



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Producción y caracterización de galactooligosacáridos a partir de permeado de suero dulce tratado con β -galactosidasa y su aplicación en el desarrollo de una bebida”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

Silvana Esther López Hernández

Dirigido por

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Querétaro, Qro. a Noviembre, 2024.

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Producción y caracterización de galactooligosacaridos a partir de suero dulce tratado con β -galactosidasa y su aplicación en el desarrollo de una bebida”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

Silvana Esther López Hernández

Dirigido por

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Presidente

Dr. Eduardo Castaño Tostado

Secretario

Dr. Carlos Regalado González

Sinodal

Dra. Flor de María Ascensión González Cataño

Suplente

Dra. Lucía Guadalupe Abadía García

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre, 2024
México

AGRADECIMIENTOS

A Dios por rodearme de familiares, amigos, compañeros y asesores que me han apoyado en todo este proceso y han sido mi soporte para no rendirme hasta la conclusión de esta etapa en mi vida.

A mi familia por el apoyo incondicional en todos los sentidos de mi vida y brindarme alegrías que me apoyaron a sobrellevar todas las adversidades. Destacando principalmente a mis padres (Israel y Margarita) y a mis hermanos (Fátima, Maximiliano y Santiago).

A la Dra. Silvia Amaya por su asesoramiento, disposición, confianza, libertad y apoyo en todo lo necesario para la elaboración de este trabajo y en mi crecimiento profesional. Gracias por permitirme asistir y presentar por primera vez en un congreso.

A los miembros de mi comité por aportar sus valiosos conocimientos, experiencia y observaciones durante el desarrollo de este trabajo. A los doctores Carlos Regalado y Eduardo Castaño porque siempre que lo requerí, tuvieron disposición para atender mis dudas. Y a las doctoras Lucia Abadía y Flor González por acompañarme en parte de la experimentación y brindarme acompañamiento cuando lo requerí, además de la constante revisión en el avance del proyecto que recibí por parte de la doctora Lucia.

A mis compañeros de la maestría, tanto del laboratorio IDEA como de otros laboratorios, por hacer amena mi estancia en el laboratorio. Gracias a ustedes no decaí ante el estrés que muchas veces me generaron los obstáculos de la experimentación. Con mención especial a mis amigas incondicionales, Lulú y Naye, que me apoyaron en más de un sentido.

A la Dra. Sofía Arvizu, mi tutora asignada, porque siempre estuvo al pendiente en cómo me encontraba de manera personal y profesional.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Facultad de Química por las instalaciones, equipos, recursos, conocimientos y la oportunidad brindada a formar parte del programa.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada.

A todos mis amigos externos a la maestría porque a pesar de tener constante o distante contacto, siempre he contado con su apoyo y amistad.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'S. López Hernández', written in a cursive style.

Silvana Esther López Hernández

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTEDECENTES	3
2.1. Suero de leche	7
2.1.1. Carbohidratos	8
2.1.1.1. Lactosa	8
2.1.1.2. Galactooligosacáridos (GOS)	10
2.1.2. Impacto económico (nacional e internacional)	12
2.1.3. Impacto ambiental	14
2.2. β -galactosidasa (β -gal)	16
2.2.1. Estructura	16
2.2.2. Mecanismos de reacción	17
2.2.3. Aplicaciones en el área de alimentos	19
2.3 Ultrasonido (US)	20
2.4. Bebidas de suero	22
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo general	28
4.2. Objetivos específicos	28
5. METODOLOGÍA	29
5.1. Producción y caracterización de suero dulce (SD) y permeado de suero dulce (PSD)	29
5.1.1. Obtención de SD a partir de la producción de queso panela	29
5.1.2. Ultrafiltración	29

5.1.3. Análisis fisicoquímicos	29
5.1.3.1. pH	29
5.1.3.2. Humedad y sólidos totales (ST)	29
5.1.3.3. Azúcares reductores (AR)	30
5.1.3.4. Proteína	30
5.1.3.4.1. Método Kjeldahl	30
5.1.3.4.2. Método Bradford	31
5.2. Efecto del US en el rendimiento y la composición de GOS producidos	32
5.2.1. Determinación de la actividad enzimática	32
5.2.2. Desmineralización de PSD	32
5.2.3. Hidrólisis y transgalactosilación de lactosa con β -gal	32
5.2.4. Cuantificación	33
5.2.5. Caracterización	33
5.3. Formulación de una bebida a base de permeado de suero dulce reaccionado (PSDR) y evaluación de su calidad	34
5.3.1. Análisis microbiológicos	34
5.3.1.1. Coliformes	35
5.3.1.2. Hongos y levaduras	35
5.3.1.3. Mesófilos aerobios	35
5.3.2. Evaluación sensorial	35
5.3.3. Evaluación de la calidad del producto final	36
5.3.3.1. Análisis fisicoquímicos	36
5.3.3.1.1. pH	36
5.3.3.1.2. Acidez titulable	36
5.3.3.1.3. Grados Brix	37
5.3.3.1.4. Actividad de agua (A_w)	37
5.3.3.1.5. AR	37
5.3.3.2. Bromatológicos	37
5.3.3.2.1. Humedad	37
5.3.3.2.2. Cenizas	37
5.3.3.2.3. Grasa	38

5.3.3.2.4. Proteína	38
5.3.3.2.5. Fibra dietética	39
5.3.3.2.6. Carbohidratos	39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1. Obtención y caracterización de SD y PSD	40
6.2. Efecto del US en el rendimiento y la composición de GOS producidos	40
6.2.1. Efecto de la aplicación del US en los productos de la reacción	40
6.2.2. Caracterización de los productos de la reacción	45
6.3. Formulación de una bebida a base de PSDR y evaluación de su calidad	60
6.3.1. Análisis microbiológicos	61
6.3.2. Evaluación sensorial	62
6.3.3. Evaluación de la calidad del producto final	64
6.3.3.1. Análisis fisicoquímicos	64
6.3.3.2. Análisis bromatológicos	65
7. CONCLUSIONES	68
8. REFERENCIAS	69
ANEXOS	83

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición de suero	8
2	Resumen de nuevas bebidas a base de suero	22
3	Tratamientos para la reacción con β -gal	33
4	Formulaciones evaluadas de la bebida	34
5	Caracterización fisicoquímica de SD y PSD	40
6	Disacáridos (DS) y GOS presentes en permeado nativo (PN)	46
7	DS y GOS presentes en permeado ajustado antes de la reacción (PAR)	49
8	DS y GOS presentes en permeado no sonificado (PNS)	53
9	DS y GOS presentes en permeado sonificado (PS)	56
10	Resultados microbiológicos de las 4 formulaciones de bebida	62
11	Parámetros fisicoquímicos de la bebida	64
12	Parámetros bromatológicos de la bebida	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Valor de mercado del queso a nivel mundial de 2019 a 2027	4
2	Producción anual de queso a nivel mundial de 2015 a 2022	4
3	10 principales productores de queso en 2020	5
4	Consumo anual de queso a nivel mundial en 2022, por país	5
5	Diagrama general del proceso de producción de queso	7
6	Utilización integrada de suero lácteo en la producción de β -gal y la síntesis de GOS seguida de purificación	12
7	Valor del mercado mundial de proteína de suero del 2021 al 2029	13
8	Mercado global de proteína de suero en 2021, por tipo	13
9	Segmento de aplicación de la proteína de suero en el periodo 2021-2029	14
10	Balance actual de la utilización global de suero	15
11	Estructura del tetrámero de β -gal	17
12	Mecanismos de reacción de β -gal con lactosa como sustrato	18
13	Rendimiento de GOS producidos a lo largo de la reacción. LS=lactosa en buffer con sonicación, LNS=lactosa en buffer sin sonicación, PS=permeado con sonicación, PNS=permeado sin sonicación.	42

14	Contenido de lactosa a lo largo de la reacción. LS=lactosa en buffer con sonicación, LNS=lactosa en buffer sin sonicación, PS=permeado con sonicación, PNS=permeado sin sonicación.	43
15	Contenido de glucosa a lo largo de la reacción. LS=lactosa en buffer con sonicación, LNS=lactosa en buffer sin sonicación, PS=permeado con sonicación, PNS=permeado sin sonicación.	44
16	Contenido de galactosa a lo largo de la reacción. LS=lactosa en buffer con sonicación, LNS=lactosa en buffer sin sonicación, PS=permeado con sonicación, PNS=permeado sin sonicación.	45
17	Bebida producida a base de permeado reaccionado con β -gal durante 90 min, con aplicación de US (40% amplitud, pulsado en un ciclo de 3 s “encendido” y 27 s “apagado”).	61
18	Calificaciones asignadas durante la evaluación sensorial de las 4 formulaciones de bebida. 267= 80% permeado y 0.25% enmascarante, 351= 50% permeado y 0.25% enmascarante, 542= 50% permeado y 0.1% enmascarante, 729= 80% permeado y 0.1% enmascarante.	62
19	Muestras más y menos preferidas en la evaluación sensorial de las 4 formulaciones de bebida. 267= 80% permeado y 0.25% enmascarante, 351= 50% permeado y 0.25% enmascarante, 542= 50% permeado y 0.1% enmascarante, 729= 80% permeado y 0.1% enmascarante.	63

RESUMEN

El suero de leche es el mayor subproducto en la elaboración de queso, aproximadamente el 90% de leche empleada es recuperada como suero. En México el suero desechado se considera un contaminante importante debido a que para su oxidación son requeridas altas cantidades de oxígeno, esto derivado de su contenido de lactosa, además de que contiene nutrientes que son desperdiciados. Se han propuesto estrategias para aprovechar sus componentes primordiales, lactosa y proteínas, mediante su transformación en compuestos más digeribles y de funcionalidad biológica y/o tecnológica. Los galactooligosacáridos (GOS), compuestos considerados prebióticos, se obtienen mediante la reacción de transgalactosilación de la lactosa con la enzima β -galactosidasa (β -gal), en condiciones específicas dependientes de la fuente de la enzima. Investigaciones han buscado mejorar el rendimiento de producción de GOS, mediante estudios de cinética enzimática con condiciones variables y el uso de tecnologías emergentes, como el ultrasonido (US), para asistir la reacción pero no hay mucha información disponible de los compuestos formados. Por todo lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron la síntesis de GOS asistida por US a partir de lactosa de permeado de suero dulce (PSD) utilizando β -gal, para aumentar el valor biológico y el rendimiento de la reacción; la caracterización cromatográfica de los productos de reacción, y el desarrollo de una bebida potencialmente prebiótica por su contenido de PSD reaccionado (PSDR) con presencia de GOS. Al utilizar US para asistir la reacción y PSD como sustrato, aumentaron los rendimientos de producción de GOS en aproximadamente 10-12%. Se utilizó el PSDR con mayor producción de GOS (el reaccionado por 90 min con US) para el desarrollo de la bebida, evaluando distintas formulaciones donde se variaron las cantidades de PSDR y enmascarante de sabor. La combinación preferida por los panelistas en la evaluación sensorial fue la que tenía 80% PSDR y 0.25% enmascarante (saborizante de menta), debido a un adecuado equilibrio entre el sabor dulce y fresco. Adicionalmente, mediante cromatografía de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS) se identificaron los compuestos formados en PSDR, destacando GOS de 3, 4 y 5 unidades, así como los disacáridos alolactosa y 6-galactobiosa.

Palabras clave: bebida, galactooligosacáridos, lactosa, suero, β -galactosidasa.

ABSTRACT

Whey is the largest byproduct in cheese production, with approximately 90% of the milk used being recovered as whey. In Mexico, discarded whey is considered a significant pollutant because its oxidation requires large amounts of oxygen, due to its lactose content, as well as containing nutrients that are wasted. Different strategies have been proposed to utilize its key components, lactose and proteins, by transforming them into more digestible compounds with biological and/or technological functionality. Galactooligosaccharides (GOS), compounds regarded as prebiotics, are obtained through the transgalactosylation reaction of lactose with the enzyme β -galactosidase (β -gal), under specific conditions dependent on the enzyme source. Research has aimed to improve the production yield of GOS through enzymatic kinetics studies with variable conditions and the use of emerging technologies, such as ultrasound (US), to assist the reaction. However, there is limited information available about the compounds formed. Given all of the above, the objectives of this work were the US-assisted synthesis of GOS from lactose from sweet whey permeate (SWP) using β -gal, to increase the biological value and yield of the reaction; to chromatographically characterize the reaction products; and to develop a potentially prebiotic beverage due to its content of reacted sweet whey permeate (RSWP) with GOS content. By using US to assist the reaction and employing SWP as a substrate, GOS production yields increased by approximately 10-12%. The RSWP with the highest GOS production (reacted for 90 min with US) was used for beverage development, evaluating different formulations where the amounts of RSWP and flavor masking agent were varied. The preferred combination by the panelists in the sensory evaluation was the one with 80% RSWP and 0.25% masking agent (mint flavoring), due to a suitable balance between sweet and fresh flavors. Additionally, through ultra-high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS), the compounds formed in RSWP were identified, highlighting GOS with 3, 4, and 5 units, as well as the disaccharides allolactose and 6-galactobiose.

Keywords: beverage, galactooligosaccharides, lactose, whey, β -galactosidase.

1. INTRODUCCIÓN

El suero es el subproducto más importante obtenido por la industria láctea. Se estima que se producen alrededor de 9 L de suero por cada kg de queso, equivalente a una producción global de suero de alrededor 200 millones de toneladas (Carvalho et al., 2013; Domingos et al., 2018). Debido a su alto valor nutricional, se ha fomentado su valorización. Cerca del 50% del suero generado en países desarrollados se aprovecha como fuente de compuestos valiosos (como proteínas de gran valor biológico, lactosa, ácido láctico y minerales) para la industria alimentaria o farmacéutica. Pese a esto, aún se desperdicia en gran cantidad, promoviendo la contaminación ambiental debido a su considerable carga orgánica, causada principalmente por su alto contenido de lactosa (35-50 g/L), lo que desencadena en sus altas demandas biológica (DBO) y química de oxígeno (DQO) (Carvalho et al., 2013; Yadav et al., 2015; Sommella et al., 2016; Panghal et al., 2018).

El derrame de suero en el suelo genera problemas de contaminación ambiental al alterar las propiedades fisicoquímicas del suelo, causando disminución del rendimiento de los cultivos. Eliminar el suero en cuerpos de agua disminuye el oxígeno disuelto, lo que representa riesgo significativo para la vida acuática, el medio ambiente y la salud humana (Yadav et al., 2015). En México, la NOM-001-SEMARNAT-2021 fija los límites permitidos de contaminantes en las descargas de aguas residuales hacia cuerpos receptores que son propiedad nacional.

Recientemente se ha prestado más atención a la sostenibilidad en la industria agroalimentaria, junto con el desarrollo sostenible y la economía circular, lo que ha aumentado el interés por valorizar los residuos de los procesos alimentarios (Barba, 2021). Han emergido tecnologías de procesamiento y enfoques biotecnológicos para transformar este subproducto en una fuente de componentes valiosos o en una amplia gama de bebidas que se pueden comercializar (Królczyk et al., 2016).

Los oligosacáridos prebióticos son compuestos que no pueden ser digeridos y que difieren en la composición y configuración de los residuos de monosacáridos y en el tipo de enlaces glucosídicos que contienen. Estos prebióticos tienen efectos benéficos a la salud humana, primordialmente porque modifican la microbiota intestinal autóctona del colon (van Loveren et al., 2012). Los galactooligosacáridos (GOS) y la lactulosa son reconocidos como prebióticos debido a los beneficios que

brindan a la salud, tales como la inmunomodulación, el metabolismo de los lípidos, la absorción de minerales, el control del peso y la prevención de problemas relacionados con la obesidad, entre otros. Los estudios *in vitro* en animales y humanos (incluidos estudios con bebés) han demostrado ampliamente el efecto prebiótico de los GOS. Además, los GOS han sido reconocidos como seguros (GRAS) en los Estados Unidos (Anadón et al., 2016). Los GOS se presentan de forma natural en la leche de animales y humanos en niveles bajos, pero se producen principalmente mediante procesos de glicosilación química o rutas enzimáticas para cumplir con las necesidades del mercado (Lappa et al., 2019).

En las últimas décadas, ha habido un creciente interés en la síntesis de GOS debido a sus propiedades prebióticas y tecnológicas, de modo que han sido de interés las investigaciones para optimizar la reacción de transgalactosilación de la lactosa y, por ende, mejorar el rendimiento de la producción de GOS. El ultrasonido es una tecnología emergente que, al ajustarse adecuadamente, puede generar cavitación, un fenómeno físico que produce efectos notables en los solutos que se encuentran en el medio de reacción, especialmente en las enzimas. La cavitación puede reducir la resistencia del sustrato a difundirse en la matriz, lo que aumenta la transferencia de masa y homogeniza el medio de reacción. También puede evitar la agregación de los solutos y cambiar la estructura de la enzima, lo que puede mejorar el rendimiento de los productos (Huicochea, 2023).

La industria alimentaria ha encontrado en la bebida de suero una importante opción para aprovechar el suero de queso. Se han creado exitosamente bebidas a partir de suero de leche, ya sean fermentadas, no fermentadas, con o sin alcohol, con gas (CO₂), naturales o con sabor a frutas. La composición beneficiosa del suero lo hace una alternativa sencilla, saludable y económica para que los productores de alimentos lo incluyan en distintos productos; además, la creciente demanda de alimentos funcionales ha motivado la inclusión de componentes prebióticos en las bebidas de suero (Souza et al., 2019; Joshi et al., 2020).

Por lo expuesto previamente, en el presente trabajo se propuso el aprovechamiento del suero lácteo para la síntesis de GOS y su aplicación en el desarrollo de una bebida potencialmente prebiótica. Adicionalmente, se estudió el efecto de asistir la reacción con US sobre el rendimiento y el tipo de GOS formados.

2. ANTECEDENTES

El queso es un producto de alto consumo en México, la Norma Oficial Mexicana 223 (NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018) define al queso como un producto lácteo de diferentes texturas (blando, semiduro, duro y extraduro), madurado o no madurado que puede estar recubierto y cuya proporción de proteínas de suero y caseína no debe ser superior a la de la leche. De igual manera, la norma especifica que este producto es obtenido mediante la coagulación total o parcial de la proteína de la leche (entera, descremada y/o parcialmente descremada), crema, mantequilla, o combinación de estos productos por medio del uso de cuajo u otros coagulantes adecuados y escurrimiento parcial del suero resultante.

El queso es un producto lácteo muy consumido a nivel mundial. Existen alrededor de 2000 variedades de queso en el mundo (Moreno, 2019). En 2021, el valor de mercado mundial del queso se situó en aproximadamente 77,600 millones de dólares, una cantidad que se estima que superará los 113,000 millones de dólares para el año 2027 (Figura 1) (Shahbandeh, 2022a).

El queso representó alrededor de 22 millones de toneladas métricas (Figura 2) en la producción del 2021. La producción mundial de queso ha aumentado cada año desde 2015 (Figura 2), siendo la Unión Europea (UE) responsable de la mitad de la producción total (10.55 millones de toneladas métricas) en 2021, liderada por Alemania con más de 2.25 millones de toneladas métricas producidas. A nivel país, Estados Unidos de América (EUA) fue el principal productor en 2021 (Shahbandeh, 2022a); al igual que en 2020, con aproximadamente 6 millones de toneladas métricas producidas, seguido de Alemania con 2.35 millones, según datos de la FAO (Figura 3) (FAO, 2023). Acorde al boletín de leche del 2019, en ese año México reportó una producción de 476,927 toneladas, equivalente a un valor de mercado de 25,554 millones de pesos; los principales tipos de queso producido fueron fresco, doble crema, amarillo y panela (18.8, 15.3, 11.1 y 11.1% de la producción de queso, respectivamente) (SADER/SIAP, 2019).

En 2022, el consumo de queso de la UE fue de alrededor de 9.4 millones de toneladas métricas, una cantidad que superó con creces las cifras de consumo en otras partes del mundo. En cuanto a principales consumidores, en ese año México

fue el sexto lugar con un consumo de 0.6 millones de toneladas métricas (Figura 4) (Shahbandeh, 2022a).

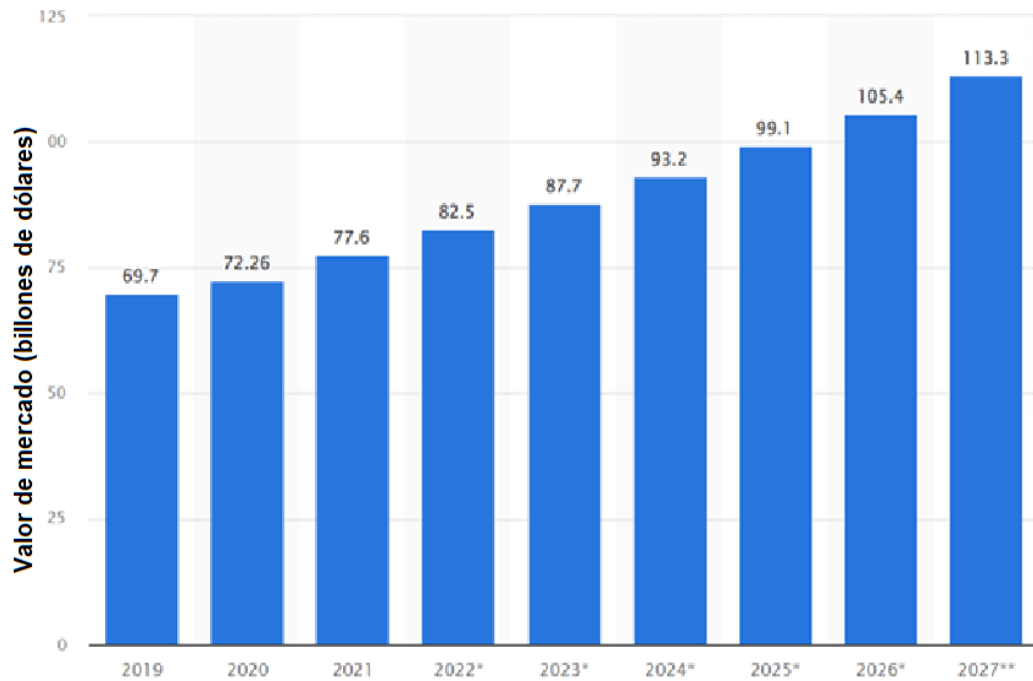


Figura 1. Valor de mercado del queso a nivel mundial de 2019 a 2027 (Shahbandeh, 2022a)

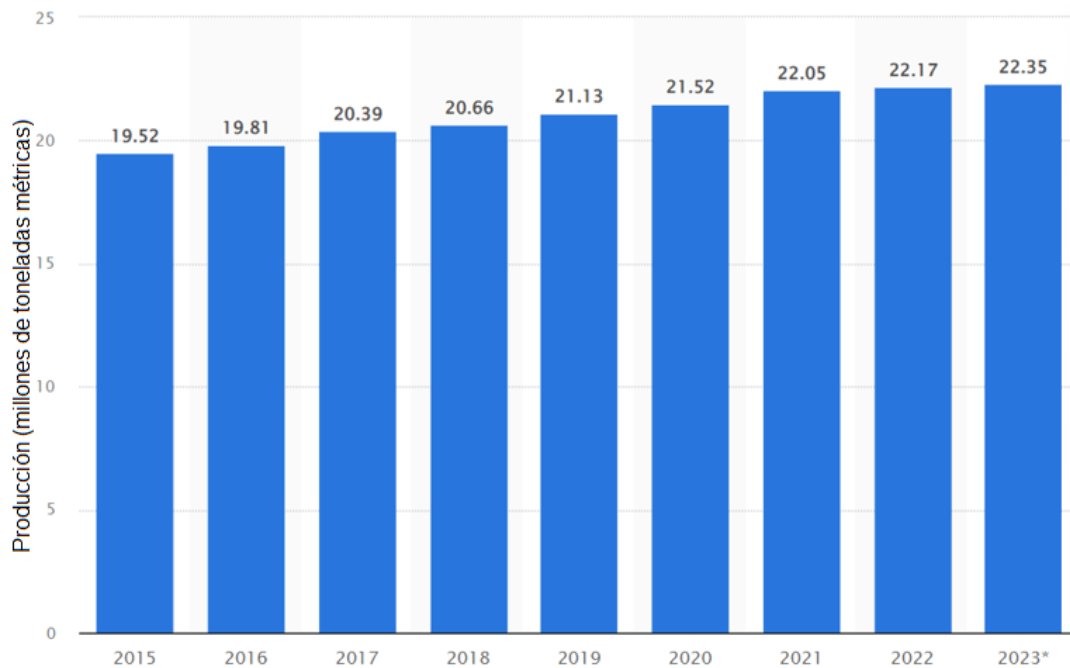


Figura 2. Producción anual de queso a nivel mundial de 2015 a 2022 (Shahbandeh, 2022a)

