UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Desarrollo de un proceso de producción-separación de galactooligosacáridos mediante un sistema acuoso de dos fases asistido por microondas

I Q MSc Germán Andrés Castro Moreno

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2020

Desarrollo de un proceso de producción-separación de galactooligosacáridos mediante un sistema acuoso de dos fases asistido por microondas

Germán Andrés Castro Moreno

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ingeniería Química

Director:

Dr. Ing. Juan Carlos Serrato Bermúdez

Línea de Investigación:

Bioprocesos

Grupo de Investigación:

Grupo de investigación en procesos químicos y bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C, Colombia

2020

A mi amada esposa Lina Huari, por su amor, apoyo, paciencia y comprensión. A mis lindas hijas Juliana, Andrea y Alejandra quienes siempre están ahí dispuestas a ayudar y por su bonita manera de quererme. A mis papás Lira y Germán, por su preocupación. A mis hermanos Jobana, Santiago y Sergio por ayudar a hacer más llevaderas las cosas. A mis sobrinos Nicolás, Ángela María y Sebastián, a mis cuñadas(os) Erika, Paola, René, Oscar, Jairo y Natalia. A mis suegros René y Carmenza por su interés. A mis demás familiares, tíos, primos. A mis amigos que me acompañaron e hicieron muy divertido el tiempo que ha durado esta etapa.

Agradecimientos

A Colciencias y Colfuturo, que por medio de la Convocatoria 567, permitieron el desarrollo de los estudios de doctorado.

Al Ingeniero Dr. Ing. Juan Carlos Serrato Bermúdez, por su colaboración, valiosos aportes y sobre todo por su amistad incondicional.

Al Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, junto con todo su personal por brindarme el apoyo y las facilidades de formación en pregrado, maestría y ahora doctorado.

A la Universidad de La Salle, por el apoyo brindado para mis estudios de doctorado.

A mis compañeros del posgrado en Ingeniería Química: Mario, Fabián, Adriana, Eliana, Astrid, Paola, por su amistad, colaboración y momentos agradables.

A mis amigos de la Universidad de La Salle: Sonia, Liliana, Ismael y Ángela, por su amistad, colaboración y apoyo.

A los profesores del ICTA UN Carlos Novoa y Luis Felipe Gutiérrez, por la colaboración con el préstamo del equipo de Microondas.

A los profesores Kirk Dolan y Muhammad Siddiq de Michigan State University, por la colaboración durante la pasantía.

Al Ingeniero PhD Rubén Godoy por la ayuda con el préstamo del Cytation Cell imaging multi-mode reader.

A Ana Rosa Salamanca, por su colaboración con diferentes trámites administrativos.

A Ricardo, Oscar y Edgar, del LIQ, por su colaboración en diferentes etapas de la ejecución experimental del proyecto.

Resumen

Los GOS (Galactooligosacáridos) son carbohidratos con una molécula de glucosa unida a 2-5 moléculas de galactosa. Los GOS son prebióticos y se obtienen industrialmente mediante reacciones enzimáticas. Los GOS son producidos a partir de lactosa, ya sea en estado puro o haciendo parte del suero de quesería, el cual debe presentar un contenido de lactosa superior al 70% (m/m). La reacción de hidrólisis rompe la lactosa en glucosa y galactosa, que reacciona para formar GOS, a través de la reacción de transgalactosilación, estas dos reacciones suceden simultáneamente, ya que una se nutre de la otra. La presencia de estos monosacáridos inhibe la última reacción y disminuye la producción de GOS.

Los sistemas acuosos de dos fases (SADF) pueden usarse para separar una mezcla de sustancias de acuerdo con su afinidad preferencial por una de las dos fases en este sistema. Estos sistemas están formados por dos polímeros o una sal y un polímero disueltos en agua en una concentración específica para producir la separación de fases. Hay muchos factores que afectan esta operación, como el pH, la temperatura, el polímero, la concentración de sales y sustancias, el peso molecular del polímero y la relación polímero / sal. El SADF puede usarse para separar los monosacáridos inhibidores de la mezcla de GOS.

La irradiación de microondas ha mostrado un efecto positivo en la separación por SADF y se ha utilizado para mejorar la reacción de producción de GOS a partir de lactosa.

El SADF se utilizó en este trabajo para producir y separar GOS simultáneamente. El medio de reacción estaba formado por lactosa a diferentes concentraciones, polietilenglicol (PEG) y citrato de sodio para formar el SADF, pH de 4.5 a 5.5, las temperaturas probadas estuvieron entre 40 y 60 ° C. Se evaluó el efecto de la irradiación de microondas sobre la reacción, la separación por SADF y la reacción - separación simultáneas.

