conoce un gran número de fuentes bacterianas potenciales como los cultivos de *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Escherichia coli*, *Thermus aquaticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus thermophilus* (Kaur *et al.*, 2023).

Sin embargo, las β -GAL más empleadas en la industria láctea debido a su alta actividad de transgalactosilación y tipo de GOS sintetizado, son *B. circulans* (bacteriana), *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus* (levadura) y *A. oryzae* (fúngica) (Yin *et al.*, 2017). Siendo una de la más reportadas en la literatura la enzima proveniente de *K. lactis* (De Albuquerque *et al.*, 2021).

El tipo de GOS producido depende en su mayoría de la elección de la enzima. Hay informes que reportan que dependiendo del tipo de enzima usada hay variaciones entre las unidades monoméricas. Por ejemplo, la enzima procedente de *Kluyveromyces spp.* generó GOS-2 y en menor medida GOS-3, *B. circulans* produjo GOS- 2 y GOS-3 y en menor cantidad GOS-4, alcanzando una síntesis de GOS con un GP máximo de 5, mientras que la β -GAL de *A. oryzae* produjo una pequeña cantidad de GOS-4 y principalmente GOS-3 y (Cheng *et al.*, 2006 y Bianco, 2016). La β -GAL más estudiada ha sido la de *Escherichia coli* por lo que existe una gran cantidad de información científica acumulada, aunque, por los posibles factores tóxicos asociados a los coliformes se hace improbable el uso de aislados crudos de la enzima directamente en los procesos alimentarios. (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996 y Kaur *et al.*, 2023).

Debido a lo anterior se ha tenido un gran interés por las enzimas de extremófilos ya que resisten condiciones extremas (principalmente de temperatura), como su nombre lo dice. Las enzimas termófilas pueden ser utilizadas a altas temperaturas, provocando en este caso que la lactosa sea más soluble y así aumentar el rendimiento, un ejemplo de ello es la enzima recombinante CloneZyme GLY 001-02, creada por la empresa Diversa.

2.6.1. β -Galactosidasa de *Escherichia coli*

Para poder hidrolizar 1 μ mol ONPG en ONP y D-Gal por minuto se requiere de una unidad de β -GAL llevando la reacción a las siguientes condiciones: pH 7.3 a 37 °C (Sigma-aldrich.com). Esta enzima se ha utilizado para la transgalactosilación en donde se sintetizan GOS a partir de lactosa generando enlaces $\beta(1-6)$ en los productos obtenidos (Rabiu *et al.*, 2001). En la base de datos para enzimas BRENDA, por sus siglas en inglés: BRaunschweig ENzyme DAtabase se reportan algunas características de esta enzima, las cuales se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Características de la β -galactosidasa de *E. coli* (BRENDA, 2024).

Parámetro	Valor
K_M	0.122 mM para ONPG
pH óptimo	7.2
Rango de pH	5-11
Temperatura óptima (°C)	35
Rango de temperatura (°C)	20-65
Inhibidores	Ag ⁺ , Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺ , Ca ²⁺
Activadores	Na ⁺ y Mg ²⁺

2.6.2. β -Galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*

En las condiciones experimentales es de 2600 UE/g (Sigma-Aldrich.com). Esta enzima es capaz de producir 6 estructuras de GOS, dentro de ellas: 6'-galactobiosa (D-Gal-(1-6)- β -D-Gal), alolactosa (D-Gal-(1-6)- β -D-Glc) y el trisacárido 6'-galactosilactosa (D-Gal-(1-6)- β -D-Gal-(1-4)-D-Glc) en grandes cantidades, con preferencia por los enlaces β -(1-6) (De Albuquerque *et al.*, 2021 y Rodríguez-Colinas *et al.*, 2011). Según Yin *et al.* (2017) su rendimiento en la producción de GOS es de 34.9%.

En la base de datos para enzimas BRENDA se reportan algunas características de esta enzima, las cuales se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Características de la β -galactosidasa de *K. lactis* (BRENDA, 2024).

Parámetro	Valor
K_M	1.5 mM para ONPG
pH óptimo	6.5
Rango de pH	5.5 – 8.5
Temperatura óptima (°C)	37
Rango de temperatura (°C)	22 - 50
Inhibidores	Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺

2.6.3. β -Galactosidasa de *Aspergillus oryzae*

Para poder hidrolizar 1 μ mol de lactosa en D-Gal y D-Glc por minuto se requiere de una unidad de β -GAL llevando la reacción a las siguientes condiciones: pH 4.5 y temperatura de 30 °C (Sigma-Aldrich, 2024).

Se ha empleado esta enzima ampliamente para la síntesis de GOS teniendo como sustrato donador y aceptor la lactosa, donde el rendimiento máximo fue de 26%, de los cuales el 81% fueron trisacáridos (Neri *et al.*, 2009). Aunque se tienen reportes de hasta 20 tipos diferentes de GOS sintetizados entre hexa-, penta-, tetra- y tri-GOS (Toba *et al.*, 1985), Deya (1990) identificó estructuras como la 6'-galactosilactosa (β -D-Gal-(1-6)- β -D-Gal-(1-4)-Glc) la cual constituye aproximadamente 70% de los GOS obtenidos. Esto es respaldado por Vera *et al.* (2011) y Urrutia *et al.* (2013), los cuales reportan que el 66% de los GOS obtenidos eran GOS-3, el 24% eran GOS-4 y el 10% de GOS-5 y otros GOS con diferente grado de polimerización.

En la base de datos para enzimas BRENDA se reportan algunas características de esta enzima, las cuales se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Características de la β -galactosidasa de *A. oryzae* (BRENDA, 2024).

Parámetro	Valor
K_M	0.72 mM para ONPG
pH óptimo	4.5
Rango de pH	2.5-8
Temperatura óptima (°C)	50
Rango de temperatura (°C)	20-60
Inhibidores	Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+}

Debido a su pH y temperatura óptima, están prácticamente limitadas a utilizarse en lactosuero ácido o en lactosuero dulce previamente acidificado (Chang y Mahoney, 1989 y Jakcson y Jellen, 1989).

2.6.4. β -Galactosidasa hipertermófila

Las enzimas hipertermófilas podrían ser definidas como aquellas que son capaces de tener actividad a altas temperaturas (90 °C o más) (Cruz-Hernández, 1999). La β -GAL hipertermófila empleada es la CloneZyme GLY 001-02 (GLY 001-02). Es una enzima recombinante producida por la compañía Recombinant Biocatalysis Inc., que actualmente opera bajo el nombre BASF que actualmente sigue en funcionamiento. Para lograrlo llevaron a cabo directamente de las muestras ambientales de hábitat extremos el aislamiento de ácidos nucleicos, de cultivos primarios enriquecidos, y de microorganismos purificados a través del amplio espectro de diversidad microbiana. Una vez que purificaron los ácidos nucleicos, se seleccionan los genes con las actividades enzimáticas requeridas para finalmente crear una nueva enzima (Robertson *et al.*, 1996).

En la librería de GLY 001 de glicosidasas se encuentran reportadas 10 enzimas termoestables, las cuales tienen la disposición para realizar actividades de galactosidasas, glucosidasas y fucosidasas (Escamilla-Lozano, 2011).

La compañía ofrecía algunos parámetros para esta enzima como: el uso de 19 sustratos, difiriendo en su estructura y configuración anomérica para la determinación de la actividad enzimática, un rango de pH de 3-10, en el que la enzima tiene actividad hidrolítica, un rango de temperatura en que la enzima esta activa de 50-90 °C y la estabilidad de la enzima reportada a 90 °C es de 145 horas.

Cruz-Hernández (1999) caracterizó la enzima GLY 001-02. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Características de la β -galactosidasa hipertermófila (Cruz-Hernández, 1999).

Parámetro	Valor
K_M	234.41 mM para lactosa
$V_{m\acute{a}x}$	5138.5 μ mol/min mg de proteína
pH óptimo	6
Inhibidores	Ca^{2+} y Na^+ a 5 mM
Activadores	Mn^{2+} a 5 mM

Además, determinó el peso molecular de las tres subunidades que mostraron actividad de β -GAL mediante un zimograma, los cuales fueron 212.7, 175.7 y 102 kDa.

García-Garibay *et al.* (2000) llevaron a cabo las reacciones de hidrólisis inversa y alcoholólisis en un medio monofásico de 1-heptanol saturado de agua con glucosa o lactosa como sustrato, para obtener heptil- β -glucósido y/o heptil- β -galactósido respectivamente. Cuando el sustrato fue lactosa el heptil- β -glucósido se obtuvo a través de la glucosa liberada que se utilizó en una reacción secundaria de hidrólisis inversa, mientras que el heptil- β -galactósido se obtuvo a través de alcoholólisis.

Posteriormente, Cruz-Guerrero *et al.* (2005) observaron que la enzima GLY 001-02 puede sintetizar GOS con una a_w mínima de 0.27, donde se obtuvo GOS-3 y que, mientras aumentaba la a_w a 0.38 y 0.49 aumentaba el grado de polimerización a GOS-4, GOS-5 respectivamente. También observaron que es capaz de producir GOS-6 a una a_w de 0.57, siendo que las β -GAL más comerciales solo son capaces de producir GOS con GP 3 y 4. Incluso las β -GAL hipertermófilas de *Pyrococcus furiosus* y *Bacillus circulans* solo son capaces de producir GOS-4 y GOS-5, respectivamente. Por otro lado, Alatorre-Santamaría *et al.* (2019), lograron sintetizar β -D-galactosil-L-fucósido, usando D-lactosa como sustrato donador.

3. Justificación

Alrededor de la cuarta parte de los productos lácteos producidos en México son queso, del cual se obtiene como subproducto el lactosuero. El lactosuero representa un problema serio de contaminación si no es tratado correctamente antes de ser desechado, debido a su alta carga orgánica, altos niveles de DBO (30-50 g/L) y alta DQO (60-80 g/L).

Entre las alternativas para su aprovechamiento y una de las más comunes en México es la producción de requesón. Sin embargo, en este proceso se obtiene como subproducto otro suero, y aunque su composición no es igual a la del lactosuero, la carga orgánica sigue siendo alta. De esta forma, se mantiene la problemática de la obtención de un subproducto altamente contaminante si no es tratado correctamente antes de ser desechado.

Debido a que para este suero de requesón no hay muchos estudios sobre su aprovechamiento, se propone su uso para la obtención de galactooligosacáridos por vía enzimática. Debido a que estos oligosacáridos son considerados prebióticos mostrando efectos benéficos a la salud al ser consumidos.

4. Hipótesis

El suero del requesón será una buena fuente de lactosa para la obtención de galactooligosacáridos al emplear β -galactosidasas, que catalizan las reacciones de transgalactosilación.

5. Objetivo general

Estudiar el suero de requesón como una fuente de sustrato para la síntesis de galactooligosacáridos empleando cuatro diferentes β -galactosidasas.

6. Objetivos particulares

1. Analizar fisicoquímicamente el suero de requesón determinando azúcares totales, proteínas y cenizas.
2. Utilizar el suero de requesón para la síntesis de GOS, a través del uso de la lactosa como sustrato para la transgalactosilación.
3. Comparar la síntesis de galactooligosacáridos obtenidos utilizando β -galactosidasas de cuatro fuentes diferentes (*Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae* y CloneZyme GLY 001-02 hipertermófila).
4. Optimizar las condiciones de temperatura y concentración inicial de lactosa para la síntesis de GOS mediante un diseño central compuesto.

7. Plan de trabajo

Para cumplir los objetivos planteados en esta tesis se realizó el siguiente plan de trabajo: (Figura 7).

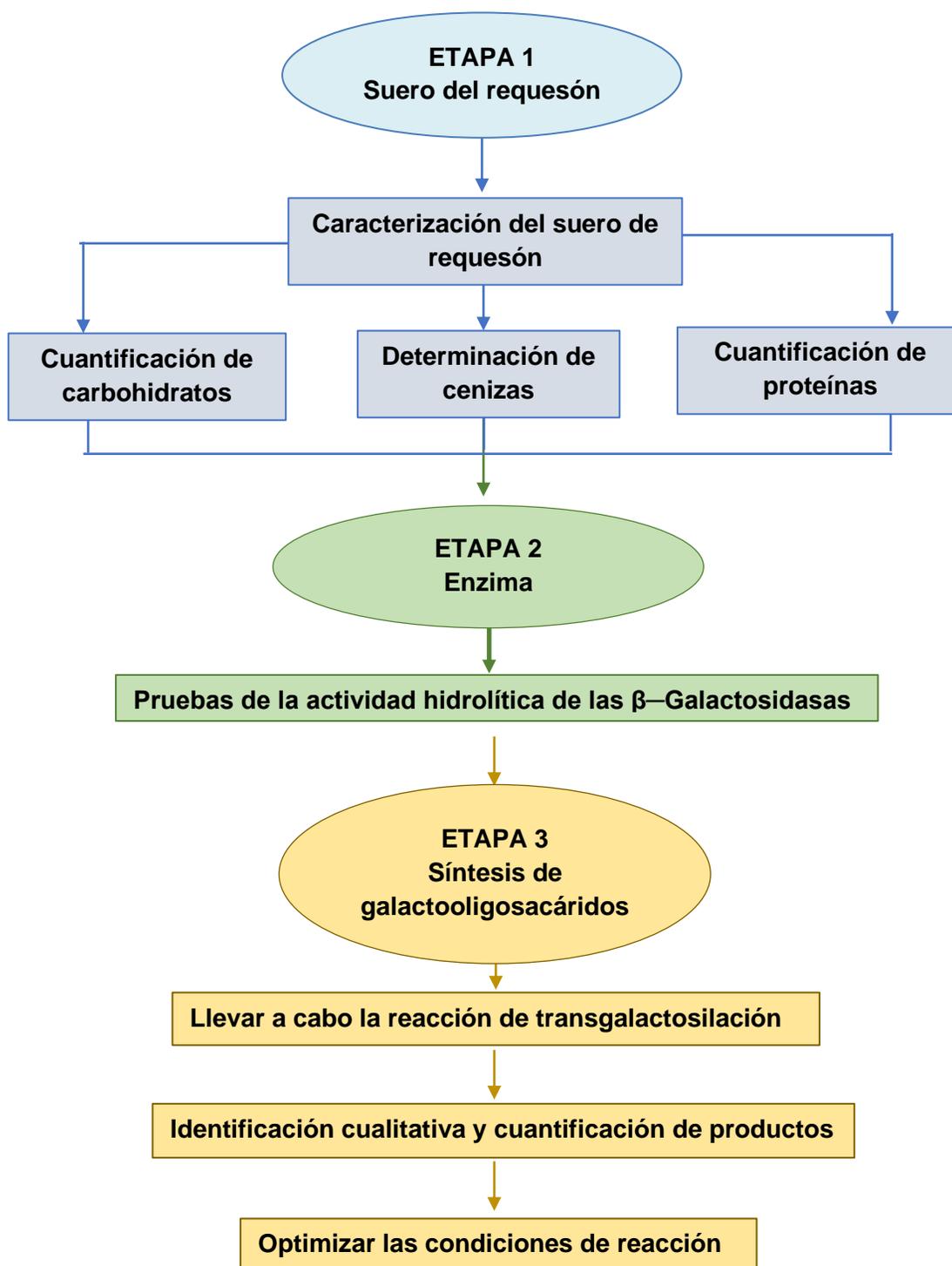


Figura 7. Plan de trabajo.

7.1. Caracterización del suero de requesón

Se analizaron los parámetros fisicoquímicos del suero de requesón el cual fue obtenido en el laboratorio como subproducto de la elaboración de requesón a partir de suero dulce. Para lograr la precipitación de las proteínas se le agregó ácido cítrico al 50% hasta llegar a un pH de entre 4.5-4.7 una vez acidificado, se calentó a 85-90 °C durante 30 min, pasado este tiempo la temperatura se disminuyó con un baño de hielo hasta llegar a temperatura ambiente, aproximadamente 22-25 °C. Posteriormente, la separación de sólidos se realizó con una manta de cielo estéril con un tamaño de poro de 0.5 mm. Finalmente, el suero de requesón se almacenó a 4 °C hasta que se realizaron los análisis correspondientes.

7.1.1. Cuantificación de carbohidratos

Para poder llevar a cabo la cuantificación de azúcares totales en el suero de requesón se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Dubois *et al.* (1956). La muestra se diluyó en agua en una proporción 1/1000. Se tomó una alícuota de 1 mL del suero de requesón diluido y se depositó en un tubo de ensayo, al cual se le agregó 1 mL de solución de fenol (C₆H₆O, SIGMA-ALDRICH®, Alemania) al 5% (p/v). Posteriormente, se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄, SIGMA-ALDRICH®, Alemania), asegurándose la adición de los reactivos por las paredes y no directamente sobre la muestra. La reacción se dejó en reposo durante 10 min y posteriormente se agitó en vórtex durante 30 s. La reacción se llevó a un baño de agua a temperatura ambiente y se dejó reposar durante 20 min. Finalmente, la medición se realizó en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1600, Kioto, Japón) utilizando una longitud de onda de 490 nm. La cuantificación se llevó a cabo por triplicado contra una curva tipo de lactosa (ANEXOS Figura 1a).

7.1.2. Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas en el suero de requesón se realizó siguiendo la metodología reportada por Bradford (1976). El reactivo de Bradford se preparó mezclando 10 mg de Azul de Comassie G-250 (SIGMA-ALDRICH®, Alemania) con 10 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄, SIGMA-ALDRICH®, Alemania) al 88% y 4.7 mL de etanol concentrado y se aforó con agua destilada a 100 mL. Finalmente, se filtró a través de papel filtro y se guardó en un frasco ámbar en oscuridad.

Para determinar la concentración de proteínas en la muestra, a 100 µL de suero de requesón, se le añadió 1 mL del reactivo de Bradford, mezclando con agitador vórtex, e incubando la reacción a temperatura ambiente por 2 min. Posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro (Shimadzu UV-1600, Kioto, Japón), en un plazo no mayor a 60 min (Bradford, 1976;

Fernández y Galván, 2005). El análisis de la muestra se realizó por triplicado empleando una curva patrón de albúmina sérica bovina (ANEXO Figura 2).

7.1.3. Determinación de cenizas

La determinación de cenizas se realizó de acuerdo con la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales, por sus siglas en inglés AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (2005), inicialmente se pesó una cápsula seca y vacía (m_0).

Al tener una muestra de alta humedad, en la cápsula seca se agregaron 5 mL de suero de requesón para secarlo por evaporación, durante 8 h a 80 °C (m_1). Posteriormente la muestra se pre-calcinó directamente en la flama del mechero, evitando que se inflame, bajo campana hasta que cese la emisión de humo, se dejó enfriar unos minutos y se continuó con la calcinación en la mufla a 550-600 °C hasta cenizas blancas o grisáceas. Se dejó en la mufla apagada para su preenfriamiento y luego se traspasó al desecador para su enfriamiento, finalmente, se pesó a temperatura ambiente (m_2).

$$\text{Expresión de resultados: \% Cenizas totales} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Donde

m_0 : masa en gramos de la cápsula vacía.

m_1 : masa en gramos de la cápsula con la muestra.

m_2 : masa en gramos de la cápsula con las cenizas.

7.1.4. Determinación de calcio

La determinación de calcio se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado por Guzmán-Rodríguez (2013) con algunas modificaciones. Se ajustaron las muestras a pH 8 con hidróxido de sodio 2 N (NaOH, J.T. Baker™) Posteriormente, el suero de requesón se diluyó 1:50 con un buffer de fosfatos (20 mM, pH 8.0) del cual se tomó una alícuota de 50 μ L y se le agregó 1 mL de arsenazo III (Genzyme, Co., E.U.A.). La muestra se incubó durante 30 s a una temperatura entre 18 a 26 °C. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 650 nm en el espectrofotómetro (Shimadzu UV-1600, Kioto, Japón). Las muestras fueron analizadas por triplicado empleando una curva patrón de calcio (ANEXOS, Figura 3a).

7.2. Actividad hidrolítica de las β -galactosidasas

La determinación de la actividad hidrolítica se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado por Haider y Husain (2007) con algunas modificaciones. Para el ensayo se utilizó ONPG (1.1 mg/mL) diluido en buffer. Este sustrato es hidrolizado en contacto con la β -GAL produciendo ONP que presenta un color amarillo intenso. En

una celda de 700 μL se agregaron 630 μL de solución de ONPG y 70 μL de enzima suspendida. La reacción se llevó a cabo en un espectrofotómetro con temperatura controlada de 37 °C (Shimadzu UV-1600, Kioto, Japón) bajo las condiciones descritas a continuación para las diferentes β -GAL:

- ***E. coli***: Se suspendió la enzima en un buffer de fosfatos de potasio 0.05 M, pH de 7. La reacción se llevó a cabo durante 30 min.
- ***K. lactis***: Se suspendió la enzima en un buffer de fosfatos de sodio 0.1 M, pH de 6.5. La reacción se llevó a cabo durante 10 min.
- ***A. oryzae***: Se suspendió la enzima en un buffer de acetatos 0.05 M, pH de 4.5. La reacción se llevó a cabo durante 30 min.
- **GLY 001-02**: Se suspendió la enzima en un buffer de fosfatos de potasio 0.1 M, pH de 6. La reacción se llevó a cabo durante 30 min.

Las reacciones se realizaron por triplicado leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm.

Para calcular la concentración de ONP se realizaron cuatro curvas patrón (una por cada pH del buffer empleado para cada enzima). Se prepararon cuatro soluciones de ONP a diferentes concentraciones 0.3125 mg/mL para pH 4.5, 0.3122 mg/mL para pH 6, 0.1533 mg/mL para pH 6.5 y 0.0667 mg/mL para pH 7.3 (ANEXOS, Figuras 4a, 5a, 6a, y 7a, respectivamente). Graficando la absorbancia vs la concentración de ONP, se puede interpolar la concentración de ONP en una muestra al medir su absorbancia a una longitud de onda de 420 nm.

7.3. Síntesis de galactooligosacáridos empleando lactosa

Para determinar si las β -GAL son capaces de sintetizar GOS, se llevó a cabo la reacción en microtubos (1.5 mL) añadiendo 50 μL de la respectiva β -GAL en 450 μL de lactosa (al 18%). La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones óptimas reportadas para cada enzima (Tabla 13) durante 6 h.

Tabla 13. Condiciones de pH y temperatura a las que se llevó a cabo la reacción de transgalactosilación.

Enzima	Buffer	UE/mL de reacción	Temperatura
<i>E. coli</i>	Fosfatos de potasio 0.05 M, pH 7.	1.051	35 °C
<i>K. lactis</i>	Fosfatos de sodio 0.1 M, pH 6.5.	3.5	37 °C
<i>A. oryzae</i>	Acetatos 0.05 M, pH de 4.5.	2.3	50 °C
GLY 001-02	Fosfatos de potasio 0.1 M, pH 6.	2.6	90 °C

La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a) Las reacciones por arriba de 40 °C se llevaron a cabo en baño seco de bloque único D1301 (Labnet, Dinamarca).
- b) Las reacciones por debajo de 40 °C se llevaron a cabo en una incubadora de hibridación Combi-SV12 (FINEPCR, Corea del Sur).

En ambos casos las reacciones se detuvieron mediante el aumento de pH empleando NaOH 1M y fueron almacenadas en congelación a 4°C.

7.3.1 Síntesis de galactooligosacáridos empleando suero de requesón

Para evaluar la síntesis de GOS empleando suero de requesón, este se pasteurizó y se estandarizó a una concentración de lactosa de 18% y se siguió la metodología mencionada en la sección anterior (Sec. 7.3).

7.4. Seguimiento de la reacción

Se realizó un monitoreo de la reacción de transgalactosilación mediante un análisis cromatográfico cualitativo (CCF), tomando una muestra cada 60 min, durante 6 h y otro cuantitativo (cromatografía de líquidos de alta eficiencia, HPLC por sus siglas en inglés) para determinar la concentración de los GOS sintetizados.

7.4.1. Cromatografía en capa fina

Las muestras tomadas se diluyeron en agua en una proporción 1:20 y se aplicaron 2 µL de la muestra diluida a 2 cm de distancia del borde inferior de la placa de 10x10 cm (Silica de gel de Sigma), y a 1 cm de los bordes laterales, teniendo 1 cm de espacio entre las muestras (Figura 8). La placa se secó con aire caliente y se aplicaron 2 µL más de muestra. El proceso se repitió hasta completar un volumen de aplicación final de 6 µL de muestra.

La placa se colocó dentro de una cámara cromatográfica, previamente cerrada de manera hermética con la fase móvil, constituida por n-butanol: acetona: agua en proporciones 40:50:10. La fase móvil tiene aproximadamente 1 cm de altura de ésta, cuidando que las muestras no entren en contacto con la fase móvil. El frente se eluyó hasta que la fase móvil alcanzó aproximadamente 0.5 cm abajo del borde superior de la placa, el procedimiento se repitió cinco veces antes de revelar la placa. La placa se secó con aire caliente entre cada elución y antes de revelarse.

El revelado se llevó a cabo mediante la aspersion de la solución reveladora (ácido sulfúrico al 20% (v/v) en metanol) sobre la placa y, posteriormente la placa se colocó en estufa a 120 °C hasta la aparición de manchas cafés bien definidas.