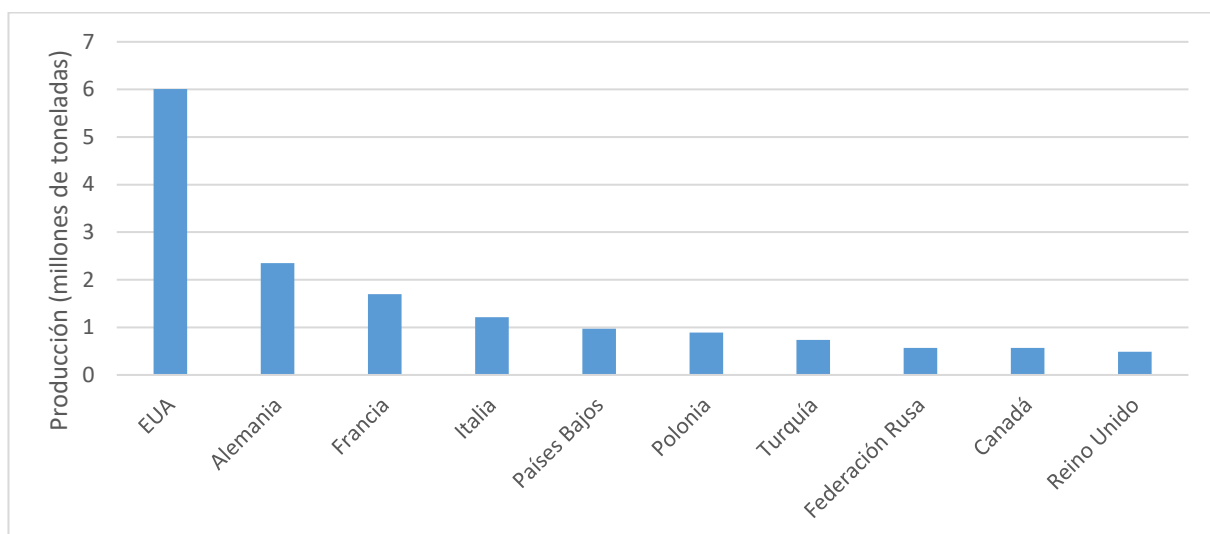


Figura 3. 10 principales productores de queso en 2020 (FAO, 2023)

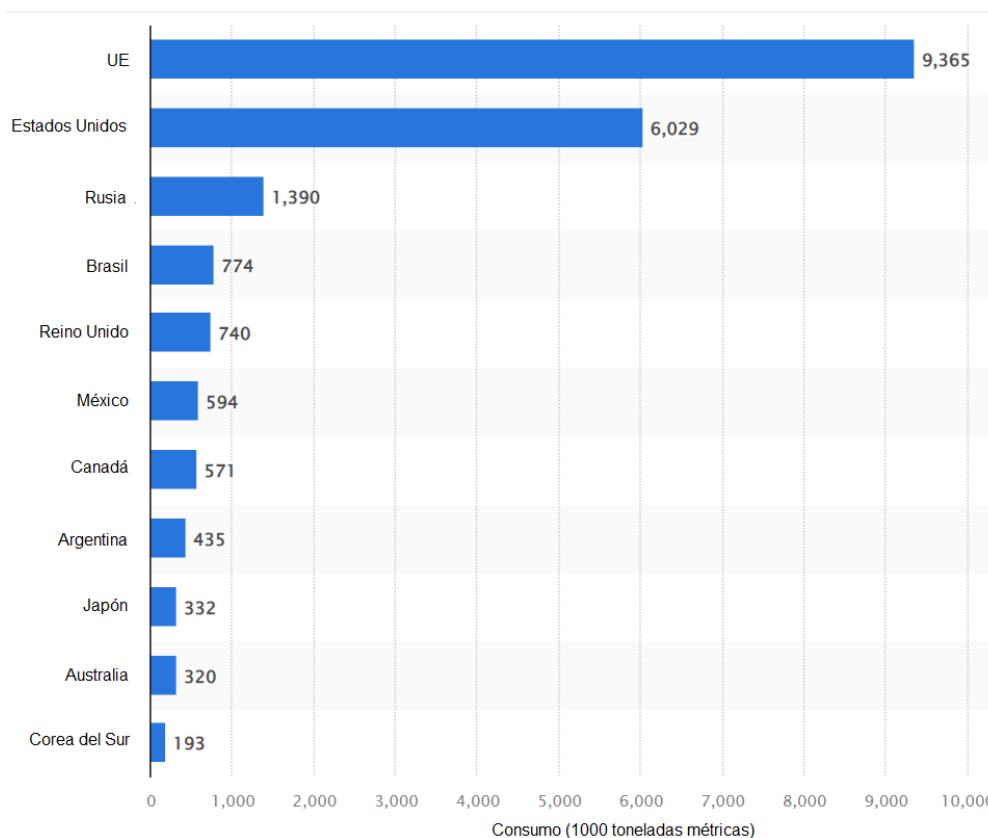


Figura 4. Consumo anual de queso a nivel mundial en 2022, por país (Shahbandeh, 2022a)

Acorde a Bintsis y Papademas (2017), el proceso de fabricación de queso puede variar según la región y el tipo de queso que se esté elaborando, pero en términos generales consiste en 6 etapas fundamentales (Figura 5):

- Preparación de la leche: esta etapa implica la clarificación de la leche para remover impurezas presentes, la estandarización del contenido de grasa y proteína para que sea el adecuado según el tipo de queso que se va a producir, la homogeneización de la leche para evitar la formación de glóbulos de grasa y la aplicación de tratamientos térmicos como la termización, pasteurización o ultra pasteurización que ayudan a garantizar la inocuidad (reduciendo o eliminando la carga microbiana presente), mejorar la calidad y en algunos casos, obtener la textura y sabor deseados en algunos tipos de quesos.
- Coagulación: implica la separación de la porción sólida (cuajada) de la líquida (suero). Para lograrlo se añaden agentes coagulantes, como cuajo (quimosina) o ácido láctico, los cuales actúan sobre las proteínas de la leche provocando su coagulación y formación de la cuajada. La coagulación se ve influenciada por elementos como el pH, la concentración de calcio, el contenido de proteína y la temperatura. La adición de CaCl_2 a la leche puede reducir el tiempo de coagulación y mejorar las propiedades del gel resultante.
- Sinéresis: una vez formada la cuajada, se corta en trozos pequeños para facilitar la salida del suero; el tamaño y forma de los cortes dependerá del tipo de queso que se está produciendo, ya que afecta la textura y firmeza final del producto. Luego del corte, se somete a calentamiento gradual y agitación para favorecer la expulsión del suero y lograr la consistencia y textura deseada.
- Salado: se realiza después del corte de la cuajada y desuerado para mejorar el sabor y la textura del queso, además de ayudar a su conservación. La sal puede ser agregada directamente antes del moldeado o después de moldear el queso puede sumergirse en una solución salina (salmuera). La cantidad de sal utilizada depende del tipo de queso que se esté produciendo y puede ir de 0.5 hasta 3% del peso del queso.
- Moldeado: se requiere moldear la cuajada para dar forma al queso. El moldeado puede ser manual o mecánico y depende del tipo de queso que se produzca. En algunos casos se utiliza una prensa para compactar el queso y eliminar el exceso de suero y posteriormente dejarlo reposar, con la finalidad

de que adquiera su forma final y se asiente la cuajada. El tiempo de reposo puede variar acorde al tipo de queso y puede ir desde unas horas a días.

- **Maduración:** es la etapa donde se desarrollan sus características organolépticas como sabor, aroma, textura y apariencia. El queso es sometido a procesos bioquímicos y microbiológicos que transforman sus componentes y le dan propiedades únicas. En general, se lleva a cabo en cámaras frías y húmedas donde se tiene un control de la temperatura, humedad y ventilación; se busca propiciar el crecimiento de bacterias y hongos añadidos intencionalmente que contribuyen al desarrollo del sabor y la textura. El tiempo de maduración varía según el tipo de queso, puede durar desde semanas a años. Los cambios son muy complejos, pero generalmente se reconoce que ocurren tres procesos fundamentales durante la maduración: glucólisis, proteólisis y lipólisis. Además, varios cambios secundarios se dan simultáneamente, y son estas transformaciones las que principalmente influyen en los matices más delicados del sabor del queso.

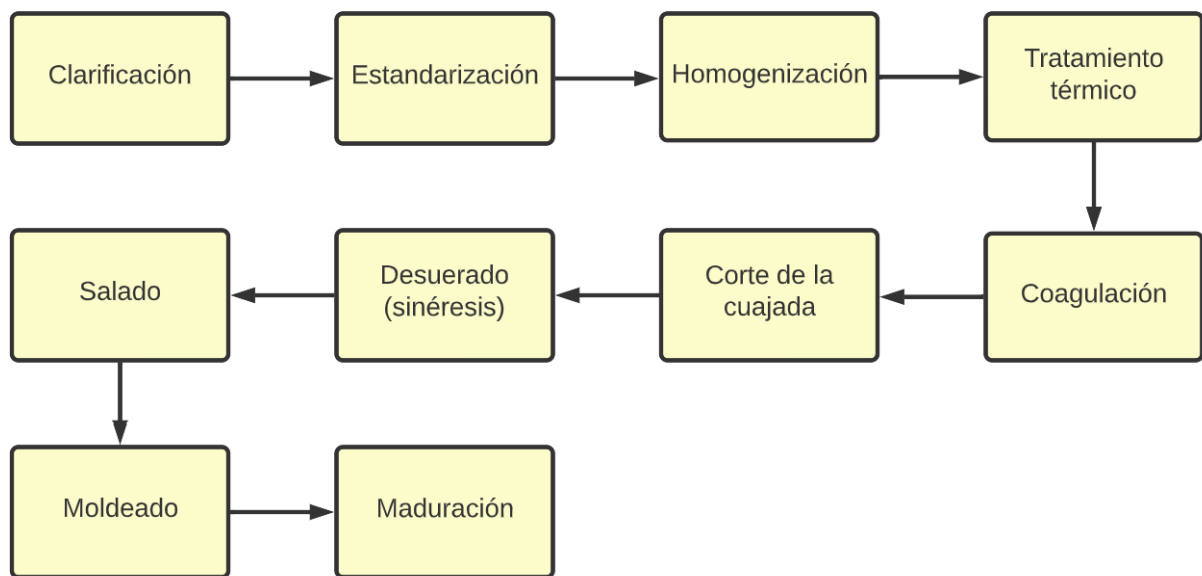


Figura 5. Diagrama general del proceso de producción de queso

2.1. Suero de leche

Se define al suero como “líquido obtenido de la coagulación de la caseína de la leche, mediante la acción de enzimas coagulantes de origen animal, vegetal o microbiano, por la adición de ácidos orgánicos o minerales de grado alimentario; acidificación por

intercambio iónico hasta alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína” (NOM-183-SCFI-2012).

El suero se clasifica ampliamente en 2 tipos: dulce y ácido. El suero dulce (SD) es un subproducto en la elaboración de quesos duros y semiduros (como el Cheddar y el Gouda), mientras que el suero ácido (SA) es un subproducto de la elaboración de productos lácteos con precipitación ácida (como el requesón y el yogur griego). Las principales diferencias entre el SA y el SD son los valores de pH, el perfil mineral y las cantidades de lactosa, ácido láctico y de proteínas de suero; el SA se caracteriza por valores de pH más bajos y mayor contenido de iones de calcio, aniones de fosfato y ácido láctico (Risner et al., 2019; Merkel et al., 2021).

Para la obtención de SD, se utilizan enzimas de tipo cuajo a un pH mínimo de 5.6 para inducir la coagulación; en el caso del SA, se crea un coágulo cuando la leche se acidifica mediante cultivo de *Lactobacillus* o ácido mineral a un pH máximo de 5.1. La composición del suero y las características sensoriales varían según el tipo de suero (SA o SD), el origen de la leche (vaca, oveja, bovino, etc.), la alimentación del animal, el procesamiento del queso utilizado, época del año y la etapa de lactancia. El suero es un producto bastante diluido con un total de sólidos de alrededor del 6.5%. Como se mencionó anteriormente, los sólidos están compuestos básicamente por lactosa, proteína de suero, ceniza, ácido láctico y grasa (Cuadro 1) (Arshad et al., 2022).

Cuadro 1. Composición de suero (Arshad et al., 2022)

	SD (%)	SA (%)
Agua	93 – 94	94 – 95
Lactosa	4.5 – 5	3.8 – 4.3
Proteína	0.8 – 1	0.8 – 1
Ácido láctico	trazas	Hasta 0.8
Ácido cítrico	0.1	0.1
Minerales	0.5 – 0.7	0.5 – 0.7
Grasa	trazas	trazas

2.1.1. Carbohidratos

2.1.1.1. Lactosa

La lactosa es un disacárido [β -D-galactopiranosil-(1→4)-D-glucosa] que por hidrólisis produce los monómeros D-glucosa y D-galactosa, es el carbohidrato característico

de la leche y es responsable de alrededor del 75% de los sólidos del suero. Tiene un valor comercial bajo como azúcar debido a varias razones: creciente incidencia de intolerancia a la lactosa (principalmente en poblaciones adultas), débil poder fermentable en comparación con los monosacáridos que lo componen (glucosa y galactosa) y no se usa como edulcorante de mesa porque no es lo suficientemente dulce. Hoy en día, la mayor parte de la lactosa que se produce cada año se recupera del suero, y las unidades de procesamiento involucran generalmente las etapas de concentración por evaporación, cristalización, separación, refinado, secado y molienda (Rocha y Guerra, 2020).

La lactosa se emplea en el sector alimentario y farmacéutico. Se usa para suplementar fórmulas infantiles y como excipiente en productos farmacéuticos, de igual manera puede contribuir al sabor y color en productos de panificación y repostería. Se puede emplear para la producción de glucosa y galactosa mediante hidrólisis. En comparación con otros carbohidratos, la lactosa tiene bajo contenido energético, índice glucémico y de potencial cariogénico. Las características favorables de plasticidad, compresibilidad, lubricación, firmeza y sabor ligero lo hacen apto para su uso en la fabricación y recubrimiento de píldoras y comprimidos en la industria farmacéutica (de Souza et al., 2010).

Hay varias tecnologías disponibles para el procesamiento de suero de queso para concentrar y fraccionar las proteínas de suero y para tratar las aguas residuales, incluidas las tecnologías de membrana. Si bien la mayoría de los procesos se centran en la concentración y el fraccionamiento de las proteínas de suero de queso, también se debe considerar la recuperación de lactosa debido a su importancia en las actividades generales de utilización de suero y eliminación de desechos. La lactosa es un componente importante del suero y su recuperación ayuda a mejorar la economía de aprovechamiento del suero y a minimizar los problemas de contaminación (ya que la recuperación de la lactosa en sí misma reduce la demanda bioquímica de los desechos). Los desafíos en torno al suero son convertir un contaminante en productos económicamente rentables y, al mismo tiempo, disminuir la huella ambiental de los procesos de la industria láctea; las posibles alternativas pasarán por la recolección del suero y la utilización de la lactosa y sus derivados

químicos bajo las más variadas formas químicas (de Souza et al., 2010; Rocha y Guerra, 2020).

2.1.1.2. Galactooligosacáridos (GOS)

Los galactooligosacáridos (GOS) son prebióticos resistentes a la digestión que contribuyen a optimizar el efecto de la flora intestinal en la salud humana y fomentan el desarrollo de bacterias benéficas, como las bifidobacterias y los lactobacilos. El crecimiento de estas bacterias probióticas puede reducir el número de bacterias patógenas, mejorar la inmunidad y prevenir el cáncer; algunas investigaciones han mostrado cómo los probióticos pueden disminuir la permeabilidad intestinal o estimular la homeostasis del sistema inmunitario de la mucosa del huésped y luego regular la disbiosis de la microbiota a un estado saludable. Además, otros beneficios de los GOS a la salud humana son la disminución del pH de las heces, la prevención de la cariogenicidad y la reducción de los niveles de colesterol sérico (Li et al., 2019). Los GOS se forman durante la hidrólisis de la lactosa con β -gal mediante una reacción de transgalactosilación, durante la cual la enzima transfiere el resto galactosa del β -galactósido al grupo hidroxilo de una lactosa o un GOS existente (Rocha y Guerra, 2020).

Los GOS se han convertido en ingredientes atractivos para numerosas aplicaciones por su bioactividad y funcionalidad tecnológica. En la industria alimentaria, se utilizan como ingrediente en la leche infantil y alimentos a base de cereales, refrescos y edulcorantes bajos en calorías. En la actualidad, la producción de GOS tiene un alto interés comercial en las industrias agroalimentaria y nutracéutica, concretamente en productos lácteos y de panadería, nutracéuticos, alimentación infantil y alimentación animal (Li et al., 2019; Rocha y Guerra, 2020).

En un estudio realizado por Barile et al. (2009) se demostró la presencia de GOS de manera natural en el suero lácteo, caracterizando los GOS por medio de espectrometría de masas (MS) acoplada a resonancia de ciclotrón iónica por transformada de Fourier (FTICR) con 2 métodos distintos de ionización: ionización por nanoelectrospray (nESI) y ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI). El estudio se basa en estudios previos que evaluaron la presencia, en el suero, del oligosacárido sialilactosa, para el cual existe un estándar comercial. A diferencia de esos estudios, la alta resolución y el análisis de masa exacta por

especie proporcionado por la instrumentación utilizada permitió identificar la composición exacta de los oligosacáridos para los que no existen estándares comerciales. Se logró la caracterización de oligosacáridos no descritos anteriormente en el permeado de suero de queso bovino mediante nESI-FTICR MS y MALDI-FTICR MS; además de la sialilactosa (el oligosacárido más abundante en el calostro bovino), identificaron otros 14 oligosacáridos, la mitad de los cuales tienen la misma composición que los oligosacáridos de la leche humana.

Se ha reportado con anterioridad (Zerva et al., 2021) la caracterización de GOS formados, en suero ácido, a partir de lactosa con β -gal de *Thermothielavioides terrestris*, una enzima novedosa de producción heteróloga. No obstante, son escasos los datos sobre la composición de GOS derivados de lactosa en SD (el cual tiene un mayor contenido de lactosa que el suero ácido, lo que podría mejorar el rendimiento de GOS producidos) con β -gal de *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), una enzima comercial. Los enlaces glucosídicos, la composición monomérica y la longitud de la cadena pueden afectar las propiedades prebióticas; de modo que, realizar la caracterización mencionada previamente otorgará información crítica para respaldar las relaciones entre la estructura y las posibles propiedades prebióticas de los GOS formados con el uso de una enzima de fácil acceso y un sustrato que posiblemente permita mayores rendimientos.

En diversos estudios (Adamczak et al., 2009; Manucci, 2009; Fischer y Kleinschmidt, 2015; González et al., 2017; Eskandarloo y Abbaspourrad, 2018; Yañez et al., 2021; Zerva et al., 2021; Bolognesi et al., 2022; entre otros) se ha evidenciado la síntesis de GOS a partir de suero (dulce y ácido) y soluciones de lactosa pura haciendo uso de β -gal recombinante y/o nativa, en su forma libre e inmovilizada, proveniente de diferentes fuentes. Además, en dichas investigaciones se ha trabajado en optimizar la reacción transgalactosilación por medio del estudio de cinéticas de reacción ante el cambio en factores como fuente de la enzima, concentración de sustrato, pH y temperatura.

En un trabajo reciente (Duan et al., 2021), se investigó la utilización integrada de suero lácteo en la producción de GOS, utilizándolo como medio de cultivo de bajo costo para el crecimiento de probióticos (*Lactobacillus bulgaricus* L3) que fueron

utilizados en la producción de enzima (β -gal) que cataliza la síntesis de GOS utilizando nuevamente el suero como el sustrato (Figura 6).

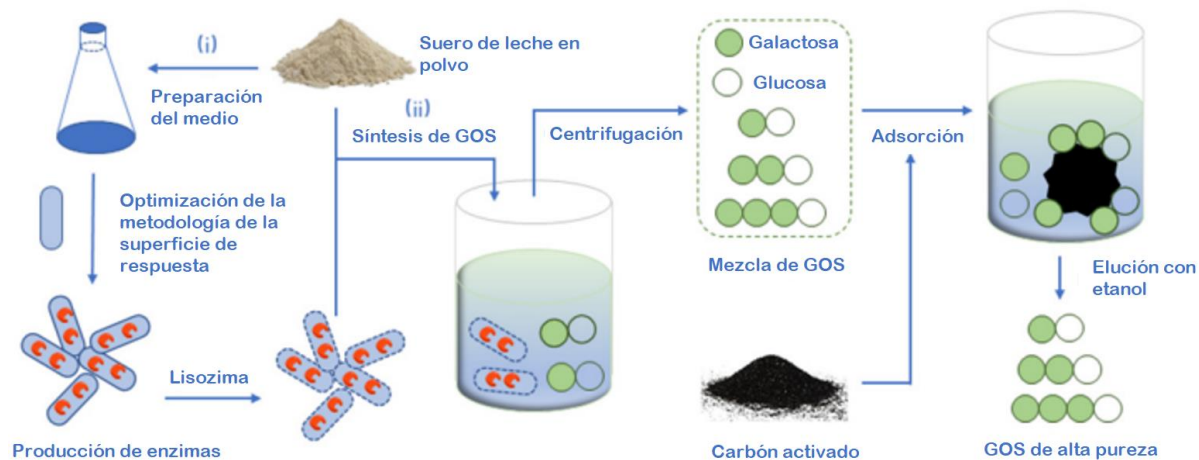


Figura 6. Utilización integrada de suero lácteo en la producción de β -gal y la síntesis de GOS seguida de purificación (Duan et al., 2021)

2.1.2. Impacto económico (nacional e internacional)

La producción mundial de suero está creciendo entre un 1% y 2% anualmente, se estima que el valor de la producción de suero es nueve veces el del queso producido (Sharma et al., 2018). En 2021, el mercado mundial de proteína de suero se valoró en alrededor de 10,300 millones de dólares y espera que alcance los 18,120 millones de dólares en 2029 (Shahbandeh, 2022b), con una tasa de crecimiento anual del 7.5% entre 2021 y 2029 (Figura 7). En México, el valor del mercado de proteína de suero aumentó un 28.6% del 2014 al 2018, y en 2019 se valoró en 794.1 millones de dólares; se espera que este valor aumente a una tasa de crecimiento anual del 17.7% para el 2023, alcanzando un valor de 1,525.2 millones de dólares (Growth Market Reports, 2021).

El segmento de concentrado de proteína de suero (WPC) dominó el mercado y representó más del 48,0 % de los ingresos globales en 2021 (Figura 8). Los WPC se utilizan como fuente de proteína para alimentos y productos nutricionales para niños recién nacidos. El WPC muestra propiedades gelificantes cuando se descompone en agua y se calienta, esta propiedad es muy útil para aplicaciones en la industria alimentaria y cárnica (MMR, 2022).