Se establecieron todas las condiciones del SADF que produjeron resultados optimizados, que se expresaron como coeficiente de partición, rendimiento de separación, selectividad para GOS y rendimiento de reacción. La selectividad para GOS aumentó más del 40%, en relación con el medio convencional (buffer + lactosa), el rendimiento de la reacción no cambió estadísticamente. La separación de la mezcla de carbohidratos fue de acuerdo con su peso molecular, las sustancias más pesadas (GOS) se mantuvieron principalmente en la fase inferior (citrato de sodio), mientras que los monosacáridos migraron en mayor medida a la fase superior (PEG).

Los resultados optimizados de reacción, separación y separación simultánea de reacción se probaron en irradiación de microondas. El rendimiento, la producción, la selectividad y la productividad disminuyeron con la acción de microondas.

Palabras clave: Galactooligosacáridos, Sistema acuoso de dos fases, transgalactosilación, microondas, reacción-separación simultáneas.

Abstract

GOS are carbohydrates with a glucose molecule linked to 2-5 molecules of galactose. GOS are prebiotics and are industrially obtained by enzymatic reactions. GOS are produced from lactose, it might be pure or as part of cheese whey with a lactose content higher than 70%. Hydrolysis reaction breaks lactose into glucose and galactose, which reacts to form GOS, through transgalactosylation reaction; those reactions occur simultaneously because each one depends of the other. Monosaccharides inhibit transgalactosylation reaction and decrease the GOS production.

Aqueous two phase system (ATPS) could be used to separate a mixture of substances according to its preferential affinity to one of the two phases in this system, it is formed by two polymers or a salt and a polymer dissolved in water upon a specific concentration to produce phase separation. There are many factors affecting this operation like pH, temperature, polymer, salt and substances concentration, molecular weight of polymer and polymer / salt ratio, ATPS could be used to separate inhibitor monosaccharides, from GOS mixture.

Microwave irradiation has shown a positive effect on ATPS separation and has been used to improve GOS production reaction from lactose.

ATPS was used in this work to produce and separate galactooligosaccharides simultaneously. Reaction medium was formed by lactose at different concentrations, polyethyleneglycol (PEG) and sodium citrate to form ATPS, pH of 4.5 – 5.5, temperatures tested were between 40 - 60°C. Was evaluated the effect of microwave irradiation on reaction, ATPS separation and simultaneous reactions-separation conditions.

Were stablished all conditions in ATPS that produced optimized results, which were expressed as partition coefficient, separation yield, selectivity to GOS and reaction yield. Selectivity to GOS raise up more than 40%, relative to conventional medium, reaction yield did not change statistically. Separation of carbohydrates mixture is according to its

molecular weight, heaviest substances (GOS) kept mainly in the bottom phase (sodium citrate), while monosaccharides kept in top phase (PEG) mainly.

Optimized results of reaction, separation and simultaneous reaction-separation were tested into microwave irradiation. Yield, production, selectivity and productivity were increased with microwave action.

Keywords: Galactooligosaccharides, aqueous two phase system, transgalactosylation, microwave, simultaneous reaction-separation

Contenido

Page

Introducción *1*

1. Evaluación de un proceso de producción-separación de galactooligosacáridos mediante un sistema acuoso de dos fases asistido por microondas *5*

2. Evaluación de β-galactosidasas fúngicas en la producción de galactooligosacáridos *35*

3. Evaluación de un sistema acuoso de dos fases (SADF) para la separación de galactooligosacáridos (GOS) *63*

4. Optimización de las condiciones de producción de galactooligosacáridos (GOS) usando un sistema acuoso de dos fases (SADF) *89*

5. Evaluación del efecto de la radiación de microondas en un sistema acuoso de dos fases (SADF) para la producción de galactooligosacáridos (GOS) *114*

6. Conclusiones *133*

7. Recomendaciones *135*

8. Anexos *137*

Lista de figuras

Pág.