Las manchas obtenidas tienen un factor de retención característico (R_f , por sus siglas en inglés), el cual se obtiene mediante la relación de la distancia recorrida por el componente de interés y la distancia total recorrida por la fase móvil, ambas tomadas desde el origen.

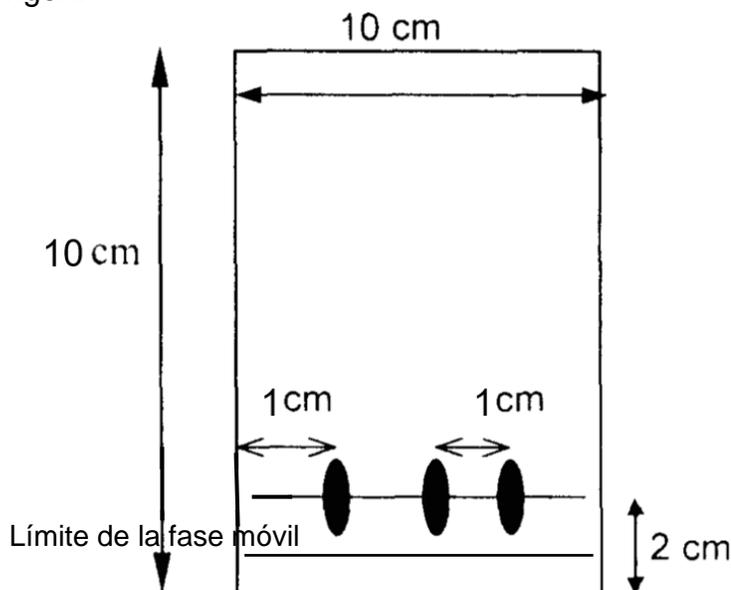


Figura 8. Diagrama de aplicación de muestras en placa de cromatografía en capa fina. (modificado de Cruz-Hernández, 1999).

7.4.2. Cuantificación de productos por HPLC

La concentración de los carbohidratos (lactosa, galactosa, glucosa y GOS) en la mezcla de reacción se determinó mediante HPLC. Para la cuantificación se utilizaron estándares de lactosa, glucosa, galactosa y para los GOS se utilizó el trisacárido rafinosa. En ANEXOS se pueden visualizar cromatogramas tipo de los estándares (Figura 8a y Figura 9a).

Se utilizó una columna HC-75 (H+) de 300 × 7,80 mm (Hamilton, Nevada, EE. UU.) colocada en un horno a 75 °C y un detector de dispersión de luz modelo SofTA 300S (Chrom Tech, Minnesota, EE. UU.), con un flujo de nitrógeno de 62.5 psi, una temperatura en el nebulizador de 10 °C y una temperatura de evaporación de 45 °C. Se utilizó como fase móvil agua destilada y desionizada (Milli-Q®), a un flujo de 0.3 mL/min en una bomba Lab Alliance Serie II (Scientific Systems, Pennsylvania, EE. UU.).

La concentración (p/v) de los carbohidratos es proporcional al área de cada pico la cual se calculó mediante un estándar interno. La figura 9 muestra una representación de un cromatograma típico que se obtiene al analizar las muestras de la reacción enzimática.

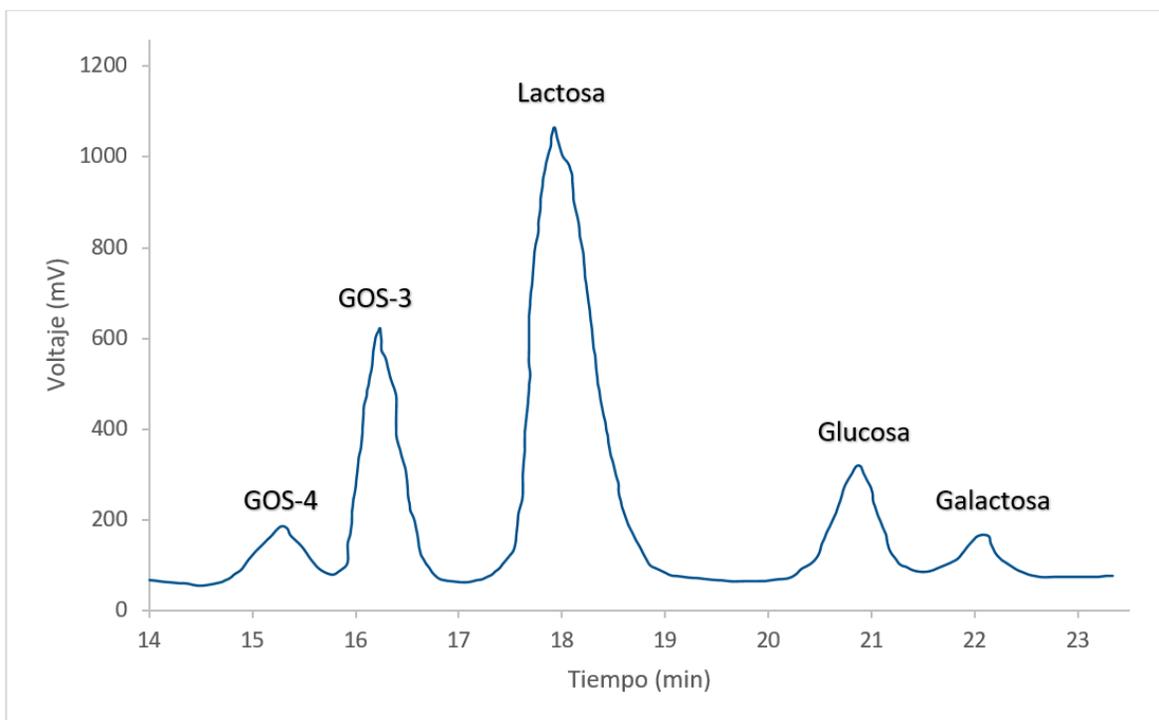


Figura 9. Representación de un cromatograma típico de HPLC.

7.5. Optimización de la reacción de transgalactosilación

La optimización de la reacción de transgalactosilación se realizó con las dos enzimas que mostraron el mayor rendimiento de síntesis de GOS. Los parámetros evaluados fueron concentración de lactosa y temperatura.

Se empleó el programa estadístico NCSS 2020 para realizar el Diseño Central Compuesto (Tabla 14) obteniendo los niveles y la combinación de los factores que optimizan la reacción. Además, se utilizó el programa SigmaPlot 14.0 para graficar la superficie de respuesta a través de los resultados obtenidos al llevar a cabo el diseño central compuesto.

Tabla 14. Diseño central compuesto para la optimización de la reacción de transgalactosilación.

Número experimento	Temperatura (°C)	Lactosa en suero (%)	Temperatura (°C)	Lactosa en suero (%)
	<i>Aspergillus oryzae</i>		GLY 001-02	
1	40	18	70	18
2	40	28	70	28
3	60	18	90	18
4	60	28	90	28
5	35.85	23	65.86	23
6	64.14	23	94.14	23
7	50	30.07	80	30.07
8	50	15.92	80	15.92
9	50	23	80	23
10	50	23	80	23
11	50	23	80	23
12	50	23	80	23
13	50	23	80	23

8. Resultados y discusión

8.1. Caracterización del suero de requesón

La composición del suero de requesón (sustrato propuesto) se determinó mediante la cuantificación de azúcares totales, proteínas, cenizas, humedad, calcio y sólidos totales.

Dado que la reacción de transgalactosilación e hidrólisis están en competencia es importante que en el medio de reacción se encuentren un mayor número de moléculasceptoras diferentes al agua para reducir actividad hidrolítica y con ello aumentar el rendimiento de la síntesis de GOS. Debido a ello, se requiere un mínimo en la concentración de lactosa para que la reacción de síntesis predomine sobre la hidrólisis. Por consiguiente, es de gran interés conocer la concentración de azúcares totales en el suero de requesón, así mismo, la caracterización general de su composición es relevante en virtud de que no existe mucha información sobre este subproducto.

8.1.1. Cuantificación de carbohidratos

La cuantificación de azúcares totales en el suero de requesón se realizó de acuerdo con lo reportado por DuBois *et al.* (1956), obteniéndose una concentración de $5.23 \pm 0.36\%$. Adicionalmente, la muestra se analizó mediante HPLC con lo que se determinó que la lactosa es el único azúcar presente en la muestra (ANEXO Figura 10a).

La concentración de lactosa obtenida es mayor a lo reportado por Guerrero-Rodríguez *et al.* (2010) quienes establecieron un rango de concentración de 3.95-4.7% de lactosa en el suero de requesón. La diferencia entre resultados podría deberse al tipo de análisis realizado, dichos autores emplearon el equipo LactoScan mientras que, en el presente estudio se empleó la técnica reportada por DuBois *et al.* (1956).

Existen diversos factores que pueden modificar la composición del suero secundario, siendo uno de ellos la especie de bovino del que se obtuvo la leche. Sik *et al.* (2023) estudiaron la composición de la leche y diversos productos lácteos, (entre ellos suero secundario que reportan como suero ácido) de 3 distintas especies de bovino. La concentración de lactosa en el suero ácido fue de 5.44% para la especie Simmental, 5.49% para Jersey y 5.73% para Holstein Friesian. El suero ácido estudiado por estos autores fue el subproducto obtenido después de agregar 5 g de ácido cítrico y calentamiento del lactosuero dulce para lograr la precipitación de las proteínas y obtener queso ricotta.

Pires *et al.* (2021) realizaron una revisión bibliográfica sobre la valorización del lactosuero y del suero secundario de queso entre ellos el scotta. Este suero es obtenido de la producción de queso ricotta y presenta una concentración de lactosa de 4.8-5% siendo valores similares en el suero de requesón determinados en este trabajo ($5.23 \pm 0.36\%$)

Las variaciones entre la concentración de lactosa reportada por Pires *et al.* (2021), Sik *et al.* (2023) y los resultados obtenidos en este estudio podrían deberse a la forma de obtención del lactosuero dulce, del queso ricotta y el requesón. Incluso existen otros factores que alteran la composición de la leche y por lo tanto la concentración de lactosa en ella, tales como: raza, edad, alimentación del bovino y/o de dónde se obtuvo la leche.

8.1.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (1976), debido a su sensibilidad, rapidez y que no tiene interferencia con los carbohidratos. La concentración de proteína en el suero de requesón fue de $0.032 \pm 0.00\%$ (p/v). Dicho valor es menor a lo reportado por otros autores. Guerrero-Rodríguez *et al.* (2010) determinaron una concentración en un rango de 0.48-0.69%, mientras que Mazorra-Manzano *et al.* (2019), establecieron una concentración de proteína en un rango de 0.8-1.1%. Sin embargo, las concentraciones reportadas por Guerrero-Rodríguez *et al.* (2010) y Mazorra-Manzano *et al.* (2019) son muy altas ya que se encuentran dentro del rango reportado para el lactosuero, estas diferencias podrían deberse a un proceso inadecuado en la precipitación de proteínas o incluso la adición de leche al lactosuero para un mayor rendimiento.

Pires *et al.* (2021) reportan una concentración menor de proteínas para el scotta (0.15–0.22%), estos valores son 5 veces más altos que los obtenidos en este trabajo. Sin embargo, Monti *et al.* (2018), reportan una concentración de proteína de 0.048-0.06% en el scotta de empresas de Italia, resultados similares a los obtenidos en este trabajo.

Las diferencias en cada resultado presentado pueden deberse a la cantidad de proteína presente en el lactosuero utilizado como sustrato para la obtención del requesón o ricotta, según sea el caso. Mares-Mares *et al.* (2017) caracterizaron tres sueros de requesón obtenidos de tres diferentes tipos de lactosuero provenientes de la elaboración de queso fresco, queso panela y queso Oaxaca. La mayor concentración de proteína en el suero de requesón la reportan al utilizar como materia prima el lactosuero proveniente de la elaboración de queso fresco ($0.77 \pm 0.45\%$), mientras que la menor concentración la obtuvieron al utilizar el lactosuero proveniente de queso Oaxaca ($0.36 \pm 0.02\%$).

Otro factor que influye en la diferencia de resultados es la forma de obtención del queso de suero, pues depende de la eficacia del método para la precipitación de la mayor cantidad de proteínas presentes en el lactosuero y así tener en el suero secundario una menor cantidad de ellas.

8.1.3. Determinación de cenizas

Otro parámetro de interés para la síntesis de GOS es la presencia de minerales en el suero de requesón, especialmente la presencia de calcio, debido a que algunas β -GAL pueden inhibirse con la presencia de dicho mineral a cierta concentración (dependiendo del origen de la enzima) (Majore *et al.*, 2017)

En la sección 7.1.4 se describe la metodología llevada a cabo de acuerdo a lo estipulado por la AOAC (2005), teniendo como resultado $1.28 \pm 0.10\%$ de cenizas presentes en el suero de requesón, lo cual es casi dos veces mayor a lo obtenido por Mazorra-Manzano *et al.* (2019), quienes obtuvieron un rango de concentración de 0.6-0.62%, valor parecido a lo obtenido por Sik *et al.* (2023) en el suero ácido, (suero resultante de la obtención de queso ricotta), reportando un rango de 0.56-0.63% empleando leche proveniente de diferentes especies.

Monti *et al.* (2018) determinaron una concentración de cenizas de 0.6-1.11% en el scotta dependiendo de la región de producción analizada. Como se puede ver, uno de los valores es cercano al obtenido en este trabajo. Del mismo modo, Pires *et al.* (2021) reportan 1.0–1.13% de cenizas, producto de la revisión de los datos para scotta.

Cabe mencionar que el método utilizado para la determinación de cenizas en todos los casos fue el mismo (Sección 7.1.4). Por lo que las diferencias obtenidas entre cada suero secundario pueden deberse a la forma de elaboración del queso de suero. En el trabajo de Monti *et al.* (2018) la diferencia en la cantidad de ceniza es debido a que los scotta son provenientes de dos diferentes empresas, localizadas una al Norte y otra al Sur de Italia, además de haberla recolectado durante 3 años, en diferentes estaciones, por lo que el proceso de elaboración de cada empresa pudo ser diferente y de igual manera la leche recolectada en diferentes estaciones del año pudo presentar diferencias en su composición, repercutiendo en la cantidad de minerales.

En la Tabla 15 se presentan los resultados de la caracterización del suero de requesón, comparada con los parámetros obtenidos para el lactosuero dulce. Los sólidos totales determinados para el suero de requesón están dentro del rango de valores reportados para el lactosuero dulce (Chombo, 2022; Gómez y Sánchez, 2019; Carvalho *et al.*, 2013), sin embargo, Guerrero-Rodríguez *et al.* (2010) reportaron para el suero de requesón 5.36% de sólidos totales, teniendo valores menores a los obtenidos en este trabajo, esto podría deberse a una menor concentración de azúcares y menor presencia de cenizas en la composición del suero de requesón (como se profundizó en las secciones 8.1.2 y 8.1.4, respectivamente).

Tabla 15. Caracterización del suero de requesón comparado con Chombo (2022) para lactosuero dulce.

Parámetro	Suero de requesón (%)	Lactosuero (%)
Sólidos totales	6.79 ± 0.09	6.3-7.0
Azúcares totales	5.23 ± 0.36	4.6-5.2
Proteínas	0.032 ± 0.00	0.6-1.0
Cenizas	1.28 ± 0.10	0.5
Humedad	93.21 ± 0.09	N.R.

NOTA: los valores se presentan como media ± desviación estándar.

N.R.: No reportado.

8.2. Determinación de la actividad hidrolítica de las β-galactosidasas

Se determinó la actividad hidrolítica de las β-galactosidasas, para saber si todas presentaban actividad hidrolítica. Una vez confirmada su actividad se estandarizaron las UE de cada solución enzimática de acuerdo con lo reportado en la Tabla 16.

Tabla 16. Estandarización de las actividades enzimáticas de las β-galactosidasas.

ENZIMA	DILUCIÓN	BUFFER DE DILUCIÓN	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (UE/mL)
GLY 001-02	1/100	Fosfatos de potasio 0.1 M, pH de 6.	2.3
<i>A. oryzae</i>	1 mg/mL, diluida 1/5	Acetatos 0.05 M, pH de 4.5	2.6
<i>E. coli</i>	se tomó directamente del frasco	Sin disolver	1.051
<i>K. lactis</i>	1/1000	Fosfatos de sodio 0.1 M, pH de 6.5.	3.5

La actividad de la β-GAL proveniente *E. coli* sin diluir presenta una actividad de 1.051 UE/mL, debido a ello se tomó como referencia para estandarizar en el mismo orden de magnitud las otras β-GAL. Sin embargo, es una actividad enzimática baja, de acuerdo con González-Delgado *et al.* (2016) 2 UE/mL de β-GAL de *K. lactis* es la concentración óptima para la síntesis de GOS en un tiempo de reacción de 5 h. Debido a ello, las actividades enzimáticas de las demás β-GAL se aumentaron

dentro de un mismo orden de magnitud, para que las horas de reacción no sean mayores a 6 h y se pueda obtener una concentración de GOS adecuada.

8.3. Síntesis de galactooligosacáridos con lactosa

Debido que al inicio de la reacción de transgalactosilación la concentración inicial de lactosa es un factor determinante para que la reacción de hidrólisis no predomine sobre ésta (Vera *et al.*, 2016), las reacciones se llevaron a cabo con una concentración de lactosa de 18%, condición que sigue favoreciendo la reacción de transgalactosilación sobre la de hidrólisis.

8.3.1. Determinación de GOS por cromatografía en capa fina (CCF)

La CCF es una técnica de detección rápida y cualitativa para poder determinar si está ocurriendo algún cambio en el medio de reacción, gracias a esta técnica es posible visualizar los componentes en la muestra analizada a través de la aparición de manchas caracterizadas por un Rf.

Para conocer el componente al que pertenece cada Rf obtenido de los productos de transgalactosilación, es necesaria la comparación con estándares de referencia (Figuras 10 a 13). En las CCF realizadas para la glicosidasa GLY 001-02 y las β -GAL de *A. oryzae*, *E. coli* y *K. lactis* se muestra un carril con la mezcla de galactosa (Gal), glucosa (Glc) y lactosa para ver cómo se comportaban estos compuestos juntos. La lactosa se logra separar muy bien de los monosacáridos, sin embargo, los monosacáridos (Glc y Gal) no logran separarse. En los siguientes carriles se encuentran los estándares individuales para Gal y Glc, los cuales tienen una distancia recorrida muy similar, por lo que, cuando se encuentran juntos no se separan y solo se visualiza una mancha alargada (Figuras 10-13).

El Rf calculado para los monosacáridos (Glc y Gal) juntos fue de 0.8, para la lactosa fue de 0.4 y los GOS están alrededor de 0.2. Estos datos indican que los GOS son más polares debido al número de grupos hidroxilo (OH) en sus estructuras, puesto que los GOS están compuestos por 3 o 4 monosacáridos lo que los hace más polares que el disacárido (lactosa) y los monosacáridos.

Comportamiento similar fue reportado por Cruz-Hernández (1999), quien al emplear la misma fase móvil de n-butanol:acetona:agua en proporciones de 40:50:10 visualizan la aparición de GOS debajo de la lactosa con un Rf de 0.22. Dichos resultados coinciden con Thøgersen *et al.* (2020), los autores reportan la aparición de GOS por debajo de la lactosa, incluso utilizando una fase móvil de acetato de etilo:ácido acético:agua, en una proporción de 6:6:1. Al tener una fase móvil más polar que la utilizada en este proyecto, se visualiza que la distancia recorrida por la lactosa es mayor, llegando casi a ser igual que la galactosa, afectando con un

aumento en su Rf de la lactosa y los GOS. En las Figuras 10 y 11 al observarse solo una mancha pareciera que sólo sintetizaron GOS-3. Sin embargo, al aumentar el tiempo de reacción, esta mancha se alarga como el caso de los monosacáridos que no llegan a separarse estando juntos en el medio por lo que se podría deducir que los GOS sintetizados son de diferente GP.

En la figura 10 se observa la CCF obtenida para la glicosidasa GLY 001-02, mostrando en la Figura 10A un estándar de lactosa en el primer carril, seguido del tiempo cero donde se aprecia la aparición de una sola mancha con Rf de 0.6 correspondiente a la lactosa, en los siguientes carriles se observan las muestras tomadas a la 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 h, mientras que en la Figura 10B se observan en los primeros tres carriles estándares seguido del tiempo cero y en los últimos tres carriles se aprecian las muestras tomadas a las 4, 5 y 6 h.

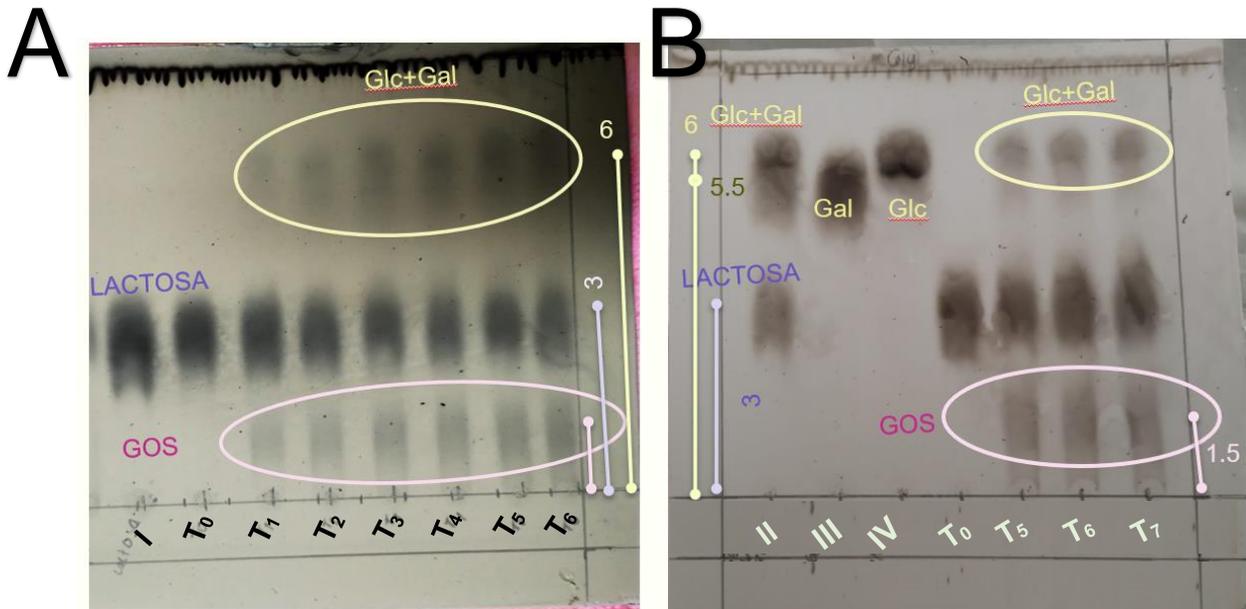


Figura 10. CCF de la reacción de transgalactosilación con A) GLY 001-02 a las primeras 5 h de reacción y B) GLY 001-02 a las 4, 5 y 6 h de reacción. De izquierda a derecha en A) el primer carril (I) contiene estándar de lactosa, en B) los primeros 3 carriles contienen estándares representados como II: lactosa, Gal y Glc juntos; III: Gal y IV: Glc. A) y B) contienen en el cuarto carril el tiempo cero representado como T0 y los siguientes carriles son los tiempos de reacción: T1: 30 min; T2: 1 h; T3: 2 h; T4: 3 h... T7: 6 h. Refiriéndose con Glc: glucosa; Gal: galactosa y GOS: galactooligosacáridos.

En la figura 11 se muestra la CCF obtenida para la β -GAL de *A. oryzae*, mostrando en los primeros tres carriles de las Figuras 11A y 11B estándares, seguido del tiempo cero con una sola mancha perteneciente a lactosa. En la Figura 11A en los últimos tres carriles se aprecian las muestras tomadas a las 0.5, 1, 2 y 3 h mientras que en la Figura 11B en los últimos tres carriles se aprecian las muestras tomadas a las 4, 5 y 6 h. En estas últimas 3 h de reacción (Figura 11B) se logra apreciar un aumento en la intensidad de las manchas pertenecientes a los GOS y a los monosacáridos, indicando un aumento en la concentración de los productos obtenidos de la reacción de transgalactosilación.