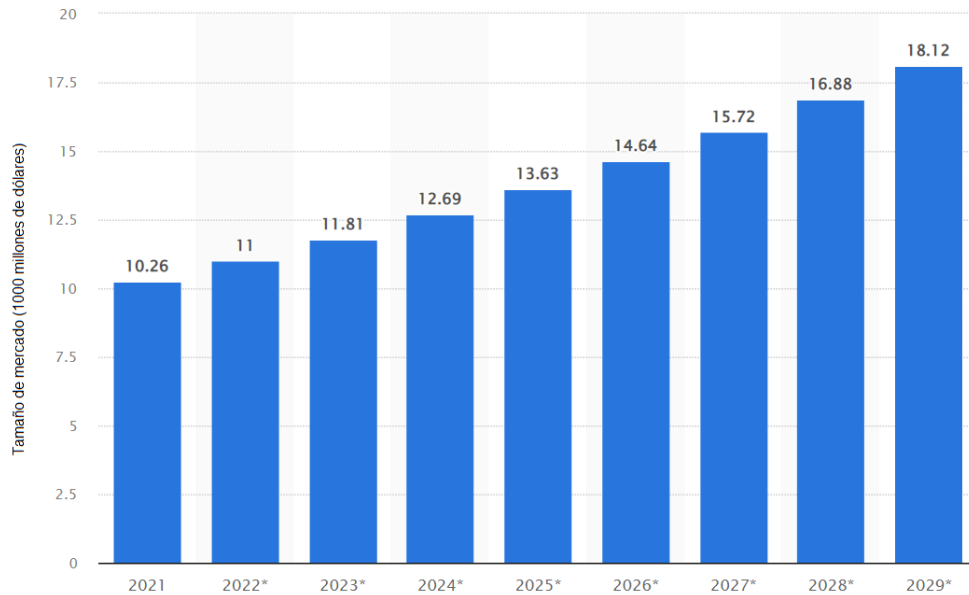


Figura 7. Valor del mercado mundial de proteína de suero del 2021 al 2029 (Shahbandeh, 2022b)

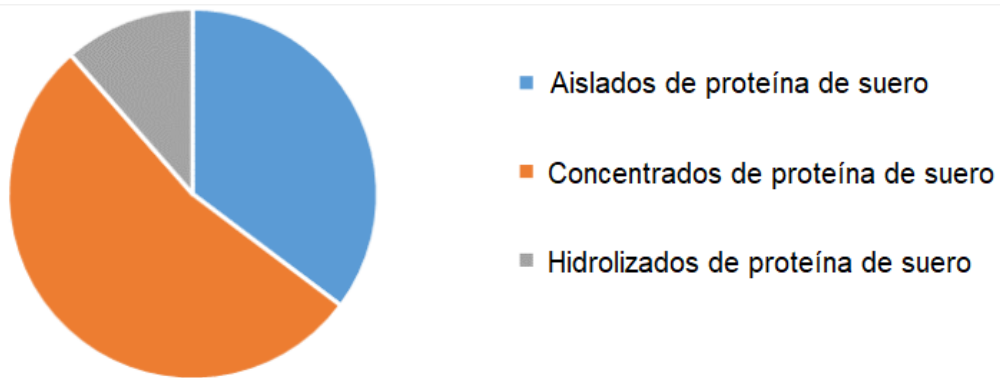


Figura 8. Mercado global de proteína de suero en 2021, por tipo (MMR, 2022)

La Figura 9 muestra la dinámica del mercado de la proteína de suero en el 2021 y su estimación hasta el año 2029. El aumento de la prevalencia de las enfermedades relacionadas con el estilo de vida y la creciente conciencia sobre el estilo de vida saludable están estimulando la demanda de proteína de suero. Los suplementos de proteína se recomiendan con frecuencia en los gimnasios y centros de bienestar, lo que está atrayendo la consideración de los compradores hacia la proteína de suero. Debido a sus propiedades antibacterianas y antihipertensivas, la proteína de suero se utiliza en la industria alimentaria en cereales, chocolates, bebidas, variedades de alimentos para niños, productos lácteos y productos horneados; esto seguirá impulsando acuerdos de proteína de suero en todo el mundo (MMR, 2022).

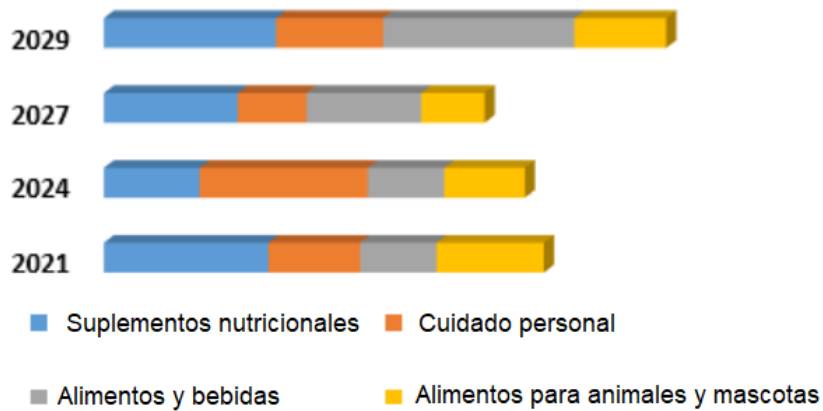


Figura 9. Segmento de aplicación de la proteína de suero en el periodo 2021-2029 (MMR, 2022)

2.1.3. Impacto ambiental

El suero se caracteriza por su alto rango de demanda biológica de oxígeno (DBO, cantidad de O₂ en mg necesaria para la oxidación biológica de la carga orgánica por litro de suero) y demanda química de oxígeno (DQO), 30-50 g/L y 60-80 g/L, respectivamente. La lactosa es la principal responsable de las elevadas DBO y DQO (Tsakali et al., 2010; Sharma et al., 2018).

Históricamente, la eliminación del suero de queso incluía principalmente la descarga en ríos, lagos o cuerpos de agua locales, alimento para animales y alimentación directa a rumiantes. Una alternativa diferente sería liberar el suero en lagunas para su oxidación o en el sistema de alcantarillado doméstico, pero la DBO y la DQO elevadas del suero de queso generalmente conducen a un excedente de materia orgánica en el sistema. La liberación del suero de queso por estas vías no proporciona ningún producto valioso, es costosa y exige una gran cantidad de mano de obra para las empresas de producción, que normalmente corren con todos los costos directos de manejo y transporte. En orden a construir soluciones integradas para el problema de eliminación de suero, debe ser reconocido como una fuente y no solo como un desperdicio, en vista de su enorme prospectiva como sustrato para productos de valor agregado (Sharma et al., 2018).

Teniendo en cuenta que anualmente se producen miles de millones de toneladas de suero en todo el mundo, se requieren nuevos métodos para utilizarlo. En los últimos años se han realizado varios estudios sobre la importancia del valor nutricional del suero y las propiedades de sus ingredientes. Actualmente se sabe que su contenido

principal, las proteínas del suero, tienen propiedades antimicrobianas, antivirales y antioxidantes, pueden ofrecer una especie de protección contra el cáncer y las enfermedades del corazón y ayudan a mejorar las defensas inmunitarias. Debido a las dificultades sustanciales encontradas en el tratamiento del suero como un desecho biológico y su alto potencial para ser materia prima valiosa para la producción de sustancias bioactivas y alimentos de valor agregado, esta última parece ser la única tendencia aceptada y popular para tratar este subproducto de la industria láctea (Tsakali et al., 2010).

Durante muchos años, el suero generado como un subproducto de la producción de queso, fue considerado un material de desecho, se rociaba en los campos como fertilizante o, en el mejor de los casos, se secaba como suero en polvo destinado a las aplicaciones de alimentación animal. La utilización global del suero se muestra brevemente en la Figura 10. Durante las últimas décadas, las empresas lácteas han aplicado diferentes tecnologías para procesar el suero de queso, lo que resultó en la separación de sus componentes principales, que comprenden fracciones enriquecidas en proteínas, lactosa y minerales. Estas tecnologías se han basado generalmente en procesos de cristalización, membrana y cromatográficos (Tsakali et al., 2010).

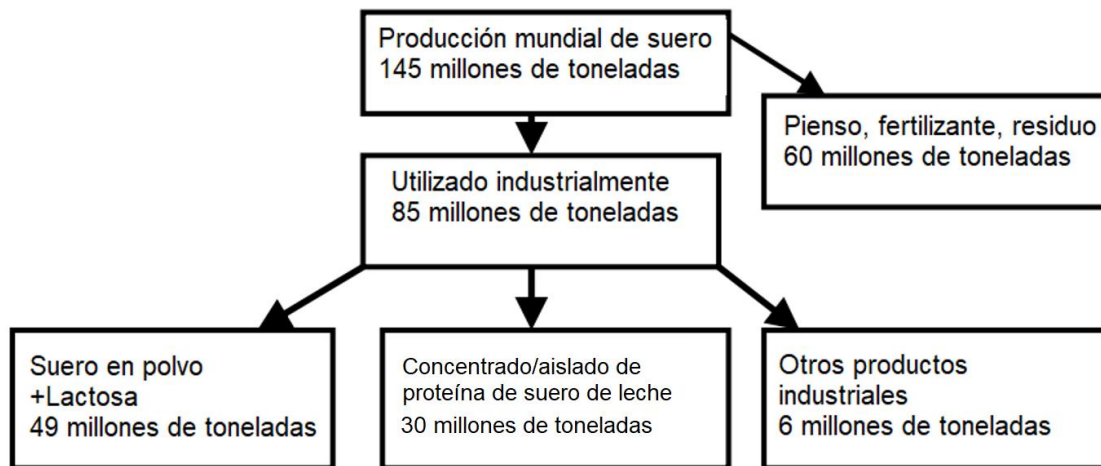


Figura 10. Balance actual de la utilización global de suero (Tsakali et al., 2010)

Los hidrolizados de proteína y lactosa del suero son productos obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática o ácida del suero lácteo, que consiste en romper las proteínas y la lactosa del suero en fragmentos más pequeños (como péptidos, aminoácidos libres y azúcares simples). La parte proteica del suero tiene un alto valor biológico

que puede mejorarse mediante la hidrólisis enzimática de estas proteínas en péptidos, lo que a su vez aumenta las propiedades funcionales, tecnológicas y bioactivas de sus proteínas. Además, se ha mostrado que la reducción del contenido de lactosa, ya sea por fermentación o hidrólisis enzimática controlada, es favorable para un mayor alcance de los productos (especialmente para las personas que presentan intolerancia a la lactosa) y tiene un efecto beneficioso en la mayor digestibilidad del suero (Ghosh et al., 2017).

2.2. β -galactosidasa (β -gal)

La β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) es un tipo de glucósido hidrolasa (GH), que cataliza la hidrólisis de lactosa y la transgalactosilación. Se ha utilizado ampliamente para descomponer la lactosa en galactosa y glucosa en la industria láctea. Además, puede producir GOS mediante transglicosilación durante la hidrólisis de lactosa u otros galactósidos estructuralmente relacionados; por lo tanto, puede usarse ampliamente en aplicaciones relacionadas con la nutrición y el procesamiento de alimentos. Hasta la fecha, las β -galactosidasas se han purificado y caracterizado a partir de diversos organismos, como bacterias, hongos, levaduras, plantas y mamíferos (Li et al., 2019).

2.2.1. Estructura

El tetrámero de β -gal (Figura 11) consta de cuatro cadenas polipeptídicas (A, B, C y D), cada una de 1023 aminoácidos. Cada monómero de 1023 aminoácidos se compone de cinco dominios (1-5, que son respectivamente de color morado, verde, amarillo, azul y rojo en la Figura 11) (Matthews, 2005).

El dominio 3 tiene una estructura de barril α/β con el sitio activo ubicado en carbono terminal del extremo del barril. Los cuatro monómeros se agrupan alrededor de tres ejes de simetría, se puede considerar que estos ejes forman tres interfaces distintas entre diferentes pares de monómeros: la interfaz larga relaciona A con B y C con D, la interfaz de activación relaciona A con D y B con C y la interfaz más pequeña relaciona A con C y B con D. Como se ve en la Figura 11, el monómero A dona su bucle del dominio 2 para completar el sitio activo del monómero D; asimismo, un bucle del monómero D completa el sitio activo del monómero A. La donación y aceptación recíproca también ocurre entre el monómero B y C por lo que se producen un total de cuatro sitios activos funcionales (Matthews, 2005).

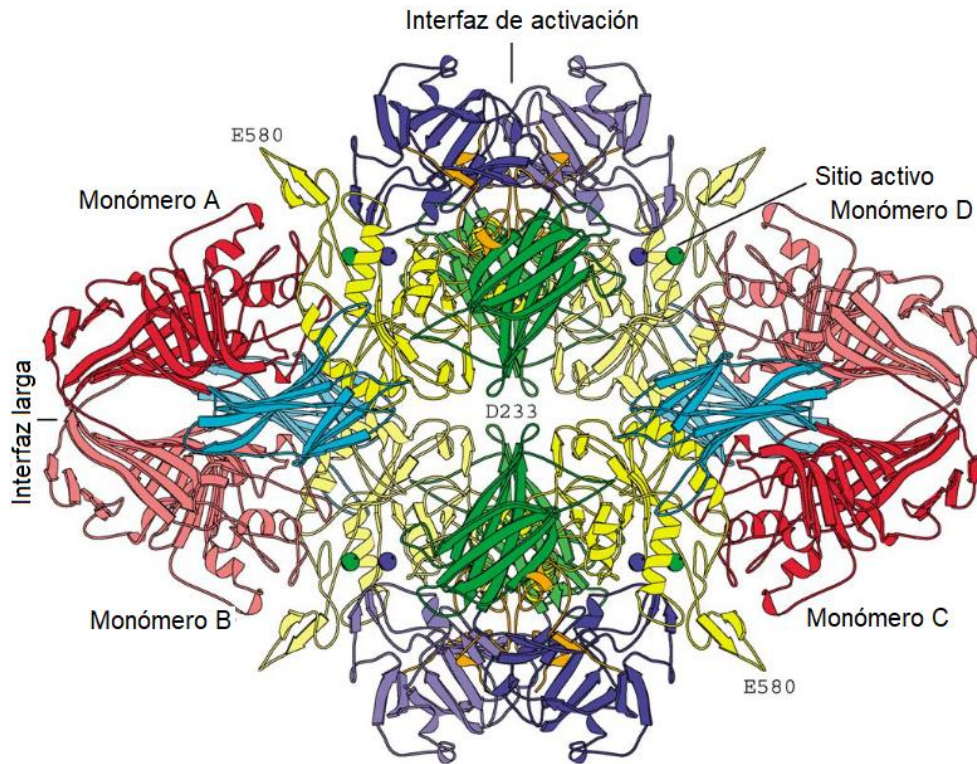


Figura 11. Estructura del tetrámero de β -gal. La coloración es dada por el dominio: naranja, péptido complementario; morado, dominio 1; verde, dominio 2; amarillo, dominio 3; azul, dominio 4; rojo, dominio 5. La distinción del mismo dominio en subunidades distintas se hace por el uso de tonos claros y oscuros de un color determinado (Matthews, 2005)

El dominio 3 tiene una estructura de barril α/β con el sitio activo ubicado en carbono terminal del extremo del barril. Los cuatro monómeros se agrupan alrededor de tres ejes de simetría, se puede considerar que estos ejes forman tres interfaces distintas entre diferentes pares de monómeros: la interfaz larga relaciona A con B y C con D, la interfaz de activación relaciona A con D y B con C y la interfaz más pequeña relaciona A con C y B con D. Como se ve en la Figura 11, el monómero A dona su bucle del dominio 2 para completar el sitio activo del monómero D; asimismo, un bucle del monómero D completa el sitio activo del monómero A. La donación y aceptación recíproca también ocurre entre el monómero B y C por lo que se producen un total de cuatro sitios activos funcionales (Matthews, 2005).

2.2.2. Mecanismos de reacción

La enzima tiene un sitio activo que se compone de dos residuos catalíticos: un nucleófilo catalítico y un catalizador ácido/base. Primero, el nucleófilo catalítico ataca el carbono anomérico de la lactosa, generando el intermediario galactosil-enzima con

liberación simultánea de glucosa (Figura 12a). Posteriormente, este intermediario sufre un proceso de hidrólisis o transgalactosilación, ambas reacciones requieren la asistencia de un catalizador ácido/base. En la reacción hidrolítica se tiene galactosa como producto si el aceptor es el agua (Figura 12b); de lo contrario, la lactosa en el medio puede actuar como aceptor con lo que se da la formación de GOS a través de un mecanismo de transgalactosilación (Figura 12c) (Bultema et al., 2014; Liburdi y Esti, 2022).

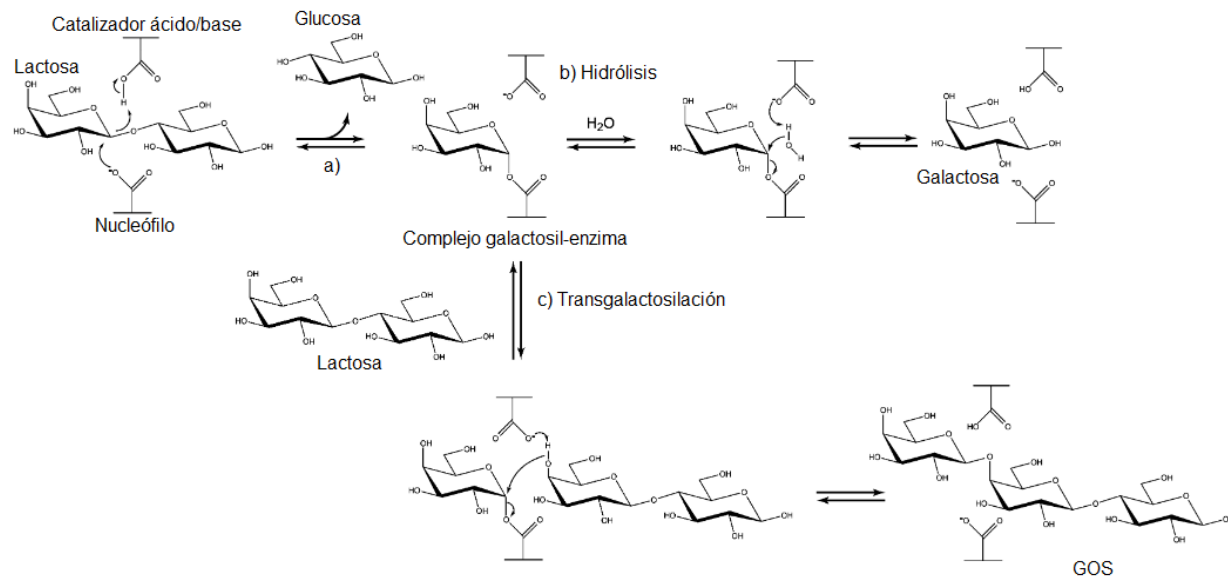


Figura 12. Mecanismos de reacción de β -gal con lactosa como sustrato: a) formación del complejo galactosil-enzima; b) reacción de hidrólisis; c) mecanismo de transgalactosilación (Bultema et al., 2014).

Las β -galactosidasas están ampliamente distribuidas en numerosos sistemas biológicos (microorganismos, plantas, tejidos animales, etc.); sin embargo, en comparación con las fuentes animales y vegetales, los microorganismos producen mayores rendimientos de enzimas. Las distintas β -galactosidasas tienen diferentes afinidades por el agua y los sacáridos (producen diferentes cantidades de GOS a la misma concentración de lactosa); parece probable que la fuente de la enzima sea el factor principal que influye profundamente en las reacciones de hidrólisis y transgalactosilación. Otro factor importante es la concentración inicial de lactosa ya que en altas concentraciones algunas β -galactosidasas cambian de un mecanismo hidrolítico a uno de síntesis, donde se forma como producto un GOS. A mayor temperatura mejora la solubilidad de la lactosa y, por lo tanto, una alta concentración

inicial puede mejorar la síntesis de GOS. Además, se sabe que el pH puede influir en la cinética de la hidrólisis de lactosa y la producción de GOS, lo que sugiere que puede ser útil controlar las tasas de síntesis y degradación de los oligosacáridos variando el pH del medio, para aumentar el rendimiento de GOS (Bultema et al., 2014; Liburdi y Esti, 2022).

Las propiedades catalíticas, la función y la especificidad de la β -gal difieren significativamente por la fuente microbiana, en términos de peso molecular, longitud de la cadena de aminoácidos, posición del sitio activo, pH óptimo, temperatura óptima y estabilidad (Liburdi y Esti, 2022).

2.2.3. Aplicaciones en el área de alimentos

La actividad hidrolítica de la β -gal se ha utilizado en la industria alimentaria durante décadas para ayudar a absorber la lactosa no digerida. Actualmente, muchos niños y adultos en todo el mundo enfrentan el problema de la dispepsia e intolerancia a la lactosa causada por la deficiencia de lactasa; la disminución de la actividad o la reducción de la síntesis de β -gal, que ocurre en el intestino delgado, es la razón detrás de estos trastornos. Aproximadamente el 70 % de la población mundial presenta intolerancia a la lactosa. Para superar las limitaciones impuestas por la intolerancia a la lactosa, en la industria alimentaria se ha utilizado β -gal para degradar la lactosa presente y obtener productos lácteos libres de lactosa (Li et al., 2019; Liburdi y Esti, 2022).

Hay una creciente inclinación de los consumidores hacia los productos lácteos libres de lactosa a medida que se vuelven más conscientes de la salud y las alternativas no lácteas basadas en plantas que están disponibles para personas con intolerancia a la lactosa. El mercado de estos productos es el segmento de crecimiento más rápido en la industria láctea, el mercado mundial de productos libres de lactosa tuvo un valor de 12,100 millones en 2022 y se estima que alcanzará 18,400 millones para 2028, con una tasa de expansión anual de 8.7% entre 2023 y 2028 (Market Data Forecast, 2023).

La actividad hidrolítica también ha sido útil para reducir la cristalización en helados y leche condensada, producida por la alta concentración de lactosa. El uso de β -gal en el tratamiento de la lactosa no solo mejora la textura, sino que también hace que los productos sean más fáciles de digerir; los productos finales de la hidrólisis de la

lactosa (glucosa y galactosa) se fermentan más fácilmente, lo que reduce el tiempo total necesario para lograr el pH preferido en diversos alimentos como yogur y requesón. Además, reduce la necesidad de agregar edulcorantes adicionales (lo que a su vez reduce la cantidad de calorías en el producto final). Adicionalmente se ha aplicado en la hidrólisis de la lactosa del suero para convertirlo en otros productos, como jarabes dulces que se utilizan en la industria de la panadería y la confitería. (Saqib et al., 2017; Xavier et al., 2018; Li et al., 2019; Liburdi y Esti, 2022).

Los GOS producidos a partir de β -gal por la actividad de transgalactosilación durante la hidrólisis de la lactosa se utilizan como ingrediente en los alimentos prebióticos. Los GOS son prebióticos no digeribles que ayudan a modificar la microflora intestinal para la salud humana y también promueven el crecimiento de bacterias útiles en el intestino, como las especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Dado que el cuerpo humano carece de la enzima necesaria para hidrolizar los enlaces β , estos GOS actúan como fibra soluble y son fermentados por la flora colónica que reside en el intestino grueso; los productos finales de esta fermentación son ácidos grasos de cadena corta que disminuyen el pH de las heces y el ambiente ácido general inhibe la formación de bacterias patógenas. Dado que estos GOS no pueden ser digeridos por las bacterias de la boca (como *Streptococcus*), no contribuyen al desarrollo de la cariogenicidad. Una amplia variedad de beneficios a la salud está relacionada con los GOS, como el efecto anticancerígeno, la reducción de los niveles de colesterol sérico (producida cuando se unen al colesterol en el intestino delgado) y la mejora de la función hepática. Debido a las condiciones ácidas, los GOS pueden almacenarse durante un período de tiempo más largo a temperatura ambiente y se puede aplicar a una variedad de productos sin descomposición alguna; las empresas que se dedican a la producción de alimentos infantiles incluyen GOS en sus productos alimenticios a base de leche y cereales (Saqib et al., 2017).

La producción enzimática de los GOS es de relevancia por los problemas asociados a su producción y/o purificación, la β -gal de *K. lactis* es una de las enzimas más utilizadas.

2.3. Ultrasonido (US)

Tecnologías emergentes, como el US, recientemente han ayudado al procesamiento convencional de alimentos. El US es una tecnología capaz de promover ciertas

reacciones lo que disminuye el tiempo de procesamiento, además de ser respetuosa con el medio ambiente. Bajo ciertas condiciones de intensidad y frecuencia, el US puede tener efecto en mejorar el momento vibratorio de las enzimas, esto podría facilitar el contacto entre el sustrato y el sitio activo de la enzima. En cambio, en condiciones adversas, puede causar la inactivación de la enzima (Rico et al., 2018). El término “ultrasonido” se refiere a las ondas sonoras que tienen una frecuencia más alta que el límite superior del rango de audición humano (20 kHz). Cuando estas ondas viajan a través de un medio, causan compresiones y rarefacciones (descompresiones) en las partículas del medio, lo que genera una gran cantidad de energía debido a la turbulencia y al aumento de la transferencia de masa. En su aplicación en alimentos, el US se puede clasificar en dos categorías según su intensidad y frecuencia: US de baja y alta intensidad (Bhargava et al., 2021).

