

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA RÁPIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE LACTOSA EN SUERO Y PERMEADO



INTRODUCCIÓN

El suero es un subproducto resultante de la coagulación de la leche en la producción de queso (Prazeres y col., 2012). En la provincia de Santa Fe se generan 11.000 tn/día de suero de quesería líquido. El 35-40% de este subproducto es utilizado para elaborar productos con escaso valor agregado (suero en polvo, lactosa en polvo y concentrados de proteína). El 60-65% restante se aprovecha en la alimentación animal o es desechado como efluente, generando conflictos ambientales entre las industrias y la comunidad (Castellano y Goizueta, 2013). El permeado se obtiene mediante el uso de un sistema de membranas (ultrafiltración) para separar las proteínas del suero que constituirán un concentrado proteico, quedando entonces como subproducto esta mezcla de lactosa, sales y agua. El porcentaje de lactosa en suero y permeado oscila entre 4-12% (Prazeres y col., 2012).

Campos, Sonia; Massera, Ariel; Mainez, Esperanza; Acosta, Nadia y Adorni, María Belén
INTA EEA Rafaela. Rafaela, Santa Fe, Argentina.
campos.sonia@inta.gob.ar

Debido a que es considerado un sustrato barato y fácil de obtener, el suero de queso y el permeado se utilizan desde 1940 para producir comercialmente biomasa microbiana (González Siso, 1996). Esto permite obtener bio-ingredientes con un alto valor agregado para la industria, ya sea biomasa para nutrición humana y animal o derivados del metabolismo microbiano (enzimas, etanol, biomateriales, etc.) (De Palma Revillion y col., 2003; Koller y col., 2012; Prazeres y col., 2012). La cuantificación de lactosa en ambas matrices es importante para conocer la concentración inicial en el medio de cultivo, donde este sustrato es utilizado como fuente de carbono.

El método de referencia para la determinación de lactosa es realizado a través del kit enzimático Lactosa/D-Galactosa (Enzymatic BioAnalysis/Food Análisis, RBIOPHARM), con el que se procesa la muestra para su posterior lectura de absorbancia en un espectrofotómetro UV Visible. Si bien esta metodología es muy utilizada debido a su sensibilidad y bajo límite de detección, aplicarla lleva mucho tiempo y los costos son elevados. Es por esto que se busca validar metodologías más rápidas y de menor costo.

La validación es la confirmación a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. Brinda una idea de las capacidades y limitaciones de la performance de ese método que se pueden experimentar durante el uso rutinario. El objetivo de la validación es probar la aptitud de los métodos, así como la capacidad del laboratorio. La realización de actividades de validación de los métodos de ensayo utilizados por el propio laboratorio, contemplan la satisfacción de las necesidades del cliente y la adecuación para realizar los ensayos previstos. Bajo este contexto, el objetivo de este trabajo fue validar la tecnología infrarroja utilizando el equipo Milkoscan Minor con el méto-

do enzimático de referencia para disponer de un método rápido para la cuantificación de lactosa en diferentes matrices lácteas y medios de cultivo con lactosa como fuente de carbono.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar adelante la validación, primero se preparó una solución madre con una concentración conocida de lactosa, empleando permeado de suero en polvo Varioac 850 (ARLA Foods Ingredients SA). A partir de esta solución primaria se obtuvo un set de 11 muestras con diferentes valores de lactosa, cubriendo el rango de lectura de rutina del laboratorio (0 a 6%). Un volumen de 30 mL de cada una de las muestras se colocó en tubos de 50 mL y los mismos fueron centrifugados a 4°C, a 5000 rpm durante 10 minutos. En un tubo falcon de 50 mL limpio se recuperó cada sobrenadante, y éstos se analizaron por ambos métodos: enzimático (referencia) versus infrarrojo.