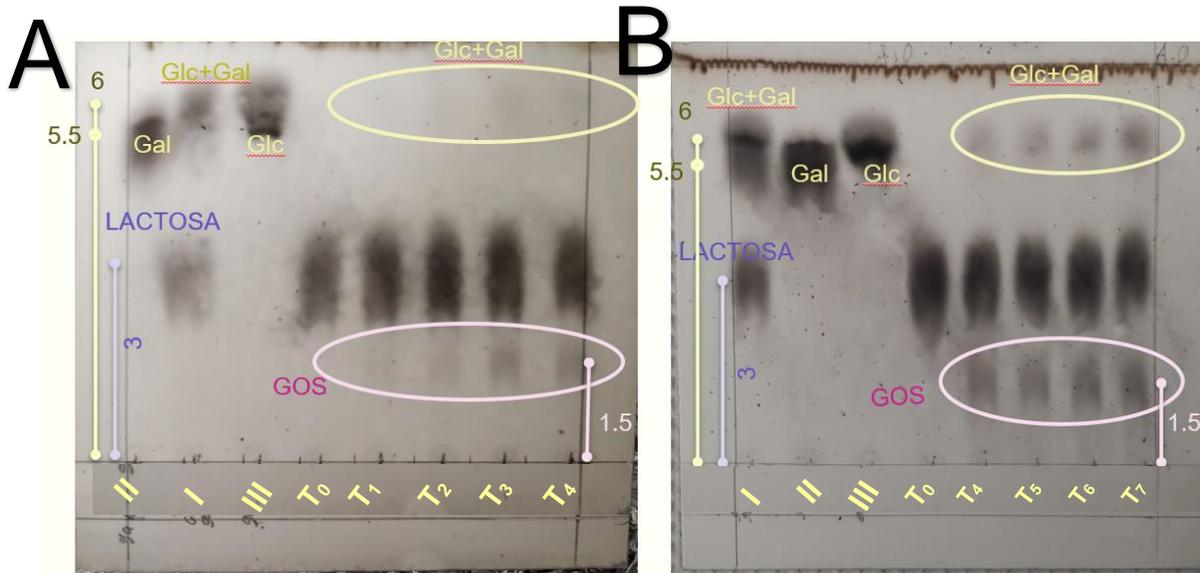


Figura 11. CCF de la reacción de transgalactosilación con *A. oryzae* a 6 h. De izquierda a derecha, los primeros 3 carriles contienen estándares representados como I: lactosa, galactosa y glucosa juntos; II: galactosa y III: glucosa, el 4° carril es el tiempo cero representado como T0 y los siguientes carriles son los tiempos de reacción: T1: 30 min; T2: 1 h; T3: 2 h; T4: 3 h... T7: 6 h. Refiriéndose con Glc: glucosa; Gal: galactosa y GOS: galactooligosacáridos.

Contrario al comportamiento observado en las figuras anteriores, en las Figuras 12 y 13, la única mancha que aparece en los tiempos de reacción 4, 5 y 6 h, corresponde a la lactosa. El análisis con esta técnica indica que tanto la β -GAL de *E. coli* como de *K. lactis* no tuvieron actividad ni de hidrólisis ni de transgalactosilación utilizando 18% de lactosa inicial y con las condiciones descritas en la sección 7.3. Debido a que las muestras se diluyeron 1:20 para su análisis mediante CCF la concentración de los productos obtenidos podría haberse diluido tanto que ya no fue detectable con esta técnica, subestimando la actividad de dichas enzimas. Sin embargo, las muestras sin diluir o con diluciones menores a 1:20 aplicadas en la placa, la lactosa dejaba una mancha alargada desde el origen hasta donde corre su elución, sin oportunidad de visualizar componentes debajo de esta.

Debido a que no fue un resultado preciso, se comprobó por HPLC la concentración y el GP de los GOS sintetizados.

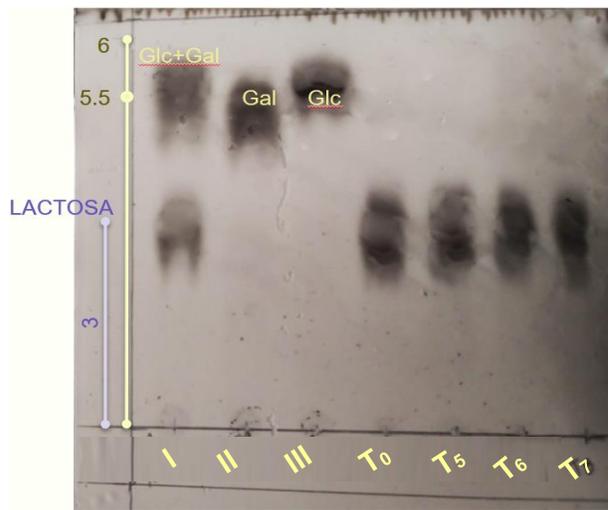


Figura 12. CCF de la reacción de transgalactosilación con *E. coli*. De izquierda a derecha, los primeros 3 carriles contienen estándares representados como I: lactosa, galactosa y glucosa juntos; II: galactosa y III: glucosa, el 4^{to} carril es el tiempo cero representado como T0 y los siguientes carriles son los últimos 3 tiempos de reacción: T5: 4 h; T6:5 h y T7: 6 h. Refiriéndose con Glc:glucosa y Gal:galactosa.

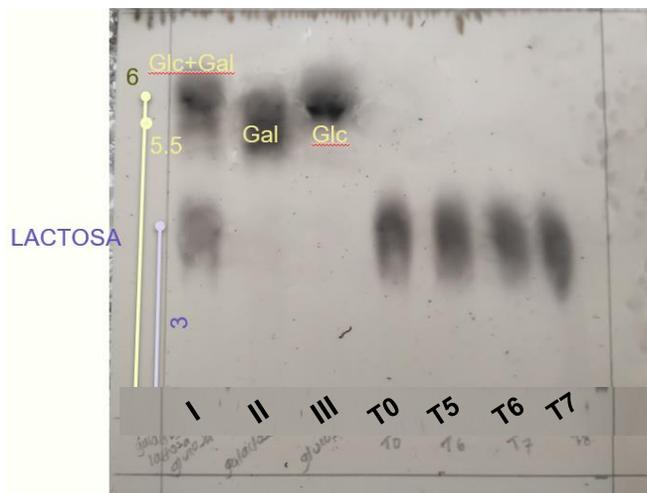


Figura 13. CCF de la reacción de transgalactosilación con *K. lactis*. De izquierda a derecha, los primeros 3 carriles contienen estándares representados como I: lactosa, galactosa y glucosa juntos; II: galactosa y III: glucosa, el 4^{to} carril es el tiempo cero representado como T0 y los siguientes carriles son los últimos 3 tiempos de reacción: T5: 4 h; T6:5 h y T7: 6 h. Refiriéndose con Glc:glucosa y Gal:galactosa.

8.3.2. Cuantificación de GOS a través de HPLC

De acuerdo con las Figuras 14, 15, 16 y 17 la mayoría de las β -GAL fueron capaces de sintetizar GOS-3 y GOS-4, únicamente la β -GAL proveniente de *E. coli* no sintetizó GOS-4 en 6 h de reacción. Esto podría deberse a que los GOS se van formando en cascada. Debe de haber una mínima concentración de GOS-3 para poder formar los GOS-4 a través de la transferencia de la galactosa a este trisacárido y así consecutivamente (Cruz-Guerrero *et al.*, 2005; Neri *et al.*, 2009). Así mismo, dicho comportamiento podría haberse debido a que se requieren tiempos más largos de reacción para la síntesis de GOS-4, o que la concentración de estos es demasiado baja que no se alcanza a apreciar en los cromatogramas obtenidos a través de HPLC. En ANEXOS se presenta un cromatograma tipo donde

se observan los productos obtenidos a las 6 h de reacción con la β -GAL proveniente de *K. lactis* y *E. coli* (Figuras 11a y 12a, respectivamente).

En la reacción catalizada por GLY 001-02 en 6 h de reacción aún no se alcanzó la máxima producción de GOS (Figura 14). Al compararla con los resultados obtenidos de Zerva *et al.* (2021) quienes utilizan una β -GAL termófila proveniente de *Thermothielavioides terrestris* con pH y temperatura óptima de 4.5 y 60 °C, respectivamente, utilizando 1 UE/mL de enzima y 10% de lactosa en el medio, tiene un rendimiento máximo de GOS a las 2.5 h. La presencia de una concentración menor de lactosa a la empleada en este trabajo (18%) pudo haber conducido a su máximo de producción en relativamente pocas horas, y posteriormente la hidrólisis de los GOS formados, disminuyendo gradualmente su concentración en el medio.



Figura 14. Productos de transgalactosilación con 18% de lactosa con la glicosidasa GLY 001-02. GOS-3 (●) y GOS-4 (▲).

En la reacción catalizada por la β -GAL de *A. oryzae* (Figura 15) se observa la misma tendencia que para GLY 001-02, en donde no se ha alcanzado la máxima producción de GOS. Mano *et al.* (2019) reportan que la β -GAL de *A. oryzae* a 2 h de reacción produce un máximo de GOS totales de 40 mg/mL con una concentración inicial de lactosa de 30%, siendo así que en este trabajo a las 2 h la producción de *A. oryzae* fue de 31.78 ± 4.69 mg/mL. No obstante, a diferencia de Mano *et al.* (2019) esta no fue la concentración máxima alcanzada de GOS, sino que siguió aumentando aún a las 6 h de reacción, alcanzando una concentración de GOS totales de 78.09 ± 1.44 mg/mL siendo mayor la concentración de GOS sintetizados en casi el doble.

La β -GAL de *A. oryzae* empleada en este trabajo muestra una mayor actividad de síntesis de GOS-3, ya que de los GOS totales sintetizados (GOS-3 y GOS-4) el $98.75 \pm 0.09\%$ pertenece a los GOS con GP 3, un porcentaje alto comparado con lo obtenido por Vera *et al.* (2011) quienes reportan que del total de GOS obtenidos el 66% corresponde a GOS-3 considerando como GOS totales a la mezcla de GOS-2, GOS-3 y GOS-4. Por otro lado, Urrutia *et al.* (2013) reportan que del total de los GOS obtenidos el 95.7% son GOS-3 en función de la mezcla de GOS-3 y GOS-4, datos similares fueron reportados por Yu y O'Sullivan (2014), con un porcentaje de GOS-3 del 94%.

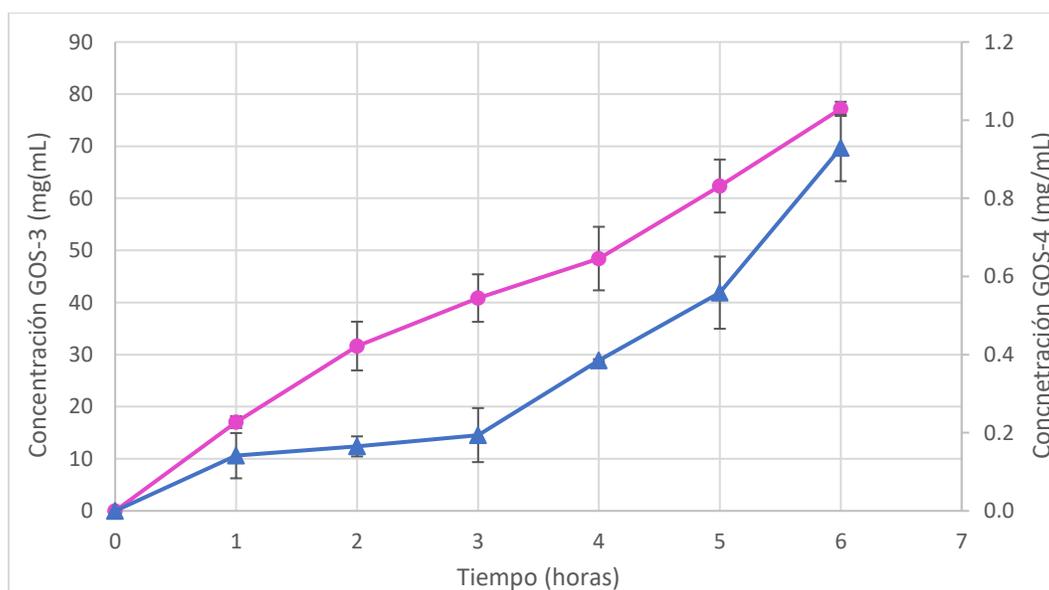


Figura 15. Productos de transgalactosilación con 18% de lactosa con la β -GAL proveniente de *A. oryzae*. GOS-3 (●) y GOS-4 (▲).

Con la β -GAL de *K. lactis* se obtuvo la concentración máxima de GOS de 0.4 ± 0.03 mg/mL a 6 h de reacción (Figura 16), siendo la β -GAL con menor producción de GOS. Fischer y Kleinschmidt (2015) reportan que esta β -GAL tiene una tendencia a preservar los GOS sintetizados debido a que va desnaturalizándose con el paso del tiempo, comportamiento que se logra visualizar desde el primer instante en que se utilizó la enzima, ya que en cuestión de minutos su actividad disminuía en dos órdenes de magnitud. De tal forma, la solución enzimática se preparaba en el instante en el que se iba a utilizar, dando resultados concordantes pues tiene la más baja producción de GOS.

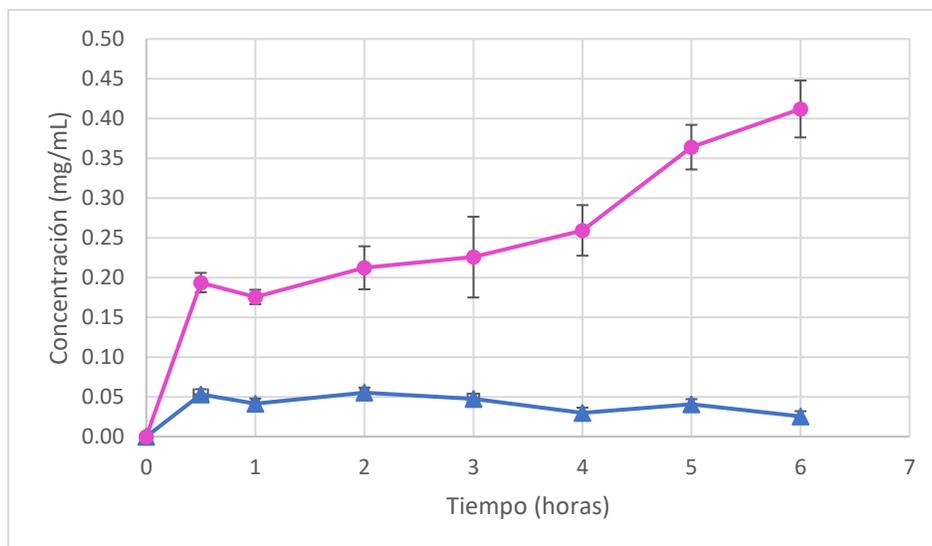


Figura 16. Productos de transgalactosilación con 18% de lactosa con la β -GAL proveniente de *A. oryzae*. GOS-3 (●) y GOS-4 (▲).

En la reacción de síntesis catalizada por la β -GAL de *E. coli* (Figura 17) se aprecia que sólo hay producción de GOS-3, siendo su máximo de producción (1.99 ± 0.15 mg/mL) a las 6 h. El hecho de que en estas 6 h no se presentara la síntesis de GOS-4 podría deberse a que aún no se ha alcanzado la concentración necesaria de GOS-3 para promover la síntesis de GOS-4 (Fig. 17), por lo que es necesario determinar si el aumento en el tiempo de reacción podría favorecer la síntesis de GOS-4. Sin embargo, el aumento del tiempo de reacción se llevó a cabo sólo con las enzimas de mayor producción (GLY 001-02 y la β -GAL de *A. oryzae*).

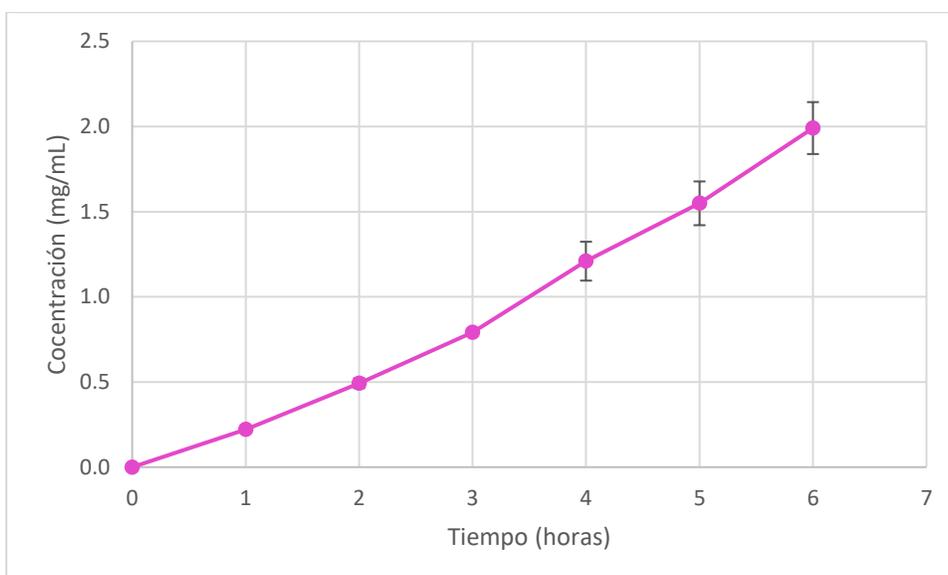


Figura 17. Producto de transgalactosilación, con 18% de lactosa con la β -GAL proveniente de *E. coli*. GOS-3 (●).

Mano *et al.* (2019) trabajaron con permeado de suero a una concentración de lactosa del 30% y una β -GAL proveniente de *E. coli* reportando a las 6 h de reacción una producción de GOS de 10 mg/mL, la cual es 5 veces mayor a la obtenida en este trabajo. Esto pudo deberse principalmente a que la concentración de lactosa inicial utilizada por los autores antes mencionados fue mayor (12%) a la utilizada en este trabajo.

Mediante la técnica de HPLC se comprobó que la β -GAL de *E. coli* y *K. lactis* presentan actividad de transgalactosilación a diferencia del análisis cualitativo de CCF, en el que debido a la dilución de la muestra no fue posible detectar la síntesis de GOS en las reacciones catalizadas por las enzimas antes mencionadas. Además, las reacciones catalizadas por las β -GAL provenientes de *K. lactis* y *E. coli* mostraron los menores rendimientos en las síntesis de GOS.

En la Tabla 17 se exponen los valores de rendimiento obtenidos de acuerdo con la concentración molar de GOS totales respecto a la concentración molar inicial de lactosa. Las enzimas de mayor rendimiento son, la glicosidasa GLY 001-02 y la β -GAL de *A. oryzae*, mostrando rendimientos arriba del 30%. En contraste, la β -GAL con la que se obtuvo menor rendimiento fue la proveniente de *K. lactis* con un rendimiento por debajo de 1%.

Tabla 17. Comparación del rendimiento de GOS totales sintetizados en este trabajo comparado con los rendimientos reportados por otros autores.

Origen de enzima	Rendimiento obtenido (%) *	Rendimiento de referencia (%)	Referencia**
<i>K. lactis</i>	0.23±0.00	11	(Córdova <i>et al.</i> , 2023)
<i>E. coli</i>	1.23±0.00	4	(Mano <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. oryzae</i>	32.49±0.00	27	(Córdova <i>et al.</i> , 2023)
GLY 001-02	52.05±0.00	45	(con base en lactosa consumida, Cruz-Guerrero, 2005)

* Rendimiento calculado en función de la relación de la concentración molar de GOS y la concentración molar de lactosa inicial (18%) en 6 horas de reacción.

** Rendimiento reportado en relación de la masa de GOS totales y la masa de lactosa inicial.

Córdova *et al.* (2023) obtuvieron un rendimiento de 11% para la β -GAL de *K. lactis*, de acuerdo con estos autores, el rendimiento obtenido es muy bajo, razón por la que no siguieron trabajando con esa enzima. Comparado con lo obtenido en este trabajo, los autores antes mencionados reportan un mayor rendimiento de síntesis

de GOS, dicha diferencia podría deberse al uso de ultrasonido para potenciar la actividad de la enzima, además de las diferentes condiciones de reacción.

Es importante destacar que para la síntesis de GOS empleando la β -GAL de *K. lactis*, es necesario preparar la enzima previo a dicha reacción, ya que esta enzima tiende a desnaturalizarse rápidamente una vez que se diluye en buffer.

En la reacción catalizada por la β -GAL proveniente de *E. coli* la diferencia en el rendimiento obtenido en este trabajo y el reportado por Mano *et al.* (2019) es del doble, esto podría deberse a las diferentes condiciones de reacción, entre ellas el tiempo de reacción, que fue el doble que el empleado en este trabajo. Es importante considerar que la solubilidad de la lactosa mejora con el aumento de la temperatura. Fox *et al.* (2015) reportaron que a una temperatura de 30-32 °C la lactosa tiene una solubilidad de aproximadamente 25-27%, mientras que, a 35 °C, es posible aumentar la concentración hasta 30% de lactosa. Debido a que en experimentos posteriores se empleó suero de requesón como medio y fuente de lactosa, estandarizando la concentración de lactosa a 18%, en este trabajo se utilizó una concentración menor a la máxima solubilidad de lactosa reportada para la temperatura de trabajo (35 °C), pues el suero además de lactosa contiene minerales y proteínas lo cual disminuye el agua disponible para solubilizar la lactosa.

Para la β -GAL de *A. oryzae* el rendimiento de GOS es 5% mayor a lo reportado por Córdova *et al.* (2023), mientras que la concentración de GOS sintetizados por GLY 001-02 fue 7% mayor a lo reportado por Cruz-Guerrero *et al.* (2005). Las condiciones para ambas enzimas empleadas en este trabajo fueron distintas a lo reportado por los autores antes mencionados. Cabe destacar que la síntesis de GOS con GLY 001-02 reportada por Cruz-Guerrero *et al.* (2005) se realizó en medio orgánico (acetona).

La mayor producción de GOS-3 fue de 129.53 ± 1.35 mg/mL y se obtuvo con la glicosidasa hipertermófila GLY 001-02 en 6 h de reacción (Figura 18). Al comparar esta concentración con la mayor producción de las demás β -GAL que van de 0.4 ± 0.03 mg/mL, 2.1 ± 0.15 mg/mL y 77.2 ± 1.35 mg/mL, para *K. lactis*, *E. coli* y *A. oryzae* es alrededor de 325, 56 y 1.5 veces mayor, respectivamente.

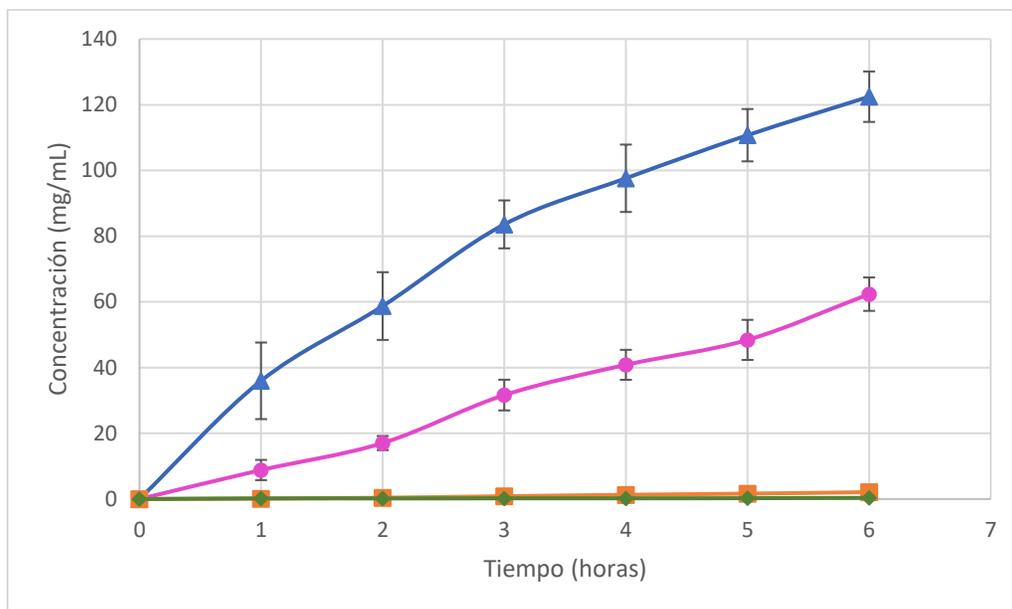


Figura 18. Comparación de los GOS-3 obtenidos con 18% de lactosa con las cuatro β -GAL. Provenientes de *A. oryzae* (●), *E. coli* (■), *K. lactis* (◆) y la glicosidasa GLY 001-02 (▲).

Es importante señalar que, en esta etapa, donde la reacción se llevó a cabo en un medio de lactosa en buffer a una concentración de 18% y un tiempo de reacción de 6 h las dos enzimas con mayor producción de GOS son la glicosidasa recombinante GLY 001-02 y la β -GAL proveniente de *A. oryzae*. Debido a esto, se decidió no continuar las reacciones con las β -GAL de *E. coli* y *K. lactis*.

8.3.3. Optimización de la producción de GOS con lactosa en buffer.

La síntesis de GOS con lactosa se catalizó con la β -GAL proveniente de *A. oryzae* y la glicosidasa recombinante GLY 001-02. Los tiempos de reacción se incrementaron a 12, 18, 24, 30 y 36 h. Los resultados de las reacciones enzimáticas analizados por técnicas cromatográficas se presentan a continuación.

8.3.3.1 Análisis cualitativo de la reacción de transgalactosilación por CCF.

En la Figura 19 se pueden observar las cromatografías obtenidas para la síntesis de GOS por parte de la enzima recombinante GLY 001-02 (Figura 19 A) y de la β -GAL de *A. oryzae* (Figura 19 B).