Las ondas ultrasónicas de baja intensidad y alta frecuencia son aquellas que tienen una frecuencia superior a 100 kHz y una intensidad inferior a 1 W/cm². Su uso se centra en el análisis no destructivo y en el control de calidad de alimentos durante el procesamiento y almacenamiento, así como en la regulación de la calidad de las frutas y verduras en operaciones previas y posteriores a la cosecha. Por otro lado, las ondas ultrasónicas de alta intensidad y baja frecuencia son disruptivas y tienen efectos considerables sobre las propiedades físicas, bioquímicas y mecánicas de los alimentos. Estas ondas tienen una frecuencia entre 20 y 100 kHz y una intensidad en el rango de 10 a 1000 W/cm². Se utilizan para emulsionar, desespumar, regular microestructuras y modificar la textura de productos grasos, la cristalización y las propiedades funcionales de las proteínas. Además, se aplican en diversas operaciones unitarias como la congelación, el secado, el ablandamiento y la concentración. La cavitación acústica es un efecto típico del US de alta intensidad, se produce por la formación, crecimiento y colapso de burbujas grandes que liberan gran cantidad de energía (Fu et al., 2020; Bhargava et al., 2021).

Rico et al. (2018), evaluaron el efecto del US sobre la generación de GOS y ácido glucónico en un sistema multienzimático utilizando β -gal de *K. lactis*. Determinaron que no hubo un efecto significativo en la actividad y cambios de estructura de la β -gal en una solución de lactosa al 40% con uso de US directo (con sonda) a una frecuencia de 20 kHz, 30% amplitud, 30% pulsos y 40 °C de temperatura. El

rendimiento máximo de GOS que obtuvieron fue de 45%. Finalmente, observaron un ligero aumento cuando se hizo uso de US después de 2 h de reacción.

En un estudio más reciente elaborado por Huicochea (2023), se evidenció que la utilización de US de alta intensidad para asistir la reacción con β -gal aumenta la producción de GOS. El tratamiento de mayor rendimiento ($35.81 \pm 1.81\%$) fue el de 40% amplitud y 10% pulsos, con 120 min de reacción en una solución de lactosa. Cuando se hizo la reacción en suero ácido, el rendimiento máximo ($28.32 \pm 0.10\%$) fue con el tratamiento de 20% amplitud y 10% pulsos.

2.4. Bebidas de suero

El suero se ha utilizado en bebidas debido a sus propiedades funcionales, como sabor, textura, viscosidad y estabilidad coloidal. Aunque se ha trabajado en la bebida de suero, todavía no se ha aprovechado a gran escala debido a desafíos como la conciencia del consumidor, la competencia de otros productos y la disponibilidad limitada en el mercado. La conversión del suero en bebidas, tanto con fermentación como sin fermentación, es la forma más atractiva de aprovecharlo para consumo humano. Los factores como el pH, la solubilidad, la dispersabilidad y la presencia de otros ingredientes afectan las características de la bebida de suero. A lo largo de los años se han desarrollado diferentes tipos de bebidas a base de suero, incluyendo bebidas alcohólicas, carbonatadas, con sabor a frutas, naturales y fermentadas (Cuadro 2) (Panghal et al., 2018).

Cuadro 2. Resumen de nuevas bebidas a base de suero

Objetivo de estudio	Resultados clave	Referencia
<p>Bebida deportiva a base de suero ácido (3.32% lactosa) fermentado con <i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>; adición de estabilizante en diferentes porcentajes (0, 0.1, 0.125 y 0.15)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor viscosidad a mayor cantidad de estabilizante. • La adición de estabilizante no afectó pH ni sólidos solubles totales. • En almacenamiento por 30 días, el recuento total de aerobios en placa, coliformes y hongos y levaduras fueron inferiores a 10^2 UFC/mL (microbiológicamente aceptable). • Adición de 0.125% de estabilizante fue la óptima porque en la evaluación sensorial fue la muestra que más 	<p>Abella et al. (2016)</p>

	<p>gustaba y porque contenía un 22.1% de carbohidratos (por lo que podría clasificarse como una “bebida deportiva hipertónica”).</p>	
<p>Bebida deportiva a base de suero ácido de yogurt</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Para la bebida deportiva a base de suero ácido de yogurt se seleccionaron jugo de lima, menta y jengibre como enmascarantes del sabor distintivo del suero. • El perfil nutricional coincidió con el de las bebidas deportivas comerciales y los consumidores encontraron aceptable la bebida en los estudios sensoriales. • La evaluación sensorial determinó que fueron aceptables las bebidas con un 35-45 % de suero. 	<p>Villarreal (2017)</p>
<p>Bebida fermentada probiótica (a base de SD) de mora negra, almacenada a 4±1°C por 21 días. Se formularon 5 mezclas de suero de leche dulce:jugo de moras negras</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La acidez de las bebidas aumentó gradualmente durante el almacenamiento en frío; mientras que el pH y contenido fenólico total se redujeron. • La actividad antioxidante se incrementó al aumentar el porcentaje de jugo de mora negra pero disminuyó durante el almacenamiento. • Todas las muestras tuvieron propiedades sensoriales aceptables, SWBM3 (25% de suero de leche:75% de jugo de moras) obtuvo las puntuaciones organolépticas más altas. 	<p>AbdulAlim et al. (2018)</p>
<p>Bebidas carbonatadas de suero fermentadas por la adición de <i>Clavispora lucitaniae</i> con incorporación de jugo de frutas de piña y fresa (15, 20, 25 y 30%)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La producción de alcohol comenzó después de 15 días. • Más variaciones en las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida almacenada a temperatura ambiente que en la almacenada en refrigeración. 	<p><u>Kaur</u> et al. (2018)</p>

	<ul style="list-style-type: none"> • La puntuación más alta de color, sabor, sensación en boca y aceptabilidad general se encontró en el tercer día, las puntuaciones fueron mayores cuando la bebida se almacenó a temperatura de refrigeración. • La vida de anaquel sensorial fue de 90 días para la bebida refrigerada y de 60 días para la bebida almacenada en condiciones ambientales. • En la fermentación hubo producción natural de CO₂, el bajo contenido de alcohol añadía efervescencia, brillo, sabor ácido y aroma. 	
<p>Producción de bebidas tipo yogurt fermentadas por medio de la combinación de suero ácido con leche UHT, leche condensada sin azúcar o leche desnatada en polvo; complementación con oligofructosa y WPC</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Al combinar suero ácido con leche es posible obtener productos similares al yogurt. • En el almacenamiento (21 días a 5±1°C), la acidez aumentó y el contenido de acetaldehído disminuyó, al igual que las propiedades sensoriales. • La prueba de preferencia del consumidor indicó mejores propiedades sensoriales en las bebidas a base de suero y leche condensada. 	<p>Skryplonek (2018)</p>
<p>Preparación de una bebida a base de suero sabor fresa con xilooligosacáridos (XOS) añadidos (1.25 g/100 mL)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La adición de XOS mejoró las propiedades de la bebida: actividad antioxidante, inhibición de enzimas (convertidora de angiotensina, α-amilasa y α-glucosidasa), perfil de aroma, viscosidad, textura y sabor; lo que resultó en una mayor aceptación sensorial. • Adicionar XOS aporta cantidades adecuadas de prebiótico en el producto (1.25 g/mL). 	<p>Souza et al. (2019)</p>
<p>Producción y evaluación de bebidas</p>	<ul style="list-style-type: none"> • El producto final presentó características sensoriales óptimas. 	<p>Tawfeuk y Khalil (2019)</p>

<p>de doum a base de SD. Por medio de maceración de doum en suero a una proporción 1:5, durante tiempos de 4, 8 y 12 horas</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La muestra fresca tuvo mejores resultados en algunos parámetros evaluados como contenido fenólico total, contenido total de flavonoides y actividad antioxidante; además de excelente apariencia, color, olor, sabor y aceptabilidad general. 	
--	---	--

Los principales problemas que generalmente se encuentran en las bebidas a base de suero son (Chavan et al., 2015):

- Cristalización de la lactosa durante el almacenamiento a temperatura de refrigeración.
- Coagulación de proteínas de suero durante la aplicación de tratamientos térmicos.
- La alta viscosidad de los concentrados afecta la efectividad de los tratamientos térmicos.
- Corta vida útil cuando se almacenan a temperatura ambiente.
- Resabio no deseado ocasionado por el alto contenido de minerales en el suero.

La demanda de productos innovadores y funcionales por parte de los consumidores ha impulsado la investigación en la optimización de la producción de bebidas de suero. Se han investigado diferentes métodos de procesamiento de alimentos para mejorar la vida útil y calidad de las bebidas a base de suero, incluyendo métodos no térmicos como los procesos de membrana, ultrasonidos de alta intensidad y la tecnología de dióxido de carbono supercrítico. En los últimos años, se han comercializado numerosas bebidas y productos similares que contienen componentes aislados de suero (como proteínas de suero), con fines refrescantes, de valor agregado y/o funcionales (Barukčić et al., 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

La producción mundial de leche está por encima de 800 millones de toneladas al año y casi dos tercios de ésta se utilizan para producir queso y mantequilla. Sin embargo, durante el procesamiento de estos productos sólo el 10-20% de la leche utilizada es recuperada como el producto final de interés, por lo que el resto se obtiene como suero. El suero de leche producido por las industrias es desechado en su mayoría y es considerado un contaminante importante debido a la gran cantidad de materia orgánica que contiene, lo cual ocasiona que tenga altas demandas biológicas y químicas de oxígeno. La producción anual de suero a nivel mundial se estima en 180 millones de toneladas, que contienen importantes cantidades de proteínas y lactosa, aproximadamente 1.5 y 8.6 millones de toneladas, respectivamente. Aunque la producción de suero aumenta cada año, menos de la mitad se utiliza en otros procesos, lo que implica que una cantidad significativa de los nutrientes de la leche no se utiliza de manera eficiente para beneficio de la humanidad, lo que puede tener graves implicaciones en términos de sostenibilidad. Para fomentarla, es necesario encontrar métodos rentables y sostenibles que permitan la utilización del suero; por lo tanto, es esencial considerar su valorización a través de diferentes tecnologías y productos con el fin de aprovechar eficazmente los valiosos nutrientes contenidos en el suero y reducir su impacto ambiental.

El suero de leche posee una amplia variedad de nutrientes, tales como lactosa y proteínas. La lactosa, un tipo de azúcar natural presente en la leche, puede ser difícil de digerir en algunas personas, lo que se conoce como intolerancia a la lactosa. Dada la creciente prevalencia de esta afección en adultos y niños a nivel mundial, se están investigando nuevas formas de convertir la lactosa en compuestos más biodisponibles. Los GOS son prebióticos que se producen a partir del proceso de transgalactosilación de la lactosa, y que promueven el crecimiento y la actividad de bacterias intestinales beneficiosas lo que puede tener efectos positivos a la salud como mejorar la digestión, fortalecer el sistema inmunológico y reducir el riesgo de enfermedades crónicas. Además, estos compuestos poseen propiedades tecnológicas que permiten su uso en la industria alimentaria. La reacción suele tener rendimientos bajos en la formación de GOS a partir de lactosa, por lo que se han buscado alternativas para propiciar las condiciones adecuadas de reacción para una

mayor obtención de GOS; una de estas alternativas es la aplicación de US para coadyuvar la reacción. A pesar de que se han llevado a cabo diversos estudios para medir la cantidad de productos de transgalactosilación de la lactosa en el suero de leche, actualmente hay poca información sobre su caracterización.

En general, incluir alimentos que contienen prebióticos en la dieta diaria puede contribuir a mejorar la salud digestiva y reducir el riesgo de enfermedades crónicas. Es importante desarrollar alimentos que contengan estos componentes para mejorar la salud de los consumidores, satisfacer la demanda del mercado y fomentar la innovación en la industria alimentaria. Adicionalmente, elaborar bebidas a base de suero puede ser una solución económica y práctica para aprovechar las propiedades nutricionales y funcionales de los componentes del suero, y también para satisfacer la creciente necesidad de los consumidores por productos innovadores y beneficiosos para la salud.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Producir y caracterizar GOS a partir de PSD y emplearlos en el desarrollo de una bebida.

4.2. Objetivos específicos

- Obtener y caracterizar fisicoquímicamente SD y PSD
- Evaluar, por medio de HPLC y UPLC-MS, el efecto del US en el rendimiento y la composición de GOS sintetizados a partir de la reacción de la lactosa presente en PSD con β -gal de *K. lactis*.
- Formular una bebida a base de PSDR con presencia de GOS y evaluar su calidad a través de parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y bromatológicos.

5. METODOLOGÍA

5.1. Producción y caracterización de suero dulce (SD) y permeado de suero dulce (PSD)

5.1.1. Obtención de SD a partir de la producción de queso panela

Se elaboró queso panela para la obtención de suero dulce. Para ello, inicialmente se calentó la leche pasteurizada a 37 °C, después se agregó cuajo microbiano y cloruro de calcio (CaCl₂) grado alimenticio (en proporción de 1 mL y 2 g por cada 10 L de leche, respectivamente), se mezcló y se dejó reposar por 45 min. Finalizado el tiempo de reposo, se hizo un corte de la cuajada en cubos de aproximadamente 1 cm y se permitió el desuerado por 5 min, posteriormente para favorecer el desuerado se calentó en rampa de temperatura por 30 min alcanzando una temperatura de 40 °C y se mantuvo agitación constante. Finalmente pudo retirarse el SD.

5.1.2. Ultrafiltración

Se removieron inicialmente las caseínas utilizando el método propuesto por Abadía et al. (2018) por medio de centrifugación a 10000 g durante 30 min a 4 °C y posterior filtración al vacío con papel filtro No. 4. Después, se ultrafiltró el suero mediante el uso de una unidad de separación de membrana en placa con una membrana MT (PES, con un tamaño de poro de 5000 Da y a una presión menor a 2 bar). La corriente del concentrado se reenvió al tanque de alimentación mientras que la del permeado se recogió en un contenedor distinto. Al finalizar este proceso, se recuperó el PSD siguiendo la metodología descrita por González et al. (2017).

5.1.3. Análisis fisicoquímicos

5.1.3.1. pH

Se determinó el valor de pH con el procedimiento descrito en la NMX-F-317-S-1978 con el uso de un potenciómetro calibrado con soluciones buffer de pH 4, 7 y 10.

5.1.3.2. Humedad y sólidos totales (ST)

El contenido de humedad se determinó utilizando el método establecido por la NOM-116-SSA1-1994. Por triplicado se pesaron 4±0.5 g de muestra (el peso exacto se anotó como P₂) en un crisol llevado a peso constante (P₁). Los crisoles con muestra se secaron en una estufa durante 2 h a una temperatura de 110 ± 5 °C. Pasado el tiempo, se pusieron los crisoles en desecador para su alcance a la temperatura del ambiente. Posteriormente, se registró el peso exacto de cada crisol y se regresaron

otros 30 min al horno. Se repitió el proceso hasta que se obtuvo un peso constante (registrado como P_3). Se usaron los 3 pesos que se registraron (del crisol vacío, del crisol con muestra antes del secado y del crisol con muestra después del secado) para calcular el contenido de humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{P_2 - (P_3 - P_1)}{P_2} \times 100$$

En donde:

P_1 = Peso del crisol (g)

P_2 = Peso de la muestra húmeda (g)

P_3 = Peso del crisol más muestra seca (g)

El contenido de ST fue calculado por la fórmula:

$$\% ST = 100 - \% \text{ humedad}$$

5.1.3.3. Azúcares reductores (AR)

Para determinar el contenido de AR se utilizó el método DNS propuesto por Gil et al. (2006). Se tomó un tubo de ensayo que contenía 0.5 mL de muestra y 0.5 mL de reactivo DNS, y se colocó dentro de un baño a ebullición durante 5 min. Después, los tubos se dejaron enfriar a la temperatura ambiental y se añadieron 5 mL de agua destilada. Por último, se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Se determinó el contenido de AR utilizando una curva patrón de lactosa que se construyó utilizando las concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 1 y 2 g/L. Para construir la curva patrón, las soluciones de lactosa se reaccionaron con el reactivo DNS de la misma manera que se hizo con las muestras.

5.1.3.4. Proteína

5.1.3.4.1. Método Kjeldahl

El método de Kjeldahl indicado por la NOM-F-68-S-1980 se utilizó para determinar el contenido de proteína total. Se colocaron en un tubo Kjeldahl aproximadamente 0.5 ± 0.05 g de muestra (P), 3.5 g K_2SO_4 y 0.4 g $CuSO_4$ y 15 mL de H_2SO_4 . Posteriormente, los tubos se colocaron en el digestor. El equipo trabajó a 150 °C durante 30 min, luego a 250 °C por 30 min más, después a 350 °C por otros 30 min y finalmente a 400 °C por 60 min. Para asegurar que la digestión se hubiera completado, se levantó la gradilla y se comprobó que los tubos mostraran una

coloración verde clara debida a la presencia de cobre. Los tubos se dejaron enfriar durante aproximadamente 30 min y, una vez fríos, se añadieron 100 mL de agua destilada de manera lenta. Los tubos se colocaron individualmente en el destilador, y a la par se acopló un matraz de 250 mL, que contenía 25 mL de ácido bórico y una mezcla de indicadores, para recibir el destilado. Finalmente, el destilado recuperado se tituló con HCl 0.1 N hasta el vire de verde a rojo y se calculó el contenido de nitrógeno utilizando la siguiente fórmula:

$$\% N = \frac{V \times N \times 0.014 \times 100}{P}$$

En donde:

V = mililitros de HCl utilizados para la titulación de la muestra – mililitros de HCl utilizados para la titulación del blanco

N = Normalidad del HCl (eq/L)

P = gramos de muestra

0.014 = Miliequivalentes del nitrógeno

Se calculó el porcentaje de proteína a partir del porcentaje de nitrógeno con la fórmula:

$$\% \text{ proteína} = \% N \times 6.25$$

5.1.3.4.2. Método Bradford

El reactivo se preparó disolviendo 100 mg de Azul de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol al 95%. Después se agregaron 100 mL de ácido fosfórico al 85%. Y finalmente, se completó el volumen a 1 L.

Para determinar el contenido de proteína, se colocaron en tubos Eppendorf 200 µL de muestra o estándar de la curva y a continuación se adicionó 1 mL del reactivo de Bradford. Se mezcló con un vórtex y se midió la absorbancia a 595 nm en un tiempo no menor a 5 min y no superior a 1 h de reacción.

La curva estándar se elaboró con el uso de diluciones seriadas disponibles en el kit “Quick Start Bovine Serum Albumin Standard Set” de la marca Bio-Rad, las concentraciones utilizadas fueron: 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 y 2 mg/mL (BioRad, México). Con los resultados obtenidos se elaboró una gráfica de absorbancia vs concentración (mg/mL), con la gráfica se obtuvo la ecuación de la recta y en base a

ésta se calculó el contenido de proteína. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

5.2. Efecto del US en el rendimiento y la composición de GOS producidos

5.2.1. Determinación de la actividad enzimática

Se estableció la actividad de la enzima por medio del método propuesto por González et al., (2017) con modificaciones, utilizando como sustrato o-nitrofenol β -D-galactopiranosido (o-NPG). A 1.35 mL de amortiguador de fosfato potásico 20 mM (pH=6.5) se adicionaron 100 μ L de solución enzimática, 100 μ L de o-NPG 34 mM (disuelto en amortiguador de fosfato potásico 20 mM). Se incubó a 40 °C durante 10 min y, transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción mediante la adición de 100 μ L de Na₂CO₃ de concentración 1 M. Se midió la densidad óptica a 420 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 10). Se define una unidad de actividad de lactasa (U) a la cantidad necesaria de la enzima para la liberación de 1 μ mol de o-nitrofenol (o-NP) por minuto a 40°C, durante un periodo de tiempo de 10 min. Para hacer la muestra del blanco de calibración se empleó agua destilada en lugar de la enzima. La relación entre la concentración de o-NPG y la absorbancia máxima del o-NP a 420 nm se determinó haciendo una curva de calibración a diferentes concentraciones de o-NP (0.4, 3.6, 6.8, 9.8, 12.8 mM) a temperatura ambiente. La determinación se realizó por triplicado.

5.2.2. Desmineralización de PSD

Se removió el calcio presente en PSD por medio de la técnica que se reporta en la patente No. 7927641. Para ello, el pH del permeado se ajustó a 7.2 con el uso de NaOH 0.1 N. La mezcla se calentó a 80°C por 30 min, para después centrifugarse a 6000 rpm y finalmente filtrarse al vacío.

5.2.3. Hidrólisis y transgalactosilación de lactosa con β -gal

En base a lo reportado por Huicochea (2023), en la reacción de la lactosa presente en el suero con β -gal se propicia la formación de GOS con la aplicación de US. Por lo que se llevó a cabo la reacción con y sin aplicación de US empleando las mejores condiciones de reacción reportadas por el mismo autor para favorecer la formación de GOS: por 3 horas, a 270 g/L de concentración inicial, pH=6.5, T=40 °C y con enzima libre en proporción de 6 U/mL. Además, se realizaron las reacciones con y sin aplicación de US en 2 distintos sustratos: PSD y solución de lactosa en buffer,

ambos con una concentración ajustada de lactosa de 270 g/L. En los tratamientos en los que se hizo uso de aplicación de US fue a una amplitud de 40% con un ciclo pulsado de 3 s “encendido” y 27 s “apagado”.

Se realizaron los 4 tratamientos (Cuadro 3) por triplicado. La toma de muestra se hizo al inicio de la reacción (t=0 min) y cada 30 min (a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min).

Cuadro 3. Tratamientos para la reacción con β -gal

Tratamiento	Sustrato	Aplicación de US
PS	PSD	Sí
PNS	PSD	No
LS	Lactosa en buffer	Sí
LSN	Lactosa en buffer	No

PS: permeado sonicado. PNS: permeado no sonicado. LS: lactosa sonicada. LSN: lactosa no sonicada.

5.2.4. Cuantificación

Para cada estándar (galactosa, glucosa, lactosa, maltotriosa y estaquiosa), se construyeron curvas de calibración utilizando 5 concentraciones diferentes (0.125, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 mg/mL). Se cuantificó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) la cantidad de GOS en las muestras tomadas de los distintos tratamientos a los respectivos tiempos de reacción. Las muestras fueron diluidas con agua grado HPLC para que tuvieran una concentración aproximada de 1 mg/mL, se pasaron por un filtro de tamaño de poro de 0.45 μ m y se analizaron en un HPLC con detector de índice de refracción y columna Hi-Plex Ca (Duo). Se utilizó como fase móvil agua grado HPLC desgasificada y filtrada. Las condiciones utilizadas fueron: $T_{\text{columna}}=80$ °C, flujo=0.3 mL/min, $V_{\text{inyección}}=10$ μ L y $t_{\text{corrida}}=30$ min. Los datos se procesaron utilizando el software HP ChemStation.

5.2.5. Caracterización

Se realizó la caracterización de los productos de transgalactosilación de la lactosa presente en suero mediante un sistema de cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC) acoplado a espectrometría de masas (MS) acorde al método propuesto por Zerva et al. (2021) con modificaciones. El sistema consistió en una cromatografía líquida de interacción hidrófila para la separación de mono, di y oligosacáridos; empleando una columna XBridge BEH Amide (2.1 mm x 150 mm, 2.5 μ m). Previo al análisis, se diluyeron las muestras 150 veces en una solución

acetonitrilo (ACN)/agua (50:50). La columna se utilizó a 35 °C. Para la fase móvil, se utilizó agua (disolvente A) y ACN/agua (95:5) (disolvente B), ambos contenían formiato de amonio 1 mM y ácido fórmico 0.01%. En el gradiente de elución se inició con una fase móvil de 100% B por 2 min, seguido de una disminución gradual hasta el 10% B en 10 min (t:12 min) y se mantuvo constante por 2 min (t:14 min). Para finalizar en restaurar al 100% B en 0.1 min (t: 14.1 min) y mantener equilibrando la columna durante 11 min, lo que resultó en un tiempo de análisis de 25 min. Se estableció un caudal de fase móvil en 0.1 mL/min y el volumen de inyección de la muestra fue de 8 µL. Las condiciones de espectrometría de masas fueron: se operó en modos de ionización positivo y negativo, energía de colisión baja=4 eV, rampa de energía de colisión alta=10-50 eV, temperatura de la fuente=120 °C (con nitrógeno como gas de desolvatación, 350 L/h a 250 °C), voltaje del capilar=2.5 kV (en positivo) y 2.7 kV (en negativo).