Figura 1.1 *Mecanismo de reacción para β-galactosidasa* 15
Figura 1.2 *Esquema para la conversión extractiva en SADF* 22
Figura 2.1 *Efecto del pH sobre la concentración de oNP[mmol oNP] para las tres enzimas a) Enzeco, b) EB-GLAN ,c) Maxilact A4 , T=40ºC, E/S*=3 g proteína /g oNPG.* 44
Figura 2.2 *Efecto del tipo de enzima y E/S* sobre la actividad hidrolítica específica [µmol oNP.g proteína^{-1}.min^{-1}] a T=40ºC, 15 min., pH 4.* 45
Figura 2.3 *Actividad hidrolítica específica con lactosa [µmol glucosa. mg proteína^{-1}.min^{-1}] a T=40ºC, 15 min., pH 4* 47
Figura 2.4 *Hidrólisis de lactosa vs tiempo para a) Enzeco, b) EBGLAN y c) Maxilact A4. pH 4, T=40ºC, E/S*=3 g proteína /g oNPG.* 48
Figura 2.5 *Cinética de la reacción de transgalactosilación para Enzeco, Maxilact A4 y EBGLAN a las mejores condiciones evaluadas para cada una de ellas. a) Lactosa, b) Glucosa, c) Galactosa y d) GOS* 51
Figura 2.6*. Gráfica de optimización de producción de GOS (g/L) con Minitab 16, para las enzimas a) Enzeco , b) Maxilact , c) EBGLAN.* 55
Figura 3.1 *Esquema de desarrollo experimental. DE: Diseño de experimentos, FC: Factorial completo, PB:Plackett.Burman, CC: Central compuesto, BB: Box Behnken.et al.* 69
Figura 3.2 *Zonas de evaluación próximas de la curva binodal para MWPEG 6000 y 4000* 71
Figura 3.3 *Coeficiente de partición (K) para GOS4, GOS3, lactosa, glucosa y galactosa.* 72
Figura 3.4*. Coeficiente de partición (K) para GOS4, GOS3, lactosa, glucosa y galactosa a diferentes tiempos de muestreo, 2, 4, y 6 h.* 74
Figura 3.5*. Grafica de caja – efecto de la agitación y la centrifugación sobre el coeficiente de partición para GOS3.* 75
Figura 3.6*. Efectos principales del diseño de tamizado sobre R.* 76
Figura 3.7*. Gráfica de cajas para* $R = KGOS.LAC \ / \ SMONO.S$ *en las 6 zonas.* 78
Figura 3.8*. Optimización de* $R = KGOS.LAC \ / \ SMONO.S$ 80
Figura 4.1 *Coeficiente de partición de lactosa a 25 y 50˚C y a diferentes concentraciones (%) de citrato de sodio – PEG.* 96
Figura 4.2 *Diagrama de Pareto de efectos estandarizados del diseño de experimentos de Plackett-Burman, para R.* 97

Figura 4.3 *Gráfica de efectos principales del Diseño factorial 2^3+3, para R.* 100
Figura 4.4 *Superficie de respuesta para la minimización de R, según el diseño de experimentos de Box Behnken*..... 101
Figura 5.1 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante sobre la producción de GOS (mg/g).*..... 120
Figura 5.2 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante sobre la productividad de GOS (mg/g.min) y la conversión (fracción).* 121
Figura 5.3 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante sobre el rendimiento de GOS (fracción) y la conversión (fracción).* 122
Figura 5.4 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante y de la agitación sobre R=KGOS LAC / SMONO T.* 123
Figura 5.5 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante y de la agitación sobre la distribución de GOS, lactosa Y monosacáridos en las dos fases del SADF.*..... 126
Figura 5.6 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante y de la agitación sobre la producción de GOS en un SADF como medio de reacción.*..... 127
..... 128
Figura 5.8 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante y de la agitación sobre R=KGOS LAC / $SMONO_S$, en la reacción –separación de GOS.* 129
Figura A3.1 *Actividad enzimática de Enzeco*..... 146
Figura A3.2 *Actividad enzimática de EBGLAN* 146
Figura A3.3 *Actividad enzimática de Maxilact A4* 147

Lista de tablas

Pág.

Tabla 2.1 *E/S* relación entre la masa de proteína (g) en la enzima y la masa de oNPG (g) para Enzeco, Maxilact A4 y EBGLAN.* 38
Tabla 2.2 *Factores y niveles en diseño de experimentos de Box Behnken.* 41
Tabla 2.3 *Actividad hidrolítica (ALU/g) para las enzimas empleadas.* 42
Tabla 2.4 *Actividad de transgalactosilación (µmol de GOS.min^{-1}.g enzima^{-1})* 49
Tabla 2.5 *Productividad y rendimiento de GOS.* 52
Tabla 2.6 *Resultados de la optimización usando el software Minitab 16.* 54
Tabla 3.1 *Condiciones evaluadas en el diseño de experimentos de Plackett-Burman.* ... 70
Tabla 3.2 *Condiciones evaluadas en la optimización gruesa, factorial* 22 *en las seis zonas definidas.* 77
Tabla 3.3 *Resultado de la validación experimental del modelo optimizado.* 81
Tabla 4.1 *Tratamientos del diseño de experimentos Plackett-Burman 12 + 3 repeticiones en el punto central..* 93
Tabla 4.2 *Coeficientes de partición de la enzima y fracción de reparto* 98
Tabla 4.3 *Comparación de dos trabajos de producción de GOS usando un SADF como medio de reacción.* 104
Tabla 4.4 *Comparación de producción de GOS en un medio de reacción convencional y un SADF.*: datos del primer capítulo de este documento. FI: fase inferior.* ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Generalidades y estructura de la tesis

Los galactooligosacáridos (GOS) son productos prebióticos, por lo cual han ganado importancia en los últimos años debido a las tendencias de alimentación saludable y al consumo de alimentos que además de nutrir posean actividad funcional. La producción de los GOS a nivel industrial se lleva a cabo con enzimas que varían su desempeño en función de la fuente y de sus condiciones de reacción. Las β-galactosidasas son las enzimas más utilizadas con este fin, porque algunas de ellas poseen el carácter GRAS (Generally recognized as safe), son de relativo bajo costo y fácil consecución.