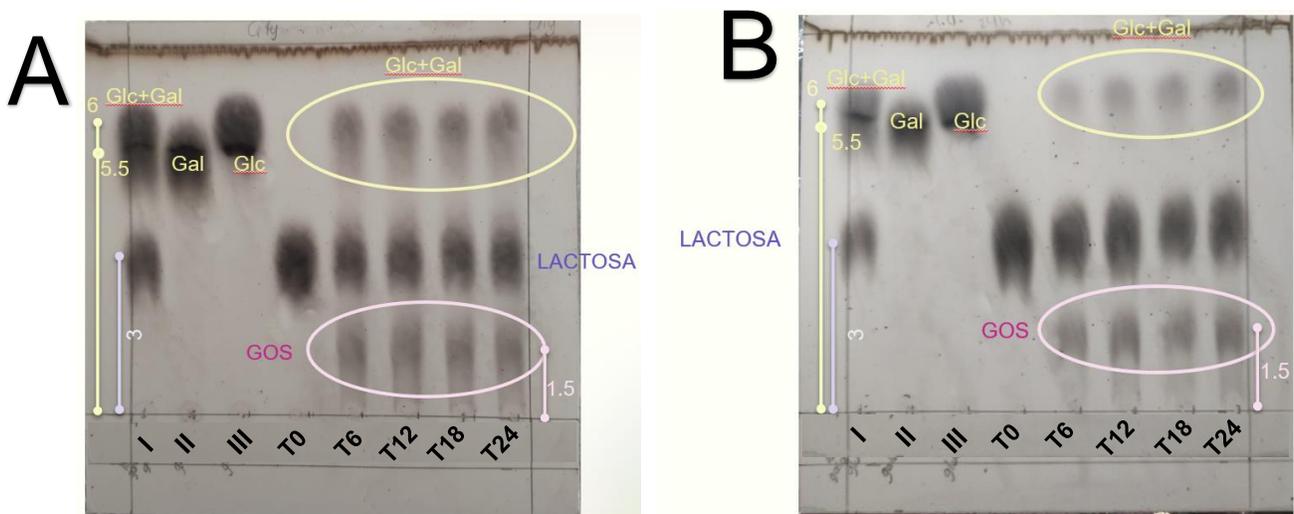


Figura 19. CCF de la reacción extendida (24 h) de transgalactosilación con A) GLY 001-02 y B) *A. oryzae*. Los primeros 3 carriles contienen estándares representados como I: lactosa, galactosa y glucosa juntos; II: galactosa y III: glucosa, el cuarto carril es el tiempo cero representado como T0 y los siguientes carriles son los tiempos de reacción: T6:6 h; T12:12 h; T18:18 h y T24:24 h. Refiriéndose con Glc:glucosa, Gal:galactosa y GOS: galactooligosacáridos.

Contrastando los resultados obtenidos en la reacción de síntesis de GOS a 6 h de reacción, se observa que, al aumentar el tiempo a 24 h, las manchas en el Rf característico para los GOS aumentaron en su intensidad, así como en su definición, lo que indica el aumento en la concentración de GOS conforme el tiempo. En contraste Fischer y Kleinschmidt (2015); Aburto *et al.* (2016); Wang *et al.* (2020) y Córdova *et al.* (2023) reportan que a tiempos prolongados de reacción en las reacciones con la β -GAL proveniente de *A. oryzae* la concentración de GOS disminuye debido a que una vez que el sustrato (lactosa) se agota, la probabilidad de que los GOS previamente sintetizados se hidrolicen aumenta. Por otro lado, para GLY 001-02 este comportamiento no ha sido reportado, ya que este es el primer trabajo donde la reacción involucra tiempos prolongados.

El aumento en la concentración de GOS a los tiempos de reacción trabajados, podría estar relacionado a la concentración de enzima. Wang *et al.* (2020) reportan una relación E/S de 20 UE/g, por otra parte, Fischer y Kleinschmidt (2015) y Aburto *et al.* (2016) trabajaron una relación de 50 UE/g mientras que Córdova *et al.* (2023) trabajaron con 200 UE/g. En este trabajo solo se empleó una relación de 1.31 UE/g, por lo que el tiempo de reacción para llegar a una concentración máxima de GOS es mayor que lo reportado por los autores antes mencionados.

8.3.3.2 Cuantificación de GOS a través de HPLC.

En un principio la reacción catalizada por la β -GAL de *A. oryzae* se llevó a cabo solo hasta las 24 h, debido a que se ha reportado que, a tiempos extensos de reacción, se puede presentar la inhibición por producto o la hidrólisis de los GOS obtenidos (Fischer y Kleinschmidt, 2015; Martínez-Villaluenga, 2008; Wang *et al.*, 2020). Sin embargo, a 24 h de reacción no se tenía la certeza de haber llegado a la concentración máxima de GOS, debido a que la concentración seguía aumentando y no se distinguía un comportamiento asintótico, por lo que el tiempo de reacción se aumentó a 36 h.

Al aumentar el tiempo de reacción la β -GAL proveniente de *A. oryzae* alcanza su máxima producción de GOS totales a las 30 h, después de este tiempo se muestra una disminución en la concentración (Figura 20). Simovic *et al.* (2019) reportaron que en la reacción de transgalactosilación con la β -GAL proveniente de *A. oryzae* y concentración inicial de lactosa de 21%, en 10 h de reacción no logran observar la máxima producción de GOS. Sin embargo, en este tiempo alcanzan una concentración de GOS cercana a los 48 mg/mL. Destacando que en el presente trabajo se obtuvieron concentraciones más altas a un mismo tiempo (92.92 ± 1.36 mg/mL), a pesar de utilizar una menor concentración inicial de lactosa (18%).

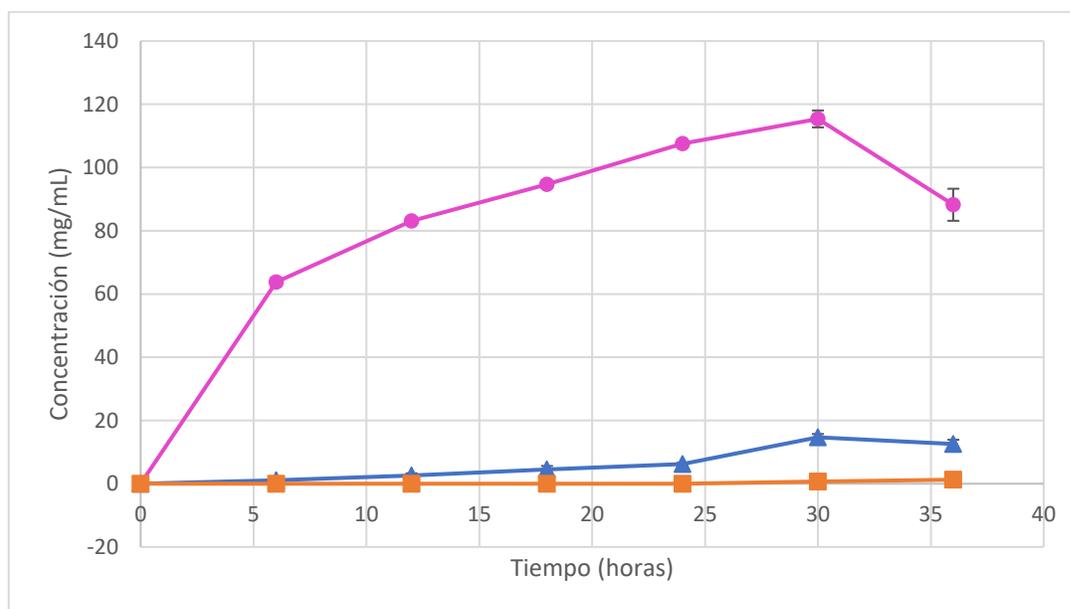


Figura 20. Productos de transgalactosilación a 36 h de reacción, con 18% de lactosa con la β -GAL proveniente de *A. oryzae*. Graficando GOS-3 (●), GOS-4 (▲) y GOS-5 (■)

La concentración máxima de GOS totales se logró a las 30 h de reacción, después de este tiempo, aumenta en la concentración de GOS-5 pero la concentración de GOS totales disminuye, indicando una hidrólisis secundaria. Para poder sintetizar

GOS con alto GP, se requiere de un mayor tiempo de reacción, lo que conlleva a una reducción en el rendimiento debido a la hidrólisis de los GOS ya sintetizados (Gosling *et al.*, 2010).

En la reacción catalizada por la glicosidasa GLY 001-02 a partir de las 18 h se alcanzó la mayor concentración de GOS y al aumentar el tiempo de reacción, se observaba una asíntota en la cinética de reacción. Sin embargo, se decidió extender el tiempo de reacción a 36 h (como se hizo con la β -GAL de *A. oryzae*), observándose que al aumentar el tiempo de reacción a 30 h se alcanzó la mayor concentración de GOS totales (Figura 21). Al incrementar el tiempo de reacción, la concentración de GOS-3 disminuyó mientras que la concentración GOS-4 aumentó significativamente, no obstante, la concentración de GOS totales disminuyó debido a la hidrólisis secundaria.

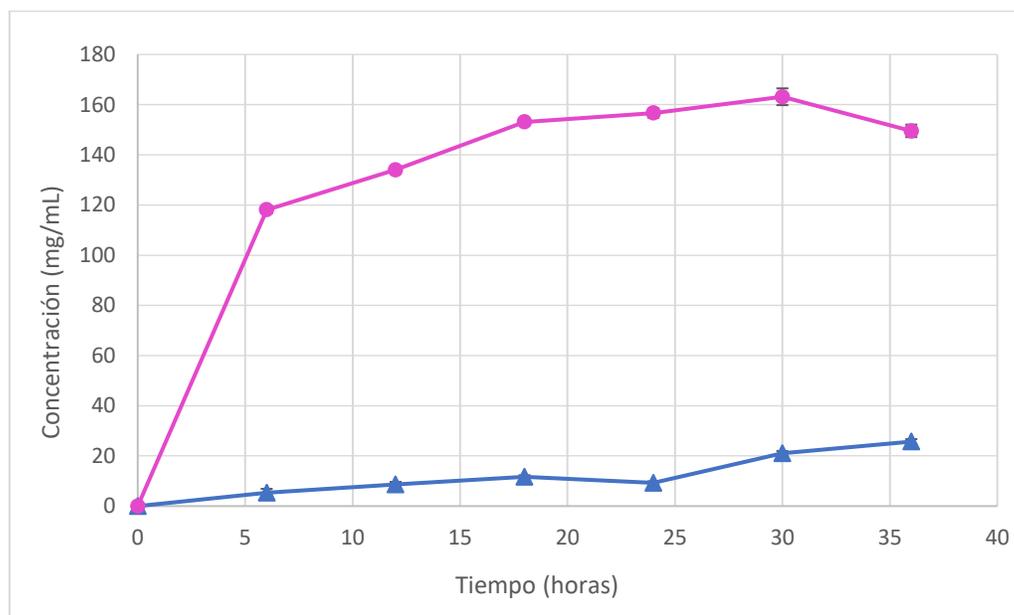


Figura 21. Productos de transgalactosilación a 36 h de reacción, con 18% de lactosa con la glicosidasa GLY 001-02. Graficando GOS-3 (●) y GOS-4 (▲).

La glicosidasa GLY 001-02 utilizada en este trabajo no ha sido estudiada en un medio acuoso, sin embargo, se han trabajado enzimas hipertermófilas para poder obtener una mayor concentración de GOS, toda vez que la solubilidad de la lactosa mejora con el aumento de temperatura (Ji *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2008 y Wu *et al.*, 2013), Yu y O'Sullivan (2014) llevaron a cabo la producción de GOS expresando la β -GAL proveniente de *Sulfolobus solfataricus* en *Lactococcus lactis* obteniendo 197.5 mg/mL de GOS (mezcla de GOS-3 y GOS-4) en 55 h de reacción y una concentración de lactosa inicial del 50%. Resultados similares se reportan en este trabajo, a 30 h y 18% de concentración inicial de lactosa se sintetizaron 184.18 ± 5.85

mg/mL de GOS. De esta manera, bajo las condiciones de reacción establecidas en este trabajo se logra un mejor rendimiento por parte de GLY 001-02 empleando menos concentración de sustrato y menor tiempo de reacción.

Comparando las cinéticas de la β -GAL de *A. oryzae* (Figura 20) y la glicosidasa GLY 001-02 (Figura 21), la reacción catalizada por GLY 001-02 es la de mayor concentración de GOS, además, del mayor rendimiento (Tabla 18). Comparando los rendimientos que se obtuvieron a 6 y 30 h, se tiene un aumento aproximadamente del 16% para ambas enzimas. Esto indica que las enzimas siguen activas después de 30 h, algo esperado para GLY 001-02 ya que como se había mencionado en la sección 2.6.4 las especificaciones técnicas del proveedor de la enzima reportan que esta glicosidasa mantiene el 92% de su actividad después de 145 h a 90 °C. Sin embargo, dicho dato no se había respaldado debido a que en los trabajos previos donde utilizan la enzima el tiempo de reacción no excede las 6 h. Al tener una reacción de 36 h, podemos respaldar que dicha glicosidasa tiene una alta estabilidad. En la sección de ANEXOS (Figuras 13a y 14a) se presentan los cromatogramas tipo obtenidos a las 30 h de reacción para la glicosidasa GLY 001-02 y de la β -GAL de *A. oryzae*, respectivamente.

Tabla 18. Rendimiento de transgalactosilación de *A. oryzae* y GLY 001-02 a 6 y 30 h de reacción.

Origen de la enzima	Rendimiento a 6 h (%)*	Rendimiento a 30 h (%)*
<i>A. oryzae</i>	32.49±0.00	47.20±0.01
GLY 001-02	52.05±0.00	66.64±0.02

* Rendimiento calculado en función de la relación de la concentración molar de GOS y la concentración molar de lactosa inicial.

Los rendimientos obtenidos para estas enzimas en otros trabajos son menores a los resultantes en esta investigación (Tabla 18). Para GLY 001-02 se destaca el hecho de que solamente Cruz-Guerrero (2005) reporta la síntesis de GOS, teniendo un rendimiento con base en lactosa consumida del 45% sin embargo, la reacción la llevo a cabo en un medio orgánico, siendo este trabajo el primero en reportar la síntesis de GOS en un medio acuoso. Por otro lado, para la β -GAL de *A. oryzae* existen extensos trabajos, pero no se han reportado rendimientos por arriba de 40% (Jovanovic-Malinovska *et al.*, 2012; Vera *et al.*, 2012; Golowczyc *et al.*, 2013; Fischer y Kleinschmidt, 2021b; Guerrero *et al.*, 2015; Aburto *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2017; Mano *et al.*, 2019; Rico-Rodríguez *et al.*, 2021 y Córdova *et al.*, 2023). En este trabajo se obtuvo un rendimiento del 47.20±0.01% empleando 18% de lactosa y 30

h de reacción, con la misma concentración de lactosa en el medio, teniendo hasta ahora un rendimiento mucho mayor que lo que se ha reportado para la β -GAL proveniente de *A. oryzae*.

8.4. Síntesis de galactooligosacáridos con suero de requesón

Una vez que se establecieron las mejores condiciones para la reacción de transgalactosilación con lactosa en un buffer, se estudió la reacción con suero de requesón. Para lograr esto, el suero de requesón se liofilizó para estandarizar una concentración de lactosa de ~30%. Posteriormente el suero liofilizado se diluyó a una concentración de lactosa de 18% empleando el buffer correspondiente para cada enzima. Para asegurar la concentración de lactosa, se determinó la cantidad de azúcares totales por el método de DuBois *et al.* (1956). Adicionalmente, el tiempo de reacción en el que se trabajó fue hasta 36 h, para observar ahora cómo se comportaban las enzimas en este medio con la presencia de iones y otros componentes (ver Tabla 15).

8.4.1 Análisis de la síntesis de GOS por cromatografía en capa fina

En la Figura 22 se presentan las CCF de la síntesis de GOS en suero de requesón catalizada por GLY 001-02 (Figura 22 A) y la β -GAL de *A. oryzae* (Figura 22 B).

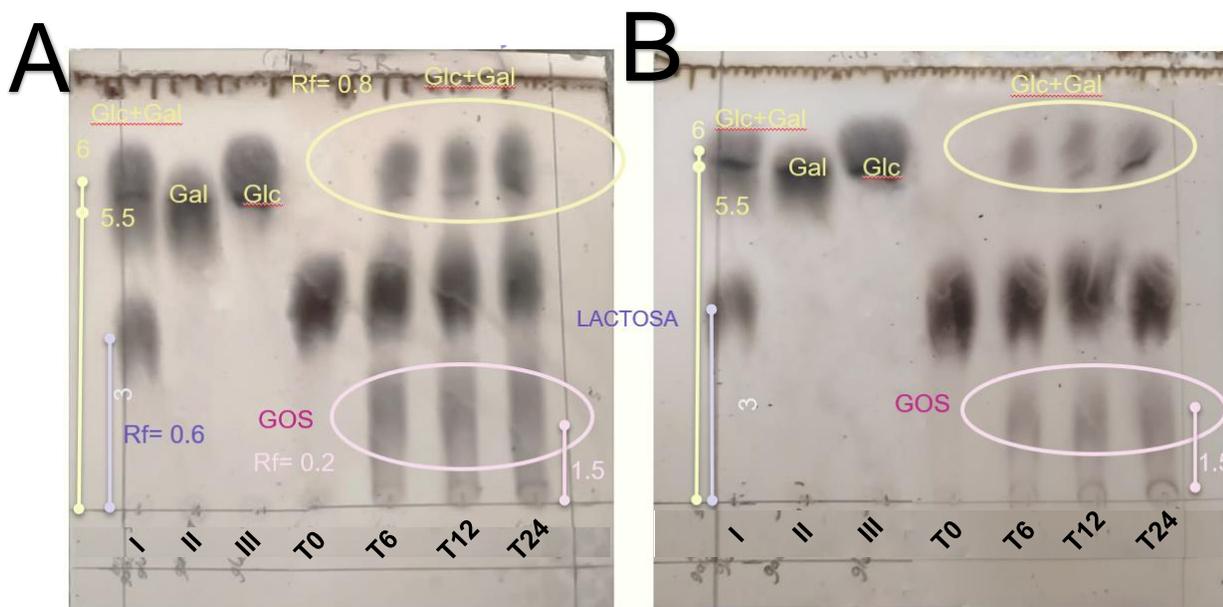


Figura 22. CCF de la reacción de transgalactosilación en suero de requesón como medio, con A) GLY 001-02 y B) β -GAL de *A. oryzae* a 24 h. De izquierda a derecha: I: mezcla de lactosa, Gal y Glc; II: Gal y III: Glc. En el 4° carril la reacción control (T0) y los carriles siguientes pertenecen a las 6, 12 y 24 h de reacción, representadas como T6, T12 y T24, respectivamente.

Al igual que los datos presentados en la sección 8.3.3.1, en la que se muestra el análisis de CCF de la reacción de transgalactosilación empleando lactosa como sustrato; en la síntesis de GOS empleando suero de requesón, se observa que los GOS presentan un Rf de 0.2, mientras que el Rf calculado para la lactosa sin reaccionar fue de 0.6 y los monosacáridos juntos (Glc y Gal) presentaron un Rf de 0.8. Este comportamiento indica que ambas enzimas catalizan la reacción de transgalactosilación en este medio, aun cuando el suero de requesón contiene minerales, en especial una elevada concentración de calcio, el cual es un inhibidor de la mayoría de las galactosidasas (BRENDA, 2024) y de GLY 001-02 (Cruz-Hernández, 1999).

La actividad de las galactosidasas en suero de requesón no ha sido reportada, sin embargo, se ha reportado la síntesis de GOS en medios similares como lo son: leche, lactosuero, permeado de suero y suero ácido obtenido de la producción de yogurt (Fischer y Kleinschmidt, 2015, 2021a y 2021b; Geiger *et al.*, 2016; Mano *et al.*, 2019; Raho *et al.*, 2020; Rico-Rodríguez *et al.*, 2021; Bolognesi *et al.*, 2022; Deshmukh *et al.*, 2024). Resultados similares fueron reportados por Li *et al.* (2019), en donde la galactosidasa de la bacteria antártica *Alteromona ssp.* (GalA) sintetizó GOS empleando como sustrato leche y lactosa en buffer.

8.4.2 Análisis cuantitativo de GOS: HPLC.

La producción de GOS por parte de la β -GAL de *A. oryzae* presentó cambios mínimos en su cinética comparada con su actividad empleando lactosa como sustrato (Figura 23). En las primeras 18 h de reacción ambas curvas presentan una concentración de GOS-3 muy similar, sin embargo, se puede observar que a partir de las 24 h se llegó a la concentración máxima de GOS producidos empleando suero de requesón como medio. Adicionalmente, se sintetizó una mayor concentración de GOS-4 en suero de requesón en comparación con el medio con lactosa, así mismo, su concentración aumenta significativamente a menor tiempo de reacción. En la Figura 15a (anexos), se encuentra el cromatograma tipo de la reacción de transgalactosilación en suero de requesón con la β -GAL proveniente de *A. oryzae*.

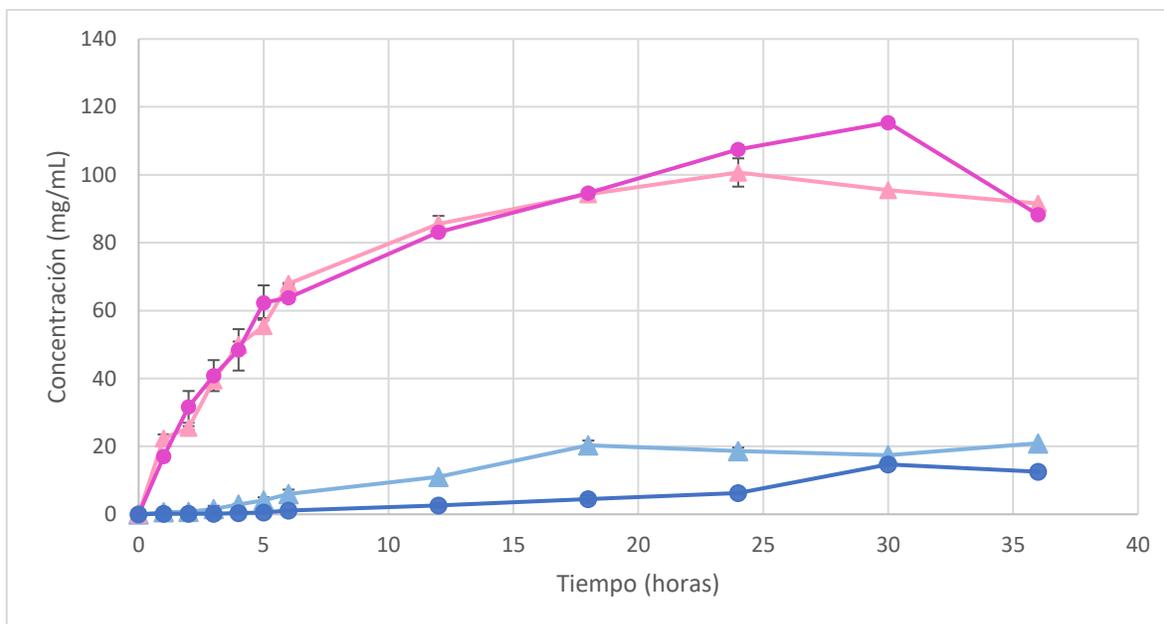


Figura 23. Comparación de los GOS sintetizados en lactosa con buffer y en suero de requesón utilizando la β -GAL proveniente de *A. oryzae*. GOS-3 sintetizados en suero de requesón (▲); GOS-3 sintetizado en un buffer con lactosa (●); GOS-4 sintetizados en suero de requesón (▲) y GOS-3 sintetizados en un buffer con lactosa (●).

Resultados similares en la síntesis enzimática de GOS han sido reportados por otros autores. Fischer y Kleinschmidt (2015) reportan que en la reacción catalizada por la β -GAL proveniente de *A. oryzae* obtienen concentraciones de GOS similares empleando como medio lactosa en buffer, lactosuero ácido y lactosuero dulce. Comportamiento esperado de su parte debido que al hacer una prueba de tolerancia a cationes metálicos (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , entre otros), la actividad de la enzima no se vio afectada. En el estudio realizado por Limnaios *et al.* (2023), sobre la influencia de los minerales presentes en el suero (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) en la actividad de la β -GAL de *A. oryzae*, llegando a una concentración de hasta 100 mM, concluyeron que la enzima no se ve influenciada por ninguno de los cationes estudiados. Contrariamente, Haider y Husain (2007) reportaron que a concentraciones de calcio de 250-1247 mM la β -GAL de *A. oryzae* disminuye su actividad hasta en un 50%. La concentración de calcio estudiada por los autores antes mencionados es mayor a la obtenida en este trabajo aun cuando el suero de requesón se concentró para obtener 18% de lactosa (lo que equivaldría a concentrar el suero de requesón 4 veces aproximadamente), teniendo en su composición una concentración de calcio de 75 mM, por lo que no se observó la inhibición de la enzima por este ion.

En la glicosidasa GLY 001-02 se observa una influencia negativa al cambiar de medio de lactosa en buffer a suero de requesón (Figura 24), debido a que la

concentración de GOS-3 producidos disminuye casi al 50%. Esto podría deberse a la inhibición de la enzima por la presencia de algunos cationes en el suero de requesón, especialmente por la presencia de calcio en una concentración de 75 mM. De acuerdo con Cruz-Hernández (1999) la glicosidasa GLY 001-02, muestra inhibición en presencia de Ca^{2+} y Na^{+} a concentraciones de 5 mM.