5.3. Formulación de una bebida a base de permeado de suero dulce reaccionado (PSDR) y evaluación de su calidad

Se utilizó un diseño factorial 2² para establecer las distintas formulaciones a evaluar, de manera que se evaluaron 4 formulaciones. Se variaron las cantidades de PSDR y enmascarante. Las distintas formulaciones de la bebida evaluadas se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Formulaciones evaluadas de la bebida

Componente	Proporción (%)			
	Formulación 1 (542)	Formulación 2 (351)	Formulación 3 (729)	Formulación 4 (267)
Agua	48.9	48.75	18.9	18.75
PSDR	50	50	80	80
Saborizante	1	1	1	1
Enmascarante	0.1	0.25	0.1	0.25

5.3.1. Análisis microbiológicos

Previo a realizar la evaluación sensorial, se hicieron los análisis microbiológicos correspondientes para garantizar la inocuidad de las 4 bebidas que se proporcionarían a los panelistas. Los análisis microbiológicos fueron establecidos en base a lo fijado por la NOM-218-SSA1-2011 y se realizaron acorde a los métodos

establecidos en las normas mexicanas NOM-113-SSA1-1994 (coliformes), NOM-111-SSA1-1994 (hongos y levaduras) y NOM-092-SSA1 (mesófilos aerobios).

5.3.1.1. Coliformes

Se utilizó el método descrito en la NOM-113-SSA1-1994 para determinar la cuenta de coliformes. En una placa Petri, se agregó 1 mL de muestra y 15 a 20 mL de agar bilis rojo violeta. Después de homogeneizar la muestra con el medio, se permitió que las placas solidificaran. Las placas se incubaron por 24 ± 2 h a una temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Se reportó el número de colonias como UFC/g.

5.3.1.2. Hongos y levaduras

Se utilizó el método descrito en la NOM-111-SSA1-1994 para determinar el contenido de hongos y levaduras. En una placa Petri, se agregó 1 mL de muestra y 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado con ácido láctico. Después de homogeneizar la muestra con el medio, se permitió que las placas solidificaran para después ser incubadas a una temperatura de $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 días. Se hicieron los conteos de las placas desde el tercer hasta el quinto día y se reportó el número de colonias como UFC/g.

5.3.1.3. Mesófilos aerobios

Se utilizó el método descrito en la NOM-092-SSA1-1994 para determinar el recuento de mesófilos aerobios. En una placa Petri, se agregaron 1 mL de muestra y 15 a 20 mL de agar para métodos estándar. Se homogeneizó la muestra con el medio y una vez solidificadas las placas, se incubaron a una temperatura de $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 h. Se reportó el número de colonias como UFC/g.

5.3.2. Evaluación sensorial

La mejor formulación se determinó en base a los resultados de una evaluación sensorial donde 50 consumidores evaluaron el agrado general en las 4 formulaciones por medio de una escala hedónica de 7 puntos e indicaron la de su mayor y menor preferencia, el formato que se proporcionó para la evaluación sensorial de los consumidores se observa en el Anexo 1. El panel de evaluación consistió en 50 personas, el número de participantes requeridos se basa en lo indicado por (Portero, 2018) respecto a que el tamaño mínimo del panel sensorial en una prueba de preferencia y aceptabilidad debe ser de 50 personas, además de que ha sido el número de participantes utilizados previamente (da Silveira et al., 2015) en la

evaluación sensorial de bebidas a base de suero lácteo. Los participantes reclutados fueron estudiantes y docentes de la Universidad Autónoma de Querétaro, no entrenados, sin exclusión de género, de edades entre 18 y 70 años, que consumían productos lácteos 3 o más veces por semana y que no presentaban intolerancia a la lactosa y/o alergia o alguna enfermedad que no les permitiera llevar a cabo la evaluación sensorial. Se recolectó de cada evaluador un consentimiento informado (Anexo 2), que incluyó de manera general las características del estudio, evitando dar información que pueda sesgar su evaluación. Los consumidores fueron reclutados por medio de infografía en físico y en digital (Anexo 3).

Para la evaluación sensorial, a cada panelista se le dieron 10 mL de bebida ($T=4\text{ }^{\circ}\text{C}$) de cada una de las formulaciones elaboradas colocadas en vasos de plástico inocuos, acomodadas de manera aleatorizada e identificadas con un código no informativo de 3 dígitos. Entre cada muestra, el evaluador tomó agua y comió un trozo de galleta para limpiar su paladar. El panelista registró los resultados de su evaluación en el formato de evaluación sensorial (Anexo 1). La formulación establecida como la mejor en base a los resultados de la evaluación sensorial fue considerada como el producto final y a éste se le hicieron los análisis de calidad correspondientes.

5.3.3. Evaluación de la calidad del producto final

5.3.3.1. Análisis fisicoquímicos

5.3.3.1.1. pH

El pH fue medido acorde a lo mencionado previamente en el punto 5.1.3.1.

5.3.3.1.2. Acidez titulable

Se empleó el método definido en la NOM-F-420-S-1982 para la determinación de acidez titulable. A partir de los mililitros de NaOH 0.1 N gastado en la titulación, se calculó el valor de acidez titulable con la fórmula:

$$\text{acidez titulable} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{V \text{ NaOH} \times N \text{ NaOH} \times \text{Eq. ácido}}{V \text{ muestra}}$$

En donde:

V NaOH = mililitros de NaOH 0.1N gastados en la titulación

N NaOH = normalidad de la solución de NaOH (eq/mL)

Eq. Ácido = equivalentes de ácido láctico (90 g/eq)

V muestra = volumen de la muestra a titular (10 mL)

5.3.3.1.3. Grados Brix

La medición del contenido de sólidos solubles totales se llevó a cabo utilizando un refractómetro y se expresó en grados Brix (°Bx), siguiendo el procedimiento descrito en la NMX-F-236-S-1979.

5.3.3.1.4. Actividad de agua (Aw)

Para medir el valor de Aw, acorde al método ISO:18787, se utilizó el equipo Aqualab series 3. En primer lugar, se encendió el equipo y se dejó en funcionamiento durante 30 min para luego calibrarlo con agua desionizada. Posteriormente, se colocó la muestra en la celda del equipo, procurando no llenarla más allá de $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad. A continuación, se situó la celda en el portacelda y se cerró girando la perilla para dar inicio al análisis de la muestra. Una vez que el equipo emitió un sonido y una luz parpadeara, indicando el final del análisis, se tomó la lectura final mostrada en la pantalla.

5.3.3.1.5. AR

El contenido de AR fue determinado acorde a lo mencionado previamente en el punto 5.1.3.3.

5.3.3.2. Bromatológicos

Los parámetros bromatológicos se analizaron siguiendo los procedimientos establecidos por las normas mexicanas: humedad (NOM-116-SSA1-1994), cenizas (NMX-F-066-S-1978), grasa (NOM-086-SSA1-1994), proteína (NOM-F-68-S-1980) y carbohidratos (por diferencia). Los análisis se realizarán por triplicado.

5.3.3.2.1. Humedad

El contenido de humedad fue determinado acorde a lo mencionado previamente en el punto 5.1.3.2.

5.3.3.2.2. Cenizas

El contenido de cenizas se determinó utilizando la técnica establecida por la NMX-F-066-S-1978, se emplearon los mismos crisoles con muestra libre de humedad utilizados en la determinación de humedad. Primero se calcinó la muestra calentándola en un plato caliente hasta que cesó la emisión de gases, después se colocó en la mufla el crisol con la muestra y se incineró por 2-3 h a una temperatura de 500-550 °C. Una vez que paso el tiempo, los crisoles se retiraron cuidadosamente

y se dejaron enfriar en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiental. Se registró el peso (P_3) de los crisoles que contenían las cenizas y se utilizó junto con los mismos pesos de los crisoles vacíos (P_1) y de las muestras (P_2) empleados en la determinación de humedad para calcular el porcentaje de cenizas con la fórmula:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{P_3 - P_1}{P_2} \times 100$$

En donde:

P_1 = Peso del crisol vacío (g)

P_2 = Peso de la muestra (g)

P_3 = Peso del crisol con cenizas (g)

5.3.3.2.3. Grasa

Se utilizó el método establecido en la NMX-F-086-S-1978 para determinar el contenido de grasa cruda. Se emplearon vasos de precipitados previamente llevados a peso constante (P_1). Se colocaron aproximadamente 4 ± 0.5 g de muestra seca (P_2) en cada cartucho y se añadieron 80 mL de éter de petróleo en el vaso de precipitados, todo se montó en el sistema Goldfish. Conectadas las mangueras de recirculación de agua, se procedió a calentar gradualmente hasta que se tuviera una velocidad de condensación de 5 o 6 gotas por segundo en el cartucho, manteniendo la temperatura del agua de recirculación a 4 °C. La extracción se llevó a cabo durante 4-6 h. Luego, el solvente restante en el vaso se evaporó por calentamiento en una parrilla y, una vez enfriado a la temperatura del ambiente en desecador, se registró su peso (P_3). Para calcular el porcentaje de grasa cruda en la muestra, se utilizó la fórmula:

$$\% \text{ grasa cruda} = \frac{P_3 - P_1}{P_2} \times 100$$

En donde:

P_1 = Peso del vaso sin grasa (g)

P_2 = Peso de muestra (g)

P_3 = Peso del vaso con grasa (g)

5.3.3.2.4. Proteína

El contenido de proteína fue determinado acorde a lo mencionado previamente en el punto 5.1.3.4.2.

5.3.3.2.5. Fibra dietética

El contenido de fibra dietética fue determinado haciendo uso del “kit de ensayo de fibra dietética total” de la marca Sigma, siguiendo el procedimiento establecido por el manual del kit, que se basa en el método AOAC 985.29. El ensayo se basa en la determinación del contenido total de fibra dietética de los alimentos utilizando una combinación de métodos enzimáticos y gravimétricos.

A las muestras de la bebida (libres de humedad) se les agregó buffer de fosfatos 0.08 M (pH=6) y se reaccionaron con α -amilasa por 15 min a 95 °C. Se ajustó el pH a 7.5 ± 0.2 con NaOH 0.275 N, se agregó la proteasa y se incubó 30 min a 60 °C. Posteriormente, se ajustó el pH entre 4.0 y 4.6 con HCl 0.325 M, se adicionó la amilogucosidasa y nuevamente se incubó 30 min a 60 °C. Se agregó etanol para precipitar la fibra dietética soluble durante toda una noche. Después el residuo fue filtrado y lavado con etanol (de 2 distintas concentraciones, 78 y 95%) y acetona, secado a 105 °C por una noche y pesado. Finalmente, para calcular el contenido de fibra dietética se restaron al residuo los pesos de cenizas y proteína con la fórmula:

$$\% \text{ fibra dietética total} = \frac{Pr - \frac{(Pm)(\% \text{ proteína})}{100} - \frac{(Pm)(\% \text{ cenizas})}{100} - Pb}{Pm} \times 100$$

En donde:

Pr = Masa del residuo (g)

Pm = Masa de la muestra (g)

Pb = Masa del blanco (g)

5.3.3.2.6. Carbohidratos

Se estimó el porcentaje de carbohidratos en la bebida por diferencia, en base a las normas de etiquetado nutricional de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), mediante la fórmula:

$$\% \text{ carbohidratos} = 100 - \% \text{ humedad} - \% \text{ proteína} - \% \text{ grasa} - \% \text{ cenizas}$$

(CFR, 2024)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Obtención y caracterización de SD y PSD

En el Cuadro 5 se muestran los resultados de la caracterización fisicoquímica del SD obtenido de la elaboración de queso panela y del PSD obtenido por la ultrafiltración del SD. Se observa que hubo diferencias significativas en todos los parámetros entre las muestras de SD y PSD. Al ultrafiltrar la muestra, hubo una disminución ligera de pH. El proceso de ultrafiltración consiste principalmente en la retención de las proteínas del suero en la fracción del concentrado, mientras que en el permeado se encuentran la mayor parte de la lactosa, minerales y agua; debido a esto es que se puede notar que en el permeado hubo un contenido casi nulo de proteína, una reducción de aproximadamente 1% del contenido de lactosa y a su vez, al disminuir el contenido de sólidos totales respecto al suero. Cabe resaltar que los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de SD y PSD coinciden con los previamente reportados por Melnikova et. al (2023) y por Pérez et. al (2020).

Cuadro 5. Caracterización fisicoquímica de SD y PSD

Muestra	pH ± DE	% ST ± DE	% AR (lactosa) ± DE	% proteína ± DE
SD	6.66 ± 0.01 ^a	8.39 ± 0.02 ^a	4.94 ± 0.07 ^a	* 1.12 ± 0.04 ^a
PSD	6.55 ± 0.01 ^b	5.75 ± 0.01 ^b	3.95 ± 0.15 ^b	** 0.01 ± 0.00 ^b

* método Kjeldahl

** método Bradford

Datos presentados como la media ± la desviación estándar (DE) de 3 réplicas. Comparación de medias entre muestras por prueba t de student ($\alpha=0.05$).

6.2. Efecto del US en el rendimiento y la composición de GOS producidos

6.2.1. Efecto de la aplicación del US en los productos de la reacción

Se observa en la Figura 13 el rendimiento de GOS formados (cuantificados como tri y tetrasacáridos) a lo largo de la reacción. Para calcular el rendimiento de GOS producidos a partir de lactosa, primero se determinaron los contenidos (en mg/mL) de tri y tetrasacáridos de cada una de las muestras, utilizando la curva de calibración respectiva para cada tipo de compuesto. Después se calculó el rendimiento por la fórmula:

$$\% \text{ rendimiento producción GOS} = \frac{[\text{trisacáridos}] + [\text{tetrasacáridos}]}{[\text{Lactosa}_{\text{inicial}}]} \times 100$$

El rendimiento de producción de GOS se consideró como el porcentaje de GOS producidos (estimados como la suma de tri y tetrasacáridos) respecto a la cantidad de lactosa al inicio de la reacción, por lo tanto, a su vez representa el porcentaje de conversión de lactosa en GOS. Puede apreciarse que del minuto 0 al 60 todos los tratamientos tienen un comportamiento similar en términos de formación de GOS, no hay diferencia significativa entre todos los tratamientos ($p=0.37$ y 0.99 en la comparación de los 4 tratamientos a 30 y 60 min de reacción, respectivamente, por medio de una prueba ANOVA con $n=3$ y $\alpha=0.05$), sin embargo, transcurrido este tiempo los tratamientos de soluciones de lactosa en buffer (con y sin aplicación de US) y de permeado sin sonicación presentan una disminución de los GOS, lo cual pudo deberse al consumo del sustrato (lactosa) que es necesario para propiciar la reacción de transgalactosilación y/o a una hidrólisis de los GOS que ya se habían formado (Huicochea, 2023). Por otra parte, en el tratamiento donde se utilizó permeado como sustrato y se aplicó US para asistir la reacción hubo un aumento de producción de GOS, incrementando $\approx 11.5\%$ el rendimiento respecto al rendimiento máximo del 25% de los demás tratamientos, en este tratamiento no hubo diferencias significativas ($p=0.92$ como resultado de la comparación de medias por ANOVA con $n=3$ y $\alpha=0.05$) en los rendimientos a partir de los 90 min de reacción. Adicionalmente, resultó evidente que la aplicación de US tuvo un efecto en el rendimiento de GOS producidos ya que los tratamientos con sonicación (ya sea con lactosa en buffer o permeado como sustrato) presentaron mayor formación de GOS que en los que no se aplicó US. Similar a lo reportado por Bhargava et al. (2021), donde se sugiere que el US favorece las reacciones enzimáticas al disminuir la energía de activación necesaria para que éstas se lleven a cabo y a su vez facilita el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima. Huicochea (2023) reportó que al aplicar US para asistir esta reacción enzimática hay una mayor conservación de la actividad de la enzima; por otro lado, Córdova et al. (2023) obtuvieron un mayor rendimiento de GOS producidos en una reacción asistida con US en suero nativo. Finalmente, también resulta evidente que hubo un aumento en la formación de GOS al utilizar permeado que lactosa en buffer como sustrato, lo que concuerda con lo reportado previamente por Fischer y Kleinschmidt (2018) que obtuvieron mayores rendimientos con β -gal de *K. lactis* en permeado de suero dulce que en lactosa en buffer lo cual atribuyen a la

presencia de minerales en el permeado (principalmente K^+ y Na^+) que tienen efecto activador en la enzima.

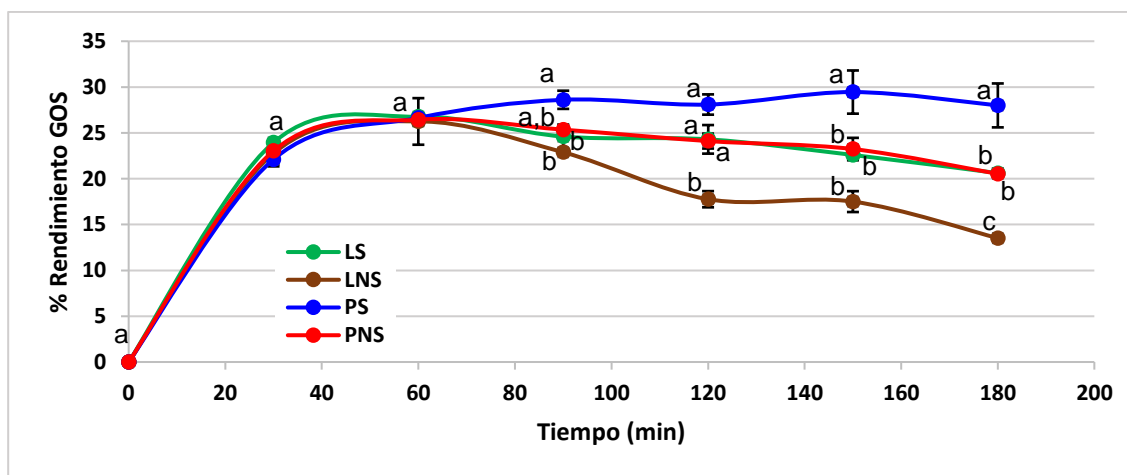


Figura 13. Rendimiento de GOS producidos a lo largo de la reacción. LS=lactosa en buffer con sonicación, LNS=lactosa en buffer sin sonicación, PS=permeado con sonicación, PNS=permeado sin sonicación. Datos presentados como la media \pm DE de 3 réplicas. Las letras diferentes en un mismo tiempo de reacción indican diferencias significativas entre tratamientos, en base a una comparación de medias por prueba Tukey ($\alpha=0.05$).

En la Figura 14 se aprecia la cinética de disminución de lactosa durante las 3 horas de reacción con la enzima β -gal de *K. lactis*, se puede apreciar una reducción de aproximadamente un 80% del contenido de lactosa inicial al haber transcurrido las 3 horas de reacción. Es apreciable que a lo largo de la reacción parece haber un menor consumo de lactosa (debido a que se encuentra en mayor concentración) en el tratamiento de permeado sonicado, lo cual parece ser contradictorio debido a que al ser el tratamiento con mayor producción de GOS se esperaba un mayor consumo de lactosa ya que es uno de los sustratos requeridos para producir GOS. Sin embargo, cabe resaltar que en el método empleado para la cuantificación (HPLC) todos los disacáridos eluyen al mismo tiempo de retención, por lo que la lactosa y otros disacáridos son cuantificados en conjunto. Dado esto, no fue posible distinguir la presencia de otros disacáridos presentes por medio de este método de cuantificación. No obstante, puede sospecharse que se trata de disacáridos distintos de la lactosa formados por la reacción, ya que previamente ha sido reportado por Rico et. al (2020) que hay una mayor formación de disacáridos y trisacáridos al utilizar la enzima β -gal de *K. lactis*.

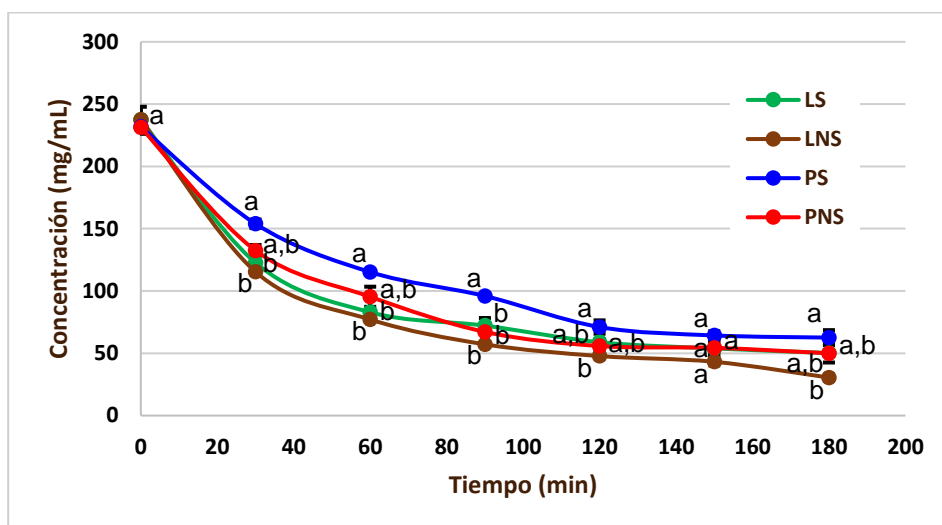


Figura 14. Contenido de lactosa a lo largo de la reacción. LS=lactosa en buffer con sonicación, LNS=lactosa en buffer sin sonicación, PS=permeado con sonicación, PNS=permeado sin sonicación. Datos presentados como la media \pm DE de 3 réplicas. Las letras diferentes en un mismo tiempo de reacción indican diferencias significativas entre tratamientos, en base a una comparación de medias por prueba Tukey ($\alpha=0.05$).

La Figura 15 muestra el contenido de galactosa en el transcurso de la reacción. De manera general, se observa un creciente aumento de la cantidad de galactosa con el aumento del tiempo de reacción. Es perceptible que hay aumento en la liberación de galactosa en los tratamientos donde se empleó US para asistir la reacción, a causa de que, como ya mencionó previamente, el US favorece la actividad de esta enzima en particular. Dicha actividad puede catalizar tanto la reacción de transgalactosilación como la de hidrólisis (en la cual se forma la galactosa). Por otra parte, en soluciones de lactosa en buffer fue mayor el contenido de galactosa obtenida que en permeado, lo que podría ser un indicativo de que al utilizar lactosa en buffer como sustrato se favorece más la reacción de hidrólisis y al utilizar permeado se ve favorecida la reacción de transgalactosilación; lo anterior puesto que la menor concentración de galactosa en los tratamientos con permeado apunta a un mayor consumo de ésta como sustrato para la formación de GOS, lo que se confirmaría a su vez por la mayor producción de GOS en dichos tratamientos.

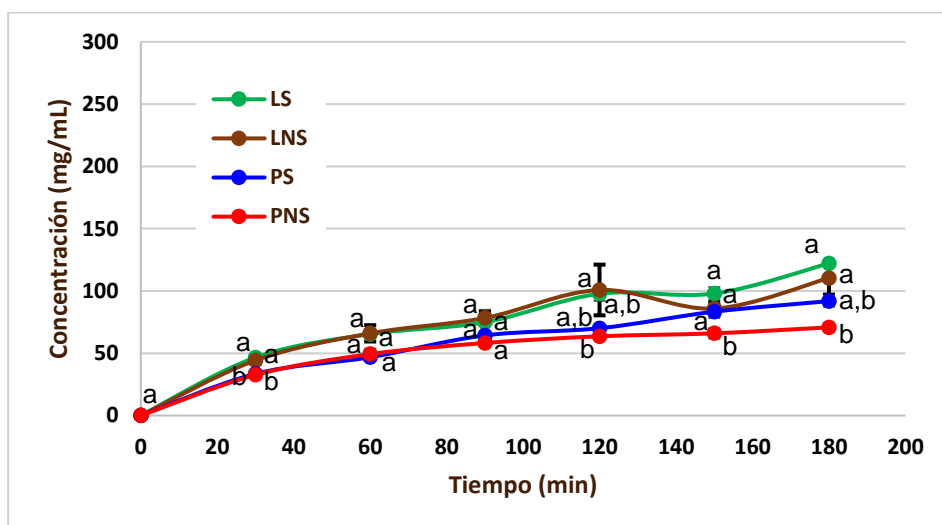


Figura 15. Contenido de galactosa a lo largo de la reacción. LS=lactosa en buffer con sonicación, LNS=lactosa en buffer sin sonicación, PS=permeado con sonicación, PNS=permeado sin sonicación. Datos presentados como la media \pm DE de 3 réplicas. Las letras diferentes en un mismo tiempo de reacción indican diferencias significativas entre tratamientos, en base a una comparación de medias por prueba Tukey ($\alpha=0.05$).

