

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“PUESTA A PUNTO DE
METODOLOGÍAS ANALÍTICAS DE
LACTOSA EN BASES LÁCTEAS”**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

POR

SILVIA VÁZQUEZ DÍAZ

JULIO, 2017





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Jullán Clavería s/n. 33071 Oviedo, España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Francisco A. Riera Rodríguez (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D^{ña}. Silvia Vázquez Díaz ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 11^a promoción curso 2016-2017.

Oviedo, 14 de Julio de 2017

D. (Francisco A. Riera Rodríguez)

V^ºB^º

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

A Francisco Riera por darme la oportunidad de realizar este proyecto. Por sus consejos y el tiempo dedicado.

A Melisa, Claudia y Soraya, por dejarme un sitio en su laboratorio. Especialmente a Claudia por su clase magistral de HPLC.

A Adrián Suárez por toda su ayuda, atención, paciencia y dedicación.

A Carmen por su aguante, por su ayuda, por todo su tiempo y por las largas conversaciones telefónicas delante del ordenador.

A Carla y Alejandro, por estar siempre dispuestos a ayudarme y por hacer mucho más ameno el trabajo de laboratorio.

Al departamento de I+D+i de CAPSA por permitirme realizar los análisis.

Al departamento de Calidad de CAPSA por facilitarme los horarios para realizar las medidas, en especial a Claudia por hacer mi primer contacto con el BIOMILK más entretenido.

A mis padres, porque sin ellos no habría podido realizar este Máster. Por su amor y apoyo incondicional.

A mis amigos, por involucrarse en este proyecto y oírles hablar de lactosa como si fuesen expertos.

En definitiva a todos los que de alguna manera han formado parte de este proyecto: gracias.

ÍNDICE

Resumen / Abstract.....	1
Lista de tablas.....	2
Lista de figuras.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS.....	11
2.1 RAZONES PARA EL DESARROLLO DE PRODUCTOS	12
DESACTOSADOS INDUSTRIALES.....	12
2.1.1 INTOLERANCIAS.....	12
2.1.1.1 INTRODUCCIÓN.....	12
2.1.1.2 ALERGIAS E INTOLERANCIAS ALIMENTARIAS.....	13
2.1.1.3 MALA ABSORCIÓN E INTOLERANCIA A LA LACTOSA.....	13
2.1.1.4 DEFICIENCIA PRIMARIA Y SECUNDARIA	14
2.1.1.5 DISTRIBUCIÓN.....	14
2.1.1.6 INTOLERANCIA PERCIBIDA.....	15
2.1.1.7 CONSIDERACIONES MÉDICAS.....	15
2.1.1.8 TEST DE HIDRÓGENO.....	16
2.1.1.9 LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	16
2.1.2 NUEVOS ALIMENTOS.....	16
2.1.2.1 PROBIÓTICOS.....	18
2.1.2.2 PREBIÓTICOS.....	18
2.1.2.3 SIMBIÓTICOS.....	19
2.1.2.4 ALIMENTOS ENRIQUECIDOS CON FIBRA.....	19
2.1.2.5 ÁCIDOS GRASOS POLISATURADOS, MONOSATURADOS Y	19
FITOESTEROLES.....	
2.1.2.6 FITOESTRÓGENOS	20
2.1.2.7 LEGUMBRES, VERDURAS Y FRUTAS.....	20
2.1.2.8 COMPUESTOS FENÓLICOS.....	21
2.2 LACTOSA.....	22
2.2.1 PROPIEDADES FÍSICAS.....	23
2.2.1.1 CRISTALIZACIÓN Y FORMAS FÍSICAS.....	23
2.2.2 PROPIEDADES QUÍMICAS.....	24
2.2.2.1 PROPIEDADES REDUCTORAS.....	24
2.2.2.2 HIDRÓLISIS QUÍMICA.....	24

2.2.3 TRANSFORMACIONES BIOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS.....	25
2.2.3.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	25
2.2.3.2 TRANSFORMACIÓN EN ÁCIDO LÁCTICO Y FERMENTACIONES SECUNDARIAS.....	26
2.2.3.3 TRANSFORMACIÓN EN ALCOHOL.....	27
2.2.3.4 TRANSFORMACIÓN EN ÁCIDO BUTÍRICO.....	27
2.3 LA LACTOSA EN LOS PRODUCTOS LÁCTEOS INDUSTRIALES.....	29
2.3.1 TIPOS DE PRODUCTOS LÁCTEOS INDUSTRIALES.....	29
2.3.1.1 LECHE.....	29
2.3.1.2 YOGUR.....	31
2.3.1.3 QUESOS	31
2.3.1.4 MANTEQUILLAS.....	32
2.3.1.5 CONTENIDO EN LACTOSA EN OTROS PRODUCTOS LÁCTEOS.....	33
2.3.2 DESLACTOSADO INDUSTRIAL.....	33
2.3.2.1 ANTECEDENTES.....	33
2.3.2.2 MÉTODOS DE DESLACTOSADO INDUSTRIAL.....	34
2.3.2.3 LECHE SIN LACTOSA MEDIANTE TÉCNICAS DE SEPARACIÓN.....	37
2.4 DESCRIPCIÓN DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS DE LACTOSA.....	38
2.4.1 MÉTODOS QUÍMICOS.....	38
2.4.1.1 MÉTODO OFICIAL CON CLORAMINA T.....	39
2.4.2 MÉTODOS FÍSICOS.....	40
2.4.2.1 MÉTODOS POLARIMÉTRICOS.....	40
2.4.2.2 MÉTODOS CRIOSCÓPICOS.....	40
2.4.2.3. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	40
2.4.3 MÉTODOS ENZIMÁTICOS.....	40
2.4.4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	42
2.4.4.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)	42
2.4.4.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)...	42
3. METODOLOGÍA.....	43
3.1 BIOMILK: FUNDAMENTOS Y METODOLOGÍA.....	44
3.1.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DEL BIOMILK.....	44

3.1.2	METODOLOGÍA DE TRABAJO PARA DETERMINACIÓN DE LACTOSA EN LECHE	46
3.1.2.1	MATERIAL NECESARIO PARA LA MEDIDA.....	46
3.1.2.2	PREPARACIÓN DE LA MEDIDA.....	46
3.1.2.3	PUESTA EN MARCHA DEL BIOSENSOR.....	48
3.1.2.4	PRETRATAMIENTO, DILUCIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRA.....	49
3.1.3	METODOLOGÍA DE TRABAJO PARA ANÁLISIS DE LACTOSA EN YOGUR.....	49
	3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	50
3.2.1	DETERMINACIÓN DE GRASA.....	50
3.2.2	DETERMINACIÓN DE LAS CENIZAS.....	50
3.2.3	DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO.....	51
3.2.4	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.....	51
	3.3 METODOLOGÍA DE TRABAJO PARA YOGUR.....	52
	3.4 METODOLOGÍA DE TRABAJO PARA MANTEQUILLA.....	53
4.	RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	55
	4.1 DETERMINACIÓN DE LACTOSA EN YOGUR.....	56
4.1.1	CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD.....	56
4.1.2	ESTUDIO DEL EFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE CARBÓN ACTIVO.....	57
4.1.3	ESTUDIO DE LA DILUCIÓN DEL PATRÓN DE MEDIDA LAC 1.....	58
4.1.4	ESTUDIO DEL AJUSTE DE GLUCOSA EN EL PATRÓN DE MEDIDA LAC 1.....	58
4.1.5	ESTUDIO DEL CICLO DE VIDA.....	60
	4.2 DETERMINACIÓN DE LACTOSA EN MANTEQUILLA.....	64
4.2.1	CARACTERIZACIÓN MANTEQUILLA PRUEBA 1.....	64
4.2.2	ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.....	65
4.2.3	CARACTERIZACIÓN PRUEBA 2, PRUEBA 3 Y BLANCO DE MANTEQUILLA.....	65
4.2.4	MEDIDA DE LAS PRUEBAS 2, 3 Y EL BLANCO DE MANTEQUILLA.....	66
4.2.5	CICLO DE VIDA	67
5.	CONCLUSIONES.....	69
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	72
7.	ANEXOS.....	78

RESUMEN

Teniendo en cuenta la creciente demanda de los consumidores por productos funcionales y el elevado número de personas que padecen intolerancias a la lactosa, el objetivo de este Proyecto Fin de Máster ha sido la puesta a punto de un método analítico, electroquímico, de carácter enzimático, para la determinación de lactosa en productos lácteos bajos en lactosa (yogur y mantequilla). Se ha llevado a cabo en la empresa CAPSA FOOD (Granda, Siero, Asturias).

Para ello se caracterizaron todos los productos mediante la medida de grasa, cenizas, proteínas y extracto seco. Tras hallar el método idóneo para cada muestra, se estudió la reproducibilidad del método, así como el ciclo de vida de cada producto a lo largo de 4 semanas.

Los resultados obtenidos se enviaron a una empresa externa, y también se analizaron mediante HPLC y mediante otro instrumento de tipo electroquímico enzimático (LactoSens) para ser cotejados, obteniéndose valores similares a los hallados con el método estudiado.

La comparación de los resultados con otros métodos ha demostrado la fiabilidad del método puesto a punto de tal forma que se adoptará en el futuro en la empresa para la fabricación de derivados lácteos total o parcialmente deslactosados.

ABSTRACT

As a result of the increasing demand for the functional products on the part of the consumers and the amount of people suffering lactose intolerance, this project aims to develop an analytic, electrochemical, enzymatic method to quantify lactose in low lactose dairy products (yogurt and butter). It was performed in CAPSA FOOD (Granda, Siero, Asturias).

All the products were characterized by the measurement of fat, ash, protein and dry extract. After finding the ideal method for each sample, the reproducibility of the method was studied as well as the life cycle of each product over four weeks.

The obtained results were sent to an external company and they were also analyzed by HPLC and by another electrochemical enzymatic technique obtaining similar values to those found with the method studied.

The analytical method studied has shown the reliability of the method in such a way that it will be adopted in the future in the company for the manufacture of totally or partially delactosed dairy products.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Efectos de algunos alimentos funcionales naturales de especial relevancia (Silveira, Monereo, and Molina 2013).....	21
Tabla 2: <i>Formas de cristalización y condiciones de formación de lactosa</i> (Zadow, 1992).	23
Tabla 3: Contenido en lactosa de diferentes tipos de leches de fluidos (Murray, 1988, FAO, 1963).	30
Tabla 4: <i>Contenido en lactosa de diferentes tipos de leches concentradas</i> (Murray, 1988; FAO, 1963)	30
Tabla 5: Contenido en lactosa de diferentes tipos de leches congeladas (Murray, 1988; FAO, 1963).	30
Tabla 6: Contenido en lactosa de diferentes tipos de leches secas (Murray, 1988; FAO, 1963).	31
Tabla 7: Contenido en lactosa de diferentes productos lácteos cultivados (Murray, 1988; FAO, 1963).	31
Tabla 8: <i>Contenido en lactosa de diferentes tipos de quesos</i> (McAllen, 1987; FAO, 1963).	32
Tabla 9: Contenido de lactosa de grasas de leche (Murray, 1988; FAO, 1963)..	33
Tabla 10: Contenido en lactosa de diferentes sueros (ADPI, 1992; FAO, 1963).	33
Tabla 11: <i>Métodos químicos para el análisis de lactosa</i> (Zadow, 1992).....	39
Tabla 12: <i>Enzimas y sustancias bioquímicas utilizadas en los métodos enzimáticos vía glucosa y galactosa</i>	41
Tabla 13: Especificaciones de los rangos de medida.....	45
Tabla 14: Preparación del Reactivo y Patrón de Calibración.....	47
Tabla 15: Condiciones de almacenaje de los reactivos.....	47
Tabla 16: Volúmenes de las adiciones en la activación, calibración y análisis de patrón.....	49
Tabla 17: Volúmenes de muestra a inyectar.....	49
Tabla 18: Caracterización de muestras de mantequilla, yogur y leche iniciales.	56

Tabla 19: <i>Estudio de la reproducibilidad del método en leche semidesnatada sin lactosa</i>	56
Tabla 20: <i>Estudio de los protocolos de leche y yogur en yogur natural azucarado sin lactosa</i>	57
Tabla 21: <i>Estudio del protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa con y sin carbón activo</i>	57
Tabla 22: <i>Estudio de la reproducibilidad del protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa sin carbón activo</i>	57
Tabla 23: <i>Estudio del efecto de la dilución del patrón de medida LAC1 junto con la adición de carbón activo en protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa</i>	58
Tabla 24: <i>Estudio de la reproducibilidad con la dilución del patrón de medida LAC1 con y sin carbón activo</i>	58
Tabla 25: <i>Caracterización muestras 1 y 2</i>	59
Tabla 26: <i>Comparación del efecto de ajustar el patrón de medida LAC1 a su cantidad real de glucosa</i>	59
Tabla 27: <i>Caracterización nueva muestra 3</i>	60
Tabla 28: <i>Ciclo de vida de muestra 1, Biotest hidratado 48 horas</i>	60
Tabla 29: <i>Ciclo de vida de muestra 2, Biotest hidratado 48 horas</i>	61
Tabla 30: <i>Ciclo de vida muestra 2, Biotest hidratado 24 horas</i>	61
Tabla 31: <i>Ciclo de vida muestra 3, Biotest hidratado 48 horas</i>	61
Tabla 32: <i>Resultados HPLC para muestras 1, 2 y 3</i>	62
Tabla 33: <i>Caracterización Prueba 1</i>	64
Tabla 34: <i>Estudio reproducibilidad Prueba 1</i>	65
Tabla 35: <i>Caracterización muestras de mantequilla</i>	66
Tabla 36: <i>Estudio de la reproducibilidad de la Prueba 2 centrifugada, sin centrifugar, la Prueba 3 y el blanco centrifugados</i>	66
Tabla 37: <i>Estudio de la reproducibilidad del Blanco y la Prueba 3</i>	66
Tabla 38: <i>Ciclo de vida Prueba 1</i>	67
Tabla 39: <i>Ciclo de vida Prueba 2</i>	67
Tabla 40: <i>Calibración para estudio de la reproducibilidad en leche sin lactosa semidesnatada</i>	85

Tabla 41: Medidas para estudio de la reproducibilidad en leche sin lactosa semidesnatada.	85
Tabla 42: <i>Calibración para protocolo de leche sin lactosa en yogur natural sin lactosa.</i>	85
Tabla 43: Medidas para protocolo de leche sin lactosa en yogur natural sin lactosa.	86
Tabla 44: <i>Calibración para protocolo de leche sin lactosa en yogur natural sin lactosa.</i>	86
Tabla 45: Medidas para protocolo de leche sin lactosa en yogur natural sin lactosa.	86
Tabla 46: Calibración para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2.	87
Tabla 47: Medidas para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2.	87
Tabla 48: Calibración para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 sin carbón activo.	87
Tabla 49: <i>Medidas para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 sin carbón activo</i>	88
Tabla 50: <i>Calibración para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 en muestra y LAC 1</i>	89
Tabla 51: Medidas para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 en muestra y LAC 1.	89
Tabla 52: Calibración para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 de muestra y LAC 1. Sin carbón activo.	89
Tabla 53: Medidas para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 de muestra y LAC 1. Sin carbón activo.	90
Tabla 54: Calibración para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 de muestra y LAC 1. Con carbón activo.	90
Tabla 55: Medidas para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 de muestra y LAC 1. Con carbón activo.	90
Tabla 56: Calibración para protocolo de yogur en muestra 1, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa en LAC 1.	91
Tabla 57: Medidas para protocolo de yogur en muestra 1, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa en LAC 1.	91

Tabla 58: Calibración para protocolo de yogur en muestra 2, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa en LAC 1.	91
Tabla 59: Medidas para protocolo de yogur en muestra 2, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa en LAC 1.	92
Tabla 60: Calibración para protocolo de yogur en muestra 1, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, sin ajuste de glucosa.	92
Tabla 61: Medidas para protocolo de yogur en muestra 1, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, sin ajuste de glucosa.	92
Tabla 62: Calibración para protocolo de yogur en muestra 2, con dilución 1:2 de muestra y LAC 1, sin ajuste de glucosa.	93
Tabla 63: Medidas para protocolo de yogur en muestra 2, con dilución 1:2 de muestra y LAC 1, sin ajuste de glucosa.	93
Tabla 64: Calibración para protocolo de yogur en muestra 1, con dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.	94
Tabla 65: Medidas para protocolo de yogur en muestra 1, con dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.....	94
Tabla 66: Calibración para protocolo de yogur en muestras 2 y 3, con dilución 1:2 de las muestras y LAC 1, con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest.	94
Tabla 67: <i>Medidas para protocolo de yogur en muestras 2 y 3, con dilución 1:2 de las muestras y LAC 1, con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest.</i>	95
Tabla 68: Calibración para protocolo de yogur en muestra 3, con dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.	95
Tabla 69: Medidas para protocolo de yogur en muestra 3, con dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.....	95
Tabla 70: Calibración para protocolo de yogur en muestra 2, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest.....	96
Tabla 71: Medidas para protocolo de yogur en muestra 2, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest.....	96

Tabla 72: Calibración para protocolo de yogur en muestras 1, 2 y 3, con dilución 1:2 de muestras y de LAC 1 , con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.	96
Tabla 73: Medidas para protocolo de yogur en muestras 1, 2 y 3, con dilución 1:2 de muestras y de LAC , con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.	97
Tabla 74: Calibración para protocolo de yogur en muestras 1 y 2, con dilución 1:2 de las muestras y de LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.	97
Tabla 75: Medidas para protocolo de yogur en muestras 1 y 2, con dilución 1:2 de las muestras y de LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.	97
Tabla 76: Calibración para protocolo de yogur en muestra 2, con dilución 1:2 de muestra y de LAC 1, con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest.....	98
Tabla 77: Medidas para protocolo de yogur en muestra 2, con dilución 1:2 de muestra y de LAC 1, con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest.....	98
Tabla 78: Calibración para protocolo de yogur en muestra 3, con dilución 1:2 en muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.....	98
Tabla 79: Medidas para protocolo de yogur en muestra 3, con dilución 1:2 en muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.	99
Tabla 80: <i>Calibración para protocolo de yogur en muestras 2 y 3, con dilución 1:2 de las muestras y de LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.</i>	99
Tabla 81: Medidas para protocolo de yogur en muestras 2 y 3, con dilución 1:2 de las muestras y de LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Detección inmunohistológica de lactasa en la vellosidad superficial de una muestra de intestino humano (Fuquay, 2011).....	13
Figura 2: Distribución global de la persistencia a la lactasa (Fuquay, 2011).....	15
Figura 3: Fórmula estructural de α - y β -lactosa (Fuquay, 2011).....	22
Figura 4: Productos de fermentación de lactosa (Fuquay, 2011).....	28
Figura 5: Dispositivo BIOMILK.....	44
Figura 6: Diagrama esquemático que muestra las reacciones implicadas de la enzima y el electrodo con el biosensor β -Gal-GOD-HRP-TTF-MPA-AuE para la determinación de lactosa (Onzuelo et al., 2010).....	45
Figura 7: Butirómetro tipo Gerber para leche, 0 a 7% de grasa.....	50
Figura 8: Ciclo de vida yogur.....	62
Figura 9: Resultados HPLC.....	63
Figura 10: Resultados adiciones estándar.....	63
Figura 11: Ciclo de vida mantequilla.....	68
Figura 12: Resultados LABER para yogur (muestra 3).....	100
Figura 13: Resultados LABER para mantequilla (Prueba 1).....	102

1. INTRODUCCIÓN

Los productos lácteos juegan un papel central en la dieta humana, constituyendo una fuente rica de minerales, vitaminas y proteínas de alta calidad. Su contribución para alcanzar la ingesta recomendada de calcio para la salud ósea en niños y adultos así como la reducción del riesgo de síndromes metabólicos con el consumo diario de productos lácteos, son algunos de los factores beneficiosos que se les asocian (Ohlsson *et al.*, 2017).

La lactosa es el carbohidrato característico de la leche, comúnmente denominado “azúcar de la leche”. La fuente principal de lactosa es la leche de los mamíferos, aunque también se encuentra presente en bajas concentraciones en sangre y orina, especialmente durante el embarazo y la lactancia procedente de los tejidos mamarios. La lactosa se encuentra en la orina de aproximadamente el 9% de la población humana sana de cualquier sexo que consumen una dieta normal, por lo que el origen es probablemente alimentario (Flynn *et al.*, 1953).

La concentración de lactosa en la leche está inversamente relacionada con la concentración de lípidos y caseína. La principal función de la lactosa y los lípidos en la leche es como fuente de energía. Los lípidos son 2,2 veces más densos en energía que la lactosa, por lo tanto cuando se requiere una leche altamente calórica (mamíferos marinos u osos polares en ambientes fríos) se consigue aumentando el contenido en grasa de la leche. La relación inversa entre las concentraciones de lactosa y caseína refleja el hecho de que la síntesis de lactosa atrae agua a la vesículas de Golgi diluyéndose así la concentración de caseína (Fuquay, 2011).

El primer registro de aislamiento de lactosa fue en 1966 por Bartoletus mediante evaporación de suero. A lo largo del siglo XVIII, la lactosa se convirtió en un producto comercial, teniendo su principal uso en el campo de la medicina (como excipiente por ejemplo). Se ha utilizado por médicos desde los tiempos de Hipócrates para aprovechar sus funciones y propiedades bioquímicas (Wong, 1988).

Debido al aumento de la intolerancia a la lactosa en la población, la industria alimentaria y en concreto la industria lechera desarrolla continuamente nuevos productos sin lactosa. Según la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria la concentración de lactosa en estos productos debe ser inferior a 1 g/l, sin embargo varias empresas indican en sus etiquetas valores inferiores a 0,01% como una característica de “calidad superior”. Además, algunos productos lácteos se comercializan utilizando la denominación “lactosa reducida”, para la cual la concentración de lactosa debe ser inferior a 5 g/l. Teniendo en cuenta esta situación en el mercado, la cuantificación fiable de la concentración de lactosa en los alimentos se ha convertido en una tarea crítica (Trani *et al.*, 2017).

Existen diferentes métodos para la determinación de azúcares, aunque muchos de ellos presentan inconvenientes considerables. Los métodos estándar precisan personal cualificado, equipos costosos y engorrosos, requieren tiempo y son complejos. Otros métodos son más simples y rápidos pero menos precisos y selectivos (métodos químicos cualitativos como la polarimetría). Por esto, existe una urgente necesidad de desarrollar métodos analíticos simples, rápidos, de bajo coste y precisos para la determinación de carbohidratos.

En la actualidad la tecnología de los biosensores es una vía de investigación prometedora para responder a los retos de los métodos tradicionales de análisis de sacáridos por sus reconocidas ventajas como rapidez de análisis, bajo coste, alta

sensibilidad y selectividad (Soldatkin et al., 2013), capacidad de miniaturización y de análisis de alto rendimiento (Yakovleva et al., 2012).

La inmovilización de enzimas usando diferentes métodos como atrapamiento, unión covalente, reticulación y adsorción se utiliza para la fabricación de distintos tipos de biosensores (Sharma et al., 2004).

OBJETIVOS

El objetivo de este Proyecto Fin de Máster ha sido la puesta a punto de un método analítico electroquímico-enzimático para la determinación de lactosa en yogures y mantequillas bajos en lactosa.