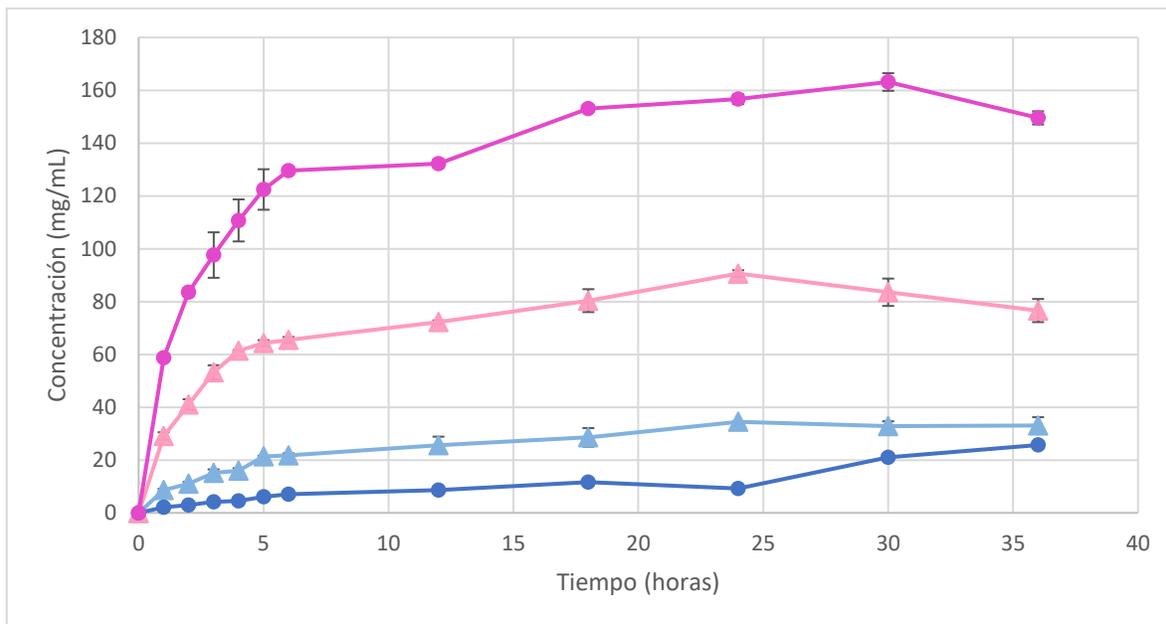


Figura 24. Comparación de los GOS sintetizados en lactosa con buffer y en suero de requesón utilizando la glicosidasa GLY 001-02. GOS-3 sintetizados en suero de requesón (\blacktriangle); GOS-3 sintetizado en un buffer con lactosa (\bullet); GOS-4 sintetizados en suero de requesón (\blacktriangle) y GOS-4 sintetizados en un buffer con lactosa (\bullet).

La β -GAL de *A. oryzae* despliega un comportamiento similar al de GLY-001-02 puesto que la concentración máxima de GOS se alcanza a un tiempo menor (24 h), y después comienza a disminuir. Así mismo, destaca la síntesis de una mayor concentración de GOS-4 empleando suero de requesón como sustrato en comparación con lactosa en buffer, comportamiento observado también para la β -GAL de *A. oryzae*. Este comportamiento podría deberse a la presencia de algún o algunos iones que pueden estar afectando la estructura de la enzima como lo reportado por Hou *et al.* (2023) para una xilanasa, donde observan que la enzima al estar en contacto con Mn^{2+} sufre un cambio estructural en el sitio activo, agrandando el bolsillo de unión del sustrato.

Esta posible modificación en la estructura de la enzima podría estar contribuyendo a la flexibilidad de los aminoácidos cercanos al sitio catalítico, para que moléculas grandes como los GOS-3 tengan un mejor acercamiento al sitio catalítico y así transferir la galactosa y sintetizar GOS-4. Como lo reportado por Rico-Díaz *et al.*

(2017) quienes estudiaron la estructura de una β -GAL proveniente de *A. niger* y su interacción con los GOS-3, observando que un amplio bolsillo catalítico permite la interacción entre los aminoácidos cercanos al sitio catalítico y la galactosa y glucosa que se encuentran fuera del bolsillo catalítico promoviendo el correcto acomodo de los GOS.

Por el momento no se tiene conocimiento de que se hayan trabajado enzimas hipertermófilas en medios complejos como lo es el suero de requesón. Sin embargo, se han reportado buenos rendimientos al emplear lactosa en buffer, debido a que las altas temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones enzimáticas permiten una mayor solubilidad de lactosa en el medio.

En la Tabla 19 se presentan los resultados de las reacciones de transgalactosilación empleando lactosa en buffer o suero de requesón como sustrato. La actividad de la β -GAL proveniente de *A. oryzae* presenta cambios mínimos al modificar el medio de lactosa en buffer a suero de requesón. Este mismo comportamiento es reportado por Fischer y Kleinschmidt (2015), quienes en la síntesis de GOS emplean lactosa como sustrato, lactosuero dulce y lactosuero ácido, obteniendo rendimientos de síntesis de GOS de $24.30\pm 0.18\%$, $24.92\pm 0.14\%$ y $24.45\pm 0.33\%$, respectivamente.

Tabla 19. Rendimiento de transgalactosilación de la β -GAL de *A. oryzae* y la glicosidasa GLY 001-02 a 24 h de reacción en suero de requesón comparado con bibliografía.

Origen de enzima	Rendimiento a 24 h con lactosa (%) *	Rendimiento a 24 h con suero de requesón (%) *	Rendimientos de referencia (%)
<i>A. oryzae</i>	42.23 ± 0.00	43.28 ± 0.02	$24.30-24.92$ ** (Fischer y Kleinschmidt, 2015)
GLY 001-02	61.68 ± 0.00	44 ± 0.00	45 *** (Cruz-Guerrero, 2005)

* Rendimiento calculado en función de la relación de la concentración molar de GOS y la concentración molar de lactosa inicial (18%).

** Rendimiento calculado en función de la relación de la masa de GOS totales y la masa de lactosa inicial.

***Rendimiento calculado con base en lactosa consumida.

En la reacción catalizada por GLY 001-02 se observó una disminución en el rendimiento de síntesis de GOS al cambiar el medio de lactosa en buffer a suero de requesón (Tabla 19). Debido a que no se tienen reportes del uso de una glicosidasa hipertermófila en medios similares al utilizado, no es posible conocer si el uso de un

medio tan complejo que involucra en su composición minerales y proteínas (péptidos) interfiere en los rendimientos de síntesis de GOS.

8.5. Optimización

La optimización se llevó a cabo con la glicosidasa GLY 001-02 y la β -GAL de *A. oryzae* mediante diferentes condiciones de temperatura y concentración de lactosa. El intervalo de temperatura estudiado para la β -GAL de *A. oryzae* fue de 40-60 °C y para la glicosidasa GLY 001-02 fue de 70-90 °C, mientras que, para la concentración de lactosa, el intervalo estudiado fue de 18-23% para ambas enzimas. Con el empleo del diseño central compuesto se obtuvieron los niveles y la combinación de los parámetros para optimizar la reacción (Tabla 14). Con los resultados obtenidos se llevó a cabo una superficie de respuesta para conocer las condiciones óptimas para la reacción.

8.5.1. Superficie de respuesta de la producción de GOS utilizando β -GAL de *A. oryzae*.

De acuerdo con la superficie de respuesta de la reacción catalizada por la β -GAL de *A. oryzae* en la síntesis de GOS-3 (Figura 25A), se requiere como condiciones de reacción una temperatura de 47.8 °C y una concentración de lactosa de 23.5%, para maximizar la síntesis del oligosacárido. Por otra parte, las condiciones óptimas de reacción de acuerdo con el modelo (Figura 25B) para incrementar la síntesis de GOS-4 serían 51 °C y 22.6% de lactosa. Una concentración menor de lactosa para obtener un óptimo de síntesis de GOS-4 comparado con los GOS-3 puede ser debido que, para sintetizar GOS-4 no se necesita de la máxima concentración de GOS-3 sino que solamente se requiere de cierta concentración para promover la síntesis de GOS-4.

De acuerdo con la superficie de respuesta, se requiere de mayor temperatura para la formación de GOS-4, para que la enzima tenga mayor flexibilidad del sitio activo requiere de mayor energía, la cual se obtiene a través de la temperatura (Karan *et al.*, 2020). Esto es debido a la reacción en cadena con la que se sintetizan los GOS, ya que para la formación de GOS-4 se necesita suficiente cantidad de GOS-3 y para la formación de GOS-5 se necesita una cantidad suficiente de GOS-4. Al ser de mayor tamaño los GOS-3 que un disacárido, se necesita de una mayor flexibilidad de los aminoácidos cercanos al sitio activo para que puedan acercarse moléculas grandes y así realizarse la transferencia de la galactosa a los GOS-3 y obtener finalmente GOS-4.

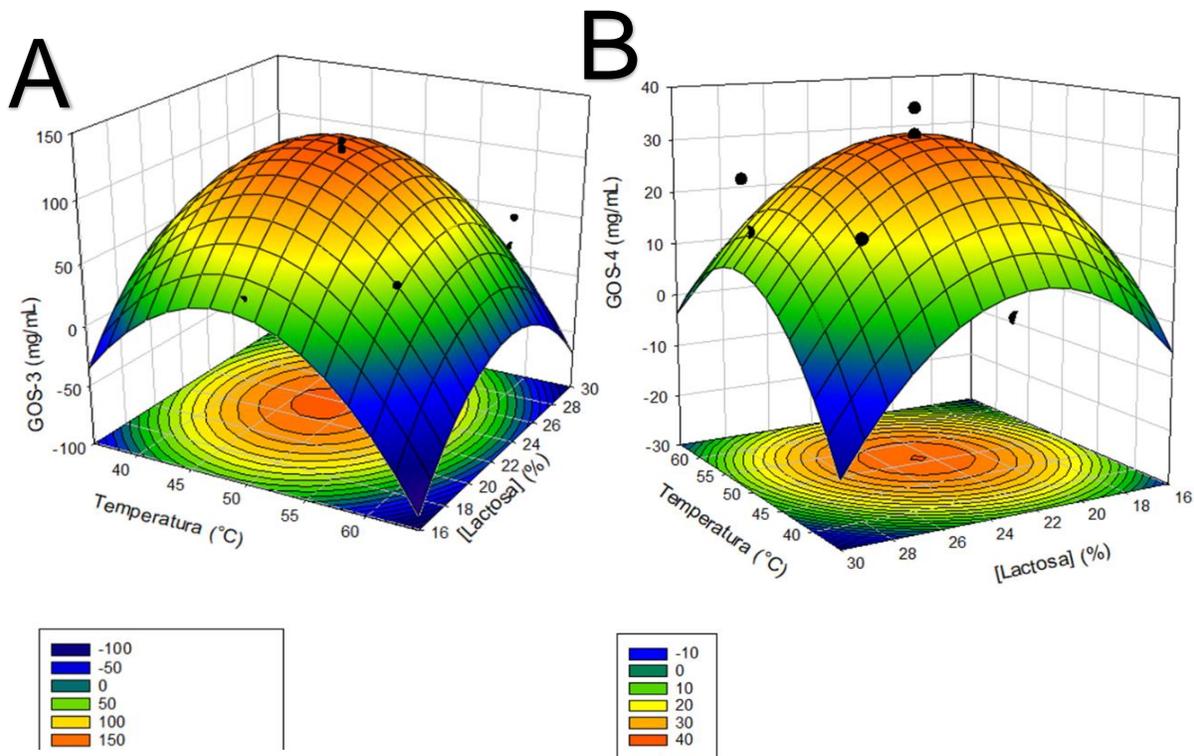


Figura 25. Superficie de respuesta utilizando la β -GAL proveniente de *A. oryzae*. A) Para la obtención de GOS-3 y B) para la obtención de GOS-4.

En la Figura 26 se observa que las condiciones óptimas para la síntesis de GOS totales se encuentran con una temperatura de 50-55 °C y una concentración de lactosa de 22-25%. Puntualmente se obtuvieron como condiciones óptimas 52.56 °C y 22.73% de lactosa para sintetizar una concentración teórica de GOS de 155.97 mg/mL, obteniendo un rendimiento del 45.20%.

Las condiciones óptimas de reacción obtenidas del modelo de superficie de respuesta se comprobaron experimentalmente obteniendo una concentración real de GOS totales de 153.13 ± 1.43 mg/mL y un rendimiento de $44.35 \pm 0.00\%$ que es muy cercano a lo estimado. Datos similares fueron reportados por Rico-Rodríguez *et al.* (2021) quienes, a pesar de optimizar las condiciones de su proceso, los autores obtuvieron una concentración máxima de GOS de 120 mg/mL en la reacción catalizada por la β -GAL de *A. oryzae* bajo condiciones de concentración de lactosa de 35%, 4 h de reacción 50 °C y pH 4.5. Es importante señalar que, aunque el tiempo de reacción fue menor, la concentración de lactosa inicial que utilizaron los autores antes mencionados fue 1.5 veces mayor que en este trabajo.

Wang *et al.* (2020) optimizaron la reacción de transgalactosilación utilizando una β -GAL de *A. oryzae*. Los autores evaluaron parámetros que pudieran influir en la concentración de GOS como: pH, temperatura, concentración de lactosa inicial, relación E/S y tiempo de reacción. Bajo las condiciones óptimas encontradas de pH

de 4.5 a 50 °C, con 50% de lactosa inicial, una E/S de 20 UE/g y 25 min de reacción, reportaron un rendimiento final de 25.1%. Los parámetros de temperatura y pH obtenidos como óptimos por Wang *et al.* (2020) fueron los utilizados en este trabajo, sin embargo, con una menor concentración de lactosa (18%) se obtuvo en este trabajo un rendimiento de 2.3 veces mayor. Otro parámetro a destacar es el tiempo de reacción, mientras que el tiempo óptimo de reacción de los autores antes mencionados fue de 25 min, en este experimento se trabajó a 24 h, no obstante, esto podría deberse a la diferente relación E/S, ya que en este trabajo fue de 1.3 UE/g.

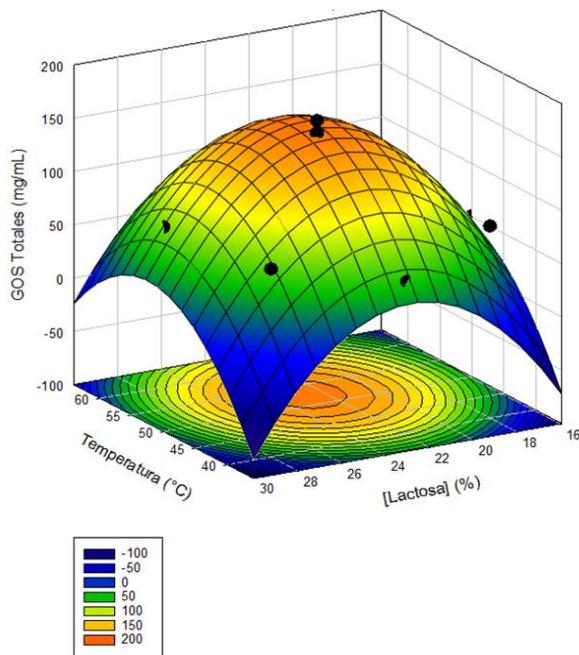


Figura 26. Superficie de respuesta para la obtención de GOS Totales, utilizando la β -GAL proveniente de *A. oryzae*.

Además de obtener las superficies de respuesta, se realizó un ANOVA de los resultados obtenidos, dando una R^2 de 0.96, lo que indica que el modelo elegido explica el 96% de los datos. La R^2 es el parámetro que nos indica el ajuste del modelo de regresión lineal a los datos reales.

Como se observa en la Tabla 20, se tiene un valor p menor a 0.05, lo que indica que ambos factores influyen en la concentración de los GOS, sin embargo, con el valor de F podemos observar que parámetro fue el más influyente en la reacción. Ya que el valor F nos indica la dispersión de los datos en cada grupo, debido a que el valor F de la concentración de lactosa es mayor que el de la temperatura, nos indica que al cambiar la concentración de lactosa hay mayor variación en los datos, por consecuencia es el factor que más afecta a la enzima.

Tabla 20. ANOVA de los datos obtenidos por parte de la β -GAL de *A. oryzae*.

Factor	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Relación-F	Nivel de probabilidad	R-cuadrado
Temp.	3	16159.48	5386.494	27.10	0.000316	0.435772
Lactosa	3	23365.74	7788.579	39.19	0.000096	0.630102
Error total	7	1391.32	198.7601			0.037520
Ajuste	3	1056.214	352.0713	4.20	0.099600	0.028483
Error	4	335.1066	83.77665			0.009037

8.5.2. Superficie de respuesta de la producción de GOS utilizando glicosidasa de GLY 001-02.

Con base en el modelo de superficie de respuesta se obtuvo para la glicosidasa GLY 001-02 las condiciones óptimas para la obtención de GOS-3 y GOS-4 (Figura 27A y 27B, respectivamente), una temperatura de 80-90 °C y una concentración inicial de lactosa de 22-24%. Puntualmente las condiciones para obtener la mayor concentración de GOS-4 son, una temperatura de 88 °C y una concentración de lactosa de 23%, mientras que para GOS-3 se necesita una menor temperatura (83.5 °C) y la misma concentración de lactosa (23%). Este comportamiento es el mismo que se observó para la enzima de *A. oryzae*.

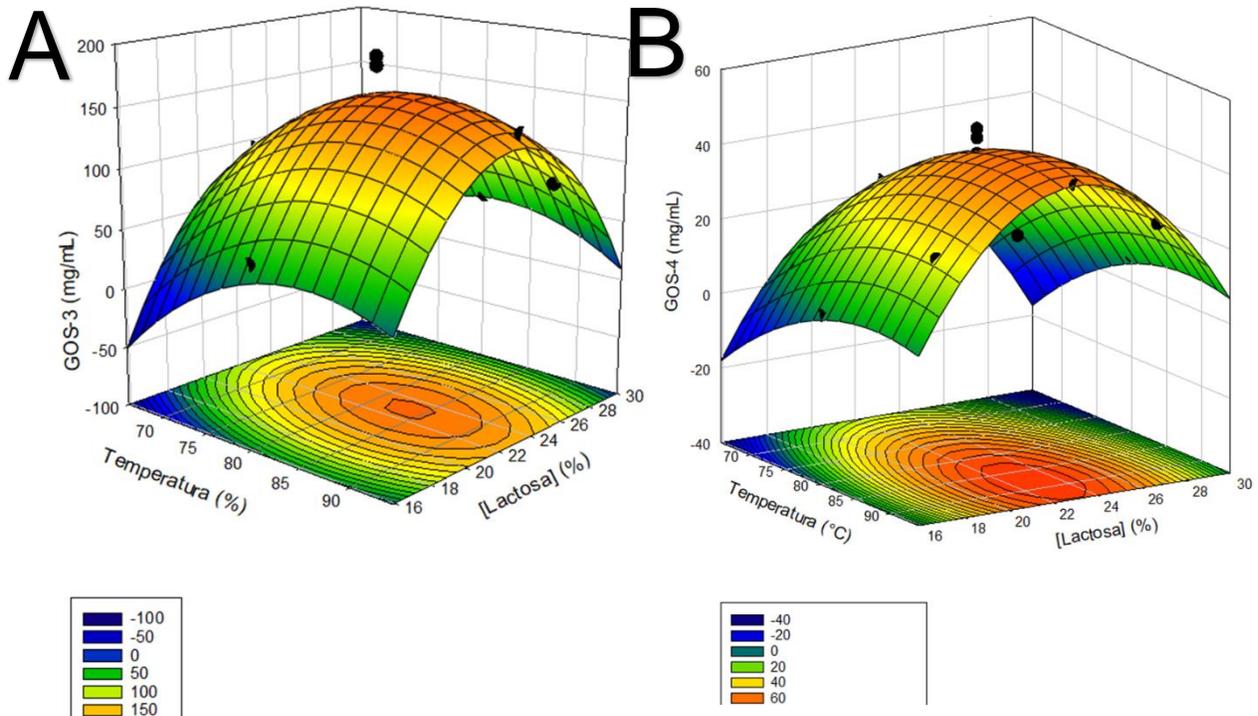


Figura 27. Superficie de respuesta utilizando la glicosidasa GLY 001-02. A) Para la obtención de GOS-3 y B) para la obtención de GOS-4.

Para tener la mayor concentración de GOS totales se requiere una temperatura de 80-85 °C y una concentración de lactosa de 22-24% (Figura 28). Puntualmente se obtuvo que las condiciones óptimas son 84 °C y 23% de lactosa inicial en el medio para obtener una concentración de GOS totales teórica de 206.41 mg/mL con un rendimiento del 58.41%. Las condiciones óptimas obtenidas del modelo se ensayaron experimentalmente. Se sintetizó una concentración de GOS totales real de 217.54 ± 0.62 mg/mL con un rendimiento de $61.56 \pm 0.00\%$, dando resultados cercanos a los estimados. Hansson y Adlercreutz (2007) reportan la optimización en la síntesis de GOS por en la reacción catalizada por una enzima hipertermófila proveniente de *Sulfolobus solfataricus* donde llegaron a un rendimiento del 53% y las condiciones óptimas encontradas fueron 85 °C, pH 6 y 70% de lactosa inicial. Las condiciones de temperatura y pH fueron cercanas a las utilizadas para esta glicosidasa, sin embargo, en esta investigación se obtuvieron mayores rendimientos con una menor concentración de lactosa.

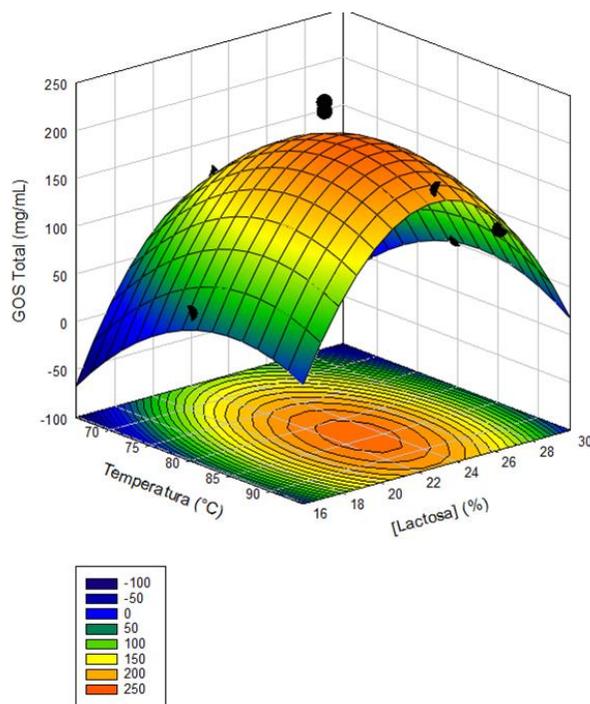


Figura 28. Superficie de respuesta para la obtención de GOS Totales utilizando la glicosidasa GLY 001-02.

Además de obtener las superficies de respuesta, se realizó un ANOVA de los resultados obtenidos, dando una R^2 de 0.92, lo que indica que el modelo elegido explica el 92% de los datos. La R^2 es el parámetro que nos indica el ajuste del modelo de regresión lineal a los datos reales.

Como se observa en la Tabla 21, tenemos un valor p menor a 0.05, lo que indica que ambos factores influyen en la concentración de los GOS. Sin embargo, gracias

al valor de F podemos observar que al igual que para la β -GAL de *A. oryzae*, el parámetro que influye más en la reacción es la concentración de lactosa.

Tabla 21. ANOVA de los datos obtenidos por parte de la glicosidasa GLY 001-02.

Factor	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Relación-F	Nivel de probabilidad	R-cuadrado
Temp.	3	10850.19	3616.731	5.78	0.026100	0.196895
Lactosa	3	43392.87	14464.29	23.14	0.000522	0.787438
Error total	7	4376.356	625.1937			0.079416
Ajuste	3	1121.961	373.987	0.46	0.725401	0.020360
Error	4	3254.395	813.5988			0.059057

Aunque la temperatura óptima de las enzimas es diferente, la concentración de lactosa inicial de GLY 001-02 y la β -GAL de *A. oryzae* fue la misma (23%), sin embargo, la glicosidasa GLY 001-02 tuvo mejores resultados ya que con la optimización alcanzó un rendimiento de $61.56 \pm 0.00\%$, mientras que *A. oryzae* solo tuvo un rendimiento máximo de $44.35 \pm 0.00\%$.

9. Conclusiones

Las cuatro enzimas estudiadas (*E. coli*, *K. lactis*, *A. oryzae* y GLY 001-02) lograron la síntesis de GOS, con una concentración inicial de lactosa de 18% (p/v) en buffer. Con la glicosidasa GLY 001-02 y la β -GAL proveniente de *A. oryzae* se obtuvieron los mejores rendimientos, llegando a un máximo de concentración de GOS a las 30 h.

El suero de requesón concentrado fue empleado como fuente de lactosa para la obtención de GOS; la β -GAL de *A. oryzae* no tuvo cambios en su rendimiento, mientras que GLY 001-02 bajó su rendimiento de síntesis al cambiar el medio de lactosa a suero de requesón. Sin embargo, ambas enzimas mostraron un buen rendimiento de síntesis de GOS (>40%) al emplear suero de requesón.

En la optimización de la reacción de transgalactosilación en suero de requesón se obtuvieron temperaturas cercanas a las óptimas para la actividad hidrolítica de la β -GAL de *A. oryzae* y la glicosidasa GLY 001-02. Respecto a la concentración de lactosa ambas enzimas tuvieron un óptimo de síntesis de GOS con una concentración cercana a 23%.