La cinética de formación de glucosa se puede ver en la Figura 16. Al igual que con la galactosa, se evidencia una clara tendencia de aumento en la concentración de glucosa al aumentar el tiempo de reacción. No obstante, la concentración de glucosa durante y al final de la reacción es mayor a la de galactosa (Figura 15) debido a que a pesar de que ambos compuestos son resultado de la reacción de hidrólisis, que es llevada a cabo por la enzima β -gal, es importante recordar que asimismo la enzima lleva a cabo la reacción de transgalactosilación en la cual utiliza lactosa y galactosa para formar GOS (Li et. al, 2019), lo que justificaría la menor cantidad de galactosa que de glucosa. Así también, la aplicación de US permitió la obtención de mayor cantidad de glucosa lo que constata una vez más que la enzima tiene mayor actividad (en este caso de hidrólisis) ante el uso de ese tratamiento.

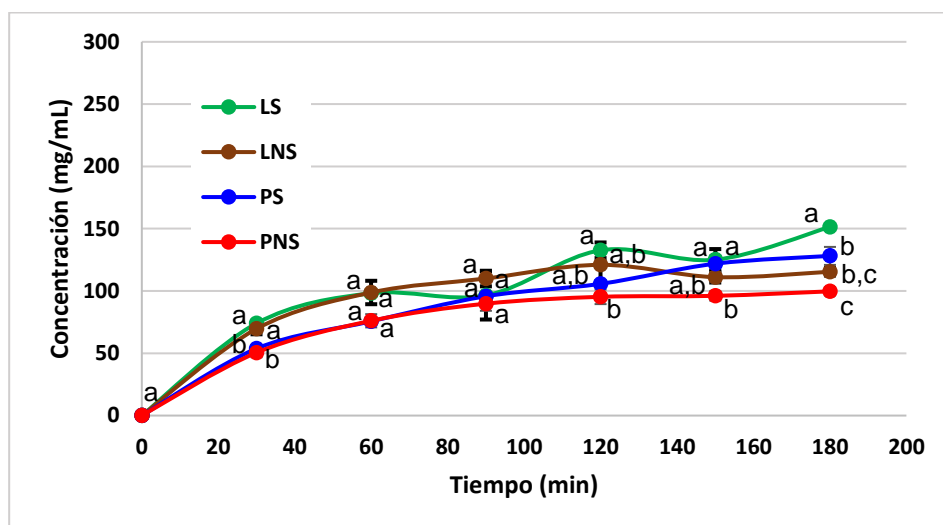


Figura 16. Contenido de glucosa a lo largo de la reacción. LS=lactosa en buffer con sonicación, LNS=lactosa en buffer sin sonicación, PS=permeado con sonicación, PNS=permeado sin sonicación. Datos presentados como la media \pm DE de 3 réplicas. Las letras diferentes en un mismo tiempo de reacción indican diferencias significativas entre tratamientos, en base a una comparación de medias por prueba Tukey ($\alpha=0.05$).

6.2.2. Caracterización de los productos de la reacción

Mediante el uso de UPLC-MS se caracterizaron los disacáridos (DS) y GOS (trisacáridos (TRS), tetrasacáridos (TES) y pentasacáridos (PTS)) presentes en las muestras de permeado: nativo (PN), previo a la reacción ajustado a 270 g/L de lactosa (PAR), después de 90 min de reacción con aplicación de US (PS) y después de 90 min de reacción sin aplicación de US (PNS). Se estableció que la caracterización de los productos de la reacción enzimática se haría en las muestras de permeado reaccionado por 90 min ya que a ese tiempo de reacción fue donde se obtuvo un rendimiento máximo en la producción de GOS (ver Figura 13).

Dado que no se tenía acceso a estándares de referencia, para la identificación de los compuestos se llevó a cabo una identificación putativa, mediante el uso de una librería creada de manera interna con las estructuras de los posibles GOS que pudieran encontrarse en la muestra, los cuáles fueron previamente reportados por distintos autores (Gopal y Gill, 2000; Urrutia et al., 2013; Urashima et al., 2015; Van Leeuwen et al., 2016; Yin et al., 2017; Lee et al., 2019; Duncan et al., 2020; Zerva et al., 2021) en muestras de permeado nativo y como productos de la reacción de lactosa (ya sea en permeado, suero o solución de lactosa en buffer) con β -gal de

diversas fuentes. Además, para la detección de los compuestos presentes en las muestras se consideró en el análisis de datos la formación de posibles aductos que se producen debido a la ionización: $[M-H]^-$ (para el modo de ionización negativo) y $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ y $[M+H-H_2O]^+$ (para el modo de ionización positivo). Se examinó el espectro de masas de cada una de las muestras inyectadas. Se estableció una precisión de masa de 5 ppm para la identificación tanto en iones precursores como en los fragmentos detectados. Se verificó la presencia de los compuestos a partir de la fragmentación *in silico* realizada por el Sistema de Información Científica UNIFI de Waters y de comparación de los fragmentos encontrados en los espectros de masas experimentales con espectros de masas de referencia localizados en bases de datos (HMDB y PubChem) (TMIC, 2021a; TMIC, 2021b; TMIC, 2021c; TMIC, 2021d; TMIC, 2022a; TMIC, 2022b; TMIC, 2022c; TMIC, 2022d; TMIC, 2022e; TMIC, 2022f; TMIC, 2022g; NCBI, 2024) y reportados anteriormente en artículos (Huang et al., 2021; Zerva et al., 2021). En los Cuadros 6, 7, 8 y 9 se muestran los resultados obtenidos por UPLC-MS para la identificación de los compuestos en las muestras de permeado.

Cuadro 6. Disacáridos (DS) y GOS presentes en permeado nativo (PN)

Compuesto identificado	Modo de ionización	Aducto	Abundancia relativa (%)	Fragmentos principales
Disacárido				
Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc (Lactosa)	Negativo / Positivo	-H / +H, +NH ₄ , +H-H ₂ O	94.087	341.109 (-)
				263.078 (-)
				179.057 (-)
				161.046 (-)
				101.025 (-)
				360.150 (+)
				343.123 (+)
				325.113 (+)
				163.061 (+)
				145.050 (+)
Trisacárido				
Gal- β (1 \rightarrow 3)-Gal- β (1 \rightarrow 6)-Glc	Negativo	-H	0.196	339.200
				325.185
				311.169
				297.153

				183.012
Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc	Negativo	-H	0.102	469.248
				283.265
				255.233
				131.071
				72.993
Tetrasacárido				
Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc	Negativo / Positivo	+H	0.353	379.086 (-)
				357.042 (-)
				289.055 (-)
				199.023 (-)
				141.018 (-)
				360.150 (+)
				343.123 (+)
				325.113 (+)
				163.061 (+)
145.050 (+)				
Otro				
3'-sialilactosa (3'-SL)	Negativo	-H	2.931	632.205
				308.802
				300.050
				242.080
				78.960
3-galactosil-lactosa	Negativo	-H	1.381	357.104
				289.055
				259.023
				243.049
				221.067
N-acetil-galactosaminil-lactosa	Negativo	-H	0.387	341.109
				179.057
				161.046
				101.025
				73.031
N-acetil-lactosamina	Negativo	-H	0.221	395.059
				352.845
				308.857

				195.052
				96.970
N-acetil-D-galactosamina	Negativo	-H	0.142	220.083
				210.949
				155.010
				152.996
				111.021
6-glucolil-neuraminil-lactosa	Negativo	-H	0.138	341.109
				179.057
				161.046
				101.025
N-acetil-D-glucosamina	Negativo	-H	0.026	97.030
				218.951
				157.01202
				155.0103
3- α -fucosil-N-acetil-lactosamina	Positivo	+H	0.025	111.0206
				89.025
				551.327
				495.264
6-sialil-N-acetil-lactosamina	Negativo	-H	0.013	439.202
				383.139
				327.077
				632.205
				421.066
				300.050
				242.080
				78.960

Zerva et al. (2021) analizaron por UPLC-MS los GOS formados por la reacción de transgalactosilación de la lactosa en suero ácido. Reportaron como valores m/z característicos de iones padre (en el espectro MS) 325, 343 y 360 con los aductos $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H]^+$ y $[M+NH_4]^+$ respectivamente, para DS; 505 y 522 con los aductos $[M+H]^+$ y $[M+NH_4]^+$ para TRS y 684 con el aducto $[M+NH_4]^+$ para TES. Además, para fragmentos iónicos (del espectro MS/MS) reportaron valores m/z de 85 (para DS), 127 (para DS), 145 (para DS), 163 (para DS, TRS y TES), 325 (para

DS, TRS y TES) y 365 (para TES). En cada uno de los compuestos identificados y reportados en los Cuadros 6, 7, 8 y 9 se verificó la presencia de los valores m/z mencionados con anterioridad, ajustándolos al respectivo aducto aplicado en función del modo de ionización empleado. Al igual que en el estudio citado previamente, algunos de los compuestos identificados se detectaron en más de una forma ionizada.

Cuadro 7. DS y GOS presentes en permeado ajustado antes de la reacción (PAR)

Compuesto identificado	Modo de ionización	Aducto	Abundancia relativa (%)	Fragmentos principales
Disacárido				
Gal-β(1→4)-Glc (Lactosa)	Negativo	-H	70.312	341.109
				263.078
				179.056
				161.046
				101.025
Gal-β(1→6)-Glc (Alolactosa)	Positivo	+NH ₄ , +H-H ₂ O, +H	4.535	343.123
				325.113
				163.061
				145.050
				85.028
Trisacárido				
Gal-β(1→2)-[Gal-β(1→6)]-Glc	Negativo	-H	20.977	503.163
				425.131
				383.120
				357.104
				221.067
Gal-β(1→3)-Gal-β(1→6)-Glc	Negativo	-H	0.600	341.109
				263.077
				179.057
				161.046
				101.025
Gal-β(1→6)-Gal-β(1→4)-Glc	Negativo	-H	0.055	455.214
				381.195
				307.122
				263.096

				227.998
Tetrasacárido				
Gal-β(1→6)-Gal-β(1→6)-Gal-β(1→4)-Glc	Negativo / Positivo	-H / +H	0.253	379.085 (-)
				248.961 (-)
				199.023 (-)
				154.997 (-)
				112.987 (-)
				360.150 (+)
				343.123 (+)
				325.113 (+)
				163.060 (+)
145.050 (+)				
Pentasacárido				
Gal-β(1→4)-Gal-β(1→4)-Gal-β(1→4)-Gal-β(1→2)-Glc	Negativo / Positivo	-H / +NH ₄	0.013	404.105 (-)
				379.023 (-)
				357.042 (-)
				311.037 (-)
				136.937 (-)
				727.427 (+)
				705.407 (+)
				664.402 (+)
				402.981 (+)
190.100 (+)				
Otro				
3'-sialilactosa (3'-SL)	Negativo	-H	1.969	632.205
				421.065
				300.049
				290.088
				78.960
3-galactosil-lactosa	Negativo	-H	0.908	503.163
				421.075
				409.097
				229.034
N-acetil-lactosamina	Negativo	-H	0.105	199.024
				143.036
				101.025

				97.030
				89.025
				73.030
N-acetil-galactosaminil-lactosa	Negativo	-H	0.081	341.109
				263.078
				179.056
				161.046
				101.025
6-glucolil-neuraminil-lactosa	Negativo	-H	0.070	341.109
				263.078
				179.056
				161.046
				101.025
N-acetil-D-galactosamina	Negativo	-H	0.063	186.078
				175.062
				144.057
				120.055
				106.042
N-acetil-D-glucosamina	Negativo	-H	0.022	214.913
				196.904
				183.012
				154.947
				136.937
3- α -fucosil-N-acetil-lactosamina	Positivo	+H	0.021	495.264
				439.202
				383.140
				327.077
				283.264
Disialillactosa	Negativo / Positivo	-H / +H, +H-H ₂ O	0.010	632.205 (-)
				421.066 (-)
				290.088 (-)
				242.080 (-)
				78.960 (-)
				786.980 (+)
				744.096 (+)
				737.768 (+)

				723.566 (+)
				680.219 (+)
6-sialil-N-acetil-lactosamina	Negativo	-H	0.005	632.205
				421.066
				290.088
				242.080
				179.057
Lacto-N-novopentaosa	Positivo	+NH ₄	0.001	786.679
				773.944
				751.006
				717.958
				656.869

Los compuestos identificados enlistados en los Cuadros 6 y 7 corresponden con los reportados con antelación por diversos autores (Gopal y Gill, 2000; Urashima et al., 2015; Duncan et al., 2020) como GOS nativos de la leche, que pudieran estar presentes en suero y permeado. En las muestras PN y PAR el principal compuesto presente fue la lactosa. Sin embargo, se puede apreciar en los Cuadros 8 y 9 que al ocurrir la reacción de transgalactosilación disminuyó significativamente la proporción encontrada de este compuesto en las muestras, conllevando el aumento de la presencia de los compuestos 6-galactobiosa (DS), alolactosa (DS), Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β (1 \rightarrow 3)-Glc (TRS), Gal- β (1 \rightarrow 2)-[Gal- β (1 \rightarrow 6)]-Glc (TRS) y Gal- β (1 \rightarrow 4)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Gal- β (1 \rightarrow 6)-Glc (TES). La formación y aumento de DS, TRS, TES y PTS lineales y ramificados es a causa de que, como lo indican Van Leeuwen et al. (2014), algunas β -galactosidasas pueden producir GOS lineales y ramificados (exclusivos o en mezclas) de distintos grados de polimerización.

Los resultados obtenidos también coinciden con los reportados por Huang et al. (2021) para el compuesto 6-galactobiosa. Para la comparación de los resultados, se tomó en cuenta que los valores m/z de fragmentación indicados por los autores consideraban el aducto [Na]⁺, por lo que al valor m/z se le restó dicho aducto y se aplicó el aducto correspondiente al modo de ionización del que se tratara. Teniendo presentes las consideraciones anteriores, los valores m/z del compuesto 6-galactobiosa obtenidos de manera experimental en el presente trabajo concordaron con los del informe previo.

Cuadro 8. DS y GOS presentes en permeado no sonificado (PNS)

Compuesto identificado	Modo de ionización	Aducto	Abundancia relativa (%)	Fragmentos principales
Disacárido				
Gal- β (1 \rightarrow 6)-Glc (Alolactosa)	Negativo	-H	27.542	243.049
				161.046
				113.025
				97.030
				73.030
Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc (Lactosa)	Positivo	+H	4.800	343.124
				325.113
				255.113
				163.061
				145.051
Trisacárido				
Gal- β (1 \rightarrow 2)-[Gal- β (1 \rightarrow 6)]-Glc	Negativo	-H	53.748	503.162
				341.109
				323.099
				179.057
				161.046
Tetrasacárido				
Gal- β (1 \rightarrow 4)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Gal- β (1 \rightarrow 6)-Glc	Negativo	-H	6.887	665.216
				545.173
				405.102
				383.120
				273.060
Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc	Positivo	+H	0.496	527.158
				343.124
				325.113
				163.061
				145.051
Gal- β (1 \rightarrow 3)-Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc	Negativo	-H	0.133	415.146
				161.046
				143.035
				113.025
				85.030

Pentasacárido				
Gal-β(1→4)-Gal-β(1→4)- Gal-β(1→4)-Gal-β(1→4)- Glc	Negativo / Positivo	-H / +H, +NH ₄	0.119	729.205 (-)
				647.201 (-)
				575.179 (-)
				254.909 (-)
				176.930 (-)
				343.124 (+)
				325.113 (+)
				163.061 (+)
				145.051 (+)
				91.040 (+)
Otro				
3'-sialilactosa (3'-SL)	Negativo	-H	0.765	632.205
				421.065
				359.119
				300.049
				179.057
N-acetil-galactosaminil- lactosa	Negativo / Positivo	-H / +H	0.084	415.146 (-)
				263.078 (-)
				161.046 (-)
				113.025 (-)
				85.030 (-)
				381.081 (+)
				343.124 (+)
				325.113 (+)
				163.061 (+)
				145.051 (+)
N-acetil-lactosamina	Negativo	-H	0.045	243.049
				161.046
				143.035
				113.025
				85.030
6-glucolil-neuraminil- lactosa	Negativo	-H	0.032	415.146
				161.046
				143.035
				113.025

				83.015
3- α -fucosil-N-acetil-lactosamina	Positivo	+H	0.017	495.264
				439.202
				383.139
				327.077
				283.264
N-acetil-D-galactosamina	Negativo	-H	0.016	161.046
				143.035
				113.025
				85.030
Disialillactosa	Negativo / Positivo	-H / +H, +H-H ₂ O	0.003	632.205 (-)
				421.065 (-)
				290.089 (-)
				253.093 (-)
				242.080 (-)
				817.241 (+)
				689.211 (+)
				527.158 (+)
				467.140 (+)
				365.107 (+)
Lacto-N-novopentaosa	Positivo	+H-H ₂ O	0.001	793.917
				766.733
				758.558
				715.472
				523.212

Los compuestos del tipo DS, TRS y TES enunciados en los Cuadros 8 y 9 fueron reportados con anterioridad (Urrutia et al., 2013; Yin et al., 2017; Lee et al., 2019) como productos de la reacción de lactosa con β -gal. En la identificación de GOS sintetizados por β -gal de *Aspergillus oryzae* desarrollada por Urrutia et al. (2013) se determinó que Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc, alolactosa y 6-galactobiosa fueron los principales productos de reacción formados. Las variaciones en composición y proporción de los productos de la reacción reportados en informes previos y los obtenidos en el presente estudio se deben al uso de distintos medios de reacción

(lactosa en buffer, suero y permeado de suero) y de enzimas provenientes de múltiples fuentes (*Bacillus circulans*, *K. lactis* y *Aspergillus oryzae*). Lo anterior fue comprobado en el estudio elaborado por Van Leeuwen et al. (2016) donde se hizo un análisis exhaustivo para la caracterización de los compuestos presentes en 7 productos de GOS comerciales, en esta investigación se reportaron cerca de 70 GOS distintos presentes en las 7 muestras comerciales, de las cuales se desconocía la forma de preparación por lo que es justificable la gran heterogeneidad de compuestos entre las muestras.

En los resultados de este estudio es evidente la disminución de la lactosa presente debido a su transformación en otros compuestos, entre ellos los DS alolactosa (principalmente en PNS) y 6-galactobiosa (únicamente en PS), compuestos que de igual manera fueron reportados anteriormente por otros autores (Urrutia et al., 2013; Yin et al., 2017). Para la diferenciación e identificación de lactosa y alolactosa se compararon los espectros de masas obtenidos de manera experimental con los reportados en la base de datos “HMDB” (TMIC, 2022c; TIMC, 2022d). Se identificaron los valores m/z de 71, 89 y 101 (en modo de ionización negativo) y de 91, 97 y 127 (en modo de ionización positivo) como característicos de la molécula de lactosa.

Cuadro 9. DS y GOS presentes en permeado sonificado (PS)

Compuesto identificado	Modo de ionización	Aducto	Abundancia relativa (%)	Fragmentos principales
Disacárido				
β -(1→6)-galactobiosa (6-galactobiosa)	Negativo	-H	32.041	273.060
				161.046
				143.036
				113.025
				101.025
Gal- β (1→6)-Glc (Alolactosa)	Positivo	+H, +NH ₄ , +H-H ₂ O	5.341	360.150
				325.113
				163.061
				145.050
				127.040
Gal- β (1→4)-Glc (Lactosa)	Positivo	+H	0.545	343.123
				325.113

				163.060
				145.050
				85.029
Trisacárido				
Gal-b(1→6)-Gal-b(1→3)-Glc	Negativo	-H	48.075	503.162
				323.099
				179.057
				161.046
				101.025
Tetrasacárido				
Gal-β(1→4)-Gal-β(1→4)-Gal-β(1→6)-Glc	Negativo	-H	6.775	665.216
				545.173
				405.102
				383.120
				273.060
Gal-β(1→6)-Gal-β(1→6)-Gal-β(1→4)-Glc	Positivo	+H, +NH ₄	0.525	689.212
				527.158
				343.123
				325.113
				163.060
Gal-β(1→4)-Gal-β(1→4)-Gal-β(1→2)-Glc	Negativo	-H	0.135	415.145
				161.046
				143.036
				113.025
				101.025
Pentasacárido				
Gal-β(1→4)-Gal-β(1→4)-Gal-β(1→4)-Gal-β(1→4)-Glc	Negativo	-H	0.104	729.208
				575.183
				254.922
				186.936
				176.930
Gal-β(1→4)-Gal-β(1→4)-Gal-β(1→4)-Gal-β(1→2)-Glc	Negativo	-H	0.020	503.162
				341.109
				323.099
				179.057
				161.046

Otro				
3-galactosil-lactosa	Positivo	+H, +NH ₄ , +H-H ₂ O	5.644	505.177
				343.124
				325.113
				163.061
				145.050
3'-sialilactosa (3'-SL)	Negativo	-H	0.645	632.204
				421.065
				359.119
				300.049
N-acetil-galactosaminil-lactosa	Negativo / Positivo	-H / +H	0.073	415.145 (-)
				161.046 (-)
				113.025 (-)
				101.025 (-)
				85.030 (-)
				381.082 (+)
				343.123 (+)
				325.113 (+)
				163.060 (+)
				145.050 (+)
6-glucolil-neuraminil-lactosa	Negativo	-H	0.026	415.145
				161.046
				113.025
				101.025
N-acetil-lactosamina	Negativo	-H	0.023	296.976
				271.022
				221.012
				154.975
				136.937
N-acetil-D-glucosamina	Negativo	-H	0.015	161.046
				143.036
				113.025
				101.025
				85.030

3- α -fucosil-N-acetil-lactosamina	Positivo	+H	0.007	495.264
				439.202
				383.139
				327.077
				283.263
Disialillactosa	Negativo	-H	0.003	632.204
				421.065
				253.093
				242.080
				161.046
6-sialil-N-acetil-lactosamina	Negativo	-H	0.002	632.204
				421.065
				253.093
				242.080
				161.046

Adicionalmente en las muestras de permeado reaccionado (Cuadros 8 y 9) se aprecia que hubo un aumento en la abundancia relativa de las moléculas de tipo TRS, TES y PTS. Yin et al. (2017) efectuaron un estudio para la comparación de los perfiles de GOS resultantes por la acción de distintas β -galactosidasas (*Bacillus circulans*, *K. lactis* y *Aspergillus oryzae*) en solución de lactosa en buffer de fosfato de sodio. Para la enzima de *K. lactis* (utilizada de igual manera en este trabajo) entre otros compuestos identificaron los TRS Gal- β (1 \rightarrow 2)-[Gal- β (1 \rightarrow 6)]-Glc y Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β (1 \rightarrow 3)-Glc en 120 y 240 min de reacción, respectivamente. Dado lo anterior, al avanzar la reacción primero se da la formación del TRS ramificado y posteriormente la del lineal que, de acuerdo a lo citado por los mismos autores, son compuestos sintetizados a partir de los DS alolactosa, Gal- β (1 \rightarrow 2)-Glc y Gal- β (1 \rightarrow 3)-Glc. En los resultados obtenidos se puede distinguir la presencia del TRS ramificado Gal- β (1 \rightarrow 2)-[Gal- β (1 \rightarrow 6)]-Glc en la muestra PNS (sin sonicación) mientras que en la muestra PS (donde se utilizó sonicación para asistir la reacción) estaba presente el TRS lineal Gal- β (1 \rightarrow 6)-Gal- β (1 \rightarrow 3)-Glc, a pesar de que ambas muestras fueron tomadas al mismo tiempo de reacción (90 min), por lo que se debe considerar el efecto del US sobre la reacción ya que previamente (Bhargava et al., 2021; Córdova et al., 2023) se ha reportado su capacidad para acelerarla. Los resultados obtenidos

en ésta investigación confirman lo anterior, dada la presencia de los TRS Gal- $\beta(1\rightarrow2)$ -[Gal- $\beta(1\rightarrow6)$]-Glc y Gal- $\beta(1\rightarrow6)$ -Gal- $\beta(1\rightarrow3)$ -Glc (que fueron obtenidos a distintos tiempos de reacción, acorde al reporte de Yin et al., 2017) al mismo tiempo de reacción en 2 tratamientos distintos (asistida y no asistida con US). Cabe destacar que entre los productos de reacción identificados (Cuadros 8 y 9) se confirmó la presencia de 4 TES y 2 PTS, en trabajos previos (Urrutia et al., 2013; Yin et al., 2017) únicamente se había reportado entre los productos al TES Gal- $\beta(1\rightarrow6)$ -Gal- $\beta(1\rightarrow6)$ -Gal- $\beta(1\rightarrow4)$ -Glc, las variaciones en los resultados podrían atribuirse a las distintas condiciones de reacción empleadas en cada uno de los trabajos.