En CAPSA este método (BIOMILK) se encontraba optimizado para matrices lácteas líquidas, y el objetivo de mi trabajo consistió en su optimización en matrices sólidas y semisólidas. Las matrices sólidas presentan el problema de difícil manejo de cantidades exactas. Se deben transformar en líquidos para poder utilizarlos en el instrumento y pipetear las cantidades necesarias de ellos. Los objetivos concretos a llevar a cabo fueron:

- Caracterizar químicamente las muestras a estudiar con el fin de conocer su contenido real de lactosa.
- Valoración de la reproducibilidad del método para muestras de leche, yogur y mantequilla sin lactosa.
- Estudiar la influencia de los pretratamientos en las muestras sin lactosa.
- Determinación de las condiciones experimentales óptimas para la determinación de lactosa en matrices sólidas y semisólidas.
- Realizar un análisis del tiempo de vida de las muestras.
- Comparar los resultados con otro método enzimático (LactoSens).
- Contrastar los resultados obtenidos con laboratorios acreditados.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1 RAZONES PARA EL DESARROLLO DE PRODUCTOS DESLACTOSADOS INDUSTRIALES

Actualmente se dispone comercialmente de un gran número de alimentos diferentes sin lactosa y, en particular, la demanda de productos lácteos bajos en lactosa está creciendo continuamente. El nivel de lactosa en estos productos disminuyó durante los últimos años y hoy en día una concentración menor de 0,01% se acepta generalmente como "sin lactosa" (van Scheppingen *et al.*, 2017). Los motivos para el desarrollo de productos bajos en lactosa se exponen a continuación.

2.1.1 INTOLERANCIAS

2.1.1.1 INTRODUCCIÓN

El “azúcar de la leche” no es tan sólo una fuente de energía sino que también posee un valor nutritivo. Su papel beneficioso se relaciona con tres conceptos:

- La lactosa favorece tanto la asimilación como la retención de calcio. Por lo tanto, en casos de insuficiencia de absorción de lactosa o de deficiencia en lactasa (alactasia), se comprueba la aparición de osteoporosis.
- La lactosa tiene una importancia particular puesto que aporta galactosa, que es necesaria para la actividad de las células cerebrales, especialmente para los cerebrósidos.
- La lactosa se digiere más lentamente que otros glúcidos. De este modo, favorece la fermentación de tipo ácido en el intestino.

Estas propiedades tienen gran importancia en la nutrición de los jóvenes (Alais, 1985).

La lactasa es la enzima que se desdobra en sus monosacáridos absorbibles. Esta enzima es esencial para la alimentación de los mamíferos recién nacidos, cuya fuente de nutrición es la leche. La enzima se encuentra en las vellosidades del intestino delgado, en la superficie fronteriza del cepillo apical de las células absorbentes conocidas como enterocitos, con el cuerpo de la enzima, incluyendo el sitio catalítico, sobresaliendo en el lumen del intestino (figura 1). La glucosa y la galactosa se introducen en los enterocitos a través de una molécula transportadora específica. En mamíferos adultos distintos de seres humanos, la producción de lactasa disminuye significativamente después del destete, cuando la leche ya no es parte de la dieta. En seres humanos que continúan consumiendo leche en la edad adulta, es más complicado, la producción de lactasa persiste en la vida adulta de algunas personas pero en otras no (Fuquay, 2011).



Figura 1. Detección inmunohistológica de lactasa en la vellosidad superficial de una muestra de intestino humano (Fuquay, 2011).

2.1.1.2 ALERGIAS E INTOLERANCIAS ALIMENTARIAS

Es importante distinguir entre una alergia a un alimento y una intolerancia alimentaria. Mientras que una intolerancia es molesta y puede tener consecuencias en la salud y el estilo de vida de los afectados, las alergias son mediadas por respuestas inmunes con un peligro potencial. La intolerancia a la lactosa es un síndrome de síntomas causados por una deficiencia de lactasa. Las personas intolerantes a la lactosa pueden estar informadas de su fisiología subyacente por su desagrado por la leche y evitar los productos lácteos. La mejor fuente de calcio son los productos lácteos. Evitar estos productos puede tener efectos adversos ya que el calcio es un nutriente esencial y el mineral más prevalente en el cuerpo humano (Carter & Attel, 2013).

La mala absorción de lactosa se puede distinguir de la alergia a la proteína de la leche por los síntomas y por el hecho de que los productos lácteos bajos en lactosa no producen dichos síntomas (Fuquay, 2011).

2.1.1.3 MALA ABSORCIÓN E INTOLERANCIA A LA LACTOSA

Debe distinguirse entre mala absorción de lactosa e intolerancia a la lactosa.

La mala digestión de la lactosa es la incapacidad de digerir cuantitativamente una dosis oral de lactosa en sus constituyentes azúcares simples (glucosa y galactosa) durante su paso a través del intestino delgado. El diagnóstico se realiza mediante medidas objetivas de la incapacidad de tomar los carbohidratos del intestino.

La intolerancia a la lactosa es la experiencia de síntomas de disconfort gastrointestinal: náuseas, gases, calambres y distensión abdominal, eructos o flatulencia y heces acuosas tras la ingestión de lactosa (Zadow, 1992).

La intolerancia a la lactosa depende de varios factores, como la dosis de lactosa en relación con la actividad de la lactasa, la fuente de lactosa y alimentos sólidos que los acompañan, el tiempo de tránsito, la acción microbiana del colon, la capacidad de absorción del colon de los productos de fermentación de la lactosa y la sensibilidad individual de cada individuo (Pawłowska, Umławska & Iwańczak, 2016).

2.1.1.4 DEFICIENCIA PRIMARIA Y SECUNDARIA

La intolerancia a la lactosa es la sensibilidad metabólica más común de la especie humana, afectando a un 60-70% de personas en todo el mundo. Niveles inadecuados de lactasa se traducen en molestias abdominales, hinchazón, gases y diarrea debido a la lactasa no digerida en el colon, que es fermentada por bacterias. La deficiencia primaria de lactasa es la causa más común de la intolerancia a la lactosa y se encuentra más frecuentemente en Sudamérica, África y Asia y en sus descendientes. La deficiencia secundaria de lactasa resulta de la inflamación del intestino delgado y puede ser causada por un sobrecrecimiento bacteriano, gastroenteritis, la enfermedad celíaca y desórdenes en la movilidad gastrointestinal. La intolerancia a la lactosa comienza en la infancia, pero es más frecuente en la edad adulta porque la lactasa disminuye progresivamente a lo largo de la vida. Alrededor de dos tercios de la población mundial no son portadores de la composición genética que permite la producción de lactasa y por lo tanto son lactasa persistentes o no persistentes (Luthy, Larimer & Freeborn, 2017).

Los individuos “lactasa no persistentes” presentan bajos niveles de lactasa desde edades tempranas. Este patrón es similar a otros mamíferos pero en el caso de los humanos el tiempo es mayor. Por otro lado, una minoría de la población humana, retiene altos niveles de actividad a lo largo de la vida adulta, lo que se denomina lactasa persistentes.

La persistencia de una actividad elevada de lactasa ha demostrado ser claramente un acontecimiento evolutivo humano relativamente reciente, surgido en los últimos 8000 a 10.000 años, coincidiendo con el desarrollo de la lechería (Baffour-Awuah *et al.*, 2015).

2.1.1.5 DISTRIBUCIÓN

La distribución global de la persistencia a la lactasa (figura 2) está actualmente bien caracterizada y revela que la no-persistencia a la lactasa es el fenotipo más común en humanos (65%), con la aparición frecuente de persistencia a la lactasa que tiende a restringirse a poblaciones con una larga historia de pastoreo y ordeño. La persistencia a la lactasa tiene su mayor frecuencia en el noroeste de Europa con una tendencia decreciente al sur y al este. En África y Oriente Medio la distribución es irregular, mostrando algunas tribus nómadas pastoralistas con mayor frecuencia de persistencia que las que no beben leche y viven en el mismo país. Se observa una correlación de la persistencia de la lactasa con la práctica cultural del ordeño que sugiere que este rasgo ha estado sujeto a una evolución adaptativa (Fuquay, 2011).

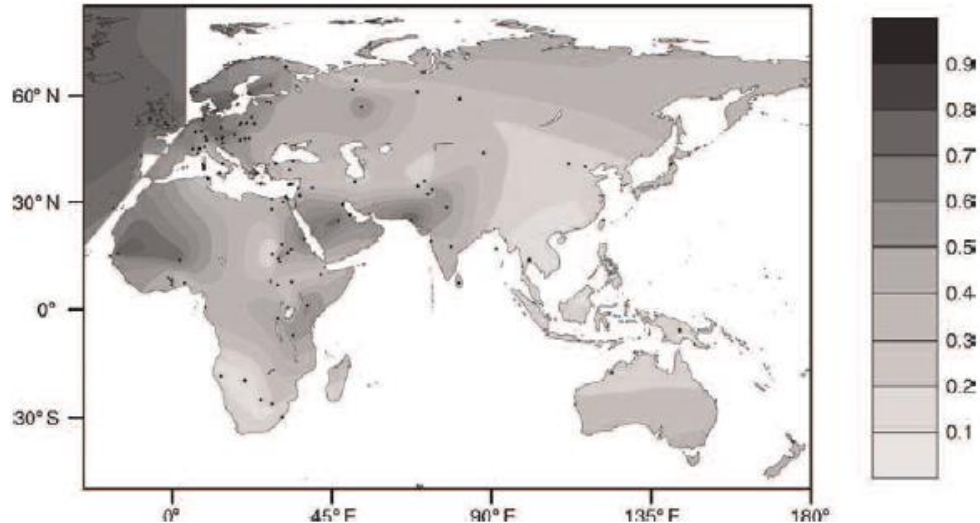


Figura 2. Distribución global de la persistencia a la lactasa (Fuquay, 2011)

2.1.1.6 INTOLERANCIA PERCIBIDA

Algunos individuos experimentan los síntomas de la ingestión de leche y creen que son intolerantes a menos de una taza de leche aunque no haya prácticamente evidencias para apoyar su suposición de que los síntomas son debidos a una intolerancia a la lactosa. Esto sugiere que la intolerancia a la lactosa está altamente influenciada por factores psicológicos. De hecho, la intolerancia a la lactosa percibida, se ha presentado como el mayor factor correlativo a la hora de limitar el consumo de leche. Aún eliminando la lactosa en pacientes con síntomas, no siempre se mejoran los mismos, ya que puede haber una causa subyacente como un intestino irritable, colitis, enteritis, enfermedad celíaca u otros problemas clínicos que resultan en problemas intestinales causando los síntomas (Brown-Esters, Mc Namara & Savaiano, 2012).

2.1.1.7 CONSIDERACIONES MÉDICAS

El consumo de leche y productos lácteos por aquellos individuos incapaces de digerir lactosa es normalmente consciente o inconscientemente ajustado para evitar consecuencias adversas. Muchos productos lácteos comerciales contienen altas concentraciones de lactosa introducidas en la fabricación, por lo que la lactosa está presente de manera más generalizada en la dieta, que lo estaba hace años.

Muchas asociaciones han realizado estudios para demostrar los beneficios del consumo de leche en personas lactasa-persistentes, por ejemplo proporcionando protección frente a la osteoporosis, y muchas otras han puesto de manifiesto los efectos adversos asociados a un alto consumo de leche en lactasa-persistentes como cataratas, cáncer de ovarios, enfermedades cardíacas y diabetes.

Estos hallazgos contradictorios, son difíciles de evaluar debido al alto riesgo de confusión de efectos como ascendencia mixta, ingesta dietética y variación en la flora intestinal (Fuquay, 2011).

2.1.1.8 TEST DE HIDRÓGENO

El estatus de persistencia a la lactasa normalmente es inferido mediante un método indirecto que depende de la digestión de la lactosa. La diferencia en la digestión se mide por un test que se conoce como “test de tolerancia a la lactosa” (Fuquay, 2011). Se trata de un método simple y no invasivo para diagnosticar la mala absorción de lactosa subclínica (Tamura, Shiomi & Hachiya, 2008).

Éste consiste en la medida de la glucosa en sangre o del hidrógeno en la respiración después de una noche de ayuno. Se realiza una medida de referencia antes de la ingestión de lactosa y después, a varios intervalos de tiempo. Un aumento de la glucosa en sangre indica la digestión de la lactosa (se produce glucosa de la hidrólisis de lactosa y se introduce en el torrente sanguíneo), si no hay aumento es un indicativo de mala digestión de lactosa (probablemente lactasa no-persistente). Un aumento en el contenido de hidrógeno en el aire expirado también es indicativo de mala digestión y refleja la fermentación en el colon de la lactosa. Estas pruebas fisiológicas pueden dar lugar tanto a falsos negativos como a falsos positivos (Fuquay, 2011).

2.1.1.9 LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

El conocimiento profundo de las razones de la intolerancia a la lactosa ha sido un estímulo para la investigación, que se ha dirigido en dos direcciones:

- 1.- Productos con lactosa transformada por acidificación o por hidrólisis. Las leches acidificadas contienen lactosa (aunque en menor proporción) y, de modo general, son aceptadas por los individuos intolerantes.
- 2.- Las galletas a base de co-precipitados de proteínas de leche, que han servido para complementar el régimen de poblaciones de África donde la alactasia impide la difusión de la leche en polvo (Alais, 1985).

2.1.2 NUEVOS ALIMENTOS

Hoy en día los alimentos no sólo nos proporcionan los nutrientes básicos, sino que intentan mejorar el bienestar físico y mental de los humanos así como prevenir enfermedades relacionadas con la nutrición.

En los últimos años, tanto el mercado de consumo como la investigación académica han informado sobre la creciente preocupación e interés de los consumidores en la salud y en los alimentos funcionales. Esto es debido a varios factores: el reconocimiento del

papel de la comida en la salud, el aumento de la esperanza de vida y el aumento de los costes de los servicios de salud debido a la prevalencia de problemas como alta presión arterial, colesterol, alta glucosa en sangre, obesidad, riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Kaur & Singh, 2017).

El concepto de alimento funcional surge por primera vez en 1980 cuando el Ministerio de Salud y Bienestar japonés creó un sistema regulador para los alimentos con beneficios para la salud. El propósito era mejorar la salud general de la población del país y mantener control sobre los crecientes costes del sistema sanitario. Desde entonces diferentes países han adoptados diferentes ideas de alimento funcional en términos de definiciones, alcance y marco regulador, pero no existe una única definición aceptada universalmente para alimentos funcionales. Un alimento puede considerarse funcional si tiene efectos beneficiosos sobre funciones específicas del cuerpo además de los efectos nutricionales de un modo que sea relevante para la salud y el bienestar y/o para la reducción de enfermedades (Diplock *et al.*, 1999).

Los alimentos funcionales están ganando aceptación a lo largo del mundo y se están convirtiendo en parte de la dieta diaria del consumidor medio. El potencial de mercado global de alimentos y bebidas funcionales se estima en 192 billones de dólares para 2020. Aunque está creciendo a buen ritmo, el desarrollo de estos productos es muy difícil para los fabricantes ya que necesitan asegurar que esos productos e ideas cumplen las expectativas de los consumidores (Urala & Lähteenmäki, 2007; Menezes *et al.*, 2011).

Analizar los estudios existentes e identificar las áreas que necesitan mejora podría contribuir a un mejor entendimiento de las elecciones y el comportamiento de los consumidores.

En las dos últimas décadas diferentes estudios de consumidores han evaluado la conciencia, preferencia, actitud, percepción e intención de compra de los consumidores en relación con los alimentos funcionales. Aunque es muy difícil tratar de explicar el comportamiento humano en lo que se refiere a elecciones de alimentos, se ha observado que ciertas características como el entorno socio-demográfico del consumidor, la motivación personal, la conciencia de salud y la actitud hacia los alimentos funcionales juegan un papel importante en su aceptación (Kaur & Singh, 2017).

Por otro lado, proporcionar información adicional a los consumidores acerca de las declaraciones de propiedades saludables de los alimentos funcionales aumenta el valor percibido del producto (Kaur & Singh, 2017).

Varios estudios resaltan la importancia de otra clave determinante a la hora de aceptar los alimentos funcionales, como las fuentes de información, los factores cognitivos y de actitud, la confianza, la neofobia, la tecnología de alimentos, conveniencia, gustos, etc (Frewer, Scholderer & Lambert, 2003).

2.1.2.1 PROBIÓTICOS

Los probióticos son microorganismos vivos que confieren varios efectos beneficiosos al huésped (mejoran la inmunidad, ayudan en la digestión, protegen de los patógenos, promueven el crecimiento y la reproducción) y, en algunos casos, podrían usarse como una alternativa parcial a los antibióticos (Banerjee & Ray, 2017).

Los microorganismos probióticos son principalmente bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. La industria láctea que fabrica productos fermentados fue la primera en comercializar con éxito cepas específicas de bacterias probióticas en productos como yogures y quesos frescos. Factores como el vegetarianismo creciente, incluido el veganismo entre los consumidores, la intolerancia a la lactosa, la alergia a las proteínas de la leche, el contenido de colesterol de los productos lácteos y los hábitos religiosos o dietéticos han limitado el crecimiento del mercado de probióticos en los productos lácteos y perjudicado su consumo por personas interesadas en una dieta más saludable (Mariotti, 2017).

2.1.2.2 PREBIÓTICOS

Los prebióticos son normalmente carbohidratos dietéticos no digeribles que se fermentan selectivamente, dando como resultado cambios específicos en la composición y / o actividad de un número limitado de bacterias intestinales, lo que confiere beneficios a la salud del huésped. Actualmente, existen ciertos carbohidratos con un estado prebiótico bien conocido, entre los que se incluyen la lactulosa, la inulina, los fructooligosacáridos, los galacto-oligosacáridos y el almidón resistente. Sin embargo, en las últimas décadas ha habido una creciente búsqueda de nuevos carbohidratos prebióticos que podrían considerarse como prebióticos emergentes, tales como xiloligosacáridos, arabinosilo-oligosacáridos, isomalto-oligosacáridos, lactosacarosa y pecticoligosacáridos, entre otros. Del mismo modo, actualmente se están concentrando esfuerzos significativos de investigación en la búsqueda y / o producción de nuevos ingredientes prebióticos que tengan una serie de propiedades deseables incluyendo que sean activos a dosis bajas, que carezcan de efectos secundarios, que sean persistentes a través del colon, que tengan un control fino de la modulación microbiana, una buena estabilidad al almacenamiento y procesamiento, que posean actividades biológicas adicionales, que ejerzan efectos beneficiosos sobre funciones fisiológicas específicas y / o que reduzcan el riesgo de enfermedad (García-Cayuela *et al.*, 2014).

2.1.2.3 SIMBIÓTICOS

Los productos simbióticos son combinaciones de un probiótico exógeno y un prebiótico, donde el probiótico alcanza el sitio objetivo y prolifera *in situ* utilizando el prebiótico. El prebiótico debe ser un sustrato específico para el probiótico, siendo capaz de estimular su crecimiento y / o actividad mientras que al mismo tiempo mejora las bacterias beneficiosas. El término simbiótico se refiere indirectamente a una sinergia y es por eso que algunos autores han sugerido que este término debe referirse exclusivamente a productos en los que los compuestos prebióticos selectivamente favorezcan el crecimiento de probióticos (Konar *et al.*, 2016).

2.1.2.4 ALIMENTOS ENRIQUECIDOS CON FIBRA

La leche es una fuente rica en compuestos nutritivos que pueden ser enriquecidos y / o modificados adicionalmente, y también fortificados. La fortificación de productos lácteos con fibra dietética es de creciente interés en la fabricación de alimentos funcionales con beneficios para la salud y para mejorar su funcionalidad inicial (Silveira, Monereo, & Molina 2013). La fibra dietética consiste en restos de células vegetales (hemicelulosas, celulosa, lignina, pectinas, gomas y ceras) y es resistente a la hidrólisis por las enzimas alimentarias humanas. Basándose en su solubilidad intestinal simulada, las fibras dietéticas se clasifican como insolubles o solubles. Las dietas con un alto contenido de fibra dietética juegan un papel importante en la prevención de varias enfermedades. Las fibras dietéticas insolubles aumentan el peso de las heces y disminuyen el tiempo de tránsito del colon. Estas características conducen a la prevención de la diverticulosis y estreñimiento del colon. Un alimento puede considerarse una fuente de fibra y etiquetado como tal cuando el producto contiene al menos 1,5 g de fibra por 100 kcal (418,68 kJ), mientras que el producto que contiene por lo menos 3 g de fibra por 100 kcal (418,68 kJ) puede clasificarse como un alimento rico en fibra (Tomic *et al.*, 2017).

2.1.2.5 ÁCIDOS GRASOS POLISATURADOS, MONOSATURADOS Y FITOESTEROLES.

Los estudios epidemiológicos y clínicos han revelado que los aceites y grasas ricos en ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) como los omega-3 y los omega-6 pueden proporcionar beneficios para la salud además de proporcionar energía y nutrientes solubles en lípidos. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) desempeñan un papel vital en el mantenimiento de la salud y el bienestar de los seres humanos al minimizar el riesgo de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, artritis, diabetes y ciertos tipos de cáncer. Dado que el cuerpo humano es incapaz de sintetizar PUFAs en la cantidad requerida, son conocidos como los ácidos grasos esenciales (AGE) y tienen que ser suministrados al cuerpo a través de la dieta o suplementos dietéticos (Timilsena *et al.*, 2017).

Los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) se distinguen de los otros tipos de ácidos grasos por tener sólo un doble enlace. Existe evidencia clínica y epidemiológica para apoyar que la dieta MUFA puede reducir la presión arterial y reducir el riesgo cardiovascular estimado (Cheng, Wang & Shao, 2016).

Los fitoesteroles son compuestos naturales en las plantas, estructuralmente similares al colesterol. La dieta humana es bastante abundante en sitosterol y campesterol. Se sabe que los fitoesteroles tienen diversas propiedades bioactivas, incluyendo la reducción de la absorción intestinal de colesterol, que reduce el colesterol LDL de la sangre y los problemas cardiovasculares. Las dietas ricas en fitosterol pueden reducir el riesgo de cáncer en un 20% (Shahzad *et al.*, 2017).

2.1.2.6 FITOESTRÓGENOS

Los fitoestrógenos son varios grupos de estrógenos no esteroideos que están ampliamente distribuidos dentro del reino vegetal. Hay una creciente evidencia de que el consumo de algunas de estas plantas o sus moléculas podría ser una herramienta aditiva eficiente para prevenir y tratar varias disfunciones y enfermedades relacionadas con el envejecimiento, los procesos mentales, el metabolismo, la transformación maligna, las enfermedades cardiovasculares, los cánceres de próstata, síntomas menopáusicos, osteoporosis, arterosclerosis, accidente cerebrovascular, y neurodegeneración (Sirotkin, 2014).

2.1.2.7 LEGUMBRES, VERDURAS Y FRUTAS

Las hortalizas y legumbres representan uno de los componentes más importantes de la dieta humana. Estar informado sobre sus características puede mejorar los beneficios para la salud, ayudando a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II y algunos tipos de cáncer. Las legumbres y hortalizas son fuentes ricas de proteínas, grasas, carbohidratos, minerales, antioxidantes, fibra y agua, además de ser excelentes fuentes de β -caroteno (provitamina A), tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina, piridoxina, ácido pantoténico, ácido fólico (folacina), ácido ascórbico y vitaminas E y K (Fabbri & Crosby, 2016).

El consumo de frutas y verduras se recomienda a menudo debido a su excelente perfil de nutrientes, alto contenido de fibra dietética, y generalmente bajo contenido calórico. Las investigaciones han demostrado que el consumo de frutas y verduras en lugar de alimentos con mayor contenido calórico puede afectar mucho el balance energético y la ayuda en la pérdida de peso (Wagner *et al.*, 2016).

2.1.2.8 COMPUESTOS FENÓLICOS

Numerosos estudios informan sobre los efectos beneficiosos para la salud de los compuestos fenólicos. Muchos de los efectos biológicos de los polifenoles se han atribuido a su alto potencial antioxidante, ya que estos compuestos pueden proteger los componentes celulares de daño oxidativo, limitando el riesgo de enfermedades degenerativas asociadas con el estrés oxidativo. Sin embargo, ahora se sabe que estos compuestos son más que antioxidantes y están implicados en muchos mecanismos y vías moleculares implicados en diversas funciones fisiológicas, resultando generalmente en un riesgo reducido de diversas enfermedades (Rossi, Bassett & Sammán, 2016). En la tabla 1 se pueden observar los efectos de algunos alimentos funcionales naturales de especial relevancia.