Posterior a la reacción se dan las operaciones de purificación de los GOS hasta llevarlos a la concentración del producto comercial, el cual podrá permitir mayores o menores niveles de mono y disacáridos (máximos cercanos al 50% en productos comerciales), hasta niveles mínimos en alimentos no calóricos o para diabéticos.

El costo de un producto biotecnológico depende principalmente de la purificación del mismo, se menciona que hasta un 60% aproximadamente del costo total es atribuido a esta etapa del proceso. Esto hace de la selección de las operaciones de purificación un punto clave que viabiliza económicamente la implementación a gran escala de un proceso biotecnológico, lo cual es más crítico en un país como el nuestro, donde el capital de riesgo para investigación y transferencia es limitado.

En el caso de los GOS, se han empleado técnicas cromatográficas, separaciones con membranas, tecnología de fluidos supercríticos, sistemas enzimáticos mixtos, fermentaciones selectivas, precipitación con etanol y adsorción con carbón activado que tienen en general mayores desventajas que ventajas en cuanto a los costos necesarios. Por otro lado, los sistemas acuosos de dos fases (SADF), se han utilizado como medio de reacción-separación en la producción de GOS, mejorando rendimientos y selectividad

respecto a sistemas convencionales, en la purificación de proteasas, amilasas, galactosidasas, entre otras biomoléculas.

La técnica de separación por sistemas acuosos de dos fases SADF, es una técnica que parte de la formación de un sistema de dos fases acuosas. Este puede resultar de la mezcla de dos polímeros o un polímero y una sal por encima de determinadas concentraciones.

Los sistemas polímero/sal son los más comunes por su efectividad para separar los productos de reacciones enzimáticas, las cuales pueden utilizar el SADF como medio de reacción, haciendo de este un proceso intensificado.

La aplicación de SADF en reacciones enzimáticas presenta ventajas, de las cuales se pueden destacar los bajos requerimientos de espacio y tiempo, la facilidad de escalamiento y bajo costo, flexibilidad para la operación en continuo, efectividad de remoción de polisacáridos, fácil adopción de equipos y métodos usados en la extracción líquida con solventes orgánicos, efectividad en la recuperación primaria de proteínas (enzimas), reducción del volumen de la corriente de proceso que se maneja en las operaciones de purificación posteriores al SADF y reducción de la inhibición por producto o sustrato al disminuir la concentración de estos en la fase donde gobierna la enzima.

En la bioconversión en SADF, las fases permanecen estáticas y los fenómenos de transferencia de masa se dan por difusión hacia y desde las enzimas y entre las fases, caracterizándose por ser lentos y menos efectivos que los fenómenos convectivos. Este inconveniente se acrecienta cuando las altas concentraciones de sustrato requeridas en la reacción de transgalactosilación, junto con la sal y el polímero, hacen que el medio de reacción sea muy concentrado y viscoso. Cualquier acción que promueva los movimientos a nivel molecular mejorará la difusión, la separación y la cinética de reacción. Este es el caso de las microondas que promueven la rotación y vibración de las moléculas de las sustancias polares, como el agua, dando pie a proponer la irradiación con microondas como una estrategia para mejorar el rendimiento de la reacción-separación por SADF, además por tratarse de una técnica con conocidas ventajas ambientales, costos y posibilidad de escalamiento.

La bioconversión en sistemas acuosos de dos fases asistida por microondas, ha sido evaluada para la extracción de compuestos naturales de plantas (colorantes,

antioxidantes, compuestos fenólicos, entre otros), mostrando efectos positivos en cuanto a rendimiento y tiempo de extracción, respecto a las técnicas sin aplicación de microondas .

Se observan las ventajas por separado de la bioconversión en SADF en la producción-separación de GOS y de la aplicación de microondas en la síntesis de GOS, razón por la cual en esta investigación se planteó desarrollar un proceso de reacción-separación en dos fases acuosas asistido por microondas, como una alternativa que pueda traer consigo los beneficios de las técnicas anteriores, potenciados por su combinación.