El suero de requesón puede ser utilizado para la obtención de GOS, los cuales tienen diferentes propiedades benéficas para la salud humana, principalmente por

su actividad prebiótica y pueden ser agregados a diversos alimentos y así obtener alimentos funcionales o consumirse directamente. Dando una alternativa al uso del suero de requesón para evitar y/o disminuir su desecho en cuerpos de agua y suelo y con ello disminuir su contaminación.

10. Perspectivas

El proceso para concentrar el suero de requesón utiliza un equipo sofisticado con un costo elevado, ya que es mediante liofilización, por lo que el estudio de otro método de concentración como la evaporación al vacío podría disminuir costos.

Dado que el suero de requesón se obtuvo en laboratorio. Cada etapa del proceso se cuidó minuciosamente partiendo desde la utilización del mismo tipo de leche para la elaboración del queso. Se recomienda la utilización de un suero de requesón proveniente de microempresas para la síntesis de GOS con la β -GAL de *A. oryzae* y la glicosidasa de GLY 001-02.

Dado que la optimización para la reacción de transgalactosilación utilizando como medio suero de requesón concentrado se llevó a cabo modificando las condiciones de temperatura y concentración de lactosa, sería interesante estudiar otros parámetros como lo son la relación E/S, el tiempo de reacción y el pH del medio.

Debido a que la enzima hipertermófila GLY 001-02 no tiene estudio alguno sobre su estructura y secuencia sería interesante estudiar estos aspectos de la enzima para poder concluir como es que el suero de requesón está afectando su actividad.

11. Bibliografía

Aburto, C., Guerrero, C., Vera, C., Wilson, L. e Illanes, A. (2016). Simultaneous synthesis and purification (SSP) of galacto-oligosaccharides in batch operation. *LWT - Food Science and Technology*. 72:81–89. doi:10.1016/j.lwt.2016.04.029.

Aktas, N., Boyacı I.H., Mutlu M. y Tanyolaç A. (2006). Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). *Bioresource Technology*. 97(18):2252–2259. doi:10.1016/j.biortech.2005.10.039

Alatorre-Santamaría, S., Escamilla-Lozano, Y., Guzmán-Rodríguez, F., García-Garibay, M., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L. y Cruz-Guerrero, A. (2019). Synthesis of fucose-containing disaccharides by glycosylhydrolases from various origins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 188(2): 369-380. doi:10.1007/s12010-018-2926-9.

Alibekov, R.S., Gabrilyants, E.A., Utebaeva, A.A., Nurseitova, Z.T., Konarbayeva, Z.K y Khamitova, B.M. (2021). Cottage cheese fortified by natural additives. *Food Research*. 5(S1):152-159. doi.org/10.26656/fr.2017.5(S1).013.

Alnadari F, Xue Y, Almakas A, Mohedein, A. Samie, A. Abdel-Shafi, M y Abdon, M. (2021). Large batch production of Galactooligosaccharides using β -glucosidase immobilized on chitosan-functionalized magnetic nanoparticle. *Journal of Food Biochemistry*. 45(2):e13589. doi: 10.1111/jfbc.13589.

AOAC 923.03. (2005). *Official Methods of Analysis* 18th Edition. Cap. 32. p.p.: 2.

Barile, D. y Rastall, R. (2013). Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Current Opinion in Biotechnology*. 24(2): 214-219. doi:10.1016/j.copbio.2013.01.008.

Barreteau, H., Delattre, C. y Michaud, P. (2006). Production of Oligosaccharides as Promising New Food Additive Generation. *Food Technology and Biotechnology*. 44(3): 323-333.

Belitz, H.-D., Grosch, W. y Schieberle, P. (2009). *Milk and Dairy Products*. En *Food Chemistry*. Springer. p.p.: 498-544. doi:10.1007/978-3-540-69934-7.

Bergandi, L., Flutto, T., Valentini, S., Thedy, L., Pramotton, R., Zenato, S. y Silvagno, F. (2022). Whey derivatives and galactooligosaccharides stimulate the wound healing and the function of human keratinocytes through the NF- κ B and FOXO-1 signaling pathways. *Nutrients*. 14(14):2888. doi: 10.3390/nu14142888.

Bianco, M. (2016). Caracterización de beta-galactosidasa estructurada en cuerpos de inclusión. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Córdoba, Argentina.

Bolognesi, L.S., Gabardo, S., Dall Cortivo, P.R. y Ayub, M.A.Z. (2022). Biotechnological production of galactooligosaccharides (GOS) using porungo cheese whey. *Food Science and Technology*. 42(2):e64520. doi:10.1590/fst.64520.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2): 248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.

CANILEC. (2022). Estadísticas del Sector lácteo 2011-2021. Consultado el 27 de febrero 2023. Disponible en <https://www.canilec.org.mx/estadisticas/>.

Carrero-Puentes, S., Fuenmayor, C., Jiménez-Pérez, C., Guzmán-Rodríguez, F., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., Alatorre-Santamaría, S., García-Garibay, M. y Cruz-Guerrero, A. (2022). Development and characterization of an exopolysaccharide-functionalized acid whey cheese (requesón) using *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *Journal of Food Processing and Preservation*. 46(6):e16095. doi:10.1111/jfpp.16095.

Carvalho, F., Prazeres, A. y Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the Total Environment*. 445:385–396. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.038.

Casá, N.E., Lois-Milevicich, J., Alvarez, P., Mateucci, R. y de Escalada Pla, M. (2022). *Chlorella vulgaris* cultivation using ricotta cheese whey as substrate for biomass production. *Journal of Applied Phycology*. 34(2):745-756. doi:10.1007/s10811-022-02685-3.

Castillo, F. J. (1990). Lactose metabolism by yeasts. *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*. H Verachert y R de Mot (Eds.). Marcel Dekkers. Nueva York. p.p.:297- 320.

Cavaille, D. y Combes, D. (1995). Characterization of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 22(1): 55-64.

Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA). (2019). Reporte: La producción y comercio de lácteos en México. Palacio Legislativo de San Lázaro.

Chang, B-Y. y Mahoney, R. R. (1989). Purification and thermostability of β -galactosidase (lactase) from an autolytic strain of *Streptococcus salivarius* subs. *Thermophilus*. *The Journal of Dairy Research*. 56(1):117-127. doi:10.1017/s0022029900026285

Chen, K.-Ch., Lee, T.-Ch. y Houn, J-K. (1992). Search method for the optimal medium for the production of lactase by *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 14(8):659-664. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90043-N](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90043-N).

Cheng C. C., Yu M. C., Cheng T. C., Sheu D. C., Duan K.J. y Tai W. L. (2006). Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*. 28(11):793-797. doi: 10.1007/s10529-006-9002-1.

Chombo, M. (2022). Aportación a la lactología en México. Construyendo redes de conocimiento. Primera Edición. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. México.

Corzo, N., Alonso, J.L., Azpiroz, F., Calvo, A., Cirici, M., Leis, R., Lombo, F., Mateos-Aparicio, I., Plou, F.J., Ruas-Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo-Cuenca, M.L. y Clemente, A. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria*. 31(1):99-118. doi:10.3305/nh.2015.31.sup1.8715.

Córdova, A., Astudillo-Castro, C., Henriquez, P., Manriquez, N., Nuñez, H., Guerrero, C., Álvarez, D., Aburto, C., Carrasco, V., Oñate, S. y Lehuedé, L. (2023). Ultrasound-assisted enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides using native whey with two commercial β -galactosidasas: *Aspergillus oryzae* and *Kluyveromyces var lactis*. *Food Chemistry*. 426:136526. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136526.

Cruz-Guerrero, A. (2005). Síntesis de galactooligosacáridos con β -galactosidasa en solventes orgánicos. Tesis para obtener el grado de doctor. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Cruz-Guerrero, A., Gómez-Ruiz, L., Viniegra-González, G., Bárzana, E. y García-Garibay, M. (2005). Influence of water activity in the synthesis of galactooligosaccharides produced by a hyperthermophilic beta-glycosidase in an organic medium. *Biotechnology and Bioengineering*. 93(6):1123-9. doi: 10.1002/bit.20824.

Cruz-Hernández C. (1999). Caracterización bioquímica y funcional de una β -glicosidasa hipertermofílica. Tesis para obtener el grado de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Costa, S., Summa, D., Semeraro, B., Zappaterra, F., Rugiero, I. y Tamburini, E. (2021). Fermentation as a Strategy for Bio-Transforming Waste into Resources: Lactic Acid Production from Agri-Food Residues. *Fermentation*. 7:3. doi:10.3390/fermentation7010003.

De Albuquerque, T.L., De Sousa, M., Gomes E Silva, N.C., Girão Neto, C.A.C., Gonçalves, L.R.B., Fernandez-Lafuente, R. y Rocha, M.V.P. (2021). β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization and applications - A review. *International Journal Biological Macromolecules*. 191:881-898. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.133.

De Giorgi, S., Raddadi, N., Fabbri, A., Gallina Toschi, T. y Fava, F. (2018). Potential use of ricotta cheese whey for the production of lactobionic acid by *Pseudomonas taetrolens* strains. *New Biotechnology*. 25(42):71-76. doi: 10.1016/j.nbt.2018.02.010.

Deshmukh, N., Rao, P., Sharma, H., M.H, S., N, L. y C.T., M. (2024). Waste to nutrition: The evolution of whey, a byproduct to galactooligosaccharides production. *Food Chemistry Advances*. 4(2):100642. doi:10.1016/j.focha.2024.100642.

Deya. (1990). Enzymic syntheses of oligosaccharides from lactose and utilization of these oligosaccharides. *Yukijirushi Nyugyo Kenkyusho Hokoku*. 92:1-54.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(3):350-356. doi:10.1021/ac60111a017.

Escamilla-Lozano, Y. (2011). Síntesis de Oligosacáridos Fucosilados por vía enzimática mediante reacciones de Fucosilación. Tesis para obtener el grado de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Faber, K. (2018). Chapter 2: Biocatalytic Applications in Biotransformations in Organic Chemistry. 7ma edición. Springer International Publishing. p.p.: 31-313. doi: 10.1007/978-3-319-61590-5.

FAOSTAT. (2017). Consultado el 21 de febrero 2023. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#home>.

Fancello, F., Zara, G., Hatami, F., Scano, E. y Mannazzu, I. (2024). Unlocking the potential of second cheese whey: a comprehensive review on valorisation strategies. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 23(2):411–441. doi.org/10.1007/s11157-024-09687-2.

Fernández y Galván. (2005). Métodos para la cuantificación de proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales. Córdoba, España.

Figuroa-González, I. Quijano, G. Ramírez, G. y Cruz-Guerrero, A. (2011). Probiotics and prebiotics – perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91(8):1341–1348. doi: 10.1002/jsfa.4367.

Fischer, C. y Kleinschmidt, T. (2015). Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*. 48:15-22. doi:10.106/j.dairyj.2015.01.003.

Fischer, C. y Kleinschmidt, T. (2021a). Synthesis of galactooligosaccharides by *Cryptococcus laurentii* and *Aspergillus oryzae* using different kinds of acid whey. *International Dairy Journal*. 11:104867. doi:10.1016/J. IDAIRYJ.2020.104867.

Fischer, C. y Kleinschmidt, T. (2021b). Valorisation of sweet whey by fermentation with mixed yoghurt starter cultures with focus on galactooligosaccharide synthesis. *International Dairy Journal*. 119:105068. doi:10.1016/J. IDAIRYJ.2021.105068.

Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H. y O'Mahony, J.A. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Chapter 2: Lactose. Segunda edición. Springer International Publishing. p.p.: 41-88. doi: 10.1007/978-3-319-14892-2.

García-Garibay, M. y Gómez-Ruiz, L. (1996). Usos de β -galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos. *Revista de Investigación Clínica*. 48(Supl):51-61.

García-Garibay, M., López-Munguía, A. y Barzana, E. (2000). Alcoholysis and reverse hydrolysis reactions in organic one-phase system with a hyperthermophilic beta-glycosidase. *Biotechnology and Bioengineering*. 69(6):627-32. doi: 10.1002/1097-0290(20000920)69:6<627::aid-bit6>3.0.co;2-7.

Gänzle, M. (2012). Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. *International Dairy Journal*. Vol. 22. p.p.: 116-122. doi:10.1016/j.idairyj.2011.06.010.

Geiger, B., Nguyen, H. M., Wenig, S., Nguyen, H. A., Lorenz, C., Kittl, R., Mathiesen, G., Eijssink, V. G. H., Haltrich, D. y Nguyen, T. H. (2016). From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Biochemical Engineering Journal*. 116:45–53. doi:10.1016/J.BEJ.2016.04.003.

Gekas, V. y López-Leiva, M. (1985). Hydrolysis of lactose: A literature review. *Process Biochemistry*. 20:2-12.

Golowczyc, M., Vera, C., Santos, M., Guerrero, C., Carasi, P., Illanes, A., Gómez-Zavaglia, A. y Tymczyszyn, E. (2013). Use of whey permeate containing in situ synthesised galactooligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Research*. 80(3):281-374. doi:10.1017/S0022029913000356.

Gómez, J. y Sánchez, O. (2019). Producción de galactooligosacáridos: alternativa para el aprovechamiento del lactosuero. Una revisión. *Ingeniería y Desarrollo*. Universidad del Norte. 37(1):129-158. doi:10.14482/inde.37.1.637.

González-Delgado, I., López-Muñoz, M-J., Morales, G. y Segura, Y. (2016). Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *International Dairy Journal*. 61:211-219. doi: 10.1016/j.idairyj.2016.06.007.

Gosling, A., Stevens, G., Barber, A., Kentish, S. y Gras, S. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*. 121(2):307-318. doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.063.

Guerrero, C., Vera, C., Conejeros, R., e Illanes, A. (2015). Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology*. 70:9–17. doi: org/10.1016/J.ENZMICTEC.2014.12.006

Guerrero-Rodríguez W.J., Gomez-Aldapa, C.A., Castro-Rosa, J., González-Ramírez, C.A. y Santos-López, E.M., (2010). Caracterización fisicoquímica del lactosuero en el Valle de Tulancingo. XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Guanajuato. División ciencias de la vida.

Guzmán-Rodríguez, F. (2013). Estudio de péptidos acarreadores de minerales y antitrombóticos liberados durante la fermentación de leche con *Lactobacillus casei shirota*. Tesis que para obtener el grado de maestro en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Gympel, S. (2021). Galactooligosacáridos (GOS): características, propiedades y tecnologías de obtención para su uso como ingrediente funcional en alimentos. Trabajo final integrador para obtención del grado Académico de Especialista en Ciencia y Tecnología de la Leche y Productos Lácteos. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ingeniería Química. Argentina.

Haider, T. y Husain, Q. (2007). Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* beta galactosidase: its stability and applications in the hydrolysis of lactose. *International Journal of Biological Macromolecules*. 41(1):72-80. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2007.01.001.

Hansson, T. y Adlercreutz, P. (2007). Optimization of galactooligo-saccharide production from lactose using β -glycosidases from hyperthermophiles. *Food Biotechnology*. 15(2):79-97. doi: 10.1081/FBT-100106830.

Hoffman, J. y Falvo, M. (2004). Protein-Which is best. *Journal of Sports Science and Medicine*. 3(3):118-130. doi:10.1081/FBT-100106830.

Hou, L., Liang, C., Fei, Y., Yang, D., Zhang, N., Lu, Y., Wang, L., Xing, Z. y Zhao, Z. (2023). Analysis of the effect of metal ions on the ability of Xylanase to hydrolyze wheat bran by

molecular dynamics simulations. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 11:1142873. doi: 10.3389/fbioe.2023.1142873.

Huerta, L., Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L. e Illanes, A. (2011). Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentration with immobilized β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *Process biochemistry*. 46(1):245-252. doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.018.

INEGI. (2023). Economía y Sectores Productivos. PIB y cuentas nacionales: Por actividad económica. Consultado el 28 de agosto 2024. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/temas/pib/#tabulados>.

Jakcson, E. H. y Jellen, P. (1989). Comparison of acid and neutral lactases for batch hydrolysis of lactose in whey. *Milchwissenschaft*. 44(9):544-546. doi: 10.1111/j.1365-2621.1989.tb07953.x.

Ji, E.S., Park, N.H. y Oh, D.K. (2005). Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant β -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *World Joournal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 21. p.p.:759–764. doi:10.1007/s11274-004-5487-8.

Jiménez-Flores, R. y Brisson, G. (2008). The milk fat globule membrane as an ingredient: why, how, when?. *Dairy Science Technology*. 88:5–18. doi:10.1051/dst:2007005.

Johnstone, N., Milesi, C., Burn, O., van den Bogert, B., Nauta, A., Hart, K., Sowden, P., Burnet, PWJ. y Cohen Kadosh, K. (2021). Anxiolytic effects of a galacto-oligosaccharides prebiotic in healthy females (18–25 years) with corresponding changes in gut bacterial composition. *Scientific Reports*. 11(1):1–11. doi: 10.1038/s41598-021-87865-w.

Jovanovic-Malinovska, R., Fernandes, P., Winkelhausen, E. y Fonseca, L. (2012). Galacto-oligosaccharides Synthesis from Lactose and Whey by β -Galactosidase Immobilized in PVA. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 168(5):1197–1211. doi:10.1007/s12010-012-9850-1.

Karan, R., Mathew, S., Muhammad, R., Bautista, D.B., Vogler, M., Eppinger, J., Oliva, R., Cavallo, L., Arold, S.T. y Rueping, M. (2020). Understanding High-Salt and Cold Adaptation of a Polyextremophilic Enzyme. *Microorganisms*. 8(10):1594. doi:10.3390/microorganisms8101594.

Kaur, M., Sood, A., Chauhan, G. y Gupta, R. (2023). β -galactosidase: A Potential Biotechnological Enzyme. *Trends in Carbohydrate Research*. 14(4):26-39. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12564>.

Klontz, E.H., Li, C., Kihn, K., Campos, J., Beckett, D., Snyder, G.A., Wintrode, P.L., Deredge, D., Wang, L. y Sundberg, E. (2020). Structure and dynamics of an α -fucosidase reveal a

mechanism for highly efficient IgG transfucosylation. *Nature Communications*. 11(1):6204. doi:10.1038/s41467-020-20044-z.

Kötzler, MP., Hancock, SM. y Withers, SG. (2014). Glycosidases: functions, families and folds. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.). p.p.:1–14. doi:10.1002/9780470015902.a0020548.pub2.

Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. *Journal of Functional Foods*. 1(2):177–187. doi:10.1016/j.jff.2009.01.007.

Kosseva, M.R., Panesar, P.S., Kaur, G. y Kennedy, J.F. (2009). Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *International Journal of Biological Macromolecules*. 45(5):437-47. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2009.09.005.

Lamsal, P. (2012) Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(10): 2020-2028. doi: 10.1002/jsfa.5712.

Leizaola-Calvo, F. (2011). Suero y requesón, productos poco valorados por los pastores vascos. *Zainak*. 34: 517-528.

Li, S., Zhu, X. y Xing, M. (2019). A New-Galactosidase from the Antarctic Bacterium *Alteromonas sp.* ANT48 and Its Potential in Formation of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides. *Marine Drugs*. 17(11):599. doi:10.3390/md17110599.

Limnaios, A., Tsevdou, M., Tsika, E., Korialou, N., Zerva, A., Topakas, E. y Taoukis, P. (2023). Production of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides from Acid Whey Catalyzed by a Novel β -Galactosidase from *Thermothielavioides terrestris* and Commercial Lactases: A Comparative Study. *Catalysts*. 13(10):1360. doi:10.3390/catal13101360.

Macfarlane, G.T., Steed, H. y Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*. 104(2):305-44. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03520.x.

Majore, K., Liepins, J. y Ciprovica, I. (2017). The impact of calcium ions on commercially available β -galactosidase. *foodbalt*. 1(1). doi:10.22616/foodbalt.2017.017.

Mano, M., Paulino, B. y Pastore, G. (2019). Whey permeate as the raw material in galactooligosaccharides synthesis using commercial enzymes. *Food Research International*. 124:78-85. doi: 10.1016/j.foodres.2018.09.019.

Mares-Mares, E., Herrera-Castillo, F. L., Barboza-Corona J. E., Navarro-Mendoza, R., Feregrino-Pérez, A. A., Sosa-Morales, M. E. y León-Galván, M. F. (2017). Molecular characterization of primary and secondary lactoserous proteins of whey coming from different

cheeses. American Society of Agricultural and Biological Engineers. 1:1701252. doi:10.13031/aim.201701252.

Mares-Mares, E., Barboza-Corona, J.E., Sosa-Morales, M.E., Gutiérrez-Chávez, A.J., Gutiérrez-Vargas, S. y León-Galván, M.F. (2019). Inhibition of dipeptidyl peptidase IV by enzymatic hydrolysates derived from primary and secondary whey of fresh and Oaxaca cheeses. International Journal Dairy Technology. 72(1):626-632. doi:10.1111/1471-0307.12623.

Martínez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A. y Villamiel, M. (2008) Optimization of conditions for galactooligosaccharides synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Food Chemistry. 107(1):258- 264. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.011

Mazorra-Manzano, M., Ramírez-Montejo, H., Lugo-Sánchez, M., González-Córdova, A. y Vallejo-Córdova, B. (2019). Caracterización del lactosuero y requesón proveniente del proceso de elaboración de queso cocido (asadero) región Sonora. Nova scientia. 11(23):00011. doi:10.21640/ns.v11i23.2072.

Mazorra-Manzano, M. y Moreno-Hernández, J., (2020). Propiedades y opciones para valorizar el lactosuero de la quesería artesanal. Ciencia UAT. 14(1):133-144. doi:10.29059/cienciauat.v14i1.1134.

Meneses, R.B., Monteiro, M.L.G., Santos, F.F., Leão, M.H.M.d.R. y Conte-Junior, C.A. (2021). Sensory Characteristics of Dairy By-Products as Potential Milk Replacers in Ice Cream. Sustainability. 13:1531. doi:org/10.3390/su13031531.

Mollea, C., Marmo, L. y Bosco, F. (2013). Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. Food Industry. 1. doi: 10.5772/53159.

Monti, L., Donati, E., Vittorio, A. y Contarini, G. (2018). Application of membrane technologies to bovine Ricotta cheese exhausted whey (scotta). International Dairy Journal. 85:121-128. doi:10.1016/j.idairyj.2018.05.007.

Muhammad, A., Mian, M., Muhammad, S., Aysha, S., Saima, R., Rizwan, A., Nighat, R., Zainab, A., Ghazala, K. y Adnan, A. (2021). Functional, textural, physicochemical and sensorial evaluation of cottage cheese standardized with food grade coagulants. Food Science and Technology, Campinas. 42(5):33420. doi.org/10.1590/fst.33420.

Neri, D., Balcão, V., Costa, R., Rocha, I., Ferreira, E., Torres, D, Rodrigues, L., Carvalho, L. y Teixeira, J. (2009). Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. Food Chemistry. 115(1):92–99. doi:10.106/j.foodchem.2008.11.068.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-035-SSA1-1993, BIENES Y SERVICIOS. QUESOS DE SUERO. ESPECIFICACIONES SANITARIAS. Publicado en el DOF el 30/01/1995. Consultado el 20 de febrero 2023.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018, QUESO-DENOMINACIÓN, ESPECIFICACIONES, INFORMACIÓN COMERCIAL Y MÉTODOS DE PRUEBA. Publicado en el DOF el 31/01/2019. Consultado el 20 de febrero 2023.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-243-SSA1-2010, PRODUCTOS Y SERVICIOS. LECHE, FÓRMULA LÁCTEA, PRODUCTO LÁCTEO COMBINADO Y DERIVADOS LÁCTEOS. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS. MÉTODOS DE PRUEBA. Publicado en el DOF el 27/09/2010. Consultado el 22 de febrero 2023.

Ortiz-Araque, L.C., Darré, M., Ortiz, C.M., Massolo, J.F. y Vicente, A.R. (2018). Quality and yield of Ricotta cheese as affected by milk fat content and coagulant type. *International Journal of Dairy Technology*. 71(2):340-346. doi:10.1111/1471-0307.12431.

Osorio-González, C., Sandoval-Salas, F., Hernández-Rosas, F., Hidalgo-Contreras, J., Gómez-Merino, F. y Ávalos de la Cruz, D. (2018). Potencial de aprovechamiento del suero de queso en México. *Agroproductividad*. 11(7): 101-106.

Padín, C. y Díaz, M. (2009). Fermentación alcohólica del lactosuero por *Kluyveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 29(2):110-116.

Pardo-Rojas, L.B. (2014). Capítulo 3: Biomoléculas. *Bioquímica estructural*. Siglo del Hombre Editores. Bogotá, D.C.

Park, H.Y., Kim, H.J., Lee, J.K., Kim, D. y Oh, D.K. (2008). Galactooligosaccharide production by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24(8):1553-1558. doi:10.1007/s11274-007-9642-x

Pires, A., Marnotes, N., Rubio, O., García, A. y Pereira, C. (2021). Dairy By-Products: A Review on the Valorization of Whey and Second Cheese Whey. *Foods*. 10(5):1067. doi:10.3390/foods10051067.

Prazeres, A.R., Carvalho, F. y Rivas, J. (2013). Fenton-like application to pretreated cheese whey wastewater. *Journal of Environmental Management*. 129 :199-205. doi: 10.1016/j.jenvman.2013.07.016.