Efectos favorables sobre el perfil lipídico
Pescado azul
Aceite de oliva virgen
Nueces, vino
Legumbres
Manzana, moras
Cebada, avena
Zanahoria, champiñón
Ajo, cebolla
Efecto antioxidante
Limón, tomate
Manzana, arándanos
Ajo
Efecto antiinflamatorio
Ginseng
Avena
Efecto antiproliferativo
Naranja, soja
Berenjena, espinacas
Repollo, coles de Bruselas
Coliflor, brócoli
Perejil, ajo
Té verde
Efecto antimicrobiano
Arándanos
Ajo, cebolla
Té verde
Efecto antiestrogénico
Anís
Soja
Hinojo
Repollo

Tabla 1. Efectos de algunos alimentos funcionales naturales de especial relevancia (Silveira, Monereo & Molina 2013).

2.2 LACTOSA

Los glúcidos de la leche están compuestos principalmente por lactosa, que es el constituyente mayoritario del extracto seco. La leche contiene alrededor de un 5%, la leche en polvo desnatada contiene un 52% y el lactosuero en polvo un 70% en peso (Alais, 1985).

La lactosa es un disacárido reductor, compuesto de galactosa y glucosa unidos por un enlace glicosídico β 1-4. Es el carbohidrato primario presente en la leche de la mayoría de los mamíferos. El contenido de lactosa de la leche de vaca está generalmente entre 4,4 y 5,2%. La lactosa también es importante por su valor económico y su contribución a las propiedades sensoriales y funcionales de los productos lácteos (Zadow, 1992).

La lactosa es el único glúcido libre que existe en cantidad importante en la leche y también es el componente más abundante, el más simple y el más constante. Existe una constancia de la secreción de lactosa entre especies, que lleva a pensar que el proceso enzimático implicado en la síntesis es similar entre especies muy diversas (Alais, 1985).

La lactosa se produce por la reacción del hidroxilo 1 hemiacetálico libre de la D-galactopiranosas con el hidroxilo 4 de la D-glucopiranosas. La galactosa y la glucosa, al ser piranosas, existen en solución acuosa en forma de dos estereoisómeros α y β reductores. En la síntesis de la lactosa, el anómero β de la galactosa se une al carbono 4 de la glucosa y el carbono-1-anomérico de la β -galactosa pierde su poder rotatorio al quedar único mediante un enlace glicosídico al carbono-4 de la glucosa; mientras que la función hemiacetálica del carbono-1 anomérico de la glucosa persiste. Por tanto, existen dos anómeros α y β de la glucosa, lo que hace que se pueda prever la existencia de dos anómeros α y β para la lactosa (figura 3) (Luquet, 1991).

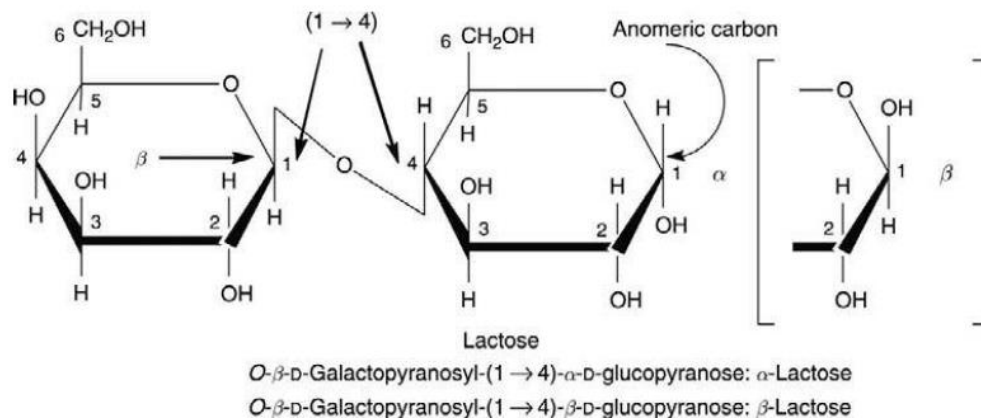


Figura 3. Fórmula estructural de α - y β -lactosa (Fuquay, 2011).

2.2.1 PROPIEDADES FÍSICAS

2.2.1.1 CRISTALIZACIÓN Y FORMAS FÍSICAS

La forma de los cristales está condicionada por la naturaleza de la cristalización (tabla 2). Una cristalización forzada y rápida (con siembra de lactosa cristalizada o de leche en polvo) proporciona pequeños prismas paralelepípedicos, y si es lenta, permite observar formas variadas (Alais, 1985). Además de la existencia en solución acuosa de los dos anómeros, se produce la formación de distintos tipos de lactosa, según que la molécula del disacárido esté en forma anhidra o hidratada (Luquet, 1991).

Forma de cristalización	Condiciones de formación
α -lactosa hidratada $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	Sobresaturación, $T^a < 93,5^\circ\text{C}$
β -lactosa anhidra $C_{12}H_{22}O_{11}$	Sobresaturación, $T^a > 93,5^\circ\text{C}$
Lactosa amorfa	Secado rápido (rodillo o spray)
α -lactosa anhidra, inestable : $C_{12}H_{22}O_{11}$	$T=100^\circ\text{C}$, vacío
α -lactosa anhidra, estable : $C_{12}H_{22}O_{11}$	$T=150^\circ\text{C}$, vapor de agua o sobresaturación con etanol

Tabla 2. Formas de cristalización y condiciones de formación de lactosa (Zadow, 1992).

La lactosa puede existir en varias formas cristalinas y no cristalinas. El estado cristalino es un estado sólido, con las moléculas bien dispuestas en una red regular. De acuerdo con Haque y Roos (2005), los principales tipos de lactosa cristalizada son la α -lactosa monohidratada, β -lactosa anhidra y formas anhidras de α - y β -lactosa en proporciones de ratios molares de 5:3 y 4:1. Comparado con la lactosa en estado cristalino, la disposición molecular de lactosa en estado amorfo está desordenada. Además, la lactosa amorfa es termodinámicamente inestable e higroscópica, mientras que la lactosa cristalina es termodinámicamente estable y mucho menos higroscópica. Estas diferentes formas afectan al comportamiento de la lactosa y a los productos que contienen lactosa.

Ha habido un considerable interés por los componentes amorfos en las industrias lechera y farmacéutica. La presencia de incluso pequeñas cantidades de componentes amorfos puede tener un impacto significativo en las propiedades fisicoquímicas de los materiales y alterar el rendimiento del producto (Li, Roos, & Miao, 2016).

El fenómeno de la mutarrotación, es muy importante para la valoración polarimétrica de la lactosa en los productos donde este azúcar se halla cristalizado. Cuando se disuelve lactosa ordinaria en agua, se observan algunas particularidades en el poder rotatorio y en la solubilidad. A temperatura ambiente, la rotación específica baja lentamente en medio neutro. La transformación es mucho más rápida cuando el pH es superior a 9,0. La rotación final, ($+55^\circ\text{C}$) es la del equilibrio $\alpha \rightleftharpoons \beta$ a 15°C ; se encuentra en solución una parte α y 1,63 partes de β -lactosa (Alais, 1985).

La lactosa es unas 10 veces menos soluble que la sacarosa. La capacidad de disolución de la α -lactosa monohidratada aumenta con el tiempo debido a que el fenómeno de mutarrotación hace que aparezca β -lactosa, que es 7 veces más soluble (LUQUET, 1991). La solubilidad de la lactosa aumenta fuertemente en caliente, por lo tanto cristaliza al enfriar sus soluciones concentradas. La presencia de alcohol reduce la solubilidad de la lactosa, precipitando primero la forma α (Alais, 1985).

La lactosa es apenas dulce (aproximadamente el 15% de la sacarosa), menos soluble que los monosacáridos y menos soluble que la mayoría de los azúcares (Illanes & Conejeros, 2016). En la leche, este dulzor está enmascarado por la caseína, el suero tiene un sabor dulce más acusado que el de la leche, aunque la proporción de lactosa sea del mismo orden. El débil sabor dulce de la lactosa se considera como una cualidad desde el punto de vista dietético (Alais, 1985).

2.2.2 PROPIEDADES QUÍMICAS

2.2.2.1 PROPIEDADES REDUCTORAS

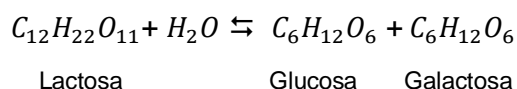
La lactosa es un azúcar reductor, por poseer un grupo aldehídico libre (Alais, 1985). Esta capacidad se puede utilizar en análisis para dosificar lactosa en solución por reducción de iones cúpricos en medio básico (reactivo de FEHLING según la técnica de BERTRAND) (Luquet, 1991). El poder reductor de la lactosa es considerablemente más débil que el de la glucosa. Si se hidroliza la lactosa por un ácido el poder reductor aumenta considerablemente.

El método anterior fue sustituido por la determinación colorimétrica, que a su vez, ha sido sustituida por la cromatografía en fase gaseosa y más reciente por la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Alais, 1985).

2.2.2.2 HIDRÓLISIS QUÍMICA

La hidrólisis puede llevarse a cabo por vía química o por vía enzimática (LUQUET, 1991).

La hidrólisis química de la lactosa es bastante difícil ya que el azúcar presenta una cierta estabilidad frente a los agentes químicos, por lo que es necesaria la utilización de ácidos calientes.



Por su función aldehídica, los azúcares reaccionan con diversas sustancias nitrogenadas: amoníaco, aminas, aminoácidos, etc. Esta reacción se puede apreciar en la leche con la lactosa. No se trata de una reacción simple, sino de un conjunto de reacciones complejas, que se agrupan bajo el nombre genérico de reacciones de Maillard y conducen finalmente a la formación de compuestos condensados reductores que son pigmentos oscuros (melanoidinas) (Alais, 1985).

Los productos lácteos son muy sensibles a la reacción de Maillard, debido a su alto contenido en azúcares reductores y proteínas ricas en lisina. Particularmente, la leche hidrolizada con lactosa es muy propensa al deterioro de proteínas, ya que la lactosa se sustituye parcialmente por glucosa y galactosa, que reaccionan con lisina a una velocidad mayor que el disacárido.

La reacción de Maillard está influenciada por muchos factores, como la temperatura, el tiempo, el pH inicial, la actividad, el estado físico de la matriz, la concentración de reactivo y el tipo de carbohidrato involucrado (Naranjo, Gonzales, Leiva, & Malec, 2013).

Esta es una de las causas del oscurecimiento de los alimentos, que se acompaña frecuentemente de una disminución del valor nutritivo de las proteínas. Las reacciones de Maillard son catalizadas por los metales y los fosfatos. La elevación de la temperatura las acelera considerablemente, lo mismo que la humedad en el caso de productos deshidratados. Se manifiestan por un descenso del pH, liberación de gas carbónico, producción de compuestos reductores, producción de compuestos fluorescentes con una fuerte absorción en el ultravioleta, disminución de la solubilidad de proteínas, coloración oscura y sabor a caramelo.

Por otro lado, la lactosa puede adsorber sustancias de bajo peso molecular, con enlaces de tipo Van der Waals y enlaces de hidrógeno, que implican dos posiciones especiales sobre la molécula de lactosa. Esto aclara el notable poder de la lactosa para fijar aromas (Alais, 1985).

Como todos los glúcidos, la lactosa se descompone por la acción del calor, dando lugar a productos caramelizados (Luquet, 1991). La descomposición de la lactosa en el curso del calentamiento de la leche, conduce a la formación de productos ácidos. Los ácidos formados durante el calentamiento tienen la propiedad de activar el crecimiento de las bacterias lácticas y además, algunos de los productos de descomposición son solubles en éter, y pueden ser causa de error en la determinación de las materias grasas (Alais, 1985).

2.2.3 TRANSFORMACIONES BIOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS

2.2.3.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática de la lactosa tiene lugar bajo la acción de una lactasa de origen animal o microbiano. (Luquet, 1991)

La lactosa no entra directamente en los ciclos biológicos del metabolismo, sino tras el catabolismo o anabolismo. Son la glucosa y galactosa, las que entran en los ciclos tras su fosforilación. Por lo tanto, la lactosa es utilizada por los organismos superiores o por los microorganismos, solamente cuando produzcan lactasa, que es la oxidasa específica que rompe el enlace β (1-4) de la lactosa (Alais, 1985).

Otra enzima cataliza esta hidrólisis, la β -6-P-galactosidasa; que actúa cuando la lactosa es previamente fosforilada sobre el carbono 6 de la galactosa; es la única presente en la mayor parte de los estreptococos lácticos.

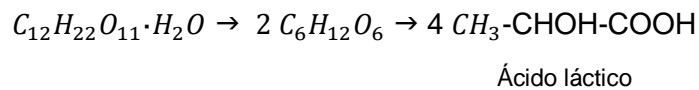
Algunas levaduras producen lactasa. Las levaduras alcohólicas habituales no fermentan la lactosa. Dentro del grupo de las bacterias lácticas, se encuentran microorganismos como *Lactobacillus delbruckii*, productores de cantidades elevadas de ácido láctico, que no pueden desarrollarse en la leche o en medios lactosados. La hidrólisis enzimática de la lactosa ha pasado a ser una operación industrial cuya importancia va en aumento. En el momento actual se utilizan dos tipos de enzimas: lactasas de levaduras: (*Kluyveromyces fragilis* o *Saccharomyces lactis*) y lactasas fúngicas (*Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, etc).

Aunque estas enzimas catalizan la misma reacción; presentan unas propiedades muy diferentes. Las lactasas de levadura actúan en medio neutro y a temperaturas medias, inactivándose rápidamente por encima de los 40°C. Las lactasas fúngicas actúan en medio ácido y a temperatura elevada, son relativamente termoestables, se pueden encontrar en este grupo enzimas que son capaces de hidrolizar la lactosa en condiciones cercanas a la pasterización. Todas estas lactasas son inhibidas por los metales pesados (Alais, 1985).

2.2.3.2 TRANSFORMACIÓN EN ÁCIDO LÁCTICO Y FERMENTACIONES SECUNDARIAS

La lactosa es el único azúcar fermentable presente en cantidades importantes en la leche. Las bacterias lácticas son especialmente aptas para producir ácido láctico a partir de lactosa (Luquet, 1991). Los productos de fermentación de la lactosa pueden observarse en la figura 4.

La fermentación láctica es la más importante. Numerosas bacterias realizan la siguiente transformación:



Esta transformación es muy compleja. A partir de la glucosa, hasta ácido láctico, hay diez etapas y hasta la novena, la vía es común a diferentes fermentaciones, siendo el intermediario común final el ácido pirúvico (Alais, 1985).

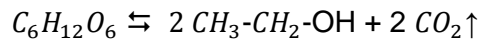
El ácido láctico formado puede ser dextrógiro o levógiro, dependiendo de los microorganismos (Luquet, 1991).

La acidificación espontánea es el hecho más comúnmente observado en la leche cruda conservada a temperatura ambiente. La leche acidificada tiene un sabor y un olor distintos al del ácido láctico puro. Al formarse pequeñas cantidades de productos secundarios junto al producto principal de la fermentación, algunos presentan un olor fuerte (CO₂, ácido butírico, acetilmetil-carbinol) (Alais, 1985).

La fermentación de lactosa a ácido láctico para alimentación o aplicaciones industriales es técnicamente factible pero no es competitiva económicamente con la producción por fermentación de otros azúcares o con la síntesis química (Fuquay, 2011).

2.2.3.3 TRANSFORMACIÓN EN ALCOHOL

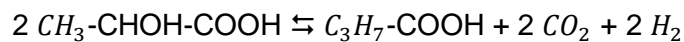
La transformación alcohólica es menos frecuente que la anterior. Las levaduras producen una carboxilasa que transforma el ácido pirúvico en acetaldehído, que se reduce a etanol por medio de la alcohol-deshidrogenasa, produciéndose ácido carbónico según la siguiente reacción:



Se produce accidentalmente en las industrias lácteas y constituye un peligro sobre todo por la formación de gas durante el desuerado de los quesos.

2.2.3.4 TRANSFORMACIÓN EN ÁCIDO BUTÍRICO

Se produce a partir de la lactosa o del ácido láctico con formación de gas en medio neutro o poco ácido:



Aparece en la leche o en el suero fuertemente contaminado por *Clostridia* o fermentos butíricos. En los quesos de pasta cocida, puede ser causa de graves accidentes (hinchamiento), como consecuencia de la producción de gas, sobre todo hidrógeno, que es poco soluble en agua (Alais, 1985).

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

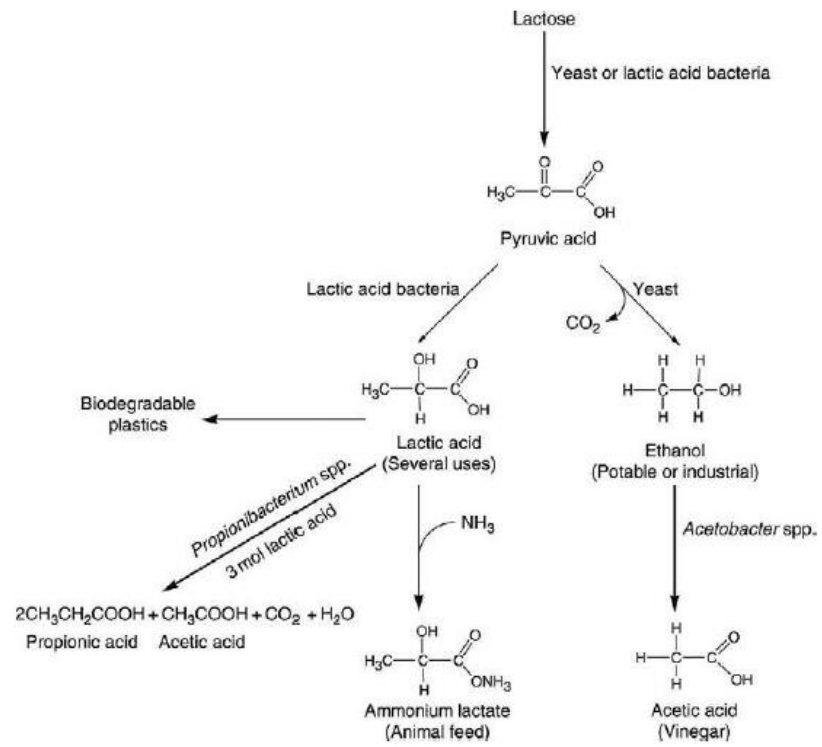


Figura 4. Productos de fermentación de lactosa (Fuquay, 2011).

2.3 LA LACTOSA EN LOS PRODUCTOS LÁCTEOS INDUSTRIALES

Aunque algunos productos lácteos como la mantequilla, el queso o las leches fermentadas se producen desde el año 3000 antes de Cristo, el proceso de producción de leche no fue industrializado hasta mediados del siglo XIX. En el rápido aumento del consumo de los mismos influyeron varios factores, como la industrialización, pero el elemento clave fue el desarrollo de la centrífuga-separadora por Gustav de Laval en 1878 para la eliminación continua de la grasa.

Gradualmente, la fabricación de productos lácteos diarios se industrializó y se desarrollaron nuevos productos. Hoy en día, la producción láctea está muy bien organizada y opera en una escala internacional donde la leche se procesa en las industrias de manera totalmente mecanizada (Fuquay, 2011).

La importancia de la leche fermentada en la nutrición humana está bien documentada y los beneficios de los productos fermentados han sido conocidos por los seres humanos desde las civilizaciones antiguas. Sin embargo, la comunidad científica dio impulso a estas creencias en 1910, cuando Élie Metchnikoff sugirió que los seres humanos deben consumir leche fermentada con lactobacilos para prolongar la vida. Postuló la presencia de bacterias deseables en la leche que podrían ayudar a suprimir las bacterias indeseables y causantes de enfermedades en el intestino de los seres humanos. Esta observación condujo a explorar los potenciales de cultivos lácticos y productos cultivados en el alivio de los trastornos humanos y animales. Recientemente se ha dado importancia a la producción de leche fermentada con atributos de salud mejorados, particularmente las propiedades terapéuticas de estos productos.

Históricamente, el proceso de fermentación implicaba una acidez impredecible y lenta de la leche causada por los organismos inherentemente presentes en la misma. Sin embargo, los procesos microbiológicos modernos han dado como resultado la producción de diferentes productos lácteos fermentados de mayor valor nutricional bajo condiciones controladas. Estos productos representan un componente importante de los alimentos funcionales, y se están realizando intensos esfuerzos de investigación para desarrollar productos lácteos en los que se incorporan los organismos probióticos para hacerlos más valiosos (Larroche, 2016).

2.3.1 TIPOS DE PRODUCTOS LÁCTEOS INDUSTRIALES

2.3.1.1 LECHE

Es necesario controlar el comportamiento de la lactosa en los ingredientes lácteos en polvo para asegurar las propiedades de manejo del polvo deseadas y la estabilidad del polvo (Huppertz & Gazi, 2016). Los productos lácteos secados por pulverización comercialmente disponibles contienen normalmente 10-15% de lactosa amorfa. Para evitar este problema es necesario precristalizar la lactosa como monohidrato de α -lactosa, que no es higroscópica, antes del secado por pulverización. Esto asegura que una alta proporción (75% o más) de la lactosa en el producto secado por pulverización está en forma de α -lactosa monohidratada, haciéndola más estable a la humedad (Goulart & Hartel, 2017).

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

La pegajosidad y la aglomeración son otros problemas específicos de la manipulación de polvos lácteos que pueden verse afectados por la lactosa. La adherencia se puede observar durante el secado y se manifiesta como partículas de polvo que se pegan al secador o al lecho fluido. El aglomerado es típicamente precedido por la pegajosidad y puede ocurrir durante el almacenamiento manifestándose con la formación de grumos. Tanto la pegajosidad como el aglomerado de polvos están fuertemente relacionados con la composición de los mismos, aumentando la propensión a la pegajosidad y la aglomeración un alto contenido de carbohidratos con bajo peso molecular. Esto está relacionado con la transición vítrea de la lactosa (Huppertz & Gazi, 2016).

Se han estudiado los efectos de la adición de lactasa después del tratamiento térmico comparando el perfil químico de la leche baja en lactosa con la leche UHT convencional durante nueve meses de almacenamiento. Los resultados mostraron que la leche baja en lactosa se caracterizó por una mayor concentración de aminoácidos libres y furosina, mayores tasas de reacción para la formación de volátiles y condiciones más favorables para la reacción de Maillard que la leche UHT convencional debido a las actividades secundarias enzimáticas de las lactasas comerciales (Troise *et al.*, 2016). En las tablas 3-6 se muestran las concentraciones de lactosa presentes en distintos tipos de leches.

Leches de fluidos	% lactosa	
	Intervalo (%)	Promedio (%)
Leche entera	3,7-5,1	4,8
Leche baja en grasa (2%)	3,7-5,3	4,9
Leche baja en grasa (1%)	4,8-5,5	5,0
Leche descremada	4,3-5,7	5,2
Crema ligera	3,7-4,0	3,9
Crema de leche	2,8-3,0	2,9
Leche con lactosa reducida 70%		1,6
Leche con lactosa reducida 80%		1,1
Leche con lactosa reducida 100%	0,0-0,5	
Chocolate con leche	4,1-4,9	5,0

Tabla 3. Contenido en lactosa de diferentes tipos de leches de fluidos (Murray, 1988; FAO, 1963).