En concreto se planteó evaluar un proceso de producción-separación de GOS mediante un sistema acuoso de dos fases asistido por microondas, como objetivo general. Para alcanzar este objetivo se inició definiendo las condiciones adecuadas (pH, temperatura, concentración de enzima y sustrato) de síntesis enzimática de GOS como punto de referencia del proceso a desarrollar. Posteriormente se establecieron experimentalmente las condiciones de operación óptimas del sistema acuoso de dos fases (SADF) para la separación de GOS. Seguidamente se optimizó el proceso simultáneo de reacción-separación de GOS con SADF como medio reaccionante y finalmente se estableció el efecto de las microondas sobre la reacción de producción de GOS, sobre la separación y sobre la reacción-separación simultáneas.

Este documento está organizado en cinco capítulos, en el primero se presenta el fundamento teórico que respalda el desarrollo del trabajo. En el segundo capítulo se presenta la optimización de las condiciones de reacción para tres enzimas comerciales evaluadas en la producción de GOS, esto sirvió para seleccionar la mejor de ellas para usarla en las etapas posteriores del trabajo. En el capítulo tres se muestran los resultados de la optimización de la separación de una mezcla comercial de GOS con un SADF. El capítulo cuatro presenta la optimización de la reacción-separación simultánea por SADF para GOS. El quinto y último capítulo muestra el efecto de las microondas sobre los tres procesos anteriores.

1. Evaluación de un proceso de producción-separación de galactooligosacáridos mediante un sistema acuoso de dos fases asistido por microondas

1.1 Introducción

Los galactooligosacáridos (GOS) son carbohidratos que presentan una molécula de glucosa unida a varias de galactosa (de 2 a 8 aproximadamente) a las que se les ha comprobado un efecto prebiótico. Los GOS son similares a los oligosacáridos de la leche materna, los cuales cumplen un importante papel en el desarrollo intestinal del recién nacido (Vera, C., *et al.*, 2016). Estos compuestos son sintetizados por medio de reacciones enzimáticas simultáneas de hidrólisis y transgalactosilación a partir de lactosa o alguna fuente de esta como el lactosuero. Por ello, se pueden convertir en una alternativa de negocio muy interesante, ya que a partir de materias primas de bajo costo y que generalmente son un problema para la industria láctea, se puede producir un compuesto de valor agregado importante.

Los GOS son aditivos utilizados en la formulación de alimentos a los que se les quiere proporcionar o mejorar su capacidad prebiótica. Adicionalmente poseen mejores propiedades (mayor resistencia a altas temperaturas y a bajos pHs, incoloro, etc) con respecto a sus homólogos como la inulina y los fructooligosacáridos (Shoaf *et al.*, 2006). Estas características los hacen más convenientes para ser aplicados en ciertos alimentos, por ejemplo en productos incoloros y aquellos que son sometidos a tratamientos térmicos fuertes como esterilización (compotas), lácteos sometidos a proceso UHT, productos horneados, para devolver características texturales a alimentos descremados, entre otros. De igual forma en alimentos ácidos, como néctares de frutas ácidas (naranja, maracuyá) o lácteos fermentados y en agua pura o saborizada. Estas ventajas abren un amplio abanico de posibilidades sobre el uso potencial de este tipo de productos, lo que hace que los GOS sean más apreciados que los otros prebióticos (Lamsal, 2012).

Los GOS han sido reconocidos como un aditivo alimentario GRAS (Generally Recognized as Safe), por la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos, son componentes de la leche materna y yogures tradicionales y son producidos a partir de la lactosa ingerida por las bacterias residentes en el intestino. No se les ha demostrado ninguna toxicidad ni mutagenicidad, el único efecto adverso conocido hasta ahora es la diarrea transitoria que ocurre cuando son consumidos en exceso (cantidades de GOS superiores a 0,3-0,4 g/kg de peso corporal por día (Sako, T., *et al.,* 1999).

Debido a las razones comentadas, los GOS tienen un valor comercial mayor (13-27 USD/kg) frente a los correspondientes a la inulina (5-10) y los fructooligoosacáridos (FOS) (8-15 USD/kg), todos ellos en polvo con pureza entre 80 y 90%. Adicionalmente, el mercado global de GOS fue de 94,1 miles de toneladas en 2013 y se esperaba que alcanzara los 175,7 miles de toneladas para el presente año, con un crecimiento anual del 9,3% entre 2014 y 2020 (https://www.globenewswire.com).

En Colombia no se producen ni se importan GOS, pero se consumen incorporados principalmente en leches maternizadas. Este consumo y la posibilidad de adicionarlos en productos donde otros prebióticos no pueden ser usados muestran la posibilidad de un mercado amplio. Por ello, Colombia de acuerdo a la tendencia internacional observada, que pronostica un aumento del 9,3% en el cosumo de GOS, para el presente año (https://www.globenewswire.com), tarde o temprano iniciará la demanda de GOS, como producto intermedio en industrias como la de lácteos, alimentos para bebés e infantes, bebidas, alimentos para diabéticos y alimentos bajos en calorías.