La metodología de referencia se llevó a cabo utilizando el kit Enzymatic BioAnalysis/Food Análisis, R-BIOPHARM, a través del cual la lactosa se hidroliza a D-glucosa y D-galactosa a pH 6.6 en presencia de la enzima β -galactosidasa y agua (1).



La D-galactosa se oxida a pH 8,6 por adenina nicotinamida dinucleótico (NAD) para dar ácido D-galactónico en presencia de la enzima β -galactosa deshidrogenasa (Gal-DH) (2).



La cantidad de NADH formado en la reacción (2) es estequiométrico con la cantidad de lactosa y D-galactosa respectivamente. El aumento en NADH se mide por medio de su absorbancia a 334, 340 ó 365 nm, a los 15, 20 y 30 minutos desde que se inicia la reacción y hasta que el aumento de la misma se haya estabilizado. La cuantificación de lactosa por el método enzimático toma aproximadamente dos horas desde que la muestra es centrifugada.

En cuanto al método infrarrojo, se llevó a cabo utilizando el equipo MilkoScan Minor (FOSS), siguiendo los lineamientos de la Norma ISO 9622 IDF 141:2013, el cual permitió cuantificar el contenido de lactosa a través de la absorción de radiación electromagnética a la longitud de onda específica para dicho componente (9,6 μm enlaces hidroxilos). La muestra absorbida por el equipo es depositada en una cubeta, donde recibe radiación emitida por una fuente de energía. Dicha radiación es absorbida por el componente mencionado anteriormente. Al final del circuito se encuentra un detector que traduce la cantidad de radiación absorbida por la muestra en concentración. La absorción de la radiación es proporcional a la cantidad de lactosa presente en la muestra analizada. La cuantificación de la lactosa por método infrarrojo demora 1,5 minutos una vez que la muestra es centrifugada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para llevar a cabo la calibración del equipo se calculó el sesgo, a partir de la diferencia entre los valores obtenidos por la metodología infrarroja versus los valores de referencia (Tabla 1) y la desviación estándar del sesgo (DS).

La DS calculada fue de 0,14%. Según la Norma ISO 9622 IDF 141:2013, la misma debe ser menor a 0,06%. De acuerdo a los resultados no satisfactorios, se realizó el ajuste al equipo, obteniéndose un R^2 de 0,996, indicando, de esta manera, una correcta concordancia entre las variables (Figura 1).



kual
cheese moulds

NO HAY QUESO SIN MOLDE





J. A. Alvarez 443, Rafaela. Santa Fe. Argentina / Tel.: +54-3492-430428 / www.kualsa.com

TABLA 1 - Resultados obtenidos a partir de las metodologías evaluadas. Cálculo del intervalo de confianza de la predicción del 95%. Referencias: Límite Inferior intervalo de confianza 95% (LI IC95) y Límite Superior intervalo de confianza 95% (LS IC95).

Muestra	Concentración teórica Lactosa (g/100 ml)	Método rápido Lactosa (g/100 ml)	Método referencia Lactosa (g/100 ml)	Sesgo	LI IC95	LS IC95
1	0,10	-0,90	0,08	0,99	-0,02	0,32
2	0,30	-0,66	0,28	0,94	0,19	0,51
3	0,50	-0,43	0,59	1,02	0,38	0,69
4	1,00	0,12	0,94	0,82	0,85	1,12
5	2,00	1,21	1,89	0,68	1,77	1,99
6	2,50	1,70	2,30	0,59	2,17	2,38
7	3,00	2,26	2,83	0,57	2,63	2,84
8	4,00	3,36	3,78	0,42	3,52	3,76
9	5,00	4,69	4,57	-0,12	4,56	4,89
10	5,50	5,02	5,20	0,17	4,82	5,17
11	6,00	5,73	5,38	-0,35	5,38	5,77

FIGURA 1 - Curva de calibración a partir de la metodología de regresión lineal simple entre el método enzimático y el infrarrojo. En rojo intervalo de confianza de la predicción del 95%.