Leches concentradas	% lactosa	
	Intervalo (%)	Promedio (%)
Leche condensada	11,4-16,3	12,9
Leche evaporada	9,7-11	10,3

Tabla 4. Contenido en lactosa de diferentes tipos de leches concentradas (Murray, 1988; FAO, 1963).

Leches congeladas	% lactosa	
	Intervalo (%)	Promedio (%)
Helados	3,1-8,4	
Hielos de leche		7,6
Sorbetes	0,6-2,1	

Tabla 5. Contenido en lactosa de diferentes tipos de leches congeladas (Murray, 1988; FAO, 1963).

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

Leches en polvo	% lactosa	
	Intervalo (%)	Promedio (%)
Leche en polvo sin grasa	49,0-52,3	51,3
Leche instantánea en polvo sin grasa	49,5-54,0	
Leche entera en polvo	36,0-38,5	37,5

Tabla 6. Contenido en lactosa de diferentes tipos de leches secas (Murray, 1988; FAO, 1963).

2.3.1.2 YOGUR

En la fabricación de yogur, el pH disminuye por la fermentación con bacterias de ácido láctico (LAB) que convierten la lactosa en ácido láctico. La proteólisis de las proteínas de la leche durante la fermentación genera péptidos y aminoácidos que contribuyen a la formación de compuestos aromáticos. Los metabolitos típicos del sabor del yogur natural son generados por cultivos iniciadores. El sabor del yogur consiste principalmente en ácido láctico, acetaldehído y diacetilo (Sert, Mercan & Dertli, 2017).

En la tabla 7 se muestra el contenido de lactosa de distintos productos lácteos procesados.

Productos Lácteos procesados	% lactosa	
	Intervalo (%)	Promedio (%)
Crema agria	3,0-4,3	3,9
Suero de la leche	3,6-5,0	4,3
Yogur, bajo en grasa comercial	1,9-6,0	
Yogur, leche entera comercial	4,01-4,07	
Dulce de leche Acidophilus		4,4
Kéfir, parcialmente descremado comercial		4,0

Tabla 7. Contenido en lactosa de diferentes productos lácteos cultivados (Murray, 1988; FAO, 1963).

2.3.1.3 QUESOS

En los quesos, el contenido en lactosa puede reducirse por fermentación con ácido láctico y por hidrólisis enzimática por lactasa (Harju, Kallioinen, & Tossavainen 2012). El proceso enzimático conduce a la reducción de lactosa a través de su hidrólisis a glucosa y galactosa, aumentando así el dulzor del producto. La fermentación microbiana del ácido láctico determina la reducción no sólo de lactosa, sino también de glucosa y galactosa, que son metabolizadas por la microflora. Como resultado, los productos fermentados largos, como el queso duro madurado, contienen cantidades muy bajas de todos los azúcares (Negri, 2017).

La fermentación excesiva de lactosa residual durante la maduración (después del final de la etapa de fabricación) aumenta el riesgo de producir un queso ácido. La concentración de sal puede modificar el grado de fermentación de la lactosa residual al modificar la actividad de las enzimas. Los quesos con valores de $\text{pH} < 5,0$ se describen como quebradizos y a menudo carecen de un perfil de sabor típico de queso (Lee et al., 2005). Durante la elaboración de quesos, existen dos enfoques comúnmente utilizados para controlar la acidez tratando de modificar la cantidad de lactosa en las partículas de cuajada mediante lavado o dilución del suero. Diversos estudios han modificado el contenido en lactosa del queso añadiendo lactosa en polvo a la leche o suero de leche, o lavando la cuajada (Moynihan *et al.*, 2016).

El lavado de la cuajada implica la adición de agua después del drenaje del suero. Es ampliamente utilizado en variedades de queso como Muenster y Colby. Se hace generalmente cuando se ha alcanzado el pH deseado final. Existen múltiples parámetros que pueden afectar el grado de eliminación de la lactosa de las partículas de cuajada, incluyendo el tamaño de partícula, el método de lavado, la temperatura del agua y de la cuajada, la composición y estructura de las partículas de cuajada y el grado de agitación.

Otro método común utilizado para modificar el contenido de lactosa durante la elaboración de quesos es la dilución del suero. Este método se utiliza en el queso Gouda e implica la eliminación de una parte del suero (20-40%) reemplazándolo con agua tibia (35°C) (Moynihan *et al.*, 2016).

En la tabla 8 se indica el contenido en lactosa de diferentes tipos de quesos.

Quesos	% lactosa	
	Intervalo (%)	Promedio (%)
Provolone	0,0-2,1	
Roquefort		2
Brie	0,0-2,0	
Queso crema	0,4-2,9	
Gouda	0,0-2,2	
Feta		4,1

Tabla 8. Contenido en lactosa de diferentes tipos de quesos (McAllen, 1987; FAO, 1963).

2.3.1.4 MANTEQUILLAS

En la elaboración de mantequilla juegan un papel importante los cultivos de diversas bacterias acidolácticas en la etapa de acidificación de la nata. Estas bacterias fermentan la lactosa formando ácido láctico y sustancias aromáticas (acetoína y diacetilo). Su capacidad de fermentación debe ser intensa para que la leche se acidifique a lo sumo en 16 horas a 20°C (Spreer, 1975).

En la tabla 9 se indica el contenido en lactosa de las grasas de la leche.

Grasas de leche	% lactosa	
	Intervalo (%)	Promedio (%)
Mantequillas	0,8-1,0	
Margarinas	0,0-1,0	

Tabla 9. Contenido de lactosa de grasas de leche (Murray, 1988; FAO, 1963).

2.3.1.5 CONTENIDO EN LACTOSA EN OTROS PRODUCTOS LÁCTEOS

En la tabla 10 se indica el contenido en lactosa de distintos sueros.

Sueros	% lactosa	
	Intervalo (%)	Promedio (%)
Suero en polvo (dulce)	63-75	
Suero en polvo (agrio)	61-70	
Suero de lactosa reducida en polvo	52-58	
Suero de minerales reducido en polvo	70-80	
Concentrado de proteína de suero de leche en polvo	10-55	
Proteína de suero en polvo		0,5
Suero tipo Cheddar líquido	4,5-5,1	
Suero de tipo Cottage líquido	4,5-4,9	

Tabla 10. Contenido en lactosa de diferentes sueros (ADPI, 1992; FAO, 1963).

2.3.2 DESLACTOSADO INDUSTRIAL

2.3.2.1 ANTECEDENTES

El elevado contenido en agua de la leche (alrededor de un 87%) así como la naturaleza de sus nutrientes y sus propiedades físico-químicas (pH especialmente) hace que sea un producto fácilmente degradable biológicamente. Las bacterias pueden contaminar la leche durante el ordeño y ésta puede estropearse rápidamente. En la antigüedad se producía mantequilla para solucionar este problema. Al producir mantequilla, 100 kg de leche se convierten en 5 kg de mantequilla y aproximadamente el 99% de agua se elimina, y a su vez, el 99% de lactosa.

En la India, ghee, una versión tradicional de aceite de mantequilla, eliminaba incluso el 1% restante de lactosa y de agua.

Otro modo tradicional de preservar la leche es la producción de queso. Este proceso convierte 100 kg de leche en 10 kg de queso. Cuando la leche cuaja, alrededor del 90% del agua es eliminada en forma de suero, junto con el 90% de la lactosa. La lactosa residual en el queso es fermentada a ácido láctico y por tanto, los quesos maduros están prácticamente libres de lactosa. El contenido en lactosa también puede reducirse en otros productos lácteos líquidos mediante fermentación láctica. En el kéfir y el yogur aproximadamente el 30% de lactosa es convertida (Harju, Kallioinen & Tossavainen, 2012).

2.3.2.2 MÉTODOS DE DESLACTOSADO INDUSTRIAL

Para eliminar lactosa (o incluso galactosa) de productos lácteos pueden utilizarse métodos como procesos de hidrólisis o técnicas de separación específicas (Batista et al., 2017).

Las enzimas se han utilizado como catalizadores industriales durante más de un siglo. Las aplicaciones a la industria alimentaria son muchas y significativas; entre ellas, un importante uso de β -galactosidasas es la reducción de la lactosa en la leche y los productos lácteos. La hidrólisis de la lactosa a sus componentes monosacáridos produce varios efectos que han sido apreciados en gran medida por los productores de alimentos: modificación del sabor, mayor solubilidad, dulzura y palatabilidad y reducción de intolerancia. El consumo de productos lácteos bajos en lactosa es ahora muy apreciado para obtener los beneficios nutricionales de la leche sin sus aparentes contraindicaciones. De esta manera, la hidrólisis de lactosa expandió considerablemente su campo de aplicación permitiendo la incorporación de lactosa hidrolizada (de leche o de suero de leche) a una gran variedad de productos lácteos. La leche hidrolizada es valiosa no sólo como un producto para intolerantes sino también para evitar la cristalización de lactosa en productos lácteos concentrados y congelados. Más allá de los beneficios ya señalados para su uso en los alimentos, los hidrolizados de lactosa pueden utilizarse como materia prima para la fermentación con una amplia variedad de microorganismos ya que sólo unos pocos pueden metabolizar la lactosa, pero la mayoría de ellos pueden metabolizar los monosacáridos resultantes. Sin embargo, los productos lácteos sin lactosa, en los que la lactosa se hidroliza enzimáticamente a glucosa y galactosa y de la que la galactosa no se elimina posteriormente, no son adecuados para pacientes con galactosemia. Por esta razón, considerando que los productos lácteos son ampliamente consumidos y presentan un alto valor nutricional, se ha pensado en alternativas tecnológicas para la eliminación de la lactosa por metodologías de separación (Batista et al., 2017).

La reducción del contenido de lactosa en la leche y el suero se puede lograr por fraccionamiento de membrana, cromatografía o hidrólisis enzimática, o combinaciones de los mismos (Illanes & Conejeros, 2016).

❖ HIDRÓLISIS DE LACTOSA

➤ CON ENZIMAS SOLUBLES

El proceso de hidrólisis de lactosa es simple y no requiere de equipos especiales en las plantas lecheras. Al utilizar enzimas de un solo uso para la hidrólisis de lactosa se debe tener en cuenta la concentración de sustrato, el pH de la operación, la temperatura, el tiempo de contacto, la actividad de la enzima y el coste. Un tiempo de contacto largo puede reducir costes pero en la leche suele dar lugar a un crecimiento microbiano (Harju et al., 2012). Alternativamente, se suelen utilizar temperaturas de refrigeración para la hidrólisis enzimática puesto que, aunque es un proceso más lento, es más seguro biológicamente (Zadow, 1992). Algunos autores han recomendado la hidrólisis de lactosa después del tratamiento térmico, para evitar reacciones de Maillard. También sugieren limitar el grado de hidrólisis entre 80-90% con el fin de evitar un excesivo dulzor, ya que la hidrólisis de lactosa aumenta el dulzor del producto, que en muchos productos ofrece la oportunidad de reducir el nivel de azúcar añadido (Harju et al., 2012).

La hidrólisis del 70% de lactosa en la leche aumenta el dulzor en una cantidad correspondiente a una adición de aproximadamente el 2% de sacarosa (Zadow, 1992). En los productos tratados térmicamente los azúcares reductores causan reacciones de Maillard más intensas (Harju et al., 2012).

➤ PROCESOS ALTERNATIVOS

1. HIDRÓLISIS ÁCIDA

La lactosa es resistente a la hidrólisis ácida en comparación a otros disacáridos como la sacarosa (Wong, 1988). El uso de ácido en la hidrólisis de lactosa es viable sólo para proteínas libres como el permeado de ultrafiltración (UF) de leche o suero. El ajuste del pH puede realizarse por adición directa de ácido o por tratamiento del permeado con una resina de intercambio iónico. Típicamente el pH se ajusta a 1,2 y la temperatura a 150°C durante un período corto de tiempo. El producto hidrolizado es marrón y requiere neutralización, desmineralización y decoloración antes de su uso. La corrosión es el desafío más importante en el diseño de este proceso. Por esta razón, no se ha adoptado comercialmente de manera significativa (Zadow, 1992). Se han desarrollado varios procesos basados en resinas de intercambio iónico, trabajando a pH 1,2 y temperaturas de 90-98°C. El color marrón de la mezcla es el mayor problema y la eliminación de este color incrementa los costes de procesos. Industrialmente este proceso se utiliza con soluciones de lactosa pura (Harju et al., 2012).

2. REACTORES DE MEMBRANA

En el pasado se desarrollaron procesos donde la enzima se recuperaba por ultrafiltración de la mezcla de la reacción después de la hidrólisis (Wong, 1988). Sin embargo la complejidad del proceso no lo hizo comercialmente atractivo (Zadow, 1992). El principal problema fue el crecimiento microbiano durante el proceso a temperatura ambiente o ligeramente superior. Además la disminución del precio de las lactasas comerciales hizo que los reactores enzimáticos no encontrasen uso a escala comercial. El uso de enzimas solubles es económicamente más factible que la inversión en procesos complejos de reactores (Harju et al., 2012).

3. SISTEMAS INMOVILIZADOS

La inmovilización de enzimas sobre un soporte poroso implica la entrada de la enzima en los poros de los soportes seguida de su fijación sobre la pared porosa. Se ha demostrado que si la velocidad de difusión de la enzima es más lenta que la velocidad de inmovilización, las enzimas pueden inmovilizarse juntas formando una corona en la sección externa de los poros del soporte, y cuando ocurre lo contrario, la enzima puede difundir a lo largo de los poros observándose una distribución más homogénea en el poro (Fernandez-Lopez *et al.*, 2017).

Se trata del método elegido para la producción a gran escala (Wong, 1988). Los sistemas inmovilizados a menudo utilizan lactasa de origen fúngico. En la práctica la vida útil de un sistema inmovilizado puede ser de varios miles de horas, lo que reduce su coste en comparación con los sistemas de enzimas solubles. Sin embargo, si la leche con pH neutro se hidroliza, la estabilidad microbiana es más difícil de controlar. Queda pendiente también, controlar o predecir la continuada pérdida de lactasa inmovilizada que es preciso reponer, con las consiguientes reducciones de rendimiento de hidrólisis (Zadow, 1992).

❖ MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE LACTOSA

➤ CRISTALIZACIÓN

La cristalización de lactosa se utiliza para la producción comercial de lactosa. La alimentación que contiene lactosa se concentra hasta un contenido total de sólidos muy alto de manera que la lactosa se sobresatura y cristaliza. A continuación se separan los cristales de lactosa mediante centrifugación (Holsinger, 1997). Industrialmente la lactosa puede ser cristalizada a partir de suero o de permeado de ultrafiltración. La separación directa de la leche por cristalización no es factible debido a la alta viscosidad del concentrado de leche y al bajo rendimiento de la cristalización.

➤ CROMATOGRAFÍA

La separación cromatográfica está basada en las diferencias de las velocidades de flujo de los componentes del líquido a tratar cuando pasa a través de una columna de resina. La cromatografía industrial suele ser cromatografía de exclusión iónica y ocurre cuando la resina y el eluato están en equilibrio. La concentración de compuestos iónicos dentro de la resina es mucho menor que fuera, lo que aumenta el flujo de compuestos iónicos a lo largo de la columna.

La lactosa puede separarse de la leche y el suero mediante resinas de intercambio catiónico fuerte. La separación se basa en los diferentes efectos en los iones y el tamaño de exclusión de los minerales y las proteínas, y también de la habilidad de la lactosa para formar enlaces con las resinas. La formación de estos complejos permite el flujo de lactosa a través de la resina de la columna. No obstante esta metodología tiene poco valor desde el punto de vista industrial especialmente desde el momento que se

desarrollaron técnicas de separación con membranas y prácticamente queda relegada hoy a ser utilizada como método de análisis cuantitativo de lactosa.

➤ SEPARACIÓN POR MEMBRANAS

La ultrafiltración y la combinación de ultrafiltración y nanofiltración pueden usarse para la separación de lactosa del suero o de la leche y en general para cualquier producto lácteo líquido. Cuando se utiliza ultrafiltración para la separación de lactosa, otros componentes de menor tamaño que la lactosa se separan con el agua (atravesando los poros de la membrana) y el contenido de proteína aumenta en el retenido junto con la lactosa, por lo que se precisan otras técnicas para producir una solución de lactosa pura (Harju et al., 2012).

2.3.2.3. LECHE SIN LACTOSA MEDIANTE TÉCNICAS DE SEPARACIÓN

En el desarrollo de leche sin lactosa, se alcanzó una nueva fase cuando en 2001 Valio Ltd lanzó su producto, que tenía el sabor de una leche normal pero contenía menos del 0,01% de lactosa. La innovación estaba basada en un proceso de separación cromatográfica que permitía la separación específica de lactosa de la leche. La separación cromatográfica hace posible mantener los minerales de la leche con las proteínas a diferencia de las otras técnicas de separación. El método fue patentado para la separación de lactosa del suero y de la leche.

En la producción de leche sin lactosa, parte de la lactosa fue separada y el resto fue hidrolizada enzimáticamente, devolviendo a la leche su dulzor natural.

El método de producción se desarrolló más basándose en las técnicas de membrana, con un enfoque fácil de adaptar a las plantas lecheras. La leche fue ultrafiltrada y el permeado de ultrafiltración fue nanofiltrado. El permeado de nanofiltración fue concentrado por ósmosis inversa. El retenido de la ósmosis inversa fue devuelto al retenido de la ultrafiltración y se hidrolizó la lactosa residual con β -galactosidasa. La leche tenía el mismo sabor que la leche normal antes de la hidrólisis enzimática a pesar de la reducción parcial de la lactosa.

A partir de entonces se han desarrollado nuevos procesos para la producción de leche sin lactosa. Todos ellos combinaciones de filtración por membrana e hidrólisis enzimática (Harju et al., 2012)

2.4 DESCRIPCIÓN DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS DE LACTOSA

La concentración de lactosa es un marcador para la evaluación de la calidad de la leche y la detección de anomalías. Por ejemplo, la leche de vacas que padecen mastitis tiene bajos niveles de lactosa. Además, la lactosa es un parámetro básico para el control de aguas residuales y medicina veterinaria. La determinación de lactosa también es clínicamente relevante. Una cantidad excesiva de lactosa en la sangre indica malignidad gastrointestinal. Como la lactosa debe ser hidrolizada por lactasa para ser absorbida por el cuerpo, también es importante conocer la cantidad relativa de lactosa en la leche y en sus derivados para evitar intolerancias. Por lo tanto, la cuantificación de lactosa es un reto importante en muchas áreas de gran importancia económica (Onzuelo *et al.*, 2010).

No existe una definición legal de los términos "sin lactosa" o "lactosa reducida", ya sea en EE.UU. o en la legislación de la UE, excepto en lactantes y en las fórmulas en las que la lactosa debe ser menor de 10 mg / 100 kcal (Directiva de la Comisión, 2006). Algunos Estados miembros de la UE han fijado límites a nivel nacional para el uso de los términos "lactosa libre", "lactosa muy baja" y "lactosa baja" para los productos alimenticios distintos de los destinados a lactantes. Estos niveles umbral varían de 0,01 a 0,1 g / 100 g de producto final (EFSA, 2010).

Un gran número de métodos químicos, enzimáticos y cromatográficos se han utilizado para la determinación de lactosa (Zadow, 1992).

El empleo de los métodos clásicos como la reducción del licor de Fehling y la polarimetría, es muy limitado en la actualidad.

El método de referencia en la mayoría de los países es el método yodométrico con Cloramina T, sin embargo éste sólo puede aplicarse al análisis de leche cruda. Además, la validez de este método ha sido ampliamente cuestionada incluso para leche cruda (Cimiano, 1991). Debido a esto, en los últimos años ha aumentado el desarrollo de biosensores y kits enzimáticos comerciales para la determinación de lactosa (Monti *et al.*, 2017).

Los métodos enzimáticos presentan también la limitación de no poderse emplear en el análisis de leche y productos lácteos que hayan sufrido un tratamiento térmico elevado, ya que alguna parte de lactosa puede convertirse en lactulosa o se puede ligar a proteínas como consecuencia de reacciones de Maillard (Cimiano, 1991).

2.4.1 MÉTODOS QUÍMICOS

Los principales métodos químicos para el análisis de lactosa son la reducción de cobre (Munson-Walker), ácido pícrico, ácido fenol-sulfúrico, ferricianuro y el método de la Cloramina T. Los principios de estos métodos se muestran en la tabla 11.

Método	Principio
Munson-Walker	Reducción de la sal cúprica al óxido cuproso y determinación gravimétrica. Requiere eliminación de grasa/proteína.
Ácido pícrico	Eliminación de las dos proteínas y conversión del ácido pícrico (amarillo) a ácido picrámico (rojo caoba).
Ácido fenol-sulfúrico	Hidrólisis de lactosa y formación de hexosas. La leche puede diluirse mucho, eliminando la necesidad de eliminar grasa/proteína. Medida de oligosacáridos.
Cloramina T	KIO (formado por la reacción de Cloramina T y KI) reacciona con lactosa para formar iodo libre que es titulado con tiosulfato sódico.
Ferricianuro	Determinación colorimétrica en el cambio de absorbancia cuando el ferricianuro (amarillo) se convierte en ferrocianuro (incoloro). Se utiliza citrato sódico para mantener la proteína en solución.

Tabla 11. Métodos químicos para el análisis de lactosa (Zadow, 1992).

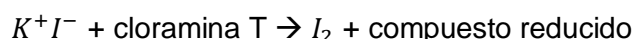
2.4.1.1 MÉTODO OFICIAL CON CLORAMINA T

Mediante este método se determina indirectamente el contenido en lactosa monohidratada, una vez desproteinizada la leche, por valoración de la cantidad de halógeno producido al final de la reacción entre lactosa y el yoduro potásico-cloramina T (Cimiano, 1991).

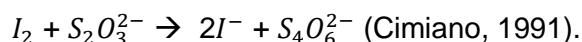
Este método puede utilizarse para productos fluidos y leche seca no grasa reconstituida a aproximadamente el 8% de sólidos (Zadow, 1992).

Después de la desproteinización de la muestra con ácido túngstico, se agrega a una cantidad de filtrado una solución de cloramina T y una solución de KI. La cantidad de cloramina T que no reacciona se valora a través de una titulación del yodo liberado, con una solución de tiosulfato sódico. La diferencia entre la cantidad de cloramina T en el blanco y la cantidad que queda en la muestra analizada es equivalente a la cantidad de lactosa en la muestra.

Reacción entre el exceso de cloramina T y el KI:



Valoración del I_2 liberado:



2.4.2 MÉTODOS FÍSICOS

Los métodos físicos incluyen procedimientos polarimétricos, crioscópicos y espectroscopía infrarroja (Zadow, 1992).

2.4.2.1 MÉTODOS POLARIMÉTRICOS

Los métodos polarimétricos parten de la separación por precipitación de la grasa y las proteínas para eliminar posibles interferencias. A continuación, se determina con el polarímetro el poder rotatorio de la solución de lactosa resultante y se calcula el contenido en lactosa hidratada de la leche mediante las siguientes expresiones:

Para leche entera: gramos de lactosa hidratada en 100 ml de leche = α 1,1929

Para leche desnatada: gramos lactosa hidratada en 100 ml de leche desnatada = α 1,2309 (Cimiano, 1991).

2.4.2.2 MÉTODOS CRIOSCÓPICOS

Los métodos crioscópicos se proponen para análisis de rutina de leches fluidas y sueros. No son recomendables para productos secos reconstituidos. Zarb y Hourigan (1979) propusieron un método basado en la adición de lactasa en un *buffer* midiendo la diferencia en el punto de congelación de la mezcla después del mezclado y la incubación a 37°C durante una hora. La diferencia en el punto de congelación fue proporcional a la concentración de lactosa. Este método no requiere la eliminación de proteínas antes de la determinación.