El objetivo del presente estudio es la formación de GOS a partir de lactosa con la intención de disminuir su presencia por ser un compuesto al que es intolerante un importante sector de la población y a su vez favorecer su transformación en compuestos de potencial prebiótico. Uno de los primeros compuestos en clasificarse como prebióticos fueron los GOS (Gibson y Roberfroid 1995), acorde a Ambrogi et al. (2023) las enzimas humanas tienen poca capacidad para hidrolizar los enlaces glucosídicos de los GOS, por lo que no son procesados directamente mediante la digestión humana pero sí se metabolizan por los microorganismos de la flora intestinal. Adicional a la producción de GOS a partir de la lactosa, se dió de manera importante la conversión de lactosa en alolactosa, según Cao et al. (2023) la alolactosa es hidrolizada por la β -gal en el intestino humano a una tasa menor al 5% de la hidrólisis de la lactosa, lo que significa que el 95% es fermentada en el colon como prebiótico. Sumado a eso, el mismo autor menciona que la transgalactosilación intramolecular de lactosa a alolactosa desencadena en la estimulación de la producción de β -gal en cepas lactobacilos y bifidobacterias (fermentadoras de lactosa) en el colon.

6.3. Formulación de una bebida a base de PSDR y evaluación de su calidad

Se estableció que el tratamiento con mayor rendimiento en la producción de GOS fue en el que se utilizó permeado como sustrato con aplicación de US para asistir la reacción y dado que después de 90 min de reacción no hubo un incremento significativo en la formación de GOS, se estableció que el rendimiento máximo para el tratamiento previamente mencionado fue a los 90 min de reacción. Por lo

anteriormente mencionado, se realizaron 4 formulaciones distintas de una bebida a base de PSDR (Figura 17) por 90 min, establecidas en base a un diseño factorial 2^2 donde los factores a evaluar fueron la cantidad de permeado (50-80%) y de enmascarante (saborizante de menta, en niveles de 0.1-0.25%). Puesto que el permeado a reaccionar tenía una alta concentración de lactosa ajustada (270 g/L), la cual a la postre fue transformada en GOS, glucosa y galactosa los cuales tienen mayor poder edulcorante que la lactosa, de tal suerte que no fue necesaria la adición de azúcar para dar el dulzor deseado a la bebida; a pesar de que el permeado se encontrara diluido en cierta medida con el agua. Además, el sabor elegido para la bebida (limón), es congruente con el color de ésta adquirido principalmente por el color propio del permeado.



Figura 17. Bebida producida a base de permeado reaccionado con β -gal durante 90 min, con aplicación de US (40% amplitud, pulsado en un ciclo de 3 s “encendido” y 27 s “apagado”).

6.3.1. Análisis microbiológicos

Previo a la evaluación sensorial por los panelistas se realizaron análisis microbiológicos para garantizar la inocuidad del producto, los resultados de los análisis previamente mencionados se exponen en el Cuadro 10.

Es notorio que se cumplió de manera exitosa con los límites establecidos por la NOM-218-SSA1-2011 para los microorganismos específicos gracias a que, posterior a la mezcla de todos los ingredientes de la bebida, y previo al envasado, se realizó un

proceso de pasteurización para eliminar los posibles riesgos microbiológicos que pudiesen haber estado presentes en cualquiera de los componentes de la bebida y conjuntamente se hizo un lavado y esterilización de los envases previo a su uso para almacenarla.

Cuadro 10. Resultados microbiológicos de las 4 formulaciones de bebida

Microorganismo	Resultado	* Límite máximo
Coliformes totales	** N.D.	10
<i>E. coli</i>	Ausente	Ausente
Mesófilos aerobios	** N.D.	50
Hongos y levaduras	** N.D.	*** N.A.

* establecido por la NOM-218-SSA1-2011

** No detectable

*** No aplica

6.3.2. Evaluación sensorial

Los resultados de la evaluación sensorial por parte de los panelistas a las 4 formulaciones de bebida se observan en las Figuras 18 y 19. En la Figura 18, es apreciable una evidente tendencia de mayor aprobación por parte de los panelistas para las muestras con mayor contenido de permeado (267 y 729) y con menor cantidad de enmascarante (542 y 729), ya que en estas muestras los panelistas asignaron mejores puntuaciones.

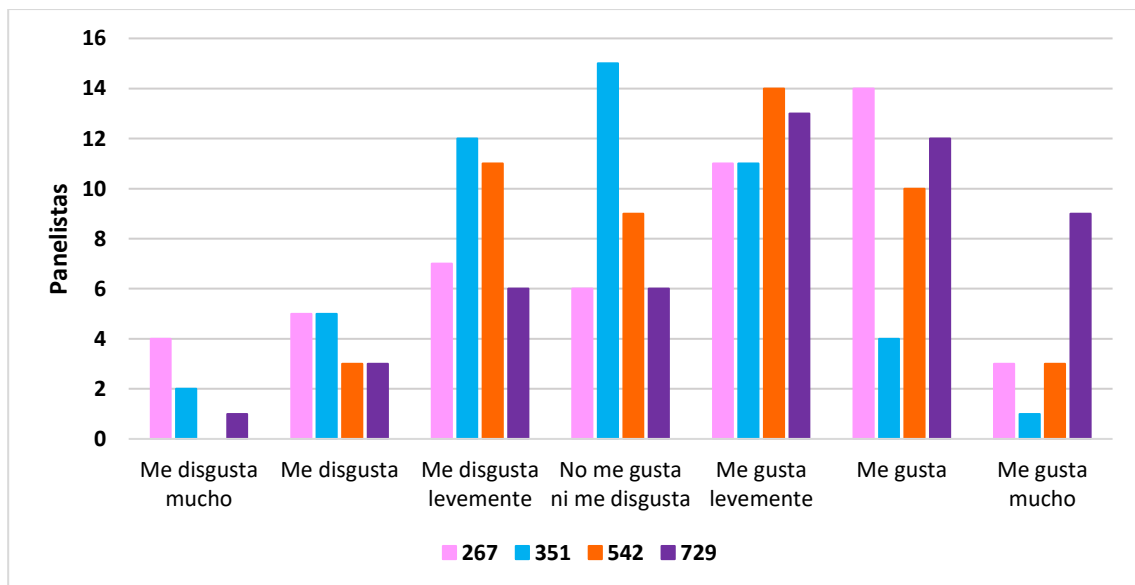


Figura 18. Calificaciones asignadas durante la evaluación sensorial de las 4 formulaciones de bebida. 267= 80% permeado y 0.25% enmascarante, 351= 50%

permeado y 0.25% enmascarante, 542= 50% permeado y 0.1% enmascarante, 729= 80% permeado y 0.1% enmascarante.

También en la Figura 18 es visible un rechazo por la muestra 351 debido a una menor cantidad de permeado presente (es decir, un menor dulzor que hiciera contraste con el elevado sabor a menta), lo que ocasionó que se tuviera una percepción mucho más fuerte del sabor a menta. En comentarios los panelistas señalaron que era mayor su agrado por las muestras más dulces y con menor sabor a menta, ya que al ser fuerte la percepción de la menta generaba un resabio y sabor amargo desagradables. A causa de lo anterior, mencionaron una vinculación con productos extremadamente mentolados.

Complementando lo observado en la Figura 18, los panelistas seleccionaron como preferida en mayor cantidad la muestra 729 y como menos preferida la 351 (Figura 19). En esta figura también es posible distinguir una menor preferencia por las muestras con mayores contenidos de enmascarante (267 y 351), por lo expuesto en el párrafo anterior. La muestra 729 fue, por mucho, la preferida por los panelistas, los cuales resaltaron que su mayor dulzor la hacía más agradable y que tenía un adecuado balance con el sabor menta.

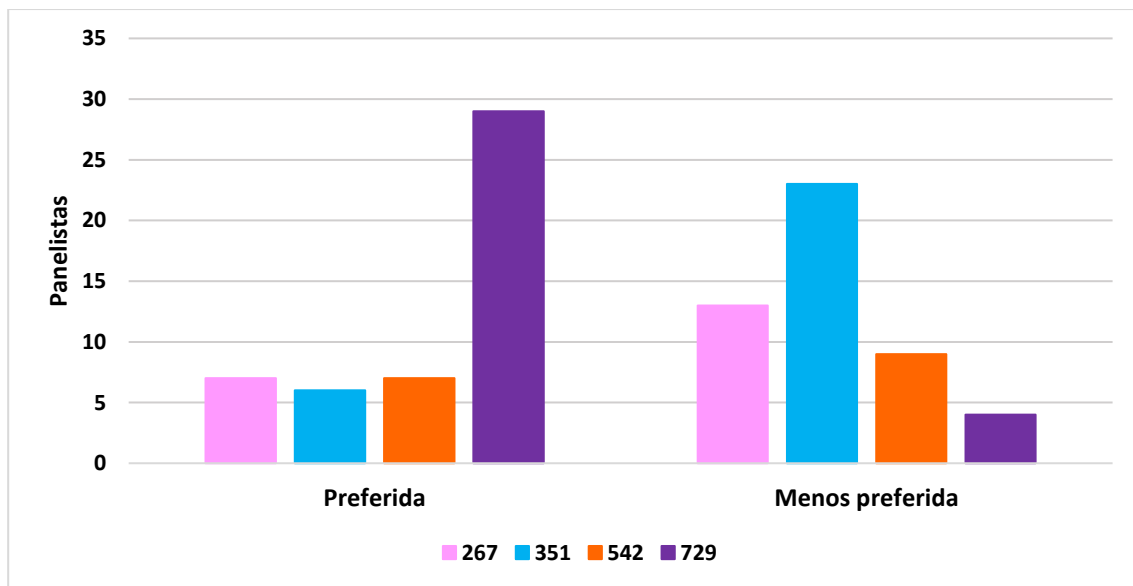


Figura 19. Muestras más y menos preferidas en la evaluación sensorial de las 4 formulaciones de bebida. 267= 80% permeado y 0.25% enmascarante, 351= 50% permeado y 0.25% enmascarante, 542= 50% permeado y 0.1% enmascarante, 729= 80% permeado y 0.1% enmascarante.

6.3.3. Evaluación de la calidad del producto final

6.3.3.1. Análisis fisicoquímicos

Se determinó como “producto final” la muestra 729, al ser la preferida por los panelistas y a la que asignaron mejores calificaciones. Por lo que a esta muestra se le hicieron los análisis de calidad (fisicoquímicos y bromatológicos) correspondientes. Los resultados de los análisis fisicoquímicos del producto final se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Parámetros fisicoquímicos de la bebida

Parámetro	Resultado \pm DE
pH	6.15 \pm 0.01
Acidez titulable (g/L)	0.61 \pm 0.04
$^{\circ}$ Bx	23.47 \pm 0.05
Aw	0.88 \pm 0.00
AR (g/L)	205.43 \pm 3.42

Datos presentados como la media \pm DE de 3 réplicas.

En trabajos previos se han desarrollado bebidas a base de permeado de suero (Beucler et al., 2005; Chavan et al., 2015; Pereira et al., 2015; Amer y El-Kholy, 2017; Becker et al., 2021) pero sólo en uno de éstos (Beucler et al., 2005) el permeado fue sometido a una reacción enzimática con β -gal de *K. lactis* durante 3 horas a 35 $^{\circ}$ C pero el propósito de éste estudio fue principalmente hidrolizar la lactosa para incrementar el dulzor en la bebida y por ende, el contenido de glucosa (que fue el azúcar que midieron) por lo que, hasta nuestro conocimiento, el presente trabajo es el único que propone el aprovechamiento del permeado de suero que es un subproducto del proceso de concentración de suero, utilizado principalmente para la producción de suplementos alimenticios como base de una bebida con adicional beneficio a la salud gracias a su potencial prebiótico dado por la presencia de GOS sintetizados a partir de la lactosa. A causa de lo anterior, no se cuenta con referencias exactas de la mayoría de los parámetros determinados en el producto final durante este estudio.

El pH final de la bebida (6.15 \pm 0.01) es cercano a los valores de 6.45 \pm 0.08 y 6.15 \pm 0.03 obtenidos por Beucler et al. (2005) y Becker et al. (2021), respectivamente, en muestras de permeado de suero. Del mismo modo, el valor de acidez titulable

(0.61 ± 0.04 g/L ó 0.06%) es similar al reportado por Becker et al. (2021) de $0.03 \pm 0.00\%$.

En cuanto a los valores obtenidos de °Bx y AR, no es raro que sean mayores a los reportados por los otros autores, ya que en este experimento se requirió hacer un ajuste de la concentración de lactosa a aproximadamente 270 g/L para propiciar la reacción de transgalactosilación en mayor medida. En consecuencia, la lactosa adicionada para ajustar la concentración tuvo efecto en los valores finales de °Bx y AR, ambos dependientes del contenido de azúcares de la bebida.

6.3.3.2. Análisis bromatológicos

En el Cuadro 12 se pueden observar los resultados de los análisis bromatológicos del producto final. El contenido de humedad ($76.441 \pm 0.073\%$) fue menor al reportado en otros trabajos: $84.41 \pm 0.02\%$ por Pereira et al. (2015) y $95.8 \pm 1.6\%$ por Beucler et al. (2005), lo cual se debió principalmente a que con el ajuste de lactosa a un valor mayor se aumentó también la cantidad de sólidos en el permeado y, al ser la humedad el resultado del residuo de 100 menos el porcentaje de sólidos, se tenía un menor contenido de humedad. El contenido de cenizas fue también menor al obtenido en el estudio de Pereira et al. (2015), lo que se explica por el proceso de desmineralización del permeado pues el contenido de cenizas representa la cantidad total de minerales.

Cuadro 12. Parámetros bromatológicos de la bebida

Parámetro	Resultado (%) ± DE
Humedad	76.441 ± 0.073
Cenizas	0.367 ± 0.005
Grasa	* N.D.
Proteína	0.008 ± 0.000
Fibra dietética	0.234 ± 0.008
Carbohidratos	22.958

* No detectable

Datos presentados como la media ± DE de 3 réplicas.

En este y otros trabajos (Beucler et al., 2005; Becker et al., 2021) se determinó que los contenidos de grasa ($0.002 \pm 0.001\%$ y $0.01 \pm 0.00\%$, respectivamente) y proteína ($0.248 \pm 0.109\%$ y $0.66 \pm 0.00\%$, respectivamente) después de la ultrafiltración del suero son casi nulos.

La cantidad de fibra dietética cuantificada en la bebida tuvo un valor menor al esperado (5.29%) calculado en base a:

$$\text{Contenido de lactosa inicial} = 231 \frac{g}{L}$$

$$\text{Rendimiento de GOS} = 28.61\%$$

$$\text{GOS formados} = \frac{231 \frac{g}{L} \times 28.61\%}{100\%} = 66.09 \frac{g}{L}$$

$$\text{GOS en la bebida} = \frac{66.09 \frac{g}{L} \times 80\% \text{ permeado en bebida}}{100\%} = 52.87 \frac{g \text{ GOS}}{L \text{ bebida}}$$

$$\% \text{ GOS en la bebida} = \frac{52.87 \text{ g GOS} \times 100\%}{1000 \text{ mL bebida}} = 5.29\% \text{ GOS en la bebida}$$

El método empleado (AOAC 985.29) para la cuantificación de fibra dietética en la bebida consiste en someter inicialmente las muestras (adicionadas con α -amilasa termoestable) a ebullición para la gelatinización, hidrólisis y despolimerización del almidón; después se incuban a 60 °C con proteasa (para solubilizar y despolimerizar proteínas) y amilogucosidasa (para hidrolizar fragmentos de almidón a glucosa). Luego se agregan cuatro volúmenes de etanol para precipitar la fibra soluble y eliminar la proteína despolimerizada y la glucosa (del almidón). El residuo se filtra; se lava con etanol al 78%, etanol al 95% y acetona; se seca; y se pesa. Al peso del residuo filtrado se le restan los contenidos de proteína y cenizas para determinar el contenido de fibra dietética total. Sin embargo, los GOS son una excepción de fibra dietética que no puede ser cuantificada por ese método, ya que actúan como fibra dietética soluble en agua y etanol al 78% por lo que se pierden en el filtrado y los lavados (McCleary et al, 2012); a ello puede atribuirse el valor subestimado de fibra dietética obtenido de manera experimental. Para la cuantificación de este tipo de fibra dietética se debe emplear el método descrito por la AOAC 2017.16 que incluye a los GOS en la medición de la fibra dietética total ya que considera dicha fibra como la medición de 2 partes:

- Fibra dietética de alto peso molecular (HMWDF), medida de manera gravimétrica, que incluye fibra dietética insoluble en agua y soluble en agua, pero precipitable en etanol al 78%.

- Fibra dietética de bajo peso molecular (LMWDF), medida por HPLC, que incluye la fibra dietética soluble en agua y etanol al 78%. Esta fracción comprende oligosacáridos no digestibles como fructooligosacáridos, inulina, povidexrosa, GOS y maltodextrinas resistentes.

7. CONCLUSIONES

El rendimiento máximo de GOS obtenido fue de 29.45%, con el uso de PSD como sustrato y de US para asistir la reacción, valor que representó aumentos de aproximadamente 10 y 11.5% en relación con los rendimientos máximos obtenidos en las reacciones con solución de lactosa en buffer y sin uso de US.

El PSD mostró ser un eficiente medio de reacción para la producción de GOS debido a la presencia de minerales que ejercen un efecto activador sobre la actividad de la enzima.

Se identificaron GOS con longitudes de cadena de 3 a 5 monosacáridos y los disacáridos alolactosa y 6-galactobiosa como resultado de la reacción de lactosa presente en PSD con β -gal.

Al aplicar US para asistir la reacción se aceleró y se tuvo mayor diversidad en los disacáridos y GOS resultantes y también incrementó el consumo de la lactosa.

La bebida formulada a base de PSDR fue aceptada por los panelistas gracias a su sabor dulce potenciado por la reacción. Los panelistas tuvieron una clara preferencia por la muestra con mayor cantidad de PSDR (80%) y menor contenido de enmascarante (0.25%) ya que consideraban que en esa muestra se tenía un adecuado equilibrio entre el dulzor y la nota fresca otorgada por el enmascarante (sabor menta).

Los análisis bromatológicos de la bebida mostraron un contenido de fibra dietética menor al esperado debido a que los GOS son un tipo de fibra dietética no cuantificable por el método mayormente empleado para la determinación de fibra dietética total.

8. REFERENCIAS

- Aamer, R., & El-Kholy, W. (2017). Production of functional beverages from whey and permeate containing kumquat fruit. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 14(1), 41-56. DOI: 10.12816/0038404
- Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., Romero-Gómez, S., Ozuna, C. y Amaya-Llano, S. L. (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 84-90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.010>
- Abella, M., Leano, M. L., Malig, J., Martin, G., Cruz, C. D. y De Leon, A. (2016). Formulation of a sports drink from fermented whey. *CLSU International Journal of Science & Technology (2016)*, 1(1), 1-10. DOI: 10.22137/ijst.2016.v1n1.01
- AbdulAlim, T. S., Zayan, A. F., Campelo, P. H. y Bakry, A. M. (2018). Development of new functional fermented product: Mulberry-whey beverage. *Journal of Nutrition, Food Research and Technology*, 1(3), 64-69. DOI: 10.30881/jnfrt.00013
- Adamczak, M., Charubin, D. y Bednarski, W. (2009). Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared from whey permeate. *Chemical Papers*, 63(2), 111-116. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11696-009-0010-1>
- Ambrogi, V., Bottacini, F., Cao, L., Kuipers, B., Schoterman, M., & van Sinderen, D. (2023). Galacto-oligosaccharides as infant prebiotics: Production, application, bioactive activities and future perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(6), 753-766. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1953437>
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Arés, I. y Martínez, M.A. (2016). Chapter 1-Prebiotics and Probiotics: An Assessment of Their Safety and Health Benefits. En: *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics* (3-23). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-802189-7.00001-0
- AOAC International. 2023. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 22nd Ed. Métodos 985.29 y 2017.16. AOAC International: Oxford University Press.
- Arshad, U. E. T., Hassan, A., Ahmad, T., Naeem, M., Chaudhary, M. T., Abbas, S. Q., ... y Aadil, R. M. (2022). A recent glance on the valorisation of cheese whey

for industrial prerogative: high-value-added products development and integrated reutilizing strategies. *International Journal of Food Science & Technology*. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.16168>

- Barba, F. J. (2021). An integrated approach for the valorization of cheese whey. *Foods*, 10(3), 564. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10030564>
- Barile, D., Tao, N., Lebrilla, C. B., Coisson, J. D., Arlorio, M. y German, J. B. (2009). Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 19(9), 524-530. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.03.008>
- Barukčić, I., Lisak Jakopović, K. y Božanić, R. (2019). Valorisation of whey and buttermilk for production of functional beverages—an overview of current possibilities. *Food technology and biotechnology*, 57(4), 448-460. DOI: <https://doi.org/10.17113/ftb.57.04.19.6460>
- Bhargava, N., Mor, R. S., Kumar, K. y Sharanagat, V. S. (2021). Advances in application of ultrasound in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105293. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105293>
- Becker, A. F., Rebelatto, E., Sabadin, K., Becker, J., Steffens, J., Bagatini, L., ... & Rigo, E. (2021). Evaluation of whey permeate obtained through nanofiltration for the formulation sports drinks. *Brazilian Journal of Development*, 7(2), 18753-18769. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-493>
- Beucler, J., Drake, M., & Foegeding, E. A. (2005). Design of a beverage from whey permeate. *Journal of food science*, 70(4), S277-S285. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07203.x>
- Bintsis, T. y Papademas, P. (2017). An overview of the cheesemaking process. *Global cheesemaking technology: Cheese quality and characteristics*, 120-156. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119046165.ch0f>
- Bolognesi, L. S., Gabardo, S., DALL CORTIVO, P. R. y Ayub, M. A. Z. (2021). Biotechnological production of galactooligosaccharides (GOS) using porungo cheese whey. *Food Science and Technology*, 42. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.64520>
- Bultema, J.B., Kuipers, B.J.H. y Dijkhuizen, L. (2014). Biochemical characterization of mutants in the active site residues of the β -galactosidase

enzyme of *Bacillus circulans* ATCC 31382. *FEBS Open Bio*, 4, 1015–1020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.11.002>

- Cao, L., Bultsma, M., Wissing, J., Gerhard, B. E., Ziegler, M., Versteeg, M., & Looijesteijn, E. (2023). High purity galacto-oligosaccharides: Optimal process design and prebiotic effect. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 30, 100387. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2023.100387>
- Carvalho, F., Prazeres, A. R. y Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the Total Environment*, 445, 385-396. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>
- CFR. (2024). *Code of Federal Regulations Title 21, Volume 2*. FDA. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=101.9>
- Chavan, R. S., Shraddha, R. C., Kumar, A. y Nalawade, T. (2015). Whey based beverage: its functionality, formulations, health benefits and applications. *Journal of Food Processing & Technology*, 6(10), 1. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7110.1000495>
- Córdova, A., Astudillo-Castro, C., Henriquez, P., Manriquez, N., Nuñez, H., Guerrero, C., ... & Lehuedé, L. (2023). Ultrasound-assisted enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides using native whey with two commercial β -galactosidases: *Aspergillus oryzae* and *Kluyveromyces var lactis*. *Food Chemistry*, 426, 136526. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136526>
- da Silveira, E. O., Neto, J. H. L., da Silva, L. A., Raposo, A. E., Magnani, M. y Cardarelli, H. R. (2015). The effects of inulin combined with oligofructose and goat cheese whey on the physicochemical properties and sensory acceptance of a probiotic chocolate goat dairy beverage. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 445-451. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.056>
- de Souza, R. R., Bergamasco, R., da Costa, S. C., Feng, X., Faria, S. H. B. y Gimenes, M. L. (2010). Recovery and purification of lactose from whey. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 49(11), 1137-1143. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2010.08.015>
- Domingos, J. M., Puccio, S., Martinez, G. A., Amaral, N., Reis, M. A., Bandini, S., ... y Bertin, L. (2018). Cheese whey integrated valorisation: Production,

concentration and exploitation of carboxylic acids for the production of polyhydroxyalkanoates by a fed-batch culture. *Chemical Engineering Journal*, 336, 47-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.11.024>

- Duan, F., Zhao, R., Yang, J., Xiao, M. y Lu, L. (2021). Integrated utilization of dairy whey in probiotic β -galactosidase production and enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides. *Catalysts*, 11(6), 658. DOI: <https://doi.org/10.3390/catal11060658>
- Duncan, P. I., Aitio, O., Heiskanen, A., Niemelä, R., Saarinen, J., Helin, J., ... & Sprenger, N. (2020). Structure and function of bovine whey derived oligosaccharides showing synbiotic epithelial barrier protective properties. *Nutrients*, 12(7), 2007. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12072007>
- Eskandarloo, H. y Abbaspourrad, A. (2018). Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using β -galactosidase immobilized on functionalized glass beads. *Food chemistry*, 251, 115-124. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.068>
- FAO. (2023, Marzo 24). *Producción (Cultivos y productos de ganadería)*. FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- Fischer, C. y Kleinschmidt, T. (2015). Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*, 48, 15-22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.003>
- Fu, X., Belwal, T., Cravotto, G. y Luo, Z. (2020). Sono-physical and sono-chemical effects of ultrasound: Primary applications in extraction and freezing operations and influence on food components. *Ultrasonics Sonochemistry*, 60, 104726. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104726>
- Ghosh, B. C., Prasad, L. N. y Saha, N. P. (2017). Enzymatic hydrolysis of whey and its analysis. *Journal of food science and technology*, 54, 1476-1483. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2574-z>
- Gibson, R., and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Proceedings - DMSVLSS 2012: 18th International Conference on Distributed Multimedia Systems* 125:1401–12. DOI: 10.1079/NRR200479.