Una posible materia prima de bajo costo para la producción de los GOS es el suero lácteo o lactosuero, este resulta de la coagulación de la leche por acción enzimática y es una sustancia rica en lactosa (46 a 52 g/L), ya que contiene más del 95% de la lactosa original de la leche, razón por la cual es muy usado como fuente de este disacárido (Guío, F., 2015).

En Colombia, en el año 2018 la cantidad de leche producida fue de aproximadamente 7257 millones de litros, parte de los cuales se destinaron a la producción de queso (https://www.fedegan.org.co/estadisticas/documentos-de-estadistica). La cantidad producida de queso fue tal que se generaron 2033 millones de litros de suero en el 2013, de los cuales se estima que el 70% se utilizó como alimentación animal o fue vertido como efluente líquido (Muset, G., Castells, M., 2017), lo que pudo haber afectado de manera importante el ambiente

circundante, debido a que esta corriente presenta una DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) de 40000 a 50000 mg de O_2/L.

La producción industrial de GOS se realiza por vía enzimática a partir de lactosa con enzimas provenientes de *Kluyveromyces* y *Aspergillus* que cuentan con la certificación GRAS, y de igual forma que en la mayoría de procesos biotecnológicos las etapas de purificación implican la mayoría de los costos de producción (Doran, P., 1995).

En este caso existe una gran variedad de operaciones de purificación, entre las que se puede mencionar ultrafiltración, nanofiltración, cromatografía, adsorción con carbón activado, fermentación de mono y disacáridos, etc (Scott, F., *et al.*2016); sin embargo, aún se sigue investigando en este tema tratando de mejorar la eficiencia técnica y económica.

Dentro de esos esquemas de separación, los sistemas acuosos de dos fases (SADF) son eficientes para muchos tipos de ensayos, especialmente para la concentración y purificación de biomoléculas (Iqbal *et al.*, 2016) y tienen ventajas sobre las técnicas convencionales de separación como constituirse en medios de reacción y separación simultánea, ser respetuosos con el medio ambiente, de bajo costo, poseer la capacidad de operar en continuo, facilidad de escalamiento, entre otras.

La formación de los SADF implican un proceso de separación de fases, para lo cual se deja la mezcla en reposo, haciendo que los fenómenos difusivos cobren gran importancia, de tal manera que vale la pena evaluar cualquier esfuerzo por mejorar la movilidad desde el nivel micro (Nagaraj, N., *et al.*, 2003), ese es el caso de las microondas que como se sabe hacen vibrar las moléculas de agua (Polshettiwar, V. & Varma, R., 2010), lo cual puede beneficiar el desempeño de la reacción-separación en SADF, al incrementar la difusividad y la interacción enzima sustrato. Adicionalmente los antecedentes muestran que el uso de microondas favorece la separación de fases (Nagaraj, N., *et al.* 2003) y la producción de GOS (Maugard *et al.*, 2003).

La producción de GOS ha cobrado interés en los últimos años gracias a sus propiedades, lo cual ha redundado en un incremento en su demanda, principalmente en Europa y permite vislumbrar un futuro prometedor para este tipo de productos. Razón por la cual esta temática se ha tornado de interés y es pertinente de ser estudiada.

1.2 Generalidades

En el presente capítulo se presentan las bases teóricas que soportan todo el documento, se mencionará primero al lactosuero como materia prima de la reacción enzimática, posteriormente a las enzimas usadas (β-galactosidasas), y por último se amplía la información sobre los GOS, sus propiedades, producción y purificación. En ese punto, el documento se orienta hacia el método de purificación seleccionado: el sistema acuoso de dos fases (SADF) del cual se presentan sus generalidades, características y particularidades que lo hacen un medio de reacción adecuado para algunas bioconversiones enzimáticas como la de producción de GOS. Por último, se mencionan las microondas y su efecto sobre las reacciones enzimáticas, sobre el SADF y sobre el proceso intensificado de producción de GOS empleando SADF. La intensificación de procesos da como resultado procesos económicamente mejorados, ya sea mediante adaptaciones o cambios en las operaciones unitarias o en el diagrama de flujo del proceso, esto permite desarrollar procesos más pequeños, que utilicen nuevas operaciones combinadas de unidades y que pueden operar de modo continuo (Woodley, J., 2017).

1.2.1 Lactosuero

El lactosuero es un subproducto de la producción de queso. Cuando se trata de suero dulce, resultado del cuajado enzimático, se aplica la enzima (cuajo) sobre la leche, ésta actúa sobre la caseína produciendo su coagulación, y los componentes restantes (lactosa, sales minerales, un poco de la grasa y la gran mayoría del agua) quedan en lo que es conocido como lactosuero, del que se generan aproximadamente 9 kg por cada kg de queso. Éste es un líquido amarillo verdoso donde los sólidos están en una concentración de 65 g/L, de los cuales 45 a 50 g/L corresponden a lactosa (Muset, G., Castells, M., 2017).