2.4.2.3. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Los métodos espectroscópicos no se consideran tan precisos como la cromatografía líquida de alta eficacia o los métodos enzimáticos. Robert et al.(1987) investigaron el uso del infrarrojo cercano para el análisis de lactosa. Asignando una longitud de onda de 2094nm a la lactosa y encontraron que se podía medir sin interferencias de proteínas o lípidos. El análisis sí resultó afectado por la absorción de agua y el método no se considera útil para análisis de rutina (Zadow, 1992).

2.4.3 MÉTODOS ENZIMÁTICOS

Los métodos enzimáticos proporcionan una especificidad que no es posible con los métodos químicos. Tienen una especial importancia en la determinación de niveles muy bajos de lactosa. Marsili et al. (1981) usaron el método enzimático Trinder para

determinar lactosa en leche humana. Este método utilizaba β -galactosidasa para romper el enlace entre la glucosa y la galactosa (Zadow, 1992).

Se exponen a continuación dos métodos enzimáticos para la determinación de lactosa en leche y productos lácteos, que puedan contener otros azúcares y que no hayan sufrido un tratamiento térmico intenso. Se trata de dos métodos complementarios, uno de ellos emplea la glucosa obtenida tras la hidrólisis de la lactosa y el otro emplea la galactosa obtenida en dicha hidrólisis. La elección del método dependerá de la cantidad de glucosa o galactosa que tenga el producto a analizar. En el caso de que éste tenga un elevado contenido en lactosa, el método de la glucosa puede dar resultados menos precisos, siendo recomendable utilizar el método donde reacciona la galactosa; mientras si en las muestras hay un contenido en galactosa muy elevado, el método donde reacciona la glucosa sería el aconsejado. Si las cantidades de glucosa y galactosa en la muestra son elevadas, la precisión del método se reducirá independientemente de que se utilice glucosa o galactosa.

En los dos métodos se trata un extracto purificado de la muestra por medio de las enzimas y sustancias bioquímicas que se exponen en la tabla 12.

	Método enzimático por la vía glucosa	Método enzimático por la vía galactosa
Enzimas y sustancias bioquímicas añadidas simultáneamente y que actúan de manera sucesiva	β -galactosidasa	β -galactosidasa
	Hexoquinasa y adenosín trifosfato (ATP)	β -galactosa deshidrogenasa en presencia de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD^+)
	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa Nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato	
Determinación NADPH	340 nm	340 nm

Tabla 12. Enzimas y sustancias bioquímicas utilizadas en los métodos enzimáticos vía glucosa y galactosa.

En ambos casos el contenido en lactosa es proporcional al contenido en NADH, teniendo en cuenta la corrección pertinente a la glucosa presente al comienzo del análisis (Cimiano, 1991).

Se utilizan también biosensores basados en enzimas que combinan la alta especificidad de las enzimas con la versatilidad del transductor.

En la última década se han desarrollado varios tipos de biosensores enzimáticos para la determinación de lactosa. La primera generación de biosensores de lactosa se basa en la detección del peróxido de hidrógeno formado mediante el uso de β -galactosidasa en combinación con la glucosa oxidasa. En la segunda generación los mediadores redox se unen al electrodo con el fin de mejorar la transferencia de electrones entre el sitio activo de la enzima y el electrodo, pueden ser β -galactosidasa, glucosa oxidasa y peroxidasa de rábano silvestre. Los biosensores de tercera generación se basan en una transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo, permitiendo un diseño más simple del biosensor y reduciendo el número de componentes. Estos biosensores tienen la ventaja de reducir los costes de construcción y aumentar la seguridad y estabilidad debido a que se eliminan los mediadores potencialmente tóxicos (Tasca *et al.*, 2013).

2.4.4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Tanto la cromatografía de gas (GC) como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se han utilizado para la determinación de lactosa en productos lácteos.

La cromatografía tiene una importancia particular en la detección y medida de azúcares específicos presentes en una mezcla. Antiguamente se utilizaba cromatografía de capa fina, pero no daban una estimación cuantitativa adecuada de la lactosa presente en la leche.

Los fundamentos básicos del funcionamiento de las técnicas cromatográficas se pueden encontrar en numerosos artículos y textos clásicos (Díez, 2015), (Fowlis, 1998).

2.4.4.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

La cromatografía de gases proporciona información cuantitativa y cualitativa en lo que se refiere a análisis de carbohidratos. La mayoría de los procedimientos requieren la formación de derivados de trimetilsililo o acetatos de alditol. Reineccius et al. (1970) identificaron y cuantificaron carbohidratos libres neutros en la leche por cromatografía de gases y espectroscopía de masas. Debido a la necesidad de preparar derivados, la cromatografía de gases no se utiliza para el análisis de lactosa y ha sido reemplazada por la cromatografía líquida de alta resolución (Zadow, 1992)

2.4.4.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es la técnica más utilizada para el análisis de compuestos individuales.

Ofrece ventajas sobre el resto de métodos como especificidad, velocidad, precisión y pequeño tamaño de muestra. Es de especial importancia cuando existen otros azúcares en la mezcla que pueden interferir con el método.

El enfoque tradicional para el análisis y la detección de azúcares en la leche es la cromatografía líquida de alta resolución acoplada con un detector de índice de refracción porque no precisa fluoróforo ni cromóforo. Sin embargo este detector tiene ciertas desventajas como que no es muy específico ni sensible a los cambios de temperatura, presión y composición de disolventes, además no permite gradientes (Negri, 2017).

Los procedimientos publicados de cromatografía líquida de alta definición para el análisis de productos lácteos se centran en la cuantificación, la selección de la columna y los medios por los que los carbohidratos se separan de la proteína y la grasa.

Los agentes desproteinizantes que se incluyen son acetonitrilo, ácido tricloroacético, alcohol, metil-alcohol y ácido perclórico (Zadow, 1992).

3. METODOLOGÍA

3.1 BIOMILK: FUNDAMENTOS Y METODOLOGÍA

3.1.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DEL BIOMILK

Para la determinación de lactosa en productos lácteos parcialmente deslactosados se ha utilizado un equipo denominado BIOMILK. BIOMILK (figura 5) contiene un biosensor, un dispositivo analítico compacto que combina un componente biológico con un transductor físico-químico para la detección de analitos de interés. Combina la alta especificidad y selectividad de enzimas específicas para cada analito con una transducción amperométrica de dicha señal biológica, fácilmente detectable y cuantificable.

La base de su tecnología radica en el desarrollo del Biotest, el electrodo de trabajo, que lleva inmovilizado un enzima junto con otros componentes electroactivos, los cuales producen un cambio de corriente eléctrica al entrar en contacto con el analito a detectar, en este caso la lactosa.



Figura 5. Dispositivo BIOMILK.

El procedimiento de medida de BIOMILK es laborioso y consta de dos fases: en la primera fase, el equipo registra la señal eléctrica que circula por la celda electroquímica estableciéndose el blanco. En la segunda fase, se utilizan patrones de calibración, que se preparan de acuerdo a la concentración de lactosa que se espera en las muestras. Esta adición supone un aumento de la corriente eléctrica en la celda debido a la secuencia de reacciones redox que tienen lugar en la superficie del electrodo de trabajo.

De la diferencia de intensidades registradas antes y después de la adición, el equipo calcula una variación de intensidad de corriente que correlaciona con la concentración

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

de lactosa mediante una calibración previa del equipo. BIOMILK determina lactosa en tres rangos de medida de una manera cuantitativa (tabla 13).

	0-200 mg/l	0-2 g/l	0-6 g/l
LD	60	0,6	1,8
Error	15%	15%	15%
Rango Cuantitativo	60-140 mg/l	0,6-1,4 g/l	1,8-4,2 g/l
Pretratamiento	SI	SI	SI
Dilución	NO	1/10	1/10

Tabla 13. Especificaciones de los rangos de medida.

El funcionamiento del biosensor puede asimilarse al descrito por (Onzuelo et al., 2010) para la determinación de lactosa en leche y productos lácteos. El bioelectrodo desarrollado se basa en un disco de oro modificado con una monocapa (SAM) auto-ensamblada de ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) donde las enzimas β -galactosidasa, glucosa oxidasa y peroxidasa de rábano silvestre y el mediador redox tetrathiafulvaleno (TTF) se encuentran coinmovilizados mediante una membrana de diálisis.

La enzima β -galactosidasa cataliza la hidrólisis de lactosa, y la glucosa producida es oxidada catalíticamente a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, que es reducido en presencia de peroxidasa de rábano silvestre. Esta reacción enzimática está mediada por tetrathiafulvaleno y la reducción de TTF^+ a 0,00V en un electrodo de plata/cloruro de plata proporciona un aumento de la señal amperométrica que es proporcional a la concentración de lactosa. Estas reacciones se encuentran esquematizadas en la figura 6.

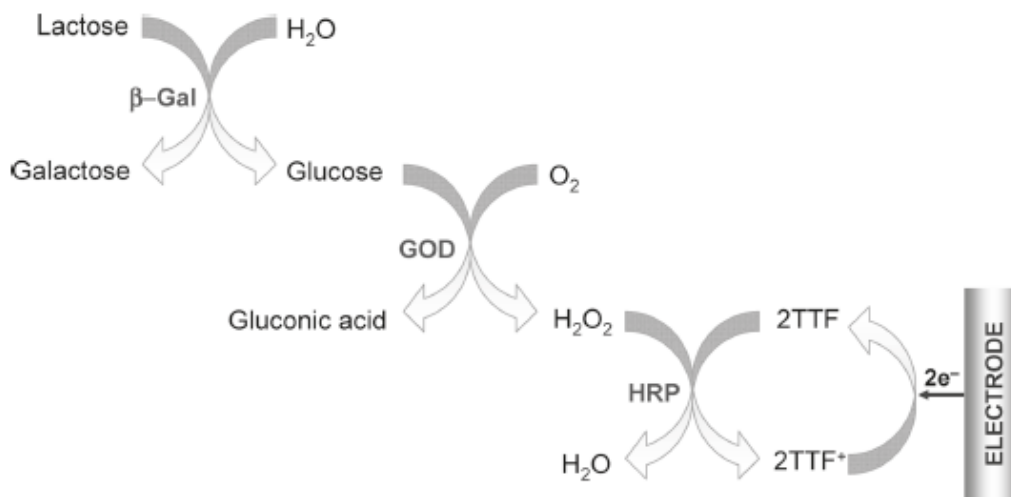


Figura 6. Diagrama esquemático que muestra las reacciones implicadas de la enzima y el electrodo con el biosensor β -Gal-GOD-HRP-TTF-MPA-AuE para la determinación de lactosa (Onzuelo et al., 2010).

Existe mucha bibliografía donde se desarrollan diferentes biosensores para la determinación de lactosa. La mayoría se corresponden con biosensores amperométricos con diferentes enzimas inmovilizadas en la superficie del electrodo: β -galactosidasa y galactooxidasa (Sharma *et al.*, 2004), β -galactosidasa y glucosa oxidasa (Rajendran & Irudayaraj, 2002), peroxidasa, glucosa oxidasa y β -galactosidasa (Eshkenazi *et al.*, 2000), β -galactosidasa, mutarotasa y glucosa deshidrogenasa (Maestre *et al.*, 2005), β -galactosidasa y galactosa deshidrogenasa (Malhotra *et al.*, 2005) y celobiosa deshidrogenasa (Stoica *et al.*, 2005).

3.1.2 METODOLOGÍA DE TRABAJO PARA DETERMINACIÓN DE LACTOSA EN LECHE

3.1.2.1 MATERIAL NECESARIO PARA LA MEDIDA

- Biosensor: equipo, cubeta de medida, electrodo de referencia y alimentador
- Biotest LAC (electrodo de trabajo)
- Kit de Calibración LAC
- Kit de Medida LAC
- Pretratamiento Lactosa
- Micropipetas de 100-1000 μ l y 0,5-5 ml
- Agua destilada

3.1.2.2 PREPARACIÓN DE LA MEDIDA

3.1.2.2.1 Almacenaje y uso de los Biotest

Los Biotest se deben conservar entre 3-8°C, durante un período máximo de 30 días.

La hidratación del Biotest se debe realizar al menos 24 horas antes de su uso. Para ello se deshecha la piedra de silica gel del interior del tubo y se rellena con Solución de Media hasta que la base del Biotest quede sumergida.

Una vez hidratado el Biotest debe almacenarse entre 3-8°C en posición vertical por un máximo de 15 días.

3.1.2.2.2 Preparación de reactivos

Solución de Medida LAC (SM)

Para la preparación de Solución de Medida se disuelve el contenido de un tubo LAC1 en 250 ml de agua destilada o un tubo LAC2 en 1 l de agua destilada.

Reactivos y patrones de Calibración LAC

Los patrones de Calibración LAC1 y LAC2 se preparan por dilución de los reactivos de calibración LAC1 y LAC2, respectivamente y son los reactivos que se utilizan para la calibración del equipo. El patrón de medida se utiliza para comprobar el estado de la calibración. Su preparación se especifica en la tabla 14.

	0-200 mg/l	0-2 g/l	0-6 g/l
Reactivo de Calibración LAC1 (RC LAC1)	10 ml SM	10 ml SM	10 ml SM
Patrón de Calibración LAC1	4 ml SM + 1ml RC LAC1	4,9 ml SM + 0,1ml RC LAC1	4,9 ml SM + 0,1ml RC LAC1
Reactivo de Calibración LAC2 (RC LAC2)	5 ml SM	5 ml SM	5 ml SM
Patrón de Calibración LAC2	9,5 ml SM + 0,5 ml RC LAC 2	9,5 ml SM + 0,5 ml RC LAC 2	8,5 ml SM + 1,5 ml RC LAC 2
Patrón de Medida	7,5 ml SM + 2 ml RC LAC1 + 0,5 ml RC LAC2	9,3 ml SM + 0,2 ml RC LAC1 + 0,5 ml RC LAC2	8,3 ml SM + 0,2 ml RC LAC1 + 1,5 ml RC LAC2

Tabla 14. Preparación del Reactivo y Patrón de Calibración.

Las condiciones de almacenaje de cada uno de los reactivos preparados se especifican en la tabla 15.

	Biotest	RC LAC1 Y LAC2	Patrón LAC1 y LAC2 Patrón de Medida	SM	MUESTRA
Seco	3-8°C/ 30 días	Temperatura ambiente/1 año	Temperatura ambiente/1 año	Temperatura ambiente/1 año	
Hidratado	3-8°C/ 15 días	3-8°C/7 días	A diario	Temperatura ambiente/15 días	2h

Tabla 15. Condiciones de almacenaje de los reactivos.

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

El reactivo LAC es el utilizado para preparar el buffer que se utiliza en la celda electroquímica para obtener un pH óptimo para el buen funcionamiento de la enzima correspondiente.

El reactivo LAC1 es el correspondiente al patrón que simula la concentración de glucosa en una leche deslactosada.

El reactivo LAC2 es el correspondiente al patrón que simula la concentración de lactosa en una leche deslactosada (100ppm).

3.1.2.3 PUESTA EN MARCHA DEL BIOSENSOR

3.1.2.3.1 Montaje del biosensor

Para el correcto montaje del biosensor se deben acoplar tanto el Biotest (introduciéndolo en el portabiotest y apretándolo con el tornillo) como el electrodo de referencia en sus respectivos conectores.

Se rellena la cubeta de medida con 10 ml de solución de medida LAC y se coloca en el portacubetas de modo que todos los componentes de la celda electroquímica queden sumergidos.

Se conecta el equipo a una toma de corriente de 100-240 VAC y se aprieta el botón de encendido durante 2 segundos.

Se selecciona el parámetro a analizar, el rango de medida y se identifica el Biotest con su etiqueta identificadora.

3.1.2.3.2 Activación y calibración del Biotest. Medida del patrón

Antes de comenzar con la realización de análisis, se debe activar y calibrar el Biotest. Es recomendable que se realicen estas dos operaciones tras largas pausas del equipo (más de 2 horas).

Para realizar la activación se debe esperar que el equipo registre el blanco de la medida y emita una señal auditiva. Se inyectan 2 ml del patrón de medida en la cubeta con la ayuda de una micropipeta.

La calibración consta de tres puntos y se lleva a cabo mediante la adición de 2 ml del Patrón de Calibrado LAC1 y dos adiciones sucesivas de 2 ml del Patrón de Calibrado LAC 2. Para el trazado de la recta de calibrado el equipo tiene en cuenta las variaciones de intensidad producidas por las distintas adiciones y las concentraciones correspondientes de cada Patrón de Calibración.

Una vez realizada la calibración, aparecen en pantalla los parámetros de la regresión lineal obtenida de la interpolación de los tres puntos de calibración. Se consideran válidos para proceder con el análisis valores de R y m iguales o superiores a 0,9990 y 6000 respectivamente.

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

Se recomienda testar el estado de la calibración tras una serie de medidas o tras una pausa larga del equipo. Para ello se coloca la cubeta correctamente con 10 ml de Solución de Medida y se inyecta el patrón de medida según indica la tabla 16.

	0-200 mg/l	0-2 g/l	0-6 g/l
Patrón de Medida	2 ml	2 ml	650 µl
Patrón de Calibración LAC1	2 ml	2 ml	650 µl
Patrón de Calibración LAC2	2 ml	2 ml	650 µl

Tabla 16. Volúmenes de las adiciones en la activación, calibración y análisis de patrón.

3.1.2.4 PRETRATAMIENTO, DILUCIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRA

Las muestras de leche necesitan un pretratamiento previo sólo si han sufrido un proceso de envasado a presión, ya que el oxígeno en suspensión de la muestra puede generar interferencias en la medida. Para ello se introducen 5 ml de muestra en un tubo de pretratamiento (con carbón activo) y se agita hasta que la muestra sea homogénea.

Las muestras en rangos de 0-2 g/l y 0-6 g/l necesitan una dilución previa. Para ello se mezcla 1 ml de muestra con 9 ml de Solución de medida y se agita hasta que la muestra sea homogénea.

Una vez realizado el pretratamiento y dilución oportunos se procede a inyectar la muestra en la cubeta de medida según indica la tabla 17.

	0-200 mg/l	0-2 g/l	0-6 g/l
Volúmenes de muestra	2 ml	2 ml	650 µl

Tabla 17. Volúmenes de muestra a inyectar.

3.1.3 METODOLOGÍA DE TRABAJO PARA ANÁLISIS DE LACTOSA EN YOGUR

En el caso de trabajar con yogur, la metodología será la misma, salvo que se aconseja batir en turrax las muestras y los patrones se preparan del siguiente modo:

Patrón 1= 1,6 ml LAC1 + 3,4 ml SM

Patrón Muestra = 3,2 ml LAC1 + 0,5 ml LAC2 + 6,3 ml SM

Correspondiendo el patrón LAC1 con 36 g/l de glucosa en SM y el patrón LAC2 con 100 mg/l de lactosa en SM.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

3.2.1 DETERMINACIÓN DE GRASA

Para la determinación de la materia grasa se pueden utilizar métodos químicos clásicos como el método butirométrico de Gerber y el método gravimétrico de Rose-Gottlieb y métodos instrumentales como el método fotométrico (Milko-Tester) y métodos de espectroscopía infrarroja (Milko-Scan o Multispec).

Los métodos químicos se basan en la medida de la materia grasa separada después de destruir su estado globular o extraer la grasa por medio de un disolvente.

Los métodos instrumentales están basados en determinadas propiedades físicas de la leche y prácticamente se realiza mediante espectroscopía infrarroja, que ha desplazado a otras técnicas pioneras.

En este trabajo se ha hecho uso del método butirométrico de Gerber (figura 7), cuyo principio de funcionamiento es el siguiente: un volumen de muestra es tratado en un butirómetro con ácido sulfúrico y alcohol amílico. El ácido sulfúrico disuelve las proteínas y el alcohol amílico facilita la separación de la grasa.

Mediante centrifugación la grasa es separada en el vástago graduado del butirómetro, donde es leído directamente el contenido en materia grasa.

El contenido en materia grasa obtenido por la aplicación de este método se expresa en gramos por 100 gramos o por 100 mililitros de leche.

El procedimiento operatorio se encuentra descrito en el anexo 1.



Figura 7. Butirómetro tipo Gerber para leche, 0 a 7% de grasa.

3.2.2 DETERMINACIÓN DE LAS CENIZAS

Se entiende como contenido en cenizas de la leche el producto resultante de la incineración del extracto seco, expresado en porcentaje en masa, obtenido según el procedimiento descrito en el anexo 2.

3.2.3 DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO

Se entiende por contenido en extracto seco de la leche, el residuo obtenido después de efectuar la desecación de la leche en unas determinadas condiciones de tiempo y temperatura.

En el extracto seco total (E.S.T.) de la leche se encuentran todos sus principales constituyentes, excepto el agua, siendo su contenido porcentual igual a la suma de los contenidos porcentuales en grasa, proteínas, lactosa anhidra y sales minerales.

Si al extracto seco total (E.S.T.) se le resta el contenido en materia grasa, se obtiene el extracto seco magro (E.S.M.).

La determinación oficial del extracto seco se realiza por el método de desecación en estufa que se expone en el anexo 3.

3.2.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

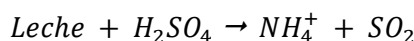
En la práctica es imposible determinar directamente las materias nitrogenadas totales o los componentes nitrogenados por aislamiento y pesada, ya que no se dispone como para la materia grasa de métodos que permitan una separación completa y fácil de las sustancias a valorar que conduzcan a una medida de peso o volumen. Por lo tanto, los métodos de determinación de proteínas son métodos de análisis indirectos.

Las proteínas se pueden determinar mediante métodos químicos clásicos (método Kjeldhal y método de formol) y métodos instrumentales (basados en la fijación de colorantes, basados en el método Kjeldahl o métodos de espectroscopía infrarroja).

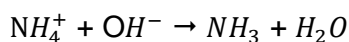
En este trabajo se ha utilizado el método Kjeldahl para la determinación de proteínas ya que está universalmente admitido como método de referencia.

El método Kjeldahl está basado en un proceso de digestión, mediante el cual se destruyen los compuestos orgánicos con ácido sulfúrico concentrado y sulfato de cobre (II) como catalizador. La adición de sulfato potásico eleva el punto de ebullición y acelera el proceso de destrucción.

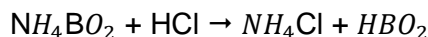
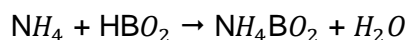
Durante la digestión el nitrógeno de la materia orgánica se convierte en sulfato amónico.



La muestra digerida se destila en presencia de hidróxido sódico en exceso. Por acción del hidróxido sódico el NH_4^+ se transforma en NH_3 .



El amoníaco destilado se recoge en una solución de ácido bórico diluido y se valora con ácido clorhídrico en presencia de rojo de metilo-azul de bromotimol-verde de bromocresol, indicador que vira de azul cobalto a naranja pálido a un pH de 4,6.



El procedimiento operatorio se encuentra descrito en el anexo 4 (Cimiano, 1991)

3.2.3 METODOLOGÍA DE TRABAJO PARA YOGUR

1. Con la finalidad de hallar el método óptimo para la determinación de lactosa en yogur se realiza el estudio de la reproducibilidad del método en leche sin lactosa, para lo cual se miden 7 muestras de leche sin lactosa semidesnatada según lo explicado en el apartado 3.1.2 del presente trabajo, procedimiento optimizado en CAPSA. Se estudian a continuación los protocolos cedidos por la empresa de BIOMILK para leche y para yogur (apartado 3.1.3) en muestras de yogur natural azucarado sin lactosa.
2. A partir de los resultados obtenidos se valora la utilización del protocolo de yogur realizando una dilución 1:2 del mismo, ya que resulta imposible pipetear las cantidades pertinentes de muestra debido a la viscosidad de la misma, y se estudia el efecto de la utilización de carbón activo en las muestras.
3. Debido a que se está diluyendo la muestra, se estudia el efecto de la misma dilución en el patrón LAC1, ya que se corresponde con la cantidad de glucosa, junto con el efecto de la utilización de carbón activo.
4. Se realizan adiciones estándar para comprobar la fiabilidad del método y de los resultados.
5. A continuación, se realiza una nueva caracterización de tres referencias distintas de yogur natural azucarado sin lactosa para realizar un seguimiento de su ciclo de vida.