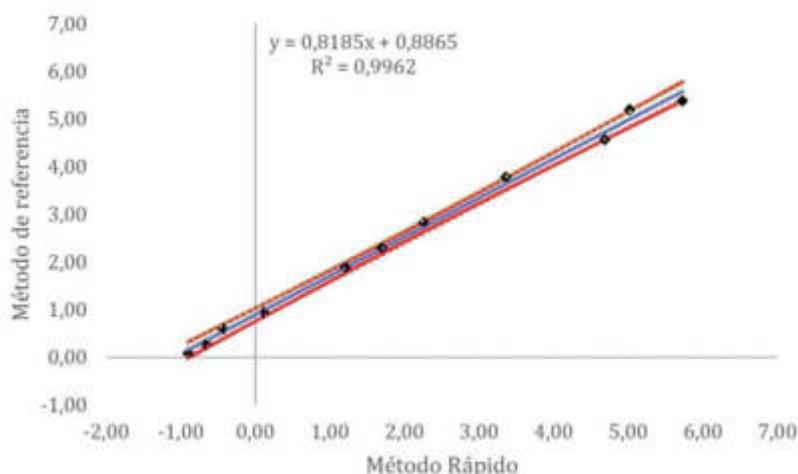


TABLA 2 - Resultados obtenidos luego del ajuste del equipo. Cálculo del intervalo de confianza de la predicción del 95%.

Muestra	Método rápido Lactosa (g/100 ml)	Método referencia Lactosa (g/100 ml)	Sesgo
1	0,21	0,08	-0,13
2	0,31	0,28	-0,03
3	0,52	0,59	0,08
4	0,98	0,94	-0,04
5	1,86	1,89	0,03
7	2,73	2,83	0,11
8	3,64	3,78	0,14
10	5,00	5,20	0,19
Media de las diferencias			0,04
Desvío estándar de las diferencias			0,11
Límite Inferior intervalo de confianza 95%			-0,06
Límite Superior intervalo de confianza 95%			0,15

Finalmente, se verificó la calibración del equipo analizando nuevamente ocho de las 11 muestras preparadas (Tabla 2). Las muestras 6, 9 y 11 no fueron tenidas en cuenta para realizar la verificación.

Luego del ajuste, la DS obtenida fue de 0,05%. Este valor se encontró dentro de las especificaciones establecidas, y los valores calculados para el sesgo (Tabla 2) fueron menores que los especificados en la tabla 1; por lo tanto, se consideró correcto el ajuste realizado. Esta metodología de trabajo fue replicada para la calibración del equipo Milkoscan Minor con muestras obtenidas a partir de diferentes fracciones de suero lácteo (suero, permeado y concentrado) obteniéndose resultados satisfactorios (R^2 : 0,95).

CONCLUSIONES

Con este trabajo, se logró desarrollar una metodología rápida para la determinación de lactosa, a través del equipo Milkoscan Minor, validada con el Enzymatic BioAnalysis/Food Análisis, R-BIOPHARM. Los resultados obtenidos por el método infrarrojo son confiables y concordantes con el método de referencia.

REFERENCIAS

- Castellano, A., Goizueta, M.E. (2013). Patrones de innovación y alternativas de agregado de valor en la industria láctea argentina. [En línea]. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. <https://inta.gov.ar/documentos/patrones-de-innovacion-y-alternativas-de-agregado-de-valor-en-la-industrialactea-argentina> [Consulta agosto de 2019].
- De Palma Revillion, J.P.; Brandelli, A., Ayub, M.A.Z. (2003). Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46 (1): 121-128.
- González Siso, M.I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology* 57: 1-11.
- Koller, M., Salerno, A., Muhr, A., Reiterer, A., Chiellini, E., Casella, S., Horvat, P., Braunnegg, G. (2012). Whey lactose as a raw material for microbial production of biodegradable polyesters. En "Polyesters", pp. 51-92. Saleh, H. (Ed.). IntechOpen, Londres, Reino Unido.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48-68.