- Gil, D. B., Bocourt, E. C. y Maqueira, Y. D. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3, 5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 40(2), 45-50.
- González-Cataño, F., Tovar-Castro, L., Castaño-Tostado, E., Regalado-González, C., García-Almendarez, B., Cardador-Martínez, A. y Amaya-Llano, S. (2017). Improvement of covalent immobilization procedure of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for galactooligosaccharides production: Modeling and kinetic study. *Biotechnology Progress*, 33(6), 1568-1578. DOI: 10.1002/btpr.2509
- Gopal, P. K., & Gill, H. S. (2000). Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 69-74. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114500002270>
- Growth Market Reports. (2021). *Mexico whey protein market size, Growth & Forecast 2030*. Growth Market Reports. <https://growthmarketreports.com/report/whey-protein-market-mexico-industry-analysis>
- Harris, J.M. and Mostyn, P. (2011). *Methods for improving the storage and handling characteristics of condensed whey permeate and for utilizing condensed whey permeate in the feeding of a ruminant animal* (U.S. Patent No. 7927641). Westway Feed Products Inc. <https://patents.google.com/patent/US8182848B2/en>
- Huang, S. P., Hsu, H. C., Liew, C. Y., Tsai, S. T., & Ni, C. K. (2021). Logically derived sequence tandem mass spectrometry for structural determination of galactose oligosaccharides. *Glycoconjugate Journal*, 38, 177-189. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09915-1>
- Huicochea, L. (2023). Efecto del ultrasonido en la producción y rendimiento de galactooligosacáridos a partir de suero ácido de yogurt griego y de una solución de lactosa utilizando la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* libre e inmovilizada [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio institucional UAQ. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/4334>

- International Organization for Standardization. (2017). Foodstuffs — Determination of water activity (ISO 18787:2017). Disponible en: <https://www.iso.org/standard/63379.html>
- Joshi, J., Gururani, P., Vishnoi, S. y Srivastava, A. (2020). Whey based beverages: A review. *Octa Journal of Bioscience*, 8, 30-7.
- Kaur, S., Bhise, S. R., Kaur, A. y Minhas, K. S. (2018). Development of naturally carbonated paneer whey fermented beverage blended with pineapple and strawberry juice. *Nutrition & Food Science*, 49(4), 528-547. DOI: <https://doi.org/10.1108/NFS-07-2018-0183>
- Królczyk, J. B., Dawidziuk, T., Janiszewska-Turak, E. y Solowiej, B. (2016). Use of whey and whey preparations in the food industry-a review. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 66(3), 157. DOI: 10.1515/pjfn-2015-0052.
- Lappa, I. K., Papadaki, A., Kachrimanidou, V., Terpou, A., Koulougliotis, D., Eriotou, E. y Kopsahelis, N. (2019). Cheese whey processing: integrated biorefinery concepts and emerging food applications. *Foods*, 8(8), 347. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods8080347>
- Lee, H., Nobrega de Moura Bell, J. M. L., & Barile, D. (2019). Discovery of Novel High-Molecular Weight Oligosaccharides Containing N-Acetylhexosamine in Bovine Colostrum Whey Permeate Hydrolyzed with *Aspergillus Oryzae* β -Galactosidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(12), 3313-3322. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06965>
- Li, S., Zhu, X. y Xing, M. (2019). A New β -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
- Liburdi, K. y Esti, M. (2022). Galacto-Oligosaccharide (GOS) synthesis during enzymatic lactose-free milk production: state of the art and emerging opportunities. *Beverages*, 8(2), 21. DOI: <https://doi.org/10.3390/beverages8020021>
- Manucci, F. (2009). Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides from whey permeate [Master's Thesis]. Dublin Institute of Technology.

- Market Data Forecast (2023, March). *Lactose-free products market size, growth, share: 2023-2028*. Market Data Forecast. <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/lactose-free-products-market>
- Matthews, B.W. (2005). The structure of *E. coli* β -galactosidase. *Comptes Rendus Biologies*, 328(6), 549-556. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.03.006>
- McCleary, B. V., DeVries, J. W., Rader, J. I., Cohen, G., Prosky, L., Mugford, D. C., ... & Okuma, K. (2012). Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber (CODEX definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 95(3), 824-844. DOI: https://doi.org/10.5740/jaoacint.CS2011_25
- Melnikova, E. I., Bogdanova, E. V., & Paveleva, D. A. (2023). Whey permeate mineral profile at various stages of membrane filtration. *Applied Food Biotechnology*, 10(4). DOI: <https://doi.org/10.22037/afb.v10i4.42664>
- Merkel, A., Voropaeva, D. y Ondrušek, M. (2021). The impact of integrated nanofiltration and electrodialytic processes on the chemical composition of sweet and acid whey streams. *Journal of Food Engineering*, 298, 110500. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110500>
- MMR. (2022, September). *Whey protein market - growth, trends, and forecasts (2022-2029)*. MAXIMIZE MARKET RESEARCH. <https://www.maximizemarketresearch.com/market-report/whey-protein-market/148037/#details>
- Morel, F. B., Dai, Q., Ni, J., Thomas, D., Parnet, P., & Fañça-Berthon, P. (2015). α -Galacto-oligosaccharides dose-dependently reduce appetite and decrease inflammation in overweight adults. *The Journal of nutrition*, 145(9), 2052-2059. DOI: <https://doi.org/10.3945/jn.114.204909>
- Moreno, J.V. (2019). Elaboración de un queso azul reestructurado [Tesis de maestría]. Instituto Politécnico Nacional.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2024). PubChem Compound Summary for CID 123914, 3'-Sialyllactose. NCBI. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3_-Sialyllactose

- Norma Mexicana NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos. México: Secretaría de Salud, 1978. (Consultado el 27 de Febrero del 2023). Disponible en: <https://xdoc.mx/documents/nmx-f-066-s-1978-determinacion-de-cenizas-en-alimentos-5f9b9221d6381>
- Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2022. (Consultado el 03 de Mayo del 2023). Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5645374&fecha=11/03/2022#gsc.tab=0
- Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994. Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. México: Secretaría de Salud, 1994. (Consultado el 27 de Febrero del 2023). Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4890075&fecha=26/06/1996#gsc.tab=0
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. México: Secretaría de Salud, 1994. (Consultado el 27 de Febrero del 2023). Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#gsc.tab=0
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. México: Secretaría de Salud, 1994. (Consultado el 27 de Febrero del 2023). Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4881226&fecha=13/09/1995#gsc.tab=0
- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. México: Secretaría de Salud, 1994. (Consultado el 27 de Febrero del 2023). Disponible en: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69536.pdf>

- Norma Oficial Mexicana NOM-116-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Determinación de Humedad en Alimentos por Tratamiento Térmico. Método por Arena o Gasa. México: Secretaría de Salud, 1994. (Consultado el 27 de Febrero del 2023). Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4728942&fecha=15/08/1994#gsc.tab=0
- Norma Oficial Mexicana NOM-183-SCFI-2012. Producto lácteo y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. México: Secretaría de Salud, 2012. (Consultado el 3 de Febrero del 2023). Disponible en: <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4693/seeco1/seeco1.htm>
- Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011. Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba. México: Secretaría de Salud, 2012. (Consultado el 3 de Febrero del 2023). Disponible en: <https://dof.gob.mx/normasOficiales/4643/salud/salud.htm>
- Norma Oficial Mexicana NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018. Queso-denominación, especificaciones, información comercial y métodos de prueba. México: Secretaría de Salud, 2018. (Consultado el 3 de Febrero del 2023). Disponible en: <https://sidof.segob.gob.mx/notas/5549319>
- Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, formula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. México: Secretaría de Salud, 2010. (Consultado el 3 de Febrero del 2023). Disponible en: <https://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm>
- Norma Oficial Mexicana NOM-F-68-S-1980. Alimentos-Determinación de proteínas. México: Secretaría de Salud, 1980. (Consultado el 27 de Febrero del 2023). Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4858024&fecha=04/08/1980#gsc.tab=0

- Norma Oficial Mexicana NOM-F-236-S-1979. Determinación en sólidos totales por el índice de refracción en salsa de tomate Catsup. México: Secretaría de Salud, 1979. (Consultado el 27 de Febrero del 2023). Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4802673&fecha=09/04/1979#gsc.tab=0
- Norma Oficial Mexicana NOM-F-317-S-1978. Determinación de pH en Alimentos. México: Secretaría de Salud, 1978. (Consultado el 27 de Febrero del 2023). Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4704689&fecha=23/05/1978
- Norma Oficial Mexicana NOM-F-420-S-1982. Productos alimenticios para uso humano - Determinación de acidez en leche fluida. México: Secretaría de Salud, 1982. (Consultado el 27 de Febrero del 2023). Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4761014&fecha=02/09/1982#gsc.tab=0
- Panghal, A., Patidar, R., Jaglan, S., Chhikara, N., Khatkar, S. K., Gat, Y. y Sindhu, N. (2018). Whey valorization: current options and future scenario—a critical review. *Nutrition & Food Science*, 48(3), 520-535. DOI: <https://doi.org/10.1108/NFS-01-2018-0017>
- Pereira, C., Henriques, M., Gomes, D., Gomez-Zavaglia, A., & de Antoni, G. (2015). Novel functional whey-based drinks with great potential in the dairy industry. *Food technology and biotechnology*, 53(3), 307-314. DOI: <https://doi.org/10.17113/ftb.53.03.15.4043>
- Pérez-Escobar, L. V., Mosquera-Martínez, A. J., Ciro-Velásquez, H. J., Sepúlveda-Valencia, J. U., & Vargas-Díaz, S. L. (2020). Obtaining a lactose hydrolyzed from nanofiltration of sweet whey: Characterization and process optimization. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(1), 445-453.
- Portero, Z. (2018). El napping, una técnica sensorial aplicada en diferentes productos [Trabajo final de grado, Universidad Miguel Hernández de Elche]. <http://dspace.umh.es/bitstream/11000/5342/1/TFG%20Portero%20Mira%2C%20Zaira.pdf>
- Rico-Rodríguez, F., Serrato, J. C., Montilla, A. y Villamiel, M. (2018). Impact of ultrasound on galactooligosaccharides and gluconic acid production throughout

a multienzymatic system. *Ultrasonics Sonochemistry*, *44*, 177-183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.022>

- Rico-Rodríguez, F., Villamiel, M., Ruiz-Aceituno, L., Serrato, J. C., & Montilla, A. (2020). Effect of the lactose source on the ultrasound-assisted enzymatic production of galactooligosaccharides and gluconic acid. *Ultrasonics Sonochemistry*, *67*, 104945. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104945>
- Risner, D., Tomasino, E., Hughes, P. y Meunier-Goddik, L. (2019). Volatile aroma composition of distillates produced from fermented sweet and acid whey. *Journal of Dairy Science*, *102*(1), 202-210. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14737>
- 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: <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03580-2>
- SADER/SIAP. (2019). *Boletín de leche*. SIAP. <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Bolet%C3%ADn%20de%20Leche%20enero-marzo%202018.pdf>
- Saqib, S., Akram, A., Halim, S. A. y Tassaduq, R. (2017). Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech*, *7*, 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5>
- Shahbandeh, M. (2022a, September 1). *Global cheese market - statistics & facts*. Statista. <https://www.statista.com/topics/6586/global-cheese-market/#topicOverview>
- Shahbandeh, M. (2022b, November 2). *Whey protein: Global market size 2029*. Statista. <https://www.statista.com/statistics/728005/global-whey-protein-market-size/>
- Sharma, D., Manzoor, M., Yadav, P., Sohal, J. S., Aseri, G. K. y Khare, N. (2018). Chapter 20: Bio-valorization of dairy whey for bioethanol by stress-tolerant yeast. En: *Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspectives*, 349-366. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-0393-7_20
- Skryplonek, K. (2018). The use of acid whey for the production of yogurt-type fermented beverages. *Mljekarstvo: časopis za unapređenje proizvodnje i*

DOI: <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2018.0207>

- Sommella, E., Pepe, G., Ventre, G., Pagano, F., Conte, G. M., Ostacolo, C., ... y Campiglia, P. (2016). Detailed peptide profiling of “Scotta”: From a dairy waste to a source of potential health-promoting compounds. *Dairy Science & Technology*, 96, 763-771. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0297-y>
- Souza, F. P., Balthazar, C. F., Guimarães, J. T., Pimentel, T. C., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., ... y Cruz, A. G. (2019). The addition of xyloligoosaccharide in strawberry-flavored whey beverage. *Lwt - Food Science and Technology*, 109, 118-122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.093>
- Tawfeuk, H. Z. y Khalil, O. S. F. (2019). Production and Evaluation of Sweet Whey Doum Beverages. *Menoufia Journal of Food and Dairy Sciences*, 4(2), 57-71. DOI: 10.21608/MJFDS.2019.174878
- The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). (2021a). Showing metabocard for 3-Galactosyllactose (HMDB0006599). Human Metabolome Database (HMDB). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0006599>
- The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). (2021b). Showing metabocard for 6'-Sialyllactose (HMDB0006569). Human Metabolome Database (HMDB). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0006569>
- The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). (2021c). Showing metabocard for Disialyllactose (HMDB0006692). Human Metabolome Database (HMDB). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0006692>
- The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). (2021d). Showing metabocard for N-Acetyllactosamine (HMDB0001542). Human Metabolome Database (HMDB). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001542>
- The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). (2022a). Showing metabocard for 3'-Sialyllactose (HMDB0000825). Human Metabolome Database (HMDB). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000825>
- The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). (2022b). Showing metabocard for 6-Sialyl-N-acetyllactosamine (HMDB0006584). Human Metabolome Database (HMDB). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0006584>

- The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). (2022c). Showing metabocard for Allolactose (HMDB0038489). Human Metabolome Database (HMDB). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0038489>
- The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). (2022d). Showing metabocard for beta-Lactose (HMDB0041627). Human Metabolome Database (HMDB). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0041627>
- The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). (2022e). Showing metabocard for Galabiose (HMDB0029902). Human Metabolome Database (HMDB). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0029902>
- The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). (2022f). Showing metabocard for N-Acetylgalactosamine (HMDB0000212). Human Metabolome Database (HMDB). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000212>
- The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). (2022g). Showing metabocard for N-Acetylgalactosaminyllactose (HMDB0041622). Human Metabolome Database (HMDB). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0041622>
- Tsakali, E., Petrotos, K., D'Allessandro, A. y Goulas, P. (2010, June). A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. In *Proc. 6th Int. Conf. Simul. Modelling Food Bioind* (pp. 195-201).
- Urashima, T., Sun, Y., Fukuda, K., Hirayama, K., Taufik, E., Nakamura, T., ... & Messer, M. (2015). Chemical characterization of milk oligosaccharides of the eastern quoll (*Dasyurus viverrinus*). *Glycoconjugate journal*, 32, 361-370. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10719-015-9600-z>
- Urrutia, P., Rodriguez-Colinas, B., Fernandez-Arrojo, L., Ballesteros, A. O., Wilson, L., Illanes, A., & Plou, F. J. (2013). Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(5), 1081-1087. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf304354u>
- Van Leeuwen, S. S., Kuipers, B. J., Dijkhuizen, L., & Kamerling, J. P. (2014). Development of a ^1H NMR structural-reporter-group concept for the analysis of prebiotic galacto-oligosaccharides of the $[\beta\text{-d-Galp-(1}\rightarrow\text{x)}]_n\text{-D-Glcp}$

type. *Carbohydrate research*, 400, 54-58.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.08.011>

- Van Leeuwen, S. S., Kuipers, B. J., Dijkhuizen, L., & Kamerling, J. P. (2016). Comparative structural characterization of 7 commercial galacto-oligosaccharide (GOS) products. *Carbohydrate Research*, 425, 48-58.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.03.006>
- van Loveren, H., Sanz, Y. y Salminen, S. (2012). Health claims in Europe: probiotics and prebiotics as case examples. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 247-261. DOI: 10.1146/annurev-food-022811-101206
- Villarreal, M. (2017). Value added products utilizing acid whey: development of a fruit yogurt beverage and a sports drink [Master's Thesis]. Cornell University.
- Xavier, J. R., Ramana, K. V. y Sharma, R. K. (2018). β -galactosidase: Biotechnological applications in food processing. *Journal of Food Biochemistry*, 42(5), e12564. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12564>
- Yadav, J. S. 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), 756-774. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>
- Yañez-Ñeco, C. V., Cervantes, F. V., Amaya-Delgado, L., Ballesteros, A. O., Plou, F. J. 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: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.10.004>
- Yin, H., Bultema, J. B., Dijkhuizen, L., & 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: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.030>
- 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*, 63, 45-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.03.002>

ANEXOS

Anexo 1. Formato de evaluación sensorial

EVALUACION SENSORIAL DE BEBIDA DE PERMEADO DE SUERO

Sexo: _____ Edad: _____ Ocupación: _____ Fecha: _____

Frente a usted tiene cuatro muestras de bebida de permeado de suero. Evalúe cada una de las muestras, tomando agua entre cada una, y señale con una cruz (X) su reacción frente al producto según la escala adjunta.

Muestra: _____

	Me disgusta mucho	Me disgusta	Me disgusta levemente	No me gusta ni me disgusta	Me gusta levemente	Me gusta	Me gusta mucho
Agrado general	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Muestra: _____

	Me disgusta mucho	Me disgusta	Me disgusta levemente	No me gusta ni me disgusta	Me gusta levemente	Me gusta	Me gusta mucho
Agrado general	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Muestra: _____

	Me disgusta mucho	Me disgusta	Me disgusta levemente	No me gusta ni me disgusta	Me gusta levemente	Me gusta	Me gusta mucho
Agrado general	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Muestra: _____

	Me disgusta mucho	Me disgusta	Me disgusta levemente	No me gusta ni me disgusta	Me gusta levemente	Me gusta	Me gusta mucho
Agrado general	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Al terminar la evaluación, de las cuatro muestras indique cuál es la que prefiere más, cuál es la que prefiere menos y ¿Por qué?

Muestra más preferida: _____

¿Por qué la eligió?

Muestra menos preferida: _____

¿Por qué la eligió?

COMENTARIOS:

Anexo 2. Formato de consentimiento informado

**FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA FACULTAD DE
QUÍMICA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**



Este formato de consentimiento informado se dirige a las personas invitadas a participar como panelista no entrenado (consumidor) en el análisis sensorial de cuatro formulaciones de bebida de permeado de suero lácteo, sabor menta-limón, como parte del proyecto de investigación “Producción y caracterización de galactooligosacáridos a partir de permeado de suero dulce tratado con β galactosidasa y su aplicación en el desarrollo de una bebida”.

Nombre del director del proyecto: Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Nombre del investigador: I.Q.Al. Silvana Esther López Hernández

Introducción

En esta investigación desarrollada por la estudiante de Maestría en Ciencia y Tecnología de alimentos, se busca evaluar la aceptabilidad de una bebida a base permeado de suero dulce que contiene galactooligosacáridos obtenidos de la lactosa presente en éste. Se le hace la invitación a formar parte de esta investigación actuando como panelista del análisis sensorial.

Propósito

El desarrollo de una bebida que contenga galactooligosacáridos potencialmente prebióticos, los cuales se obtienen a partir de la transgalactosilación de lactosa de permeado de suero de leche. Además, al aprovechar el suero de leche como una fuente para obtener ingredientes funcionales, se disminuye el impacto ambiental que este subproducto genera.

Selección de participantes

Los invitados a participar en esta evaluación serán 50 personas, sin exclusión de género, en un rango de edad entre 18 y 70 años y que consuman productos lácteos tres o más veces por semana. Es de suma importancia que si usted es alérgico a algún componente de la leche, o tiene alguna restricción médica para el consumo de productos lácteos, lo notifique de inmediato para que se excluya de participar en este estudio, ya que su salud es primordial. De igual manera si tiene la duda de que algún ingrediente pueda causarle alguna reacción.

Participación voluntaria

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria, usted puede elegir participar o no, e incluso puede cambiar de parecer durante el transcurso del experimento, aún cuando haya firmado con anterioridad este formato de consentimiento informado.

Protocolo

Se presentarán ante usted 4 muestras de bebida, debe indicar el agrado general hacia cada una de las muestras acorde a la escala establecida. Todas las muestras se presentarán simultáneamente con números aleatorios de tres dígitos.

Riesgos

Las bebidas se elaboraron siguiendo las buenas prácticas de manufactura en la Planta Piloto de Productos Lácteos ubicada en el Parque Biotecnológico de la Universidad Autónoma de Querétaro, todos los ingredientes son de grado alimenticio y se utilizó leche pasteurizada. Además, se obtuvieron muestras de cada formulación y fueron sometidas a análisis microbiológicos, lo que garantiza la inocuidad del producto, es decir, se considera libre de riesgos a la salud.

Se hace de su conocimiento la disponibilidad de tratamiento médico en la clínica de atención médica FarmaUAQ, en caso de sufrir daños directamente causados por la Investigación.

Confidencialidad

La información de los panelistas de esta investigación no se compartirá con personas ajenas a la misma y la información obtenida será presentada sin revelar el nombre del panelista.

Contacto

En el transcurso del estudio, usted podrá solicitar al investigador responsable información actualizada sobre sus resultados, así como evidencia de la inocuidad del producto evaluado. Se le garantiza que usted recibirá respuesta a cualquier pregunta, duda o aclaración acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios u otros asuntos relacionados con el presente estudio.

Si tiene cualquier duda o comentario posterior al análisis puede contactarse con:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano: samayal@uaq.com.mx. 442-192-1200 ext: 5509

IQAI. Silvana Esther López Hernández: silvanalh96@gmail.com. 442-837-2235

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO:

Fecha: _____

He sido invitado a participar en el análisis sensorial de 4 formulaciones de bebida de permeado de suero lácteo como parte del proyecto de investigación "Producción y caracterización de galactooligosacáridos a partir de permeado de suero dulce tratado con β -galactosidasa y su aplicación en el desarrollo de una bebida", he sido informado de que se han buscado prevenir posibles riesgos. Se me ha proporcionado el nombre y los datos del investigador responsable y he leído la información proporcionada, por ello, elijo de manera voluntaria participar en esta investigación como un panelista no entrenado para una evaluación sensorial.

Nombre del participante: _____

Firma del participante: _____

He sido testigo de la lectura del documento de consentimiento informado por parte del participante, por lo que confirmo que el individuo ha dado su consentimiento libremente.

Nombre del director del proyecto: Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Nombre del investigador asistente: I.Q.AI. Silvana Esther López Hernández

Firma del investigador asistente: _____

*Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de consentimiento informado.



¡Te invitamos!

Evaluación sensorial de una bebida con prebióticos

¿Dónde? Planta piloto de lácteos (piso 1 del parque biotecnológico)

¿Cuándo? 29/05/2024
11:30 a.m. - 15:30 p.m.

Requisitos:

- Tener entre 18 y 50 años
- Gusto por los productos lácteos
- No presentar intolerancia a la lactosa y/o productos lácteos

Mayor información contactar a:
Silvana Esther López Hernández
Cel. 442-837-2235

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Anexo 4. Formato de revocación de consentimiento informado

FORMULARIO DE REVOCACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Fecha: _____

Mediante el presente documento declaro la revocación del consentimiento informado firmado el día _____ en el que consentí mi participación en el análisis sensorial de una bebida a base de suero lácteo.

Nombre del participante: _____

Firma del participante: _____

Nombre del director del proyecto: Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Nombre del investigador asistente: I.Q.AI. Silvana Esther López Hernández

Firma del investigador asistente: _____

*Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de revocación de consentimiento informado.