Muestra 1: (09/03; 05:57:55 031F)

Muestra 2: (18/03; 06:27:08 038A)

Muestra 3: (28/03; 06:29:19 052B)

6. A partir de la caracterización, se calcula la concentración exacta de glucosa de cada muestra y se prepara el patrón de glucosa LAC1 ajustado a dicha concentración.
7. Por último se estudia el efecto de la hidratación del Biotest 24 y 48 horas antes de su utilización.
8. Las muestras estudiadas se miden para cotejar resultados utilizando el instrumento LactoSens, por HPLC y se envían a una empresa externa de validación.

3.2.4 METODOLOGÍA DE TRABAJO PARA MANTEQUILLA

Se lleva a cabo el siguiente protocolo:

- Se toman 1000 g de mantequilla (Prueba 1, deslactosado industrial) (27/04/17, L-148-16 06:45 13). Se llevan a una termomix a 90°C, con agitación durante 15 minutos.
- La mezcla líquida obtenida se trasvasa a un bote de 1000 ml y se deja reposar otros 15 minutos para que se separen las fases.
- Una vez separadas, la fase acuosa se lleva a centrifugación durante 10 minutos.
- Se decanta y se vuelve a centrifugar la fase líquida otros 10 minutos.
- Tras otra decantación, se trabaja con la fase acuosa obtenida.
- Para llevar a cabo el análisis de lactosa, se supone que en la mantequilla no existe glucosa, por lo que el patrón de calibrado de glucosa se sustituye por el buffer “LAC”, manteniéndose el patrón de medida y el patrón de calibrado de lactosa igual que los utilizados hasta el momento en el análisis de yogur.

Se caracterizan a continuación otras tres muestras de mantequilla y se comparan los resultados obtenidos centrifugando y sin centrifugar.

Prueba 2: (30-01-18 L-060-17 09:07). Corresponde con una mantequilla deslactosada.

Prueba 3: (31-01-18 L-061-17 16:45). Corresponde con una mantequilla con un deslactosado parcial (nata sin deslactosar).

Blanco: 05-02-18 L-066-17 12:16. Se trata de una mantequilla tradicional.

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

Se realiza el estudio del ciclo de vida de dos mantequillas. Por un lado se separa la fase acuosa de las mantequillas en la semana 1 y se conserva en la nevera para los análisis sucesivos (Inicio). Por otro lado, se separa la fase acuosa de cada mantequilla el día del análisis (semanalmente) para ver las diferencias.

Prueba 1: (27-04-17, L-148-16 06:45). Corresponde con una mantequilla deslactosada.

Prueba 2: (30-01-18 L-060-17 09:07). Corresponde con una mantequilla deslactosada.

Las muestras estudiadas se envían a un laboratorio externo de referencia para cotejar los resultados.

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1 DETERMINACIÓN DE LACTOSA EN YOGUR

4.1.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD

- ❖ Previamente a la puesta a punto del método para la determinación de lactosa se caracterizaron físico-químicamente algunas de las muestras de yogur mantequilla y leche. En la tabla 18 se muestra la caracterización de las mismas, utilizadas en los experimentos iniciales para el estudio de la reproducibilidad del método. Se hallan valores esperados en todos los casos. No es posible determinar el % de proteínas de la mantequilla, ya que al finalizar el proceso descrito en el apartado 3.2.4 la muestra se encuentra quemada.

Muestras	% Grasa	% Cenizas	% Proteínas	% Extracto Seco
Mantequilla Muestra 1	83	0,18	-	83,48
Yogur Muestra 1	3,3	1,3	5,91	23,82
Leche Muestra 1	1,6	1,008	3,33	10,91

Tabla 18. Caracterización de muestras de mantequilla, yogur y leche iniciales.

- ❖ Tras el estudio de la reproducibilidad del método en leche semidesnatada sin lactosa siguiendo el procedimiento optimizado en CAPSA se hallan los valores recogidos en la tabla 19. Los valores correspondientes a cada medida se encuentran en el anexo 5.

	[lactosa]mg/l
\bar{X}	131±2
DE	5,93

Tabla 19. Estudio de la reproducibilidad del método en leche semidesnatada sin lactosa.

- ❖ Se estudia a continuación el protocolo de leche y el protocolo del yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, junto con el efecto del uso de carbón activo, hallando los resultados recogidos en la tabla 20. El protocolo de yogur no proporciona resultados ya que no se realizan diluciones y la cantidad de muestra adicionada en cada medida no produce lectura del instrumento. Los valores correspondientes a cada medida se encuentran recogidos en el anexo 5.

	Protocolo de leche [lactosa]mg/l		Protocolo de yogur [lactosa]mg/l	
	Con Carbón Activo	Sin Carbón Activo	Con Carbón Activo	Sin Carbón Activo
\bar{X}	31±2	28±4	0	0
DE	2,65	6,43	0	0

Tabla 20. Estudio de los protocolos de leche y yogur en yogur natural azucarado sin lactosa.

Al llevar a cabo el protocolo de la leche no se considera la cantidad de glucosa presente en el yogur, sino la que existe en leche sin lactosa.

4.1.2 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE CARBÓN ACTIVO

- ❖ Se repite el ensayo con el protocolo de yogur con una dilución 1:2 de la muestra (12/01; 06:11:42 341F) comparando la utilización de carbón activo en la preparación de la misma (tabla 21). Los valores correspondientes a cada medida se encuentran recogidos en el anexo 6.

	Protocolo de yogur [lactosa]mg/l	
	Con Carbón Activo	Sin Carbón Activo
\bar{X}	99±12	91±8
DE	20,03	14,05

Tabla 21. Estudio del protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa con y sin carbón activo.

La utilización de carbón activo parece no tener mucha influencia sobre los resultados. Se trabaja sin la adición de carbón en los experimentos posteriores.

- ❖ Se estudia la reproducibilidad del método proporcionado por el fabricante para yogur natural azucarado sin lactosa (12/01; 06:11:42 341F) con una dilución 1:2 y sin la utilización de carbón activo (tabla 22). Los valores correspondientes a cada medida se encuentran recogidos en el anexo 6.

	[lactosa]mg/l
\bar{X}	63±4
DE	10,87

Tabla 22. Estudio de la reproducibilidad del protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa sin carbón activo.

Los resultados se encuentran dentro de la normalidad esperada para un yogur natural azucarado sin lactosa. En experimentos posteriores se estudiarán los resultados obtenidos al diluir, además de la muestra, el patrón de medida LAC 1.

4.1.3 ESTUDIO DE LA DILUCIÓN DEL PATRÓN DE MEDIDA LAC 1

- ❖ Se estudia el efecto de diluir tanto la muestra (12/01; 06:11:42 341F) como el patrón de medida LAC 1, además de la adición de carbón activo con la utilización del protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa (tabla 23). Los valores correspondientes a cada medida se encuentran recogidos en el anexo 7.

	Protocolo de yogur [lactosa]mg/l	
	Con Carbón Activo	Sin Carbón Activo
\bar{X}	121±1	81±9
DE	1,15	16,16

Tabla 23. Estudio del efecto de la dilución del patrón de medida LAC1 junto con la adición de carbón activo en protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa.

Estos resultados no proporcionan mucha información sobre el método ya que se obtienen valores semejantes en ambos casos. Para determinar la influencia del pretratamiento de la muestra con carbón activo junto con la dilución de la misma, es preciso realizar más ensayos para conocer la reproducibilidad del método en cada caso.

- ❖ Se repite el experimento por separado utilizando el protocolo de yogur para yogur natural azucarado sin lactosa, realizando diluciones 1:2 en la muestra y en LAC1 para conocer la reproducibilidad del método sin carbón activo y con carbón activo realizando 6 medidas de cada muestra (tabla 24). Los valores correspondientes a cada medida se encuentran recogidos en el anexo 7.

	Protocolo de yogur [lactosa]mg/l	
	Con Carbón Activo	Sin Carbón Activo
\bar{X}	50±5	72±5
DE	11,89	11,31

Tabla 24. Estudio de la reproducibilidad con la dilución del patrón de medida LAC1 con y sin carbón activo.

Se obtienen en los dos casos valores dentro de la normalidad.

4.1.4 ESTUDIO DEL AJUSTE DE GLUCOSA EN EL PATRÓN DE MEDIDA LAC 1

- ❖ Se procede a caracterizar de nuevo dos referencias de yogur distintas, de forma que se conozca su contenido de glucosa y, de este modo, poder ajustar el patrón de medida LAC 1 de forma precisa (tabla 25).

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

Muestra 1: (09/03; 05:57:55 031F)

Muestra 2: (18/03; 06:27:08 038A)

Muestras Yogur	% Grasa	% Cenizas	% Proteínas	% Extracto Seco
Muestra 1	3,3	1,25	5,9307	23,81
Muestra 1	3,3	-	5,8964	-
Muestra 2	3,4	1,37	5,8965	23,98
Muestra 2	3,4	-	5,8691	-

Tabla 25. Caracterización muestras 1 y 2.

Muestra 1 = 40,4695 g/l glucosa

Preparación del patrón 1 ajustado a la glucosa = 1,8 ml LAC1 + 3,2 mL LAC

Muestra 2 = 39,4479 g/l glucosa

Preparación del patrón 1 ajustado a la glucosa = 1,7 ml LAC1 + 3,3 mL LAC

- ❖ Se comparan los resultados obtenidos ajustando el patrón de medida LAC1 a su cantidad real de glucosa y sin ajustarlo en las dos muestras (tabla 26). Los valores correspondientes a cada medida se encuentran recogidos en el anexo 8.

	Muestra 1 [lactosa]mg/l		Muestra 2 [lactosa]mg/l	
	LAC 1 ajustado	LAC 1 sin ajustar	LAC 1 ajustado	LAC 1 sin ajustar
\bar{X}	44±4	56±6	39±5	37±8
DE	9,53	13,7	11,63	17,9

Tabla 26. Comparación del efecto de ajustar el patrón de medida LAC1 a su cantidad real de glucosa.

A la vista de los resultados obtenidos, se decide en los experimentos sucesivos trabajar con la glucosa ajustada, ya que de este modo se ha obtenido una menor desviación en las dos muestras de yogur. El reactivo LAC 1 corrige la glucosa en el primer punto de calibración, por lo que lo más sensato es ajustar cada muestra a su propia cantidad de glucosa.

- ❖ Como las referencias de yogur medidas tienen más de una semana de fabricación, se utiliza un yogur recién producido (nueva muestra 3), se caracteriza (tabla 27) y se estudia su ciclo de vida junto con las muestras 1 y 2. Se comprueba también la existencia de diferencias en el resultado hidratando el Biotest 48 horas en vez de 24 horas.

Muestra 3: (28/03; 06:29:19 052B)

Muestras Yogur	% Grasa	% Cenizas	% Proteínas	% Extracto Seco
Muestra 3	3,2	1,27	5,3768	22,77

Tabla 27. Caracterización nueva muestra 3.

4.1.5 ESTUDIO DEL CICLO DE VIDA

Se lleva a cabo el estudio del ciclo de vida de los yogures (figura 8) para confirmar las hipótesis que surgen a partir los resultados anteriores. Al caracterizar las muestras en función de su contenido en glucosa, a medida que avance el tiempo, éste no será el mismo que al principio, puesto que la lactasa continúa actuando y produciendo más glucosa. Como el reactivo LAC 1 está preparado de acuerdo a la cantidad inicial de glucosa, habrá un error por el cual se determinará más lactosa de la que en realidad existe en la muestra.

Las siguientes pruebas (tablas 28-31) se realizan para comprobar la evolución en las medidas de lactosa a lo largo de su tiempo de vida. Los valores correspondientes a cada medida se encuentran recogidos en el anexo 9.

Muestra 1: (09/03; 05:57:55 031F) Medidas realizadas con un biotest hidratado 48 horas

	Semana 1 (13/02/17) [lactosa]mg/l	Semana 2 (20/02/17) [lactosa]mg/l	Semana 3 (01/03/17) [lactosa]mg/l	Semana 4 (07/03/17) [lactosa]mg/l
\bar{X}	44±4	68±3	102±3	107±5
DE	9,53	6,84	7,40	10,82

Tabla 28. Ciclo de vida de muestra 1, Biotest hidratado 48 horas.

Muestra 2: (18/03; 06:27:08 038A) Medidas realizadas con un biotest hidratado 24 y 48 horas.

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

A 48 h:

	Semana 1 (13/02/17) [lactosa]mg/l	Semana 2 (01/03/17) [lactosa]mg/l	Semana 3 (07/03/17) [lactosa]mg/l	Semana 4 (13/03/17) [lactosa]mg/l
\bar{X}	39±5	85±3	90±3	99±3
DE	11,63	5,93	5,72	5,93

Tabla 29. Ciclo de vida de muestra 2, Biotest hidratado 48 horas.

A 24 h:

	Semana 1 (21/02/17) [lactosa]mg/l	Semana 2 (28/02/17) [lactosa]mg/l	Semana 3 (08/03/17) [lactosa]mg/l	Semana 4 (22/02/17) [lactosa]mg/l
\bar{X}	38±3	85±3	85±1	-
DE	6,54	7,29	2,68	-

Tabla 30. Ciclo de vida muestra 2, Biotest hidratado 24 horas.

Muestra 3: (28/03; 06:29:19 052B) Medidas realizadas con un biotest hidratado 48 horas.

	Semana 1 (22/02/17) [lactosa]mg/l	Semana 2 (01/03/17) [lactosa]mg/l	Semana 3 (10/03/17) [lactosa]mg/l	Semana 4 (13/03/17) [lactosa]mg/l
\bar{X}	52±2	62±2	82±4	72±2
DE	5,55	4,33	9,84	5,09

Tabla 31. Ciclo de vida muestra 3, Biotest hidratado 48 horas.

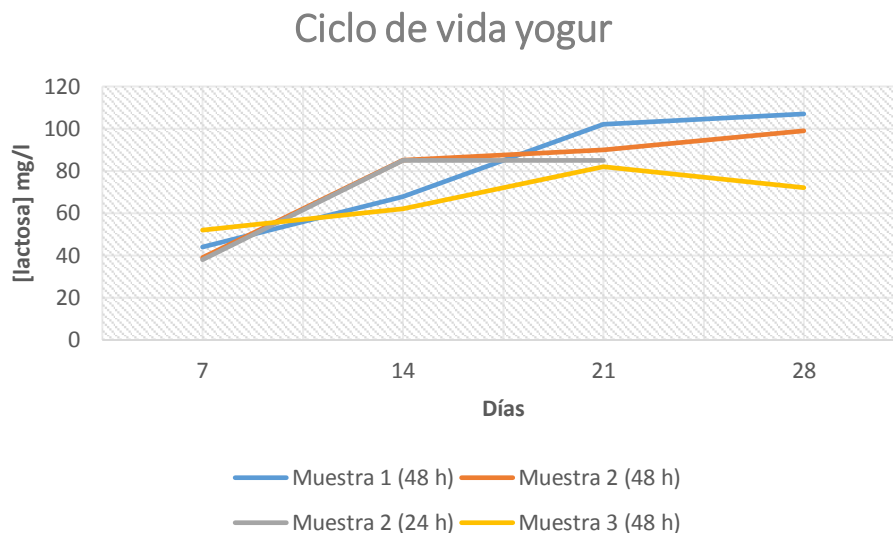


Figura 8. Ciclo de vida yogur.

A la vista de los resultados obtenidos (figura 8) se puede afirmar que la cantidad de lactosa que se está midiendo es ligeramente superior a la que hay en las muestras. Esto es debido a la mayor presencia de glucosa en las mismas. Los patrones están preparados de acuerdo con la cantidad inicial de glucosa y, por ello, hay un error por exceso en las medidas a lo largo que va avanzando el tiempo de vida de los yogures.

- ❖ El resultado de la muestra 3 enviada para validación a empresa externa (LABER) se encuentra en el anexo 10.
- ❖ Las muestras fueron medidas por HPLC el día 06/03/17, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 32. Se incluye el calibrado del análisis por HPLC (figura 9) donde puede observarse un coeficiente de determinación de 0,9999.

	[lactosa] mg/L
Muestra 1(Réplica 1)	39,293
Muestra 1(Réplica 2)	31,278
Muestra 2(Réplica 1)	34,650
Muestra 2(Réplica 2)	40,463
Muestra 3(Réplica 1)	46,848
Muestra 3(Réplica 2)	49,041

Tabla 32. Resultados HPLC para muestras 1, 2 y 3.

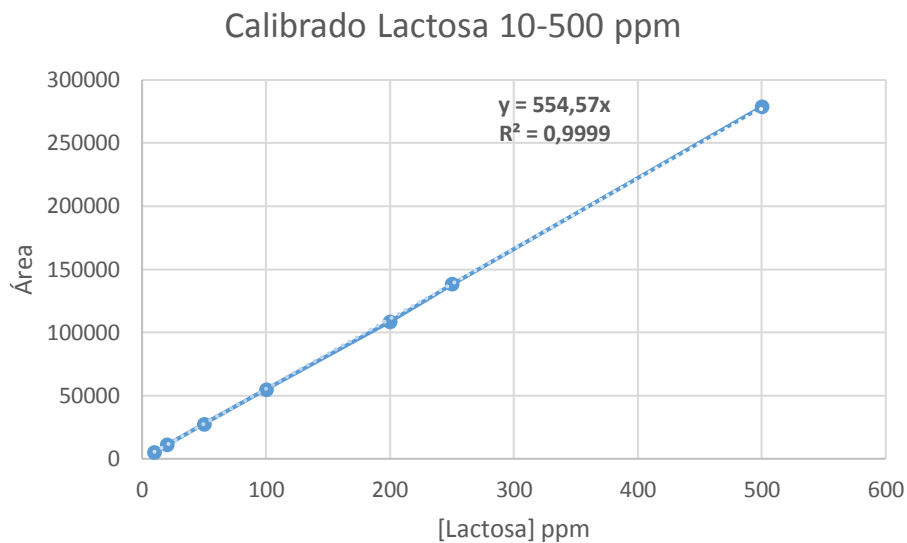


Figura 9. Resultados HPLC.

Los resultados coinciden con los obtenidos con Biomilk, teniendo en cuenta el aumento de la glucosa a medida que avanzan las semanas.

- ❖ Se realizan adiciones estándar para comprobar la fiabilidad del método (figura 10).

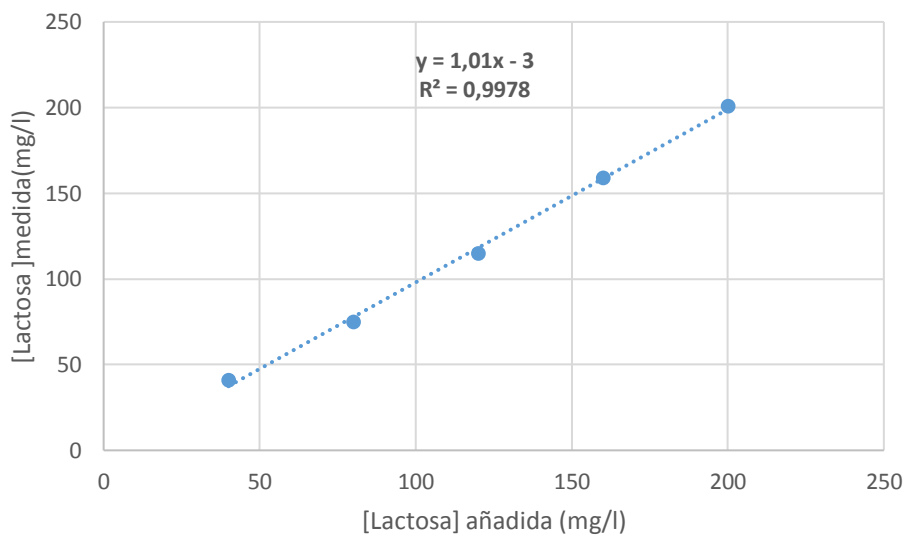


Figura 10. Resultados adiciones estándar.

Las adiciones estándar proporcionan un buen resultado, aunque no se encuentra una r^2 de 0,999 como está estipulado en el protocolo. Esto puede atribuirse a la preparación de las muestras.

- ❖ La muestra 3 fue medida adicionalmente por el equipo LactoSens obteniéndose un resultado menor de 0,1 g/l de lactosa.

Los resultados obtenidos mediante Biomilk han sido cotejados satisfactoriamente, quedando demostrada la fiabilidad del método para la realización de análisis de rutina en yogures.

Se ha comprobado experimentalmente que no existe necesidad de utilizar carbón activo como pretratamiento en las muestras de yogur así como ha quedado demostrada la necesidad de ajustar el reactivo LAC 1 a la cantidad de glucosa existente en cada muestra para obtener un resultado sin desviaciones. Por otro lado, se ha demostrado la importancia de la hidratación adecuada del Biotest para la obtención de medidas exactas.

Ha quedado patente la evolución de la glucosa a lo largo del tiempo de vida de los yogures, debido a la actividad residual de la lactasa.

4.2 DETERMINACIÓN DE LACTOSA EN MANTEQUILLA

4.2.1 CARACTERIZACIÓN MANTEQUILLA PRUEBA 1

Para llevar a cabo la determinación de lactosa en mantequillas se comenzó trabajando con una muestra “Prueba 1” (27/04/17, L-148-16 06:45 13) que corresponde con un deslactosado industrial. La caracterización de la misma se expone en la tabla 33.

Los experimentos que se exponen a continuación tienen como objetivo tratar de cuantificar la lactosa presente en mantequillas con bajo contenido en lactosa utilizando BIOMILK. Se trata de una experimentación novedosa para la empresa, que no cuenta con datos previos. La utilización de BIOMILK en mantequilla parte de la dificultad de manejo de este producto. La lactosa en la mantequilla se encuentra en la fase acuosa, por lo que se tiene que llevar a cabo un proceso de separación de fases.

Muestras	% Grasa	% Cenizas	% Proteínas	% Extracto Seco
Mantequilla Prueba 1	83	0,18	3,27	83,48

Tabla 33. Caracterización Prueba 1.

4.2.2 ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

- ❖ Se sigue el protocolo descrito en el apartado 3.4 del presente trabajo, realizándose una dilución 1:3 de la Prueba 1 y se estudia la reproducibilidad (tabla 34) del método para lo que se realizan 5 medidas de dos réplicas de la Prueba 1 controlándose los volúmenes de las fracciones grasas y acuosas, y los pesos de las mismas.

Prueba 1	Concentración lactosa (mg/l) Réplica 1	Concentración lactosa (mg/l) Réplica 2
\bar{X}	122±3	117±3
DE	6,38	5,06

Tabla 34. Estudio reproducibilidad Prueba 1.

Estos resultados tienen que ser tratados para que sean representativos de toda la mantequilla. Los cálculos se encuentran detallados en el anexo 11.

Para la réplica 1= 30 mg lactosa/l

Para la réplica 2=63 mg lactosa/l

Los resultados obtenidos se consideran satisfactorios. El valor proporcionado como concentración de lactosa por BIOMILK, es el correspondiente a la muestra de fase acuosa previamente centrifugada y decantada. Después del tratamiento de datos, parece que éstos no son tan similares entre sí pero se debe tener en cuenta el proceso de separación de fases que ha tenido lugar. De todos modos, la concentración en ambas muestras es menor de 0,1 g/l.