Este subproducto no es empleado industrialmente en la mayoría de países a pesar de que sus características pueden ser aprovechadas en diversas aplicaciones industriales. Por la presencia de lactosa y materia orgánica en general, el lactosuero en las grandes industrias lácteas colombianas (Alpina, Colanta y Parmalat) es deshidratado para evitar el desarrollo microbiano, hasta llevarlo a estado en polvo. De esta forma es muy usado en la industria de alimentos y es de fácil comercialización, debido a que es una fuente económica de proteína que aumenta el valor nutritivo de muchos alimentos y les brinda propiedades funcionales. Además, las proteínas del suero como la lactoalbúmina pueden recuperarse mediante

ultrafiltración e hidrolizarse para producir varios productos intermedios farmacéuticos (Domingues *et al.*, 2005).

En Colombia aproximadamente el 70% del lactosuero producido (2033 millones de litros en 2013) es vertido al alcantarillado o a otras corrientes de agua creando así un problema ambiental (Muset, G., Castells, M., 2017; Kokkiligadda *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2010), o es usado como fuente de alimentación para cerdos. En los países desarrollados, estos porcentajes se invierten, de tal manera que el 70% se procesa y el 30% se emplea en alimentación animal; muestra de ello es que el mercado global de lactosuero en polvo es de 6.000 millones de dólares (Klotz, B., 2014).

Sin embargo, en Colombia se importaron 13263 t de lactosuero en polvo en 2017 (Contexto Ganadero, 2018), siendo el alimento más importado en cantidad para ese año. Esa demanda podría ser suplida con el lactosuero líquido generado, a partir del cual inclusive podrían producirse 128000 t de lactosuero en polvo incrementando de esta forma la productividad de la cadena láctea.

1.2.2 β-Galactosidasas

1.2.2.1 Definición y Generalidades

Las β-galactosidasas son enzimas que hidrolizan el enlace β-(1,4) de la lactosa y otros galactopiranósidos (Gargova *et al.*2017), razón por la cual también son conocidas como lactasas. Estas enzimas escinden la lactosa en glucosa y galactosa durante el proceso de digestión; por tanto, la deficiencia de éstas conduce a la intolerancia a la lactosa y por ende a la leche y a los derivados lácteos; problema que afecta a cerca del 70% de los adultos a nivel mundial (Saqib *et al.*2017).

*et al.et al.*Además de la reacción de hidrólisis que caracteriza a las lactasas, estas también presentan otro tipo de actividad denominada transgalactosilación, por medio de la cual se generan productos como los galactooligosacáridos, lactulosa y lactosucrosa (Albayrak N., Yang S., 2002, Pocedicova *et al.*2010, *et al.*Wei *et al.*, 2009).

1.2.2.2 Fuentes de β-Galactosidasas

Las β-galactosidasas pueden ser obtenidas de fuentes microbianas, vegetales y animales. Las primeras muestran una mayor productividad y en consecuencia su uso da como resultado una reducción de los costos. La elección del origen a emplear depende básicamente de las condiciones de reacción requeridas; por ejemplo, las β-galactosidasas fúngicas funcionan a un pH óptimo entre 2,5 y 5,4 y se usan principalmente para la hidrólisis de suero de leche ácido, mientras que la β-galactosidasa de levadura muestra una actividad máxima a pH 6,0-7,0 que es más adecuada para la hidrólisis de leche y suero dulce (Saqib *et al.*2017).

A pesar de que a escala comercial e industrial las fuentes de β-galactosidasa más comúnmente usadas son hongos *Aspergillus*, levaduras *Kluyveromyces* y bacterias (*Bacillus y Escherichia)* (Scott, F., *et al.,* 2016).

1.2.2.3 β-Galactosidasas Fúngicas

Las β-galactosidasas fúngicas son enzimas termoestables y, como se mencionó anteriormente, poseen un intervalo de pH óptimo ácido, además son más sensibles a la inhibición por producto principalmente por la galactosa (Boon, Janssen y Van't Riet, 2000).

Las fuentes fúngicas más comunes de β-galactosidasas son *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis* (*Saccharomyces fragilis*) y algunas especies de *Aspergillus* que son aceptadas como GRAS (generalmente reconocidas como seguras) por la FDA (Lewis, 2014). Por ejemplo, *Aspergillus oryzae* produce una β-galactosidasa extracelular que se usa a escala comercial en la hidrólisis de lactosa, mientras que la β-galactosidasa originada por *Aspergillus niger* suele estar involucrada en la eliminación de los residuos de galactosa de los oligosacáridos y polisacáridos derivados de las plantas (Kazemi *et al.*, 2016).

1.2.2.4 Aplicaciones

Las aplicaciones más habituales para las β-galactosidasas están relacionadas con los alimentos, la medicina y la química analítica. En el primer sector los usos se pueden dividir en tres principalmente: la hidrólisis de lactosa, el tratamiento de lactosuero y la producción de galactooligosacáridos (GOS); siendo la primera aplicación muy importante en el procesamiento de los productos lácteos ya que el tratamiento con β-galactosidasas ofrece una

solución al problema de la malabsorción de la lactosa, reduciendo su concentración (Iqbal, M., *et al., 2016,* Rao, M. & Dutta, S., 1978).

Por otro lado, la hidrólisis de lactosa no es utilizada únicamente en la industria alimentaria para fabricar productos sin lactosa, también se usa para mejorar la textura y por la facilidad de digestión de los alimentos. Otros usos incluyen: reducción de la cristalización en helados, leche condensada y arequipe, lo que ocurre debido a la alta concentración de lactosa y su tendencia a formar cristales grandes; reducción del tiempo total requerido para alcanzar el pH adecuado en diversos productos como yogures y requesón; disminución de la necesidad de agregar edulcorantes a los productos debido a la mayor capacidad edulcorante de la glucosa y galactosa respecto a la lactosa, lo que a su vez reduce la cantidad de calorías en el producto final y los costos; y finalmente, los productos de la hidrólisis de lactosa (glucosa y galactosa) fermentan más fácilmente que los disacáridos (lactosa, maltosa, sacarosa), usados comúnmente como fuente de energía en fermentaciones (Domingues *et al.*, 2005).

La segunda aplicación mencionada es el tratamiento del lactosuero, a través del cual este se puede convertir en sustratos fácilmente disponibles para el cultivo celular (Parashar *et al.*, 2016). Adicionalmente, con la hidrólisis de la lactosa allí contenida se pueden obtener una serie de productos como jarabes dulces que se usan en la industria de panadería y confitería.

La tercera aplicación es la producción de galactooligosacáridos (GOS), compuestos con características prebióticas, que se explicarán más adelante.

En el sector médico, se encuentran disponibles en el mercado medicamentos que contienen β-galactosidasa para consumir antes de los productos lácteos (Francesconi *et al.*, 2016). Estos suplementos enzimáticos poseen β-galactosidasas derivadas de hongos, generalmente *Aspergillus* que son estables a pH bajo, lo que permite su correcto funcionamiento en el estómago (Panesar *et al.*, 2007).

Finalmente, la principal aplicación de estas enzimas en la química analítica son los biosensores, herramientas importantes en campos que incluyen inmunoensayos, análisis de toxicología, análisis forense, análisis de expresión génica, identificación de genes, agrodiagnósticos y farmacogenética (Huang *et al.*, 2002; Levicky & Horgan, 2005).

Gracias a todas estas aplicaciones, el mercado mundial de la lactasa para 2017 fue de 1235 millones de dólares y se espera que aumente a 1647 millones para 2025 (https://www.prnewswire.com). De este mercado el 45.8% correspondió a bebidas y alimentos.

1.2.3 Galactooligosacáridos

1.2.3.1 Definición y Generalidades

Los galactooligosacáridos (GOS) son carbohidratos que presentan una unidad de glucosa unida a varias unidades de galactosa (entre 2 y 8) (Gosling *et al.*, 2010). Numerosos estudios han demostrado la capacidad prebiótica de este tipo de compuestos (Torres *et al.*2010, Tzortzis 2009, Shoaf *et al.*2006, Charalampopoulos & Rastall 2012).

1.2.3.2 Propiedades de los Galactooligosacáridos

Propiedades Funcionales

La FFC (Fuctional Food Center) define a un alimento funcional como “alimentos naturales o procesados que contienen compuestos biológicamente activos conocidos o desconocidos; los alimentos, en cantidades definidas, eficaces y no tóxicas, proporcionan un beneficio a la salud para la prevención, el manejo o el tratamiento de enfermedades crónicas.” (Martirosyan, D., & Singh, J., 2015). Los GOS poseen propiedades de este tipo, como las que se mencionan a continuación:

Bifidogenicidad

La bifidogenicidad se define como la capacidad de una sustancia para promover la reproducción, el mantenimiento y el crecimiento de bacterias bifidogénicas, que contribuyen al mejoramiento de la salud intestinal. Los trabajos de Nasir, M. *et al.* (2011) y Davis, L. (2010), han demostrado que la dosificación de GOS en la dieta produce el incremento de la población intestinal de bifidobacterias con respecto a dietas sin GOS y otros efectos positivos como