Rabiu, A., Jay, J., Gibson, R. y Rastall, A. (2001). Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by galactosidases from *Bifidobacterium species*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(6):2526–2530. doi: 10.1128/AEM.67.6.2526-2530.2001.

Raho, S., Carofiglio, V. E., Montemurro, M., Miceli, V., Centrone, D., Stufano, P., Schioppa, M., Pontonio, E. y Rizzello, C. G. (2020). Production of the polyhydroxyalkanoate PHBV from ricotta cheese exhausted whey by *haloferax mediterranei* fermentation. *Foods*. 9(10):1459. doi:10.3390/FOODS9101459

Ramírez-Rivas, I. K. y Chávez-Martínez, A. (2017). Efecto del ultrasonido aplicado al suero de leche previo al calentamiento en la elaboración de requesón. *Interciencia*. 42(12):828-833.

Ramírez-Rivas, I., Gutiérrez, N., Rentería, A., Sánchez-Vega, R., Tirado, J., Santellano-Estrada, E., Arévalos, M. y Chávez, A. (2022a). Effect of Packaging and Salt Content and Type on Antioxidant and ACE-Inhibitory Activities in Requeson Cheese. *Foods*. 11(9):1264. doi:10.3390/foods11091264.

Ramírez-Rivas, I. K., Gutiérrez-Méndez, N., Rentería-Monterrubio, A. L., Sánchez-Vega, R., Tirado-Gallegos, J. M., Santellano-Estrada, E. y Chávez-Martínez, A. (2022b). Effect of different types and concentrations of salts added to Requeson cheese on texture, sensory, and physiochemical characteristics. *Journal of Food Processing and Preservation*. 46(4):e16336. doi:10.1111/jfpp.16336.

Rastall, R. (2006). Chapter 4: Galacto-oligosaccharides as prebiotic food ingredients. En: Gibson, G.R., Rastall, R.A. (Eds.), *Prebiotics: Development and Applications*. John Wiley, New York, p.p.: 101–109.

Rastall, R. (2010). Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annual Review of Food Science and Technology*. 1(1):305-339. doi:10.1146/annurev.food.080708.100746.

Rico-Díaz, A., Ramírez-Escudero, M., Vizoso-Vázquez, Á., Cerdán, M.E., Becerra, M. y Sanz-Aparicio, J. (2017). Structural features of *Aspergillus niger* β -galactosidase define its activity against glycoside linkages. *284(12):1815-1829*. doi: 10.1111/febs.14083.

Rico-Rodríguez, F., Strani, L., Grassi, S., Lancheros, R., Serrato, J. C. y Casiraghi, E. (2021). Study of Galactooligosaccharides production from dairy waste by FTIR and chemometrics as Process Analytical Technology. *Food and Bioproducts Processing*. 126(7-8):113–120. doi:10.1016/j.fbp.2020.12.009.

Rocha, J.M. y Guerra, A. (2020). On the valorization of lactose and its derivatives from cheese whey as a dairy industry by-product: an overview. *European Food Research and Technology*. 246(11):2161–2174. doi:10.1007/s00217-020-03580-2.

Rodríguez-Colinas, B. (2013). Obtención enzimática, caracterización y propiedades prebióticas de oligosacáridos empleados en leches infantiles. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Rodríguez-Colinas, B., De Abreu, M. A., Fernández-Arrojo, L., De Beer, R., Poveda, A., Jiménez-Barbero, J. y Ellipsis Plou, F.J. (2011). Production of galacto-oligosaccharides by the β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(19):10477–10484. doi:10.1021/jf2022012.

Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M. y Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*. 104(Suppl 2):S1-63. doi: 10.1017/S0007114510003363.

Robertson, D. E., Mathur, E. J., Swason, R. V., Marrs, B. L. y Short, J. M. (1996). The discovery of new biocatalysts from microbial diversity. *SIM News*. 46:1-8.

Ruiz-Marroquín, J.A. (2006). Efectos de la acidez sobre las características sensoriales, fisicoquímicas y rendimiento del requesón de lactosuero de queso crema. Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Agroindustria en el Grado Académico de Licenciatura. Honduras.

Sangwan, V., Tomar, S.K., Singh, R.R.B. y Ali, B. (2011). Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. *Journal of Food Science*. 6(4):R103-R111. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02131.x.

Sass, A-C. y Jördening H-J. (2020). Immobilization of β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae* on Electrospun Gelatin Nanofiber Mats for the Production of Galactooligosaccharides. *Applied of Biochemistry and Biotechnology*. 191(3):1155-1170. doi: 10.1007/s12010-020-03252-7.

Sears, P. y Wong, C.H. (2001). Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins. *Science*. 291(5512):2344-50. doi: 10.1126/science.1058899.

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2022). Convoca agricultura a impulsar el consumo de leche en México. Consultado el 11 de febrero 2023. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/convoca-agricultura-a-impulsar-el-consumo-de-leche-en-mexico#:~:text=De%20acuerdo%20con%20cifras%20del,toneladas%20de%20un%20a%C3%B1o%20atr%C3%A1s>.

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2016). Quesos mexicanos genuinos, delicias que nos distinguen. Consultado el 11 de febrero 2023. Disponible en:

<https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/quesos-mexicanos-genuinos-delicias-que-nos-distinguen#:~:text=Se%20estima%20que%20en%20M%C3%A9xico,y%20rueda%20%20entre%20muchos%20otros.>

Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2022). Escenario mensual de productos agroalimentarios. Consultado el 11 de febrero 2023. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/744355/Leche de bovino Junio.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/744355/Leche_de_bovino_Junio.pdf).

Seibel, J. y Buchholz, K. (2010). Chapter 4-Tools in oligosaccharide synthesis: current research and application. *Advances in Carbohydrate Chemistry Biochemistry*. 63:101-38. doi: 10.1016/S0065-2318(10)63004-1.

Shoaf, K., Mulvey, G.L., Armstrong, G.D. y Hutkins, R.W. (2006). Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infection and Immunity*. 74(12):6920–8. doi: 10.1128/IAI.01030-06.

Sigma-Aldrich. Product Specification. Consultado el 13 de marzo 2023. Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/specification-sheets/194/640/G5160-BULK____SIGMA____.pdf.

Sigma-Aldrich. Product Specification. Consultado el 13 de marzo 2023. Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/specification-sheets/674/508/G3153-BULK____SIGMA____.pdf.

Sik, B., Buzás, H., Kapcsándi, V., Lakatos, E., Daróczi, F. y Székelyhidi, R. (2023). Antioxidant and polyphenol content of different milk and dairy products. *Journal of King Saud University- Science*. 35(4):102839. doi: 10.1016/j.jksus.2023.102839.

Silva, G.S., da Costa Castro, C.D.P., Borges, G.S.C., de Freitas, S.T., Aidar, S.T., Biasoto, A.C.T., Rybka, A.C.P. y Cardarelli, H.R. (2023). Physicochemical and functional properties of new sports drink with ricotta cheese whey and a brazilian passion fruit variety. *Journal of Food Science and Technology*. 60(2):538–548. doi:10.1007/s13197-022-05636-5.

Simovic, M., Milivojevic, A., Corovic, M., Banjanac, K. y Bezbradica, D. (2019). Whey valorization using transgalactosylation activity of immobilized β -galactosidase. *International Journal of Food Science and Technology*. 54(11): 3074 – 3082. doi:10.1111/ijfs.14222.

Smithers, G. (2008). Whey and whey proteins—From “gutter-to-gold”. *International Dairy Journal*. 18(7):695– 704. doi:10.1016/j.idairyj.2008.03.008.

Spalatel, C. (2012). Biotechnological valorisation of whey. *Innovative Romanian Food Biotechnology*. 10:1-8.

Souza, A.F.C.E., Gabardo, S. y Coelho, R.J.S. (2022) Galactooligosaccharides: Physiological benefits, production strategies, and industrial application. *Journal of Biotechnology*. 20(359):116-129. doi: 10.1016/j.jbiotec.2022.09.020.

Suh, M.G., Hong, Y.H., Jung, E.Y. y Suh, H.J. (2019). Inhibitory effect of galactooligosaccharide on skin pigmentation. *Preventive Nutrition and Food Science*. 24(3):321–6. doi: 10.3746/pnf.2019.24.3.321.

Tanaka, H. y Suzuki, K. (1975). Lactosylceramide beta-galactosidase in human sphingolipidoses. Evidence for two genetically distinct enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*. 250(6): 2324-32. doi:10.1016/S0021-9258(19)41720-1.

Tapia, C. e Iturrieta, C. (2020). Comercio exterior de quesos. Oficina De Estudios y Políticas Agrarias – ODEPA. Ministerio De Agricultura. Chile.

The CAZypedia Consortium. (2018). Ten years of CAZypedia: a living encyclopedia of carbohydrate active enzymes. *Glycobiology*. 28(1):3–8. doi: 10.1093/glycob/cwx089.

Thøgersen, M.S., Christensen, S.J., Jepsen, M., Pedersen, L.H. y Stougaard, P. (2020). Transglycosylating β -d-galactosidase and α -l-fucosidase from *Paenibacillus* sp. 3179 from a hot spring in East Greenland. *MicrobiologyOpen*. 9(3):e980. doi: 10.1002/mbo3.980.

Toba, T., Yokota, A. y Adachi, S. (1985). Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry*. 16(2):147-162. doi:10.1016/0308-8146(85)90008-1.

Tomal, A.A.B., Cunha, M.E.T., Bosso, A., Youssef, E.Y. y Suguimoto, H.H. (2015). Avanços Tecnológicos na Obtenção, Purificação e Identificação de Galactooligossacarídeos e Estudo de suas Propriedades Prébióticas. *UNOPAR, científica ciências biológicas e da saúde*. 12(4):41–49. doi:10.17921/24478938.2010v12n4p%25p.

Torres, D., Goncalves, M., Teixeira, J. y Rodrigues, L. (2010). Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications and significances as prebiotics. *Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety*. 9:438-454. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x.

Urrutia, P., Rodríguez-Colinas, B., Fernandez-Arrojo, L., Ballesteros, A.O., Wilson, L., Illanes, A. y Plou, F.J. (2013). Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal and Agriculture Food Chemistry*. 61(5):1081–7. doi: 10.1021/jf304354u.

Valencia-Denicia, E. y Ramírez-Castillo, M. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos*. 16(73):27-31.

Vera, C., Córdova, A., Aburto, C., Guerrero, C., Suárez, S. e Illanes, A. (2016). Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32(197). doi:10.1007/s11274-016-2159-4.

Vera, C., Guerrero, C., Illanes A. y Conejeros, R. (2011). A pseudo steady-state model for galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 108(10):2270 - 9. doi: 10.1002/bit.23201.

Vera, C., Guerrero, C., Conejeros, R., e Illanes, A. (2012). Synthesis of galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. *Enzyme and Microbial Technology*. 50(3):188–194. doi:10.1016/j.enzmictec.2011.12.003.

Vera, C. e Illanes, A. (2016). Lactose-Derived Nondigestible Oligosaccharides and Other High Added-Value Products. En: *Lactose-Derived Prebiotics. A Progress Perspective*. doi:10.1016/B978-0-12-802724-0.00003-2.

Vera, C., Guerrero, C. e Illanes, A. (2022). Galacto-oligosacáridos. En: Jafari, SM, Rashidinejad, A., Simal-Gandara, J. (eds) *Manual de ingredientes bioactivos alimentarios*. Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-030-81404-5_33-1.

Villarruel-López, A., Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C.A., Nuño, K., Torres-Vitela, M.R., Martínez-González, N.E., y Garay-Martínez, L.E. (2016). Indicator microorganisms, Salmonella, Listeria monocytogenes, Staphylococcal enterotoxin, and physicochemical parameters in requesón cheese. *African Journal of Food Science and Technology*. 10(9):178-184. doi:10.5897/AJFS2016.1473.

Walstra, P., Wouters, J.T.M., y Geurts, T.J. (2005). Chapter 25: Cheese ripening and properties. En *CRC Press (Ed). Dairy Science and Technology (2nd ed)*. doi: 10.1201/9781420028010.

Wang, G., Zhu, J., Liu, L., Yaqoob, M. U., Pei, X., Tao, W., Xiao, Z., Sun, W. y Wang, M. (2020). Optimization for galactooligosaccharides synthesis: A potential alternative for gut health and immunity. *Life Sciences*. 245:117353. doi:10.1016/j.lfs.2020.117353.

Whitaker, J., (1994). *Principles of enzymology for the food science*. Second edition, edit Marcel Dekker, Inc., New York, New York. doi:10.1201/9780203742136.

Wu, Y., Yuan, S., Chen, S., Wu, D., Chen, J. y Wu, J. (2013). Enhancing the production of galacto-oligosaccharides by mutagenesis of *Sulfolobus solfataricus* β -galactosidase. *Food Chemistry*. 138(2-3):1588–1595. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.052.

Yadav, J.S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R.D. y Surampalli, R.Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*. 33(6 Pt. 1):756-74. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.07.002.

Yañez-Ñeco, C., Cervantes, F., Amaya-Delgado, L., Ballesteros, A., Plou, F. y Arrizon, J. (2021). Synthesis of β (1 \rightarrow 3) and β (1 \rightarrow 6) galactooligosaccharides from lactose and whey using a recombinant β -galactosidase from *Pantoea anthophila*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 49:14-21. doi: 10.1016/j.ejbt.2020.10.004.

Yin, H., Bultema, J.B., Dijkhuizen, L. y Van Leeuwen, S.S. (2017). Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the β -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. *Food Chemistry*. 225:230-238. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.030.

Yu, L. y O'Sullivan, D.J. (2014). Production of galactooligosaccharides using a hyperthermophilic β -galactosidase in permeabilized whole cells of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Science*. 97(2):694 – 703. doi: 10.3168/jds.2013-7492.

Zerva, A., Limnaios, A., Kritikou, A.S., Thomaidis, N.S., Taoukis, P. y Topakas, E. (2021). A novel thermophile β -galactosidase from *Thermothielavioides terrestris* producing galactooligosaccharides from acid whey. *New Biotechnology*. 25(63):45-53. doi: 10.1016/j.nbt.2021.03.002.

Zheng, P., Yu, H., Sun, Z., Ni, Y., Zhang, W., Fan, Y. y Xu, Y. (2006). Production of galactooligosaccharides by immobilized recombinant β -galactosidase from *Aspergillus candidus*. *Biotechnology Journal*. 1(12):1464-1470.

12. Anexos

Curvas patrón

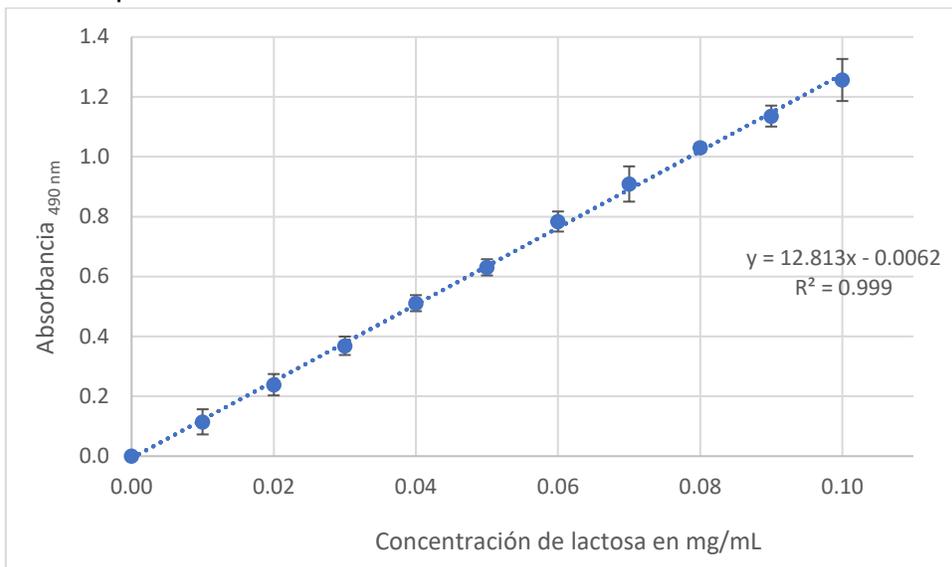


Figura 1a. Curva patrón para el método de DuBois con lactosa como estándar.

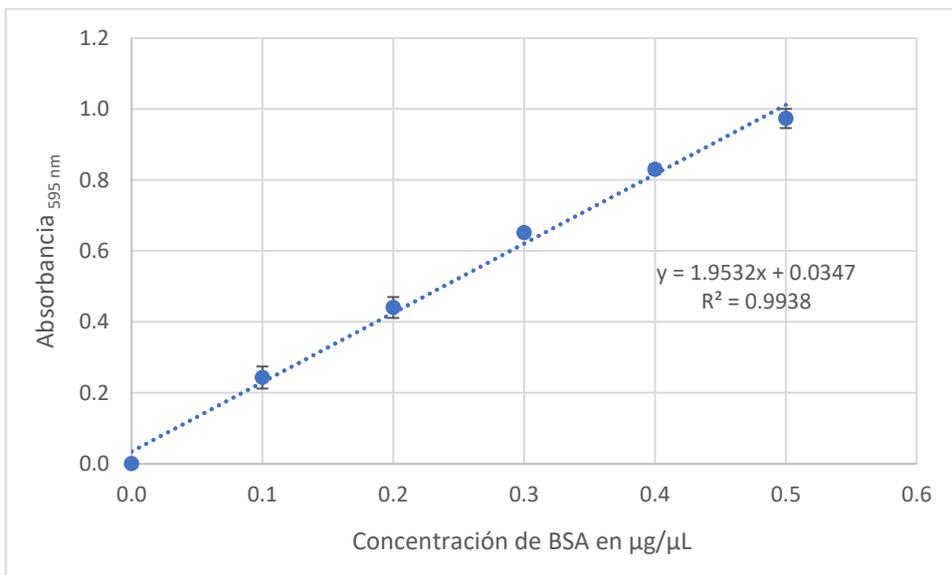


Figura 2a. Curva patrón para Bradford con BSA como estándar.

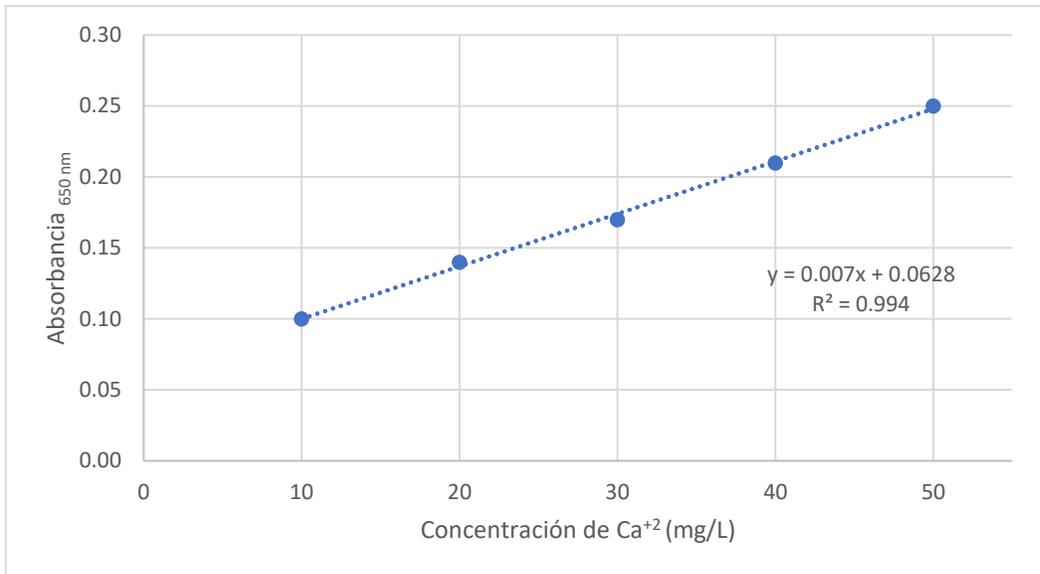


Figura 3a. Curva patrón para la determinación de calcio.

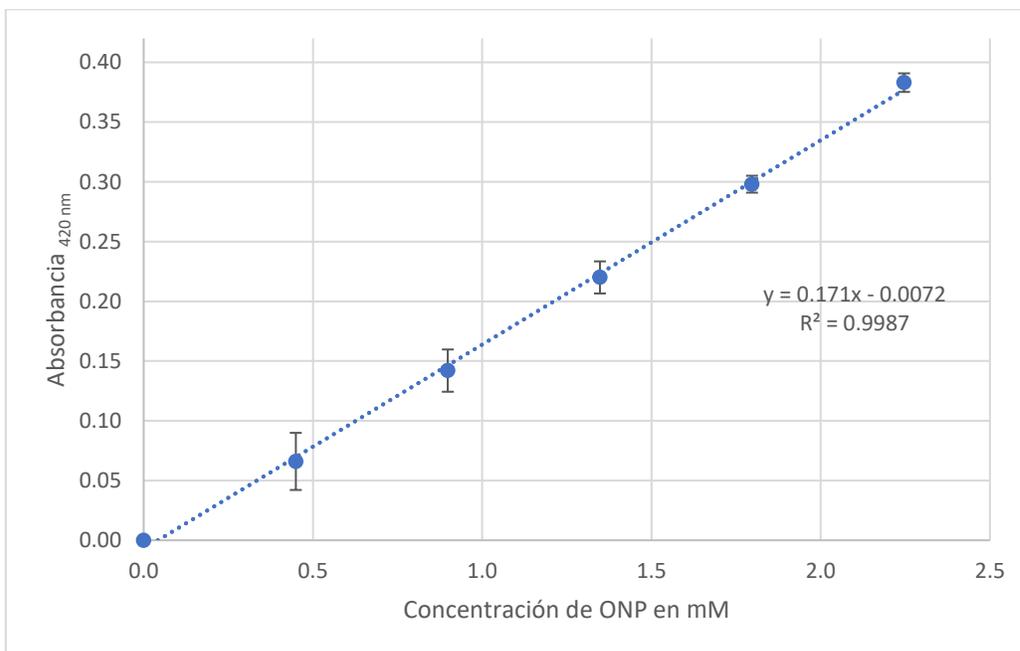


Figura 4a. Curva patrón de ONP diluido en buffer de acetatos pH 4.5.

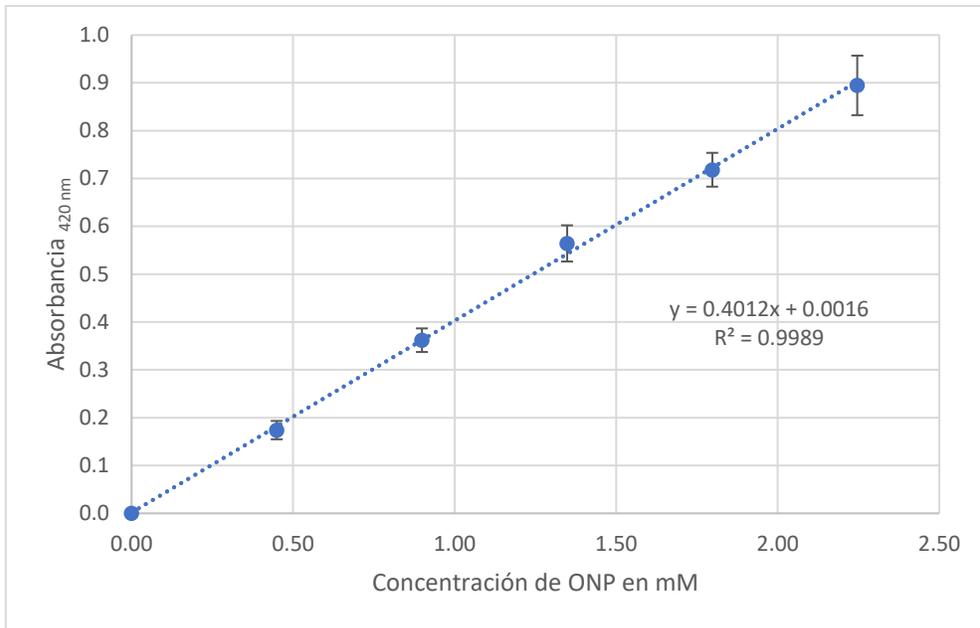


Figura 5a. Curva patrón de ONP diluido en buffer de fosfatos de potasio pH 6.

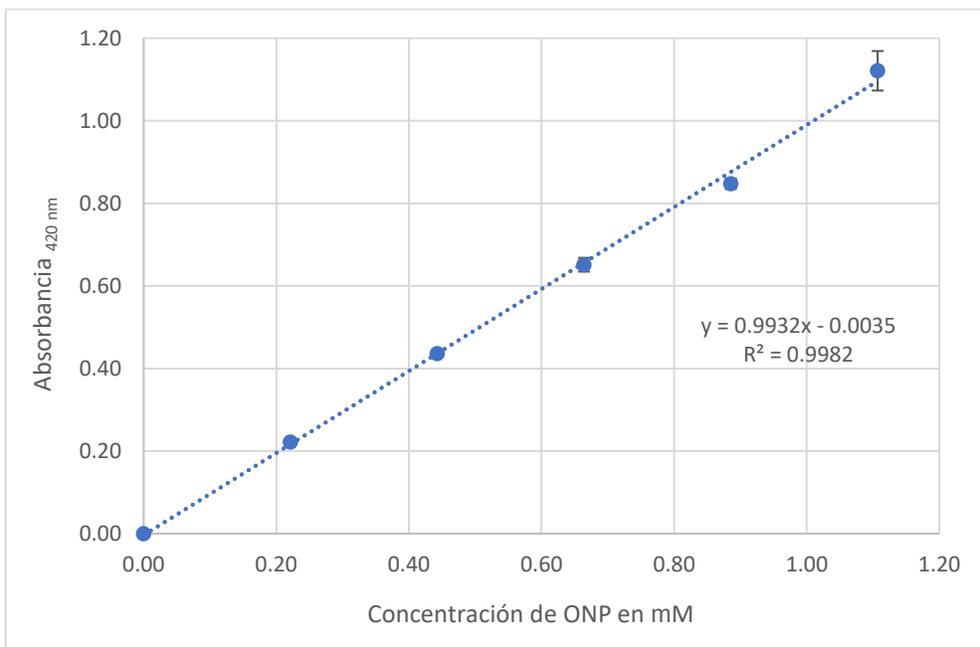


Figura 6a. Curva patrón de ONP diluido en buffer de fosfatos de sodio pH 6.5.

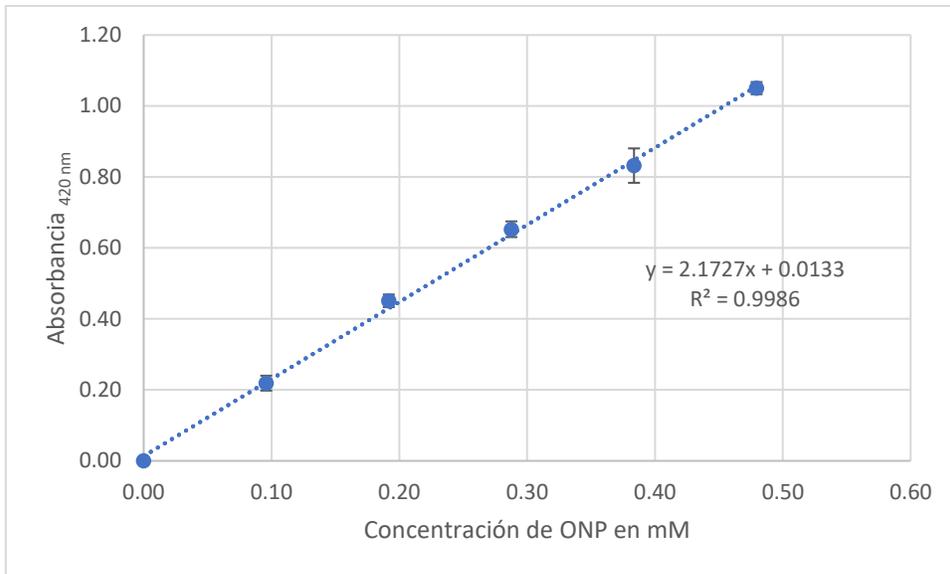


Figura 7a. Curva patrón de ONP diluido en buffer de fosfatos de potasio pH 7.3.

CROMATOGRAMAS

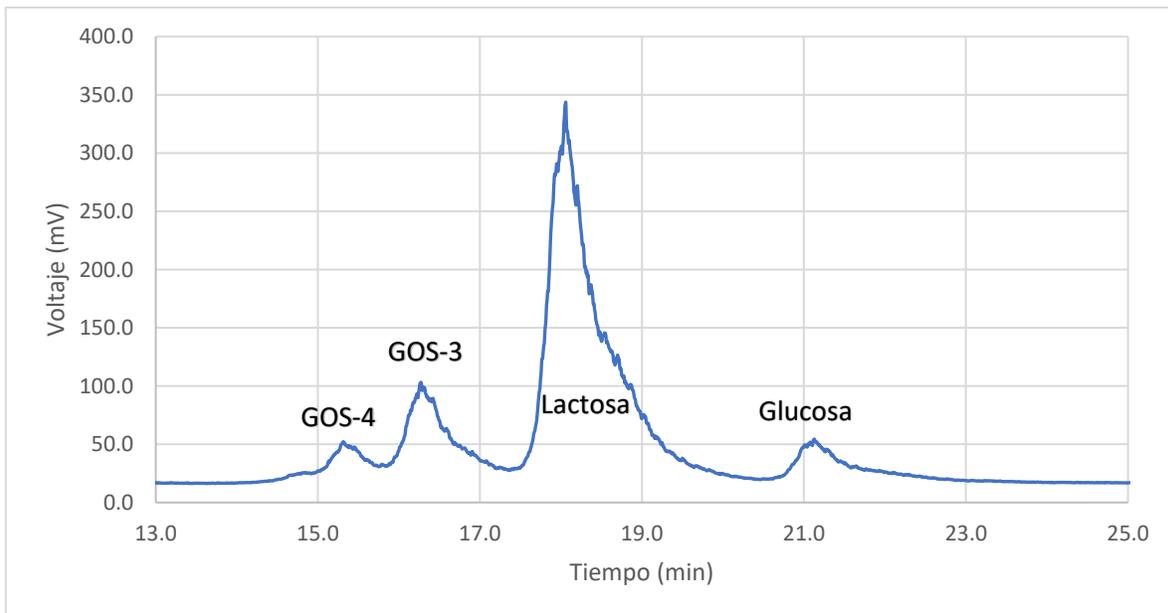


Figura 8a. Cromatograma del estándar oligomato.

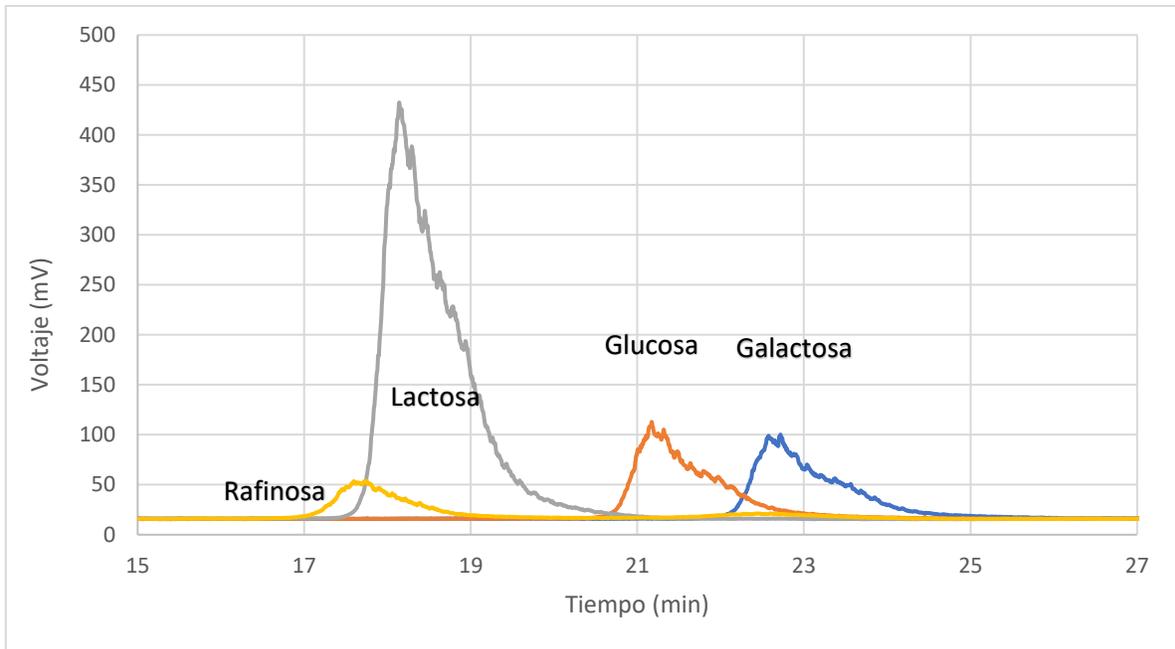


Figura 9a. Cromatograma tipo de los estándares galactosa, glucosa, lactosa y rafinosa.

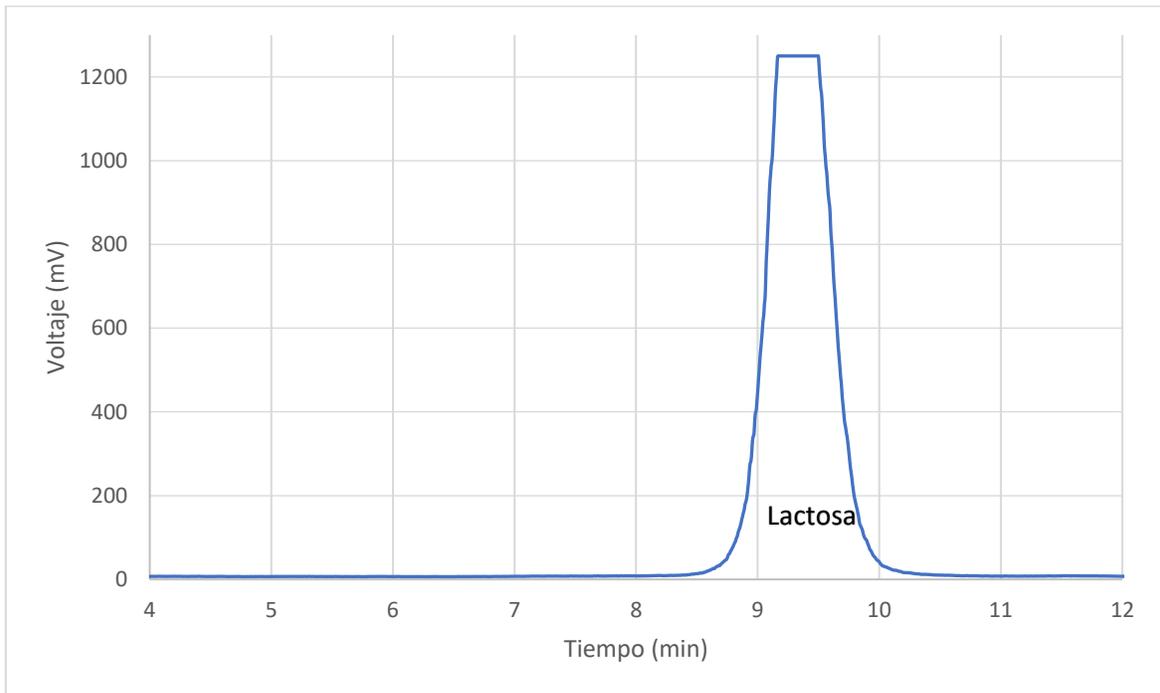


Figura 10a. Análisis del suero de requesón por HPLC.

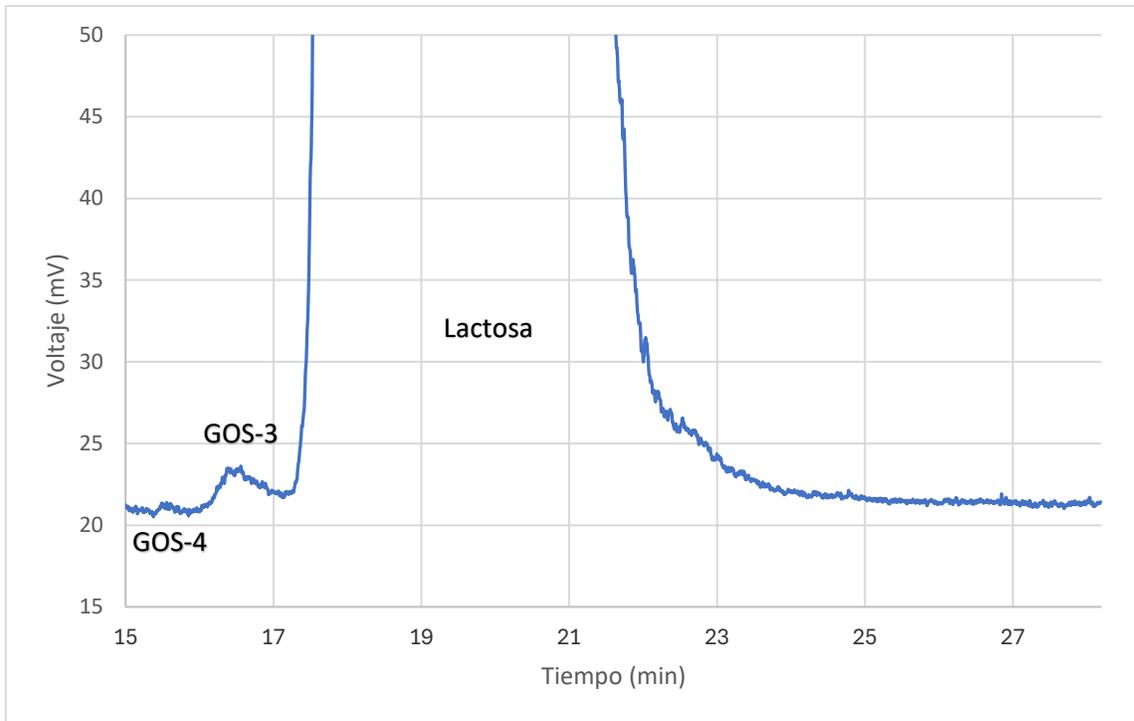


Figura 11a. Cromatograma tipo de la reacción de transgalactosilación con la β -GAL de *K. lactis* a las 6 h (dilución 1/10).

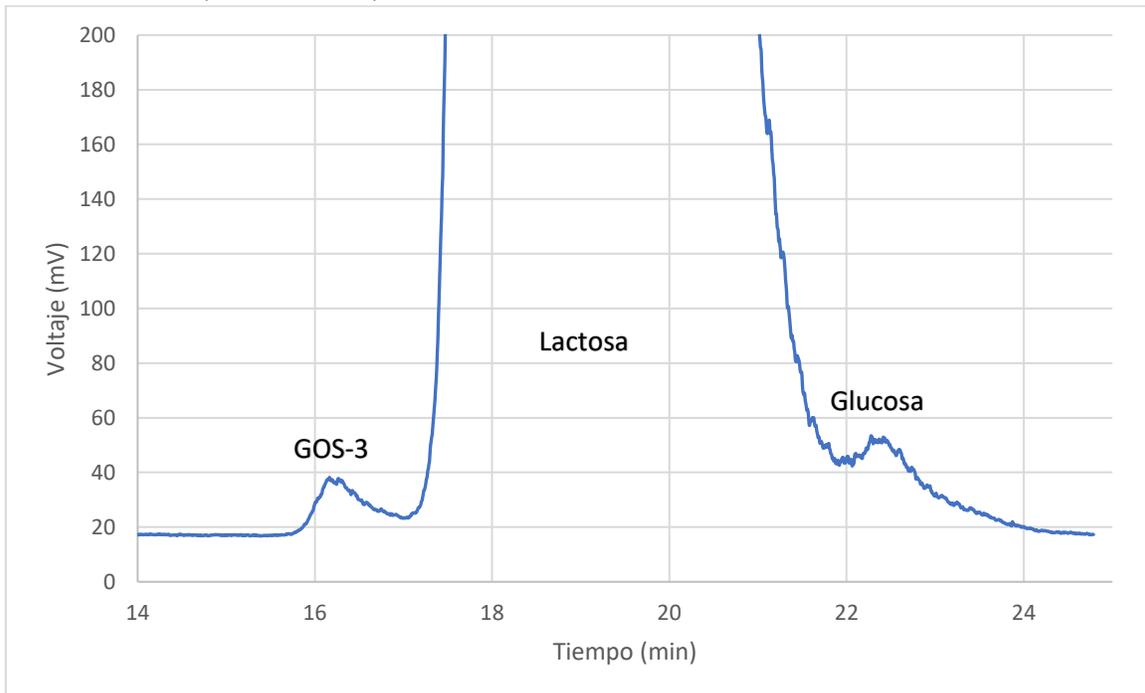


Figura 12a. Cromatograma tipo de la reacción de transgalactosilación con la β -GAL de *E. coli* a las 6 h (dilución 1/10).

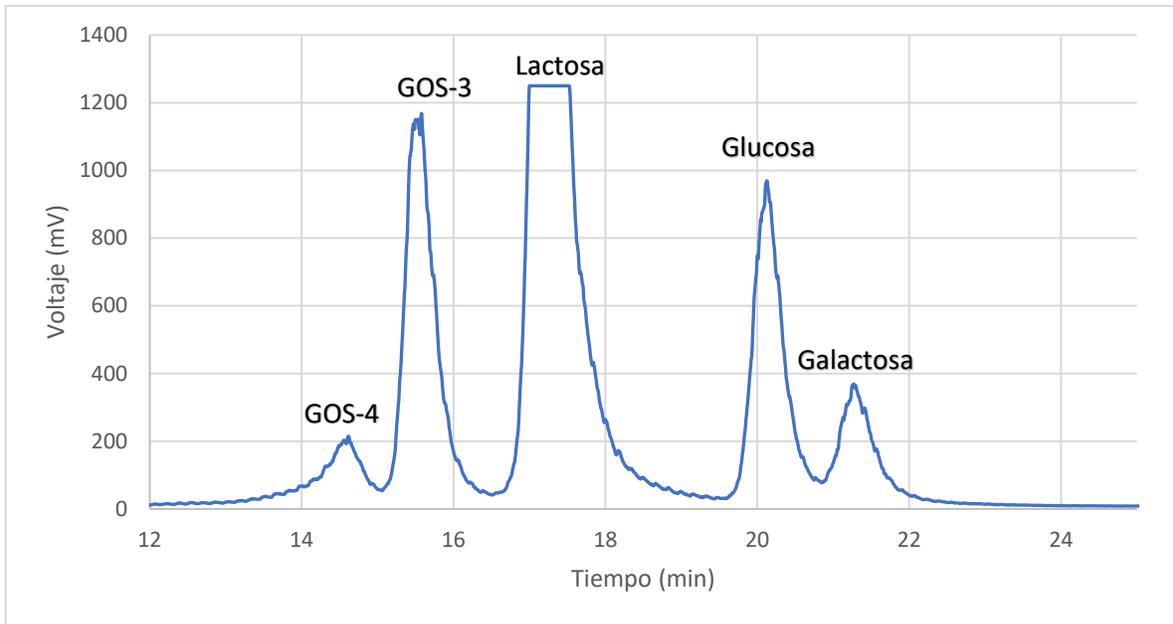


Figura 13a. Cromatograma tipo de la reacción de transgalactosilación con la glicosidasa GLY 001-02 a las 30 h diluida 1/25.

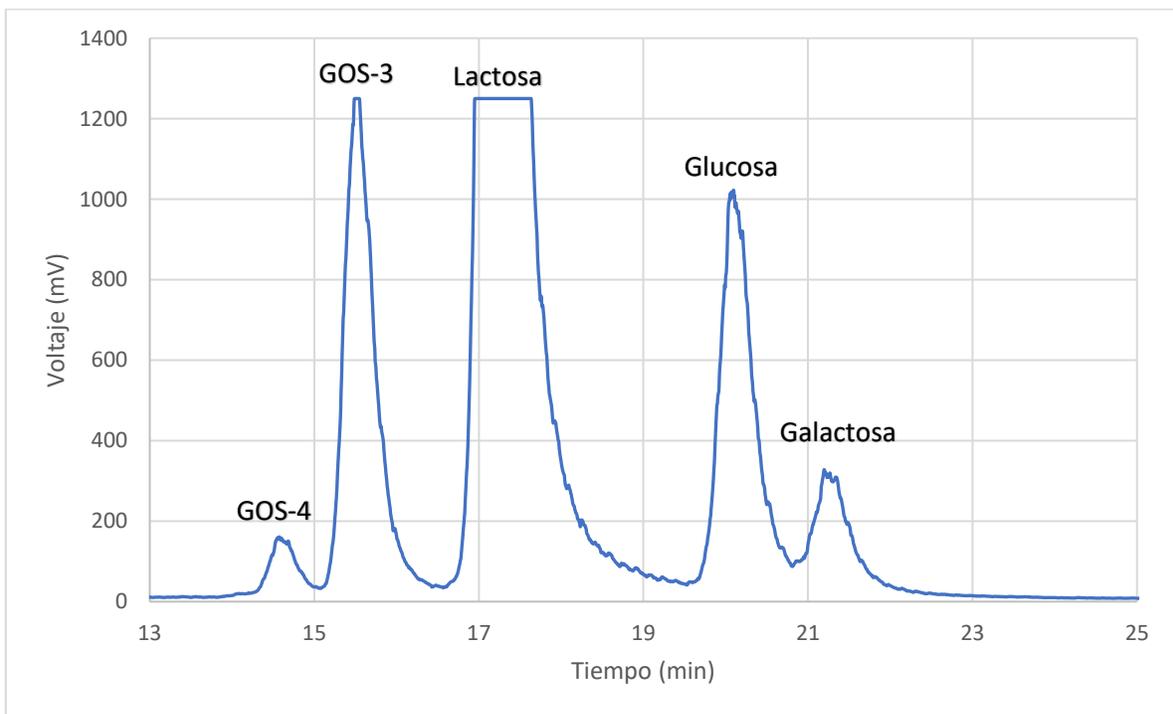


Figura 14a. Cromatograma de la reacción de transgalactosilación con la β -GAL de *A. oryzae* a las 30 h (dilución 1/25).

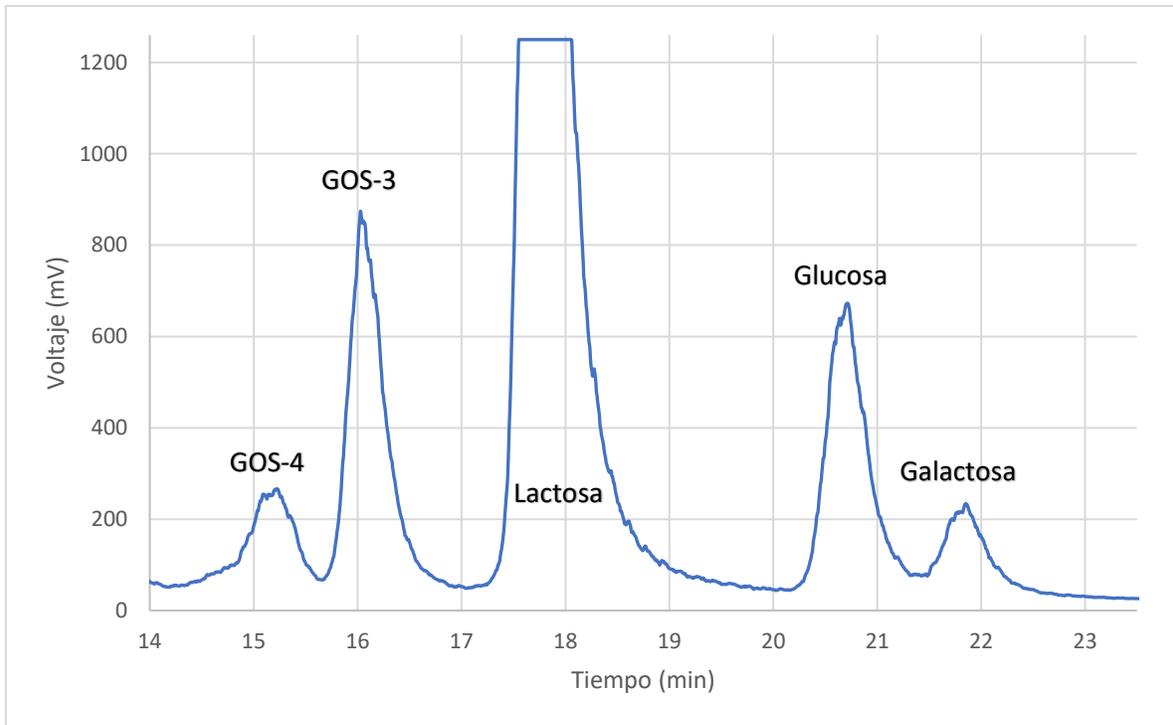


Figura 15a. Cromatograma de la reacción de transgalactosilación en suero de requesón con la β -GAL de *A. oryzae* a las 24 h (dilución 1/50).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00310

Matrícula: 2223801930

Utilización del suero de requesón para la obtención de galactooligosacáridos utilizando β -galactosidasas

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 30 del mes de octubre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO
DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES
DRA. MONICA ALEJANDRA ROBLES ARIAS
DR. FRANCISCO JAVIER GUZMAN RODRIGUEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: MARIA DE JESUS GRANADOS MARTINEZ



MARIA DE JESUS GRANADOS MARTINEZ
ALUMNA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO

VOCAL

DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES

VOCAL

DRA. MONICA ALEJANDRA ROBLES ARIAS

SECRETARIO

DR. FRANCISCO JAVIER GUZMAN
RODRIGUEZ

Con base en la facultad que me otorga el Acuerdo 9/2002 del Rector General que formaliza la creación, estructura orgánica funciones de la Dirección de Sistemas Escolares, apartado Tercero, incisos k), l) y s), y de conformidad con la información y documentos escolares que integran el expediente de GRANADOS MARTINEZ MARIA DE JESUS con matrícula 2223801930, la denominación correcta de la idónea comunicación de resultados es "Utilización del suero de requesón para la obtención de galactooligosacáridos utilizando β -galactosidasas", lo cual se aclara para los efectos legales ha que haya lugar.



Mtra. Rosalía Serrano de la Paz
Directora de Sistemas Escolares