4.2.3 CARACTERIZACIÓN PRUEBA 2, PRUEBA 3 Y BLANCO DE MANTEQUILLA

Una vez se han obtenido resultados razonables con el método, se procede a caracterizar tres nuevas muestras (tabla 35) con diferentes concentraciones de lactosa. Se comienza caracterizando las muestras.

Prueba 2: 30-01-18 L-060-17 09:07. Corresponde con una mantequilla deslactosada.

Prueba 3: 31-01-18 L-061-17 16:45. Corresponde con una mantequilla con un deslactosado parcial (nata sin deslactosar)

Blanco: 05-02-18 L-066-17 12:16. Se trata de una mantequilla tradicional.

Muestras mantequillas	Proteínas %	Extracto Seco %	Grasa %	Cenizas %
Prueba 2 Deslactosado	2,95	16,06	86	0,109
Prueba 3 Deslactosado Industrial	2,84	15,27	87	0,107
Blanco Tradicional	3,59	15,78	85	-

Tabla 35. Caracterización muestras de mantequilla.

4.2.4 MEDIDA DE LAS PRUEBAS 2, 3 Y EL BLANCO DE MANTEQUILLA

- ❖ Se prepara una dilución 1:3 en agua destilada de cada fase líquida de las mantequillas, obteniéndose los siguientes resultados. Se comparan los resultados obtenidos centrifugando la Prueba 2 (CF) y sin centrifugarla (SC) (tabla 36).

	Prueba 2 SC	Prueba 2 CF	Prueba 3 CF	Blanco CF
\bar{X}	45±2	51±3	Fuera de rango	Fuera de rango
DE	3,67	5,64		

Tabla 36. Estudio de la reproducibilidad de la Prueba 2 centrifugada, sin centrifugar, la Prueba 3 y el blanco centrifugados.

El tratamiento de datos se encuentra detallado en el anexo 12.

Para la prueba 2 sin centrifugar= 17 mg lactosa/L

Para la prueba 2 centrifugada = 20 mg lactosa/L

- ❖ La prueba 3 se prepara a partir de 222 µl del centrifugado y el blanco se prepara a partir de 193 µl de su centrifugado correspondiente. Los resultados de las medidas se encuentran recogidos en la tabla 37.

	Blanco (mg/L)	Prueba 3 (mg/l)
\bar{X}	184±2	160±3
DE	4,22	7,36

Tabla 37. Estudio de la reproducibilidad del Blanco y la Prueba 3.

Se calcula su concentración real de lactosa (anexo 12).

Blanco=6510 mg lactosa/L

Prueba 3= 4268 mg lactosa/L

4.2.5 CICLO DE VIDA

Se estudia el ciclo de vida de las mantequillas para comprobar si existe algún cambio en la evolución de la lactosa con el tiempo. No va a existir un cambio análogo al yogur, ya que para realizar la medida de la mantequilla se supone que no existe glucosa.

Se trabaja con dos muestras:

Prueba 1: 27-04-17, L-148-16 06:45 13. Corresponde con una mantequilla deslactosada.

Prueba 2: 30-01-18 L-060-17 09:07. Corresponde con una mantequilla deslactosada.

Se realizan dos estudios, por un lado se separa la fase acuosa de las mantequillas en la semana 1 y se conserva en la nevera para los análisis sucesivos (Inicio). Por otro lado, se separa la fase acuosa de cada mantequilla el día del análisis (semanal) para ver las diferencias. Los resultados se encuentran recogidos en las tablas 38 y 39.

Prueba 1

Días	[Lactosa] mg/l Inicio	[Lactosa] mg/l Semanal
1	105	105
7	107	114
14	92	105

Tabla 38. Ciclo de vida Prueba 1.

Prueba 2

Días	[Lactosa] mg/l Inicio	[Lactosa] mg/l Semanal
1	41	41
7	34	49
14	27	38

Tabla 39. Ciclo de vida Prueba 2

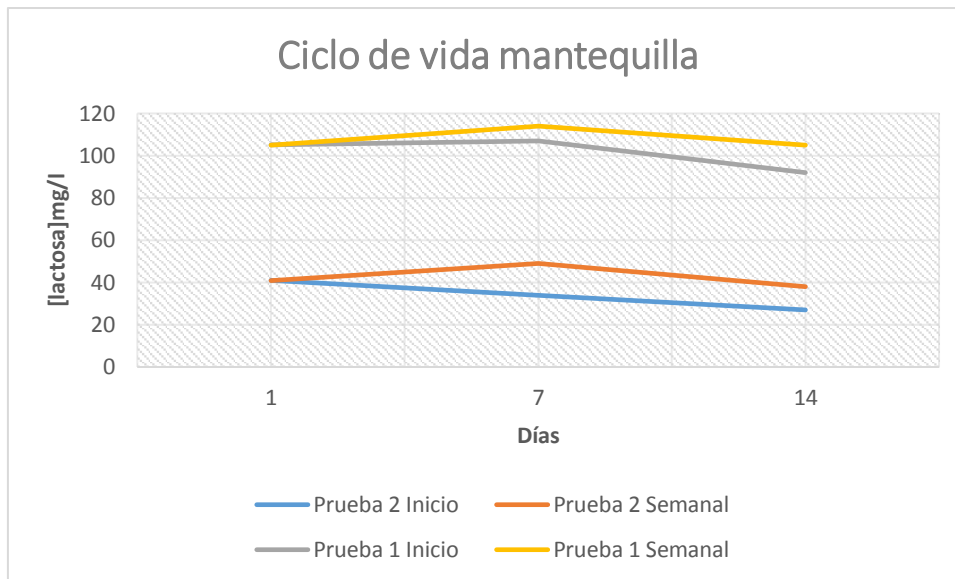


Figura 11. Ciclo de vida mantequilla.

A la vista de los resultados (figura 11), se observa que no hay apenas cambio en la concentración de lactosa a lo largo de las semanas estudiadas, aunque si se aprecia una pequeña disminución de la cantidad de lactosa en la mantequilla inicial. Esto puede deberse al deterioro de la fase acuosa, que fue conservada desde el día 1 para su medida continua.

- ❖ El resultado de la Prueba 1 enviada para validación a empresa externa (LABER) se encuentra en el anexo 13
- ❖ .La Prueba 1 fue medida adicionalmente por el equipo LactoSens obteniéndose un valor menor de 0,1 g/l.

5. CONCLUSIONES

Se ha puesto a punto un método para la determinación de lactosa en yogur natural azucarado bajo en lactosa obteniéndose las siguientes conclusiones generales:

1. La utilización de carbón activo en la preparación de las muestras no tiene efectos notables en los resultados, su utilización se ve reducida a aquellas muestras que hayan sido envasadas a presión ya que el carbón elimina el O_2 que pueda estar presente en la muestra, el cual, al aplicarle un potencial se oxida y genera una señal eléctrica. En el yogur, su sistema de envasado no da lugar a este tipo de problemas.
2. Es necesario aplicar la misma dilución que se realice a la muestra al patrón de medida LAC 1. La calibración está ajustada en el protocolo para la leche a la medida de leche sin lactosa, es decir, una matriz con 23 g/l de glucosa. Esto se ajusta en el primer punto de la calibración, con el patrón LAC1, que corresponde con una solución de 23 g/l de glucosa en el buffer (solución de medida). Si se desea hacer análisis de otras matrices habrá que tener en cuenta la cantidad de glucosa que poseen y ajustar el patrón LAC 1 a dicha concentración. Si no poseen glucosa, en el primer punto de la calibración habrá que añadir 2 ml de Solución de Medida.
3. Es imprescindible cumplir el tiempo de hidratación de los reactivos de 24 horas, ya que necesitan ese tiempo para mutarotar. Una de las consecuencias de no dejarlos ese tiempo es que se pueden hallar medidas incorrectas (incluso de 0 ppm). También es importante que el Biotest lleve 48 horas hidratado para su correcto funcionamiento.
4. Con el estudio del ciclo de vida de yogur se puede afirmar que a medida que aumenta el tiempo de vida de cada yogur, la cantidad de glucosa aumenta. Para conocer la cantidad real de lactosa en cada momento sería necesario medir la glucosa en el momento del análisis.
5. Gracias a los resultados proporcionados por LABER, HPLC y LactoSens, el método ha demostrado su fiabilidad para ser utilizado para análisis rutinario en yogures bajos en lactosa.

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

Por otro lado, se ha puesto a punto un método para la determinación de lactosa en mantequillas bajas en lactosa llegando a las siguientes conclusiones:

1. Es necesario realizar un pretratamiento de la muestra para separar la lactosa, presente de la materia grasa de la mantequilla.
2. La fase de centrifugado del pretratamiento de la muestra no es necesaria para obtener resultados fiables.
3. Con el estudio del ciclo de vida de las mantequillas no se encuentran cambios significativos en la cantidad de lactosa presente en las muestras, salvo en aquellas conservadas desde su centrifugado que muestran un pequeño descenso en lactosa.
4. Gracias a los resultados proporcionados por LABER y LactoSens, el método ha demostrado ser fiable para utilizarse en análisis de rutina de mantequillas bajas en lactosa.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alais, C.(1985). *Ciencia de la leche*. Barcelona: Reverté.
- Baffour-Awuah, N. Y. *et al.* (2015) Functional Significance of Single Nucleotide Polymorphisms in the Lactase Gene in Diverse US Patients and Evidence for a Novel Lactase Persistence Allele at -13909 in Those of European Ancestry. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 60(2), 182–191.
- Banerjee, G. and Ray, A. K. (2017) The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Research in Veterinary Science*, 115, 66–77.
- Batista, K. A. *et al.* (2017) Development of a new bioaffinity stationary phase for lactose removal using a lactose-binding lectin immobilized onto polyaniline. *Separation and Purification Technology*, 185, 54–60.
- Brown-Esters, O., Mc Namara, P. , & Savaiano, D. (2012) Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. *International Dairy Journal*, 22(2), 98–103.
- Carter, S. L. & Attel, S. (2013) The diagnosis and management of patients with lactose intolerance. *The Nurse Practitioner*, 38(7), 23–28.
- Cheng, P., Wang, J. & Shao, W. (2016). Monounsaturated fatty acid intake and stroke risk: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 25(6), 326-1334.
- Cimiano, P. (1991) *Guía para el análisis química de la leche y los derivados lácteos*. Madrid: Ayala.
- Díez, L.M. (2015). *Fundamentos de cromatografía*. Madrid: Dextra.
- Diplock, A. T. *et al.* (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *The British Journal of Nutrition*, 81 Suppl 1, S1–S27.
- Eshkenazi, I. *et al.* (2000). A Three-Cascaded-Enzymes Biosensor to Determine Lactose Concentration in Raw Milk. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 1939–1945.
- Fabbri, A. D. T. & Crosby, G. A. (2016). A review of the impact of preparation and cooking on the nutritional quality of vegetables and legumes. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 3, 2–11.
- Fernandez-Lopez, L. *et al.* (2017). Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 98, 18–25.
- Flynn, F. V., Harper, C. & de Mayo, P. 1953. Lactosuria and glycosuria in pregnancy and the Puerperium. *Lancet* 265, 698-704.

- Fowles, I.A. (1998). Gas chromatography: analytical chemistry by open learning. New York: John Wiley & Sons.
- Frewer, L., Scholderer, J. & Lambert, N. (2003). Consumer acceptance of functional foods: issues for the future. *British Food Journal*, 105(10), 714–731.
- Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (2011). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Oxford: Elsevier.
- García-Cayuela, T. *et al.* (2014). Selective fermentation of potential prebiotic lactose-derived oligosaccharides by probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 38(1), 11–15.
- Goulart, D. B. & Hartel, R. W. (2017). Lactose crystallization in milk protein concentrate and its effects on rheology. *Journal of Food Engineering*, 30 (1), 1–11.
- Harju, M., Kallioinen, H. & Tossavainen, O. (2012). Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*, 22(2), 104–109.
- Holsinger, V.H. & Kligerman, A.E. (1991). Applications of lactase in dairy foods, and other foods containing lactase. *Food Technol.*, 45 (1), 92-95.
- Huppertz, T. & Gazi, I. (2016). Lactose in dairy ingredients: Effect on processing and storage stability. *Journal of Dairy Science*. American Dairy Science Association, 99(8), 6842–6851.
- Illanes, A. & Conejeros, R. (2016). *Lactose-Derived prebiotics. A process perspective*. London : Academic Press
- Kaur, N. & Singh, D. P. (2017). Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. *Appetite*, 112, 167–187.
- Konar, N. *et al.* (2016). Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. *Trends in Food Science and Technology*, 49, 35–44.
- Larroche, C. (2016). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. London: Academic Press.
- Lee, M.R.M.E. Johnson & J.A. Lucey, J.J. Jaeggi. Lactose and galactose content in cheese results in overestimation of moisture by vacuum oven and microwave methods. *Journal of Dairy Science*, 97, 2567-2577.

- Li, R., Roos, Y. H. & Miao, S. (2016). Physical and mechanical properties of lactose/WPI mixtures: Effect of pre-crystallisation. *International Dairy Journal*, 56, 55–63.
- Luquet, F. (1991). *Leche y productos lácteos*. Zaragoza: Acribia.
- Luthy, K. E., Larimer, S. G. & Freeborn, D. S. (2017). Differentiating Between Lactose Intolerance, Celiac Disease, and Irritable Bowel Syndrome-Diarrhea. *Journal for Nurse Practitioners*, 13(5), 348–353.
- Maestre, E. *et al.* (2005). A multianalyte flow electrochemical cell: Application to the simultaneous determination of carbohydrates based on bioelectrocatalytic detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(5), 774–781.
- Malhotra, B. D. *et al.* (2005). Recent trends in biosensors. *Current Applied Physics*, 5(2), 92–97.
- Mariotti, F. (2017) *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention*. London:Academic Press.
- Menezes, E. *et al.* (2011). Preferences and attitudes towards açai based products among North American consumers. *Food Research International*, 44(7), 1997–2008.
- Negri, S., Monti, L., Meucci, A., Stroppa, A., Galli, A., & Contarini, G. (2016). Lactose, galactose and glucose determination in naturally lactose-free hard cheese: HPAEC-PAD method Validation. *Food Chem*, 220, 18-24.
- Moynihan, A. C. *et al.* (2016). Effect of standardizing the lactose content of cheesemilk on the properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese', *Journal of Dairy Science*, 99(10), 7791–7802.
- Naranjo, G. B. *et al.* (2013). The kinetics of Maillard reaction in lactose-hydrolysed milk powder and related systems containing carbohydrate mixtures. *Food Chemistry*, 141(4), 3790–3795.
- Ohlsson, J. A. *et al.* (2017). Lactose, glucose and galactose content in milk, fermented milk and lactose-free milk products. *International Dairy Journal*. Recuperado de: 10.1016/j.idairyj.2017.06.004
- Onzuelo, F. C. *et al.* (2010). An Integrated Amperometric Biosensor for the Determination of Lactose in Milk and Dairy Products', 78, 7141–7148.
- Pawłowska, K., Umławska, W. & Iwańczak, B. (2016). The impact of lactose malabsorption and lactose intolerance on dairy consumption in children and adolescents with selected gastrointestinal diseases. *Pediatrics Polska*, (1), 1–7.

- Rajendran, V. and Irudayaraj, J. (2002). Detection of Glucose, Galactose, and Lactose in Milk with a Microdialysis-Coupled Flow Injection Amperometric Sensor. *Journal of Dairy Science*, 85(6), 1357–1361.
- Rossi, M. C., Bassett, M. N. & Sammán, N. C. (2016). Dietary nutritional profile and phenolic compounds consumption in school children of highlands of Argentine Northwest. *Food Chemistry*. Recuperado: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.065>
- Sert, D., Mercan, E. & Dertli, E. (2017). Characterization of lactic acid bacteria from yogurt-like product fermented with pine cone and determination of their role on physicochemical, textural and microbiological properties of product. *Food Science and Technology*, 78, 70–76.
- Shahzad, N. *et al.* (2017). Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 88, 786–794.
- Sharma, S. K. *et al.* (2004). Lactose biosensor based on Langmuir-Blodgett films of poly(3-hexyl thiophene). *Biosensors and Bioelectronics*, 20(3), 651–657.
- Silveira, M. B., Monereo, S. & Molina, B. (2013). Alimentos funcionales y nutrición óptima. *Revista Española de Salud Pública* 77(3).
- Sirotkin, A. V. (2014). Phytoestrogens and their effects. *European Journal of Pharmacology*, 741(1), 230–236.
- Soldatkin, O. O. *et al.* (2013). Development of conductometric biosensor array for simultaneous determination of maltose, lactose, sucrose and glucose. *Talanta*, 115, 200–207.
- Spreer, E. (1975) *.Lactología industrial*. Zaragoza: Acribia.
- Stoica, L. *et al.* (2005). Electrochemical investigation of cellobiose dehydrogenase from new fungal sources on Au electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2010–2018.
- Tamura, A., Shiomi, T. & Hachiya, S. (2008). Low activities of intestinal lactase suppress the early phase absorption of soy isoflavones in Japanese adults. *Clinical Nutrition*, 27, 248–253.
- Tasca, F. *et al.* (2013). Determination of lactose by a novel third generation biosensor based on a cellobiose dehydrogenase and aryl diazonium modified single wall carbon nanotubes electrode. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 177, 64–69.
- Timilsena, Y. P. *et al.* (2017). Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review', *Food Hydrocolloids*, 69, 369–381.

- Tomic, N. *et al.* (2017). Enrichment of yoghurt with insoluble dietary fiber from triticale. A sensory perspective. *Food Science and Technology*, 80, 59–66.
- Trani, A. *et al.* (2017). Comparison of HPLC-RI, LC/MS-MS and enzymatic assays for the analysis of residual lactose in lactose-free milk. *Food Chemistry*, 233, 385–390.
- Troise, A. D. *et al.* (2016). The quality of low lactose milk is affected by the side proteolytic activity of the lactase used in the production process. *Food Research International*, 89, 514–525.
- Urala, N. and Lähteenmäki, L. (2007). Consumers' changing attitudes towards functional foods. *Food Quality and Preference*, 18(1), 1–12.
- van Scheppingen, W. B. *et al.* (2017). Selective and sensitive determination of lactose in low-lactose dairy products with HPAEC-PAD. *Journal of Chromatography*. Recuperado: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.024>.
- Wagner, M. G. *et al.* (2016). Nutrition education effective in increasing fruit and vegetable consumption among overweight and obese adults. *Appetite*, 100, 94–101.
- Wong, P, Nennes R., Kenny M. and Marth EH. (1988). *Fundamentals of dairy chemistry*, 3rd edn. Westport, CT: the AVI Publishing Company Inc..
- Yakovleva, M. *et al.* (2012). A novel combined thermometric and amperometric biosensor for lactose determination based on immobilised cellobiose dehydrogenase. *Biosensors and Bioelectronics*, 31(1), 251–256.
- Zadow, J. (1984). Lactose: Properties and uses. *Journal of Dairy Science* 67, 2654-2679.
- Zadow, J. (1992). *Lactose and Whey Processing*. London: Elsevier Applied Science.

7. ANEXOS

ANEXO 1

MATERIA GRASA EN LECHE (MÉTODO GERBER)

Material necesario

- Ácido sulfúrico Gerber: densidad 1,820+/-0,003, 90,91% (m/m).
- Alcohol isoamílico para Gerber: densidad 0,81.
- Butirómetros de leche: deben ser originales contrastados Gerber.
- Pipeta de 11 ml contrastada +/-0,03.
- Centrífuga calentadora (65°C).
- Dosificadores.

Instrucciones

- Homogeneizar la muestra invirtiendo repetidamente el recipiente que la contiene evitando al mismo tiempo la formación de espuma.
- Verter con un dosificador 10 ml de ácido sulfúrico en el butirómetro (por las paredes, no añadirlo directamente sobre la muestra) asegurándose que llene la ampolla y el tubo graduado.
- Invertir la muestra 3-4 veces y pipetear 11 ml de leche
- Verter la leche en un butirómetro manteniendo la pipeta inclinada formando un ángulo de 45° y tocando la pared interna del butirómetro de modo que la leche se deslice por ella.
- Añadir 1 ml de alcohol isoamílico.
- Tapar el butirómetro y agitar, primero sin invertirlo y luego invirtiéndolo varias veces hasta que quede perfectamente mezclado. Hacer esta operación protegiéndose con un paño para evitar posibles accidentes.
- Centrifugar a 1200 rpm durante 6 minutos.
- Ajustar con el tapón la columna de grasa a una de las marcas principales del butirómetro más cercana y leer. El resultado se obtiene en m/v.

MATERIA GRASA EN YOGUR

El procedimiento es el mismo. Se debe calentar ligeramente el yogur para poder pipetear 11 ml de manera precisa.

MATERIA GRASA EN MANTEQUILLA

En el caso de la mantequilla se pesan 5 g de muestra en el butirómetro y se utiliza ácido sulfúrico al 50%.

ANEXO 2 DETERMINACIÓN DE LAS CENIZAS

Material necesario

- Balanza analítica.
- Crisoles.
- Estufa (100+/-5°C).
- Mufla (500+/-50°C).

Instrucciones

- Tarar la cápsula.
- Pesar 3 g de muestra, anotar peso exacto.
- Introducir la cápsula con la muestra en la estufa durante 2 horas.
- Pasar la cápsula a la mufla durante 4 horas.
- Dejar enfriar hasta temperatura ambiente y pesar.
- Realizar el cálculo.

$$\text{(peso final-tara/peso muestra) x 100 = \% de cenizas}$$

ANEXO 3

DETERMINACIÓN EXTRACTO SECO TOTAL

Material necesario

- Estufa 102+/-2°C.
- Cápsulas de acero inoxidable de 2 cm de altura y 6 cm de diámetro, provistas de tapa.
- Balanza de precisión hasta diezmilésimas.
- Desecador.

Instrucciones

- Tomar la cápsula del desecador que está a temperatura ambiente.
- Pesar y tarar la cápsula y la tapa, previamente identificadas.
- Anotar el peso.
- Pesar aproximadamente 3 gramos de muestra y anotar el peso de muestra.
- Pasar cápsula y tapa a la estufa a 100°C (cápsula destapada) donde permanecerá durante 4 horas.
- Sacar la cápsula de la estufa, dejar en la meseta para que alcance temperatura ambiente y pesar.

$$\text{EST} = ((\text{peso final} - \text{tara}) / \text{peso muestra}) \times 100$$

El ESM en peso se obtiene restando al valor del EST el valor de la materia grasa en peso.

ANEXO 4

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Material necesario

- Bloque de digestión.
- Tubos de digestión Kjeldhal de 250 ml.
- Unidad de destilación Kjelttec 2300.
- Balanza analítica con una precisión de 0,1 mg.

Reactivos

- Ácido sulfúrico concentrado (98%).
- Catalizador y sal: pastillas Kjeltab con 1,5 g de sulfato potásico y 7,5 mg de Se.
- Ácido clorhídrico 0,1 N.
- Hidróxido de sodio 40%.
- Ácido bórico.
- Agua destilada

Instrucciones

- Pesar 1 g de muestra en un tubo previamente tarado.
- Añadir a cada tubo 12 ml de ácido sulfúrico 98%.
- Añadir una pastilla de catalizador “Kjeltabs auto” a cada tubo.
- Introducir los tubos en el aparato digestor, taparlos, abrir el grifo de aspiración, encender el ventilador de la campana y digerir durante 2 horas.
- Transcurridas las 2 horas apagar la maquinaria, sacar los tubos y dejar enfriar durante 15 minutos con el grifo abierto.
- Añadir a cada tubo 75 ml de agua destilada.
- Introducir cada tubo en el “Kjelttec auto” y seguir las instrucciones del aparato.

1.1 Selección de volumen de muestra y preparación de la muestra

El volumen de muestra necesario será función de su contenido en proteína, en nuestro caso, al tratarse de leche y tener un contenido proteico menor del 10%, pesaremos entre 1,5 y 5 g de muestra.

1.2 Digestión

- Encender el bloque de digestión y dejar que alcance 420 °C.
- Pesar la cantidad de muestra que se ha indicado anteriormente en el tubo de digestión.
- Añadir una pastilla Kjeltab.
- Añadir 12 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- Una vez estén todas las muestras pesadas y preparadas introducirlas en el bloque de digestión. Para iniciar la digestión apretar el botón start. La digestión estará finalizada al cabo de 1 hora. Después de la cual se debe apagar el bloque de digestión.
- Sacar los tubos del bloque de digestión y dejarlos enfriar a temperatura ambiente con el colector de gases colocado.

1.3 Destilación

Para llevar a cabo la destilación es necesario realizar una serie de comprobaciones cada vez que se encienda el destilador:

- Comprobación de los niveles de todos los reactivos que se encuentran en los bidones.
- Cambiar el tubo de destilación que se encuentre colocado por otro vacío.
- Seleccionar el icono “mano”. En esta pantalla encontraremos el resto de comprobaciones que debemos realizar.
- Debemos asegurarnos de la ausencia de burbujas en la bureta de HCl, para ello seleccionaremos “vaciar bureta” y “llenar bureta”. Este proceso se realizará, al menos, dos o tres veces hasta que se compruebe que no hay burbujas.
- Seleccionar “adición de agua”.
- Seleccionar “vapor en marcha”. El vapor en marcha se debe dejar unos 10 minutos.
- Seleccionar el icono situado sobre el icono “mano”. En esta pantalla podremos decidir el método utilizado: Kjeldhal 1, Kjeldhal 2,...

El Kjeldhal 1 se utiliza para la determinación del blanco y de las muestras. Para llevar a cabo las medidas del blanco debemos de tener una pantalla del siguiente tipo:

Programa: Kjeldhal
1

Blanco: 0 ml

Unidad: blanco

Peso: 0

Los parámetros a seleccionar aparecen en cursiva.

El blanco debe dar resultado $<0,20$ y debemos realizar al menos 3 medidas. Al iniciar la determinación de la proteína en las muestras este valor pasa automáticamente a considerarse como el blanco de operación.

Para llevar a cabo la determinación de las muestras debemos seleccionar las siguientes opciones:

Programa: Kjeldhal 1

Blanco: x ml

Unidad: % proteína

Factor: 6,38

Peso: peso de la muestra

Este procedimiento se repite con cada una de las muestras. El inicio de la destilación se produce automáticamente al bajar la pantalla protectora de los tubos de destilación.

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

Una vez acabadas todas las destilaciones se debe realizar un programa de limpieza empleando para ello el sistema de vapor y agua. Cuando se apague el equipo, el vaso de valoración y el tubo de destilación deben quedar con agua destilada.

ANEXO 5

CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD

- ❖ Resultados de la reproducibilidad del método en leche sin lactosa semidesnatada.

- Calibración


R	0,9999
M	8750,9
B	38,71

Tabla 40. Calibración para estudio de la reproducibilidad en leche sin lactosa semidesnatada.

- Medidas

Muestras de leche sin lactosa	Concentración lactosa (mg/l)
1	127
2	140
3	133
4	126
5	131
6	124
7	137

Tabla 41. Medidas para estudio de la reproducibilidad en leche sin lactosa semidesnatada.

 DE=5,93
 $\bar{X}=131\pm 2$

- ❖ Resultados protocolo utilizado para leches sin lactosa en yogur natural sin lactosa.

- Calibración

R	0,9996
M	9958,27
B	41,90

Tabla 42. Calibración para protocolo de leche sin lactosa en yogur natural sin lactosa.

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

➤ Medidas

Muestras de yogur sin lactosa	Concentración (mg/l)	
	Con Carbón activo	Sin Carbón activo
1	34	31
2	30	33
3	29	21

Tabla 43. Medidas para protocolo de leche sin lactosa en yogur natural sin lactosa



DE=2,65

$\bar{X}=31\pm 2$



DE=6,43

$\bar{X}=28\pm 4$

❖ Resultados del protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa.

➤ Calibración

R	0,9998
M	13965,07
B	79,99

Tabla 44. Calibración para protocolo de leche sin lactosa en yogur natural sin lactosa.

➤ Medidas

Muestras de yogur sin lactosa	Concentración (mg/l)	
	Con Carbón activo	Sin Carbón activo
1	0	0
2	0	0
3	0	0

Tabla 45. Medidas para protocolo de leche sin lactosa en yogur natural sin lactosa.

ANEXO 6

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE CARBÓN ACTIVO

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 (12/01; 06:11:42 341F)

- Calibración

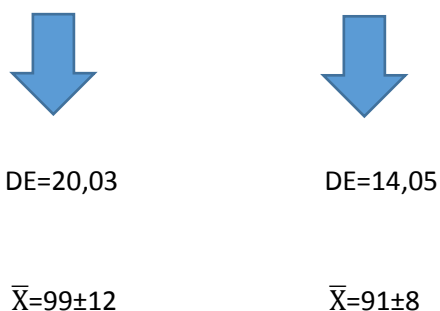
R	0,9997
M	7011,65
B	41,59

Tabla 46. Calibración para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2.

- Medidas

Muestras de yogur sin lactosa	Concentración (mg/l)	
	Con Carbón activo	Sin Carbón activo
1	57 → 114	53 → 106
2	53 → 106	39 → 78
3	38 → 76	45 → 90

Tabla 47. Medidas para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2.



- ❖ Resultados del protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 y sin carbón activo. (12/01; 06:11:42 341F)

- Calibración

R	0,9997
m	8975,55
b	60,52


Tabla 48. Calibración para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 sin carbón activo.

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

➤ Medidas

Muestras de yogur sin lactosa	Concentración lactosa (mg/l)
1	35 → 70
2	38 → 76
3	30 → 60
4	25 → 50
5	37 → 74
6	29 → 58
7	25 → 50

Tabla 49. Medidas para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 sin carbón activo.

 DE=10,876
 $\bar{X}=63\pm 4$

ANEXO 7

ESTUDIO DE LA DILUCIÓN DEL PATRÓN DE MEDIDA LAC 1

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 (muestra y LAC1) (12/01; 06:11:42 341F)

➤ Calibración

R	0,9993
M	11202,00
B	21,46

Tabla 50. Calibración para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 en muestra y LAC 1.

➤ Medidas

Muestras de yogur sin lactosa	Concentración (mg/l)	
	Con Carbón activo	Sin Carbón activo
1	60 → 120	50 → 100
2	61 → 122	36 → 72
3	61 → 122	36 → 72

Tabla 51. Medidas para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 en muestra y LAC 1.



DE=1,154

$\bar{X}=121\pm 1$



DE=16,165

$\bar{X}=81\pm 9$

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Sin carbón activo. (09/02; 10:36:17 009B)

➤ Calibración

R	0,9997
m	15186,97
b	20,62


Tabla 52. Calibración para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 de muestra y LAC 1. Sin carbón activo.

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

➤ Medidas

Muestras de yogur sin lactosa	Concentración lactosa (mg/l)
1	40 → 80
2	41 → 82
3	33 → 66
4	39 → 78
5	26 → 52
6	37 → 74

Tabla 53. Medidas para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 de muestra y LAC 1. Sin carbón activo.

 DE=11,314
 $\bar{X}=72\pm 5$

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Con carbón activo. (02/02; 13:52:30 362A)

➤ Calibración

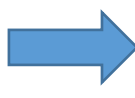
R	0,9998
M	13476,85
B	71,85

Tabla 54. Calibración para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 de muestra y LAC 1. Con carbón activo.

➤ Medidas

Muestras de yogur sin lactosa	Concentración lactosa (mg/l)
1	22 → 44
2	22 → 44
3	36 → 72
4	28 → 56
5	20 → 40
6	23 → 46

Tabla 55. Medidas para protocolo de yogur en yogur natural azucarado sin lactosa, dilución 1:2 de muestra y LAC 1. Con carbón activo.

 DE=11,894
 $\bar{X}=50\pm 5$

ANEXO 8

ESTUDIO DEL AJUSTE DE GLUCOSA EN EL PATRÓN DE MEDIDA LAC

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en muestra 1, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Con ajuste de glucosa en LAC 1.

- Calibración


R	0,9990
M	9749,82
B	17,59

Tabla 56. Calibración para protocolo de yogur en muestra 1, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa en LAC 1.

- Medidas

Muestra 1	Concentración lactosa (mg/l)
1	21 → 42
2	28 → 56
3	21 → 42
4	15 → 30
5	24 → 48

Tabla 57. Medidas para protocolo de yogur en muestra 1, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa en LAC 1.



DE=9,529
 $\bar{X}=44\pm 4$

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en muestra 2, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Con ajuste de glucosa en LAC 1.

- Calibración

R	0,9998
M	9799,13
B	31,15


Tabla 58. Calibración para protocolo de yogur en muestra 2, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa en LAC 1.

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

➤ Medidas

Muestra 2	Concentración lactosa (mg/l)
1	24 → 48
2	21 → 42
3	24 → 48
4	18 → 36
5	10 → 20

Tabla 59. Medidas para protocolo de yogur en muestra 2, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa en LAC 1.

 DE=11,627
 $\bar{X}=39\pm 5$

- ❖ Estudio del protocolo de yogur en muestra 1, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Sin ajuste de glucosa.

➤ Calibración

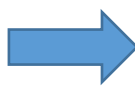
R	0,9996
M	11173,55
B	51,88

Tabla 60. Calibración para protocolo de yogur en muestra 1, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, sin ajuste de glucosa.

➤ Medidas

Muestra 1	Concentración lactosa (mg/l)
1	34 → 68
2	22 → 44
3	20 → 40
4	30 → 60
5	35 → 70

Tabla 61. Medidas para protocolo de yogur en muestra 1, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, sin ajuste de glucosa.

 DE=13,74
 $\bar{X}=56\pm 6$

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en muestra 2, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Sin ajuste de glucosa.

- Calibración


R	0,9996
M	11173,55
B	51,88

Tabla 62. Calibración para protocolo de yogur en muestra 2, con dilución 1:2 de muestra y LAC 1, sin ajuste de glucosa.

- Medidas

Muestra 2	Concentración lactosa (mg/l)
1	19 → 38
2	31 → 62
3	8 → 16
4	12 → 24
5	22 → 44

Tabla 63. Medidas para protocolo de yogur en muestra 2, con dilución 1:2 de muestra y LAC 1, sin ajuste de glucosa.

 $DE=17,92$
 $\bar{X}=37\pm 8$

ANEXO 9

ESTUDIO DEL CICLO DE VIDA YOGUR

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en muestra 1, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.

- Calibración


R	0,9993
M	12564,84
B	41,90

Tabla 64. Calibración para protocolo de yogur en muestra 1, con dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.

- Medidas

Muestra 1	Concentración lactosa (mg/l)
1	36 → 72
2	35 → 70
3	29 → 58
4	38 → 76
5	33 → 66

Tabla 65. Medidas para protocolo de yogur en muestra 1, con dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.



DE=6,84
 $\bar{X}=68\pm 3$

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en muestras 2 y 3, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest.

- Calibración

R	0,9993
M	13140,93
B	61,75

Tabla 66. Calibración para protocolo de yogur en muestras 2 y 3, con dilución 1:2 de las muestras y LAC 1, con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest.

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

➤ Medidas

Muestras	Concentración (mg/l)	
	Muestra 2	Muestra 3
1	20 → 40	9 → 18
2	15 → 30	7 → 14
3	24 → 48	13 → 26
4	19 → 38	14 → 28
5	18 → 36	14 → 28

Tabla 67. Medidas para protocolo de yogur en muestras 2 y 3, con dilución 1:2 de las muestras y LAC 1, con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest.



DE=6,54

$\bar{X}=38\pm 3$



DE=6,42

$\bar{X}=23\pm 3$

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en muestra 3, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.

➤ Calibración

R	0,9999
m	15845,61
b	27,45

Tabla 68. Calibración para protocolo de yogur en muestra 3, con dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.

➤ Medidas

Muestra 3	Concentración lactosa (mg/l)
1	23 → 46
2	29 → 58
3	28 → 56
4	26 → 52
5	23 → 46

Tabla 69. Medidas para protocolo de yogur en muestra 3, con dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.



DE=5,55

$\bar{X}=52\pm 2$

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en muestra 2, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest.

➤ Calibración

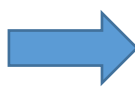
R	0,9999
m	17353,45
b	41,69

Tabla 70. Calibración para protocolo de yogur en muestra 2, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest.

➤ Medidas

Muestra 2	Concentración lactosa (mg/l)
1	45 → 90
2	47 → 94
3	40 → 80
4	38 → 76
5	43 → 86

Tabla 71. Medidas para protocolo de yogur en muestra 2, dilución 1:2 de muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest

 DE=7,29
 $\bar{X}=85\pm 3$

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en muestras 1, 2 y 3, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.

➤ Calibración

R	0,9997
m	16371,52
b	49,79

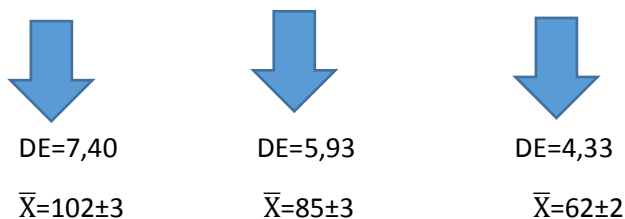
Tabla 72. Calibración para protocolo de yogur en muestras 1, 2 y 3, con dilución 1:2 de muestras y de LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

➤ Medidas

Muestras	Concentración (mg/l)		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
1	48 → 96	39 → 78	32 → 64
2	53 → 106	47 → 94	29 → 58
3	46 → 92	41 → 82	28 → 56
4	52 → 104	43 → 86	32 → 64
5	55 → 110	43 → 86	33 → 66

Tabla 73. Medidas para protocolo de yogur en muestras 1, 2 y 3, con dilución 1:2 de muestras y de LAC, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.



- ❖ Resultado del protocolo de yogur en muestras 1 y 2, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.

➤ Calibración

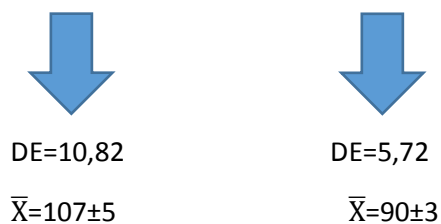
R	0,9996
m	16335,27
b	35,15

Tabla 74. Calibración para protocolo de yogur en muestras 1 y 2, con dilución 1:2 de las muestras y de LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.

➤ Medidas

Muestras	Concentración (mg/l)	
	Muestra 1	Muestra 2
1	54 → 108	45 → 90
2	59 → 118	41 → 82
3	57 → 114	44 → 88
4	52 → 104	49 → 98
5	45 → 90	45 → 90

Tabla 75. Medidas para protocolo de yogur en muestras 1 y 2, con dilución 1:2 de las muestras y de LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.



“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en muestra 2, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest.

- Calibración

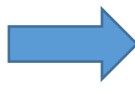
R	0,9999
m	16481,63
b	60,65

Tabla 76. Calibración para protocolo de yogur en muestra 2, con dilución 1:2 de muestra y de LAC 1, con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest.

- Medidas

Muestra 2	Concentración lactosa (mg/l)
1	44 → 88
2	42 → 84
3	41 → 82
4	44 → 88
5	42 → 84

Tabla 77. Medidas para protocolo de yogur en muestra 2, con dilución 1:2 de muestra y de LAC 1, con ajuste de glucosa y 24 horas de hidratación del Biotest.

 $DE=2,68$
 $\bar{X}=85\pm 1$

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en muestra 3, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.

- Calibración

R	0,9999
m	13270,75
b	42,82


Tabla 78. Calibración para protocolo de yogur en muestra 3, con dilución 1:2 en muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.

“Puesta a punto de metodologías analíticas de lactosa en bases lácteas”

➤ Medidas

Muestra 3	Concentración lactosa (mg/l)
1	43 → 86
2	41 → 82
3	33 → 66
4	46 → 92
5	43 → 86

Tabla 79. Medidas para protocolo de yogur en muestra 3, con dilución 1:2 en muestra y LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.


 $DE=9,84$
 $\bar{X}=82\pm 4$

- ❖ Resultados del protocolo de yogur en muestras 2 y 3, dilución 1:2 (muestra y LAC1) Con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.

➤ Calibración

R	0,9996
m	12691,56
b	40,33

Tabla 80. Calibración para protocolo de yogur en muestras 2 y 3, con dilución 1:2 de las muestras y de LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.

➤ Medidas

Muestras	Concentración (mg/l)	
	Muestra 2	Muestra 3
1	47 → 94	33 → 66
2	51 → 102	38 → 76
3	46 → 92	36 → 72
4	51 → 102	39 → 78
5	53 → 106	34 → 68

Tabla 81. Medidas para protocolo de yogur en muestras 2 y 3, con dilución 1:2 de las muestras y de LAC 1, con ajuste de glucosa y 48 horas de hidratación del Biotest.

	
$DE=5,93$	$DE=5,09$
$\bar{X}=99\pm 3$	$\bar{X}=72\pm 2$

ANEXO 10
RESULTADOS LABER YOGUR



Informe de Ensayo
PRODUCTO LACTEO

Muestra: A / 99160 -1

Identificación del Cliente	
Nombre Fiscal CAPSA FOOD	Dirección
Nombre Claf.	
Teléfonos	ASTURIAS
Fax	0

Identificación de la Muestra			
Tomador muestra	FACILITADO CLIENTE	Fecha Toma Muestra	28/02/2017
Tipo de envase	FACILITADO CLIENTE	Fecha Recepción	28/02/2017
Método toma de muestra	MUESTRA FACILITADA POR EL CLIENTE	Fecha Inicio Análisis	01/03/2017
Estado a la recepción	CONFORME	Fecha Final Análisis	03/03/2017
Nº Hoja de Entrada	EMC-1392-280217	Fecha Emisión Informe	06/03/2017
Descripción de la muestra	YOGUR NATURAL AZUCARADO SIN LACTOSA		
Origen / Lote	Mynewgum7		
	28/03		
	06:29:22		
	052H		

Rev 01: Este informe anula y sustituye al informe código A99160 que fue emitido con fecha 03/03/2017

Parámetros	Método / PNT	Min / Max	Resultado	Uds
LACTOSA	ELECTROENZIMÁTICO / LOR/A L/PT/0014		89 ±23,1	mg/l

Figura 12. Resultados LABER para yogur (muestra 3).

ANEXO 11

CÁLCULOS REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

❖ Para la réplica 1:

$$\frac{122 \text{ mg lactosa}}{L \text{ disolución}} \times \frac{1 \text{ L disolución}}{1000 \text{ mL disolución}} \times \frac{3 \text{ mL disolución}}{1 \text{ mL fase líquida}} \times \frac{1 \text{ mL fase líquida}}{1 \text{ g fase líquida}} \times \frac{88 \text{ g fase líquida}}{988 \text{ g totales}} \times \frac{911 \text{ g mantequilla}}{1 \text{ L mantequilla}} = 30 \text{ mg lactosa/L}$$

❖ Para la réplica 2:

$$3 \times 117 \text{ mg lactosa/l} \times \frac{0,190 \text{ l fase líquida}}{1,085 \text{ L totales}} = 63 \text{ mg lactosa/L}$$

ANEXO 12

TRATAMIENTO DE DATOS DE LAS PRUEBAS 2, 3 Y EL BLANCO DE MANTEQUILLA

Si se tiene en cuenta que el peso total de la mantequilla de la prueba 2 es 982,8 g y considerando el porcentaje de fase líquida presente en el volumen total de la mantequilla, se llega al siguiente resultado:

❖ Para la prueba 2 sin centrifugar:

$$\frac{45 \text{ mg lactosa}}{L \text{ disolución}} \times \frac{1 \text{ L disolución}}{1000 \text{ mL disolución}} \times \frac{3 \text{ mL disolución}}{1 \text{ mL fase líquida}} \times \frac{1 \text{ mL fase líquida}}{1 \text{ g fase líquida}} \times \frac{139,5 \text{ g fase líquida}}{982,8 \text{ g totales}} \times \frac{911 \text{ g mantequilla}}{1 \text{ L mantequilla}} = 17 \text{ mg lactosa/L}$$

❖ Para la prueba 2 centrifugada:

$$\frac{51 \text{ mg lactosa}}{L \text{ disolución}} \times \frac{1 \text{ L disolución}}{1000 \text{ mL disolución}} \times \frac{3 \text{ mL disolución}}{1 \text{ mL fase líquida}} \times \frac{1 \text{ mL fase líquida}}{1 \text{ g fase líquida}} \times \frac{139,5 \text{ g fase líquida}}{982,8 \text{ g totales}} \times \frac{911 \text{ g mantequilla}}{1 \text{ L mantequilla}} = 20 \text{ mg lactosa/L}$$

❖ Blanco= 15% de 972,5 g totales

$$\frac{184 \text{ mg lactosa}}{L \text{ disolución}} \times \frac{1 \text{ L disolución}}{1000 \text{ mL disolución}} \times \frac{50 \text{ mL disolución}}{0,193 \text{ mL fase líquida}} \times \frac{1 \text{ mL fase líquida}}{1 \text{ g fase líquida}} \times \frac{145,8 \text{ g fase líquida}}{972,5 \text{ g totales}} \times \frac{911 \text{ g mantequilla}}{1 \text{ L mantequilla}} = 6510 \text{ mg lactosa/L}$$

❖ Prueba 3= 13% de 980,6 g totales

$$\frac{160 \text{ mg lactosa}}{L \text{ disolución}} \times \frac{1 \text{ L disolución}}{1000 \text{ mL disolución}} \times \frac{50 \text{ mL disolución}}{0,222 \text{ mL fase líquida}} \times \frac{1 \text{ mL fase líquida}}{1 \text{ g fase líquida}} \times \frac{127,5 \text{ g fase líquida}}{980,6 \text{ g totales}} \times \frac{911 \text{ g mantequilla}}{1 \text{ L mantequilla}} = 4268 \text{ mg lactosa/L}$$

ANEXO 13
RESULTADOS LABER MANTEQUILLA



Informe de Ensayo
ANALISIS DE ALIMENTOS

Muestra: A/ 99161 -1

Identificación del Cliente	
Nombre Fiscal	CAP SA FOOD
Nombre Cial.	
Teléfonos	
Fax	
Dirección	ASTURIAS
	0

Identificación de la Muestra			
Tomador muestra	FACILITADO CLIENTE	Fecha Toma Muestra	28/02/2017
Tipo de envase	FACILITADO CLIENTE	Fecha Recepción	28/02/2017
Método toma de muestra	MUESTRA FACILITADA POR EL CLIENTE	Fecha Inicio Análisis	01/03/2017
Estado a la recepción	CONFORME	Fecha Final Análisis	03/03/2017
Nº Hoja de Entrada	EMC-1392-280217	Fecha Emisión Informe	06/03/2017
Descripción de la muestra	Mantequilla sin lactosa en envase de mantequilla tradicional.		
Origen / Lote	M ynewgut48		
FECHA CADUCIDAD	27-04-17		
	L-148-16		
	06:44:03		

Rev 01: Este informe anula y sustituye al informe código A99161 que fue emitido con fecha 03/03/2017

Parámetros	Método / PNT	Min / Max	Resultado	Uds
ALERGENO LACTOSA	ESPECTROFOTOMÉTRICO / LOR/AL/PT/007		0,029	% m/m

Figura 13. Resultados LABER para mantequilla (Prueba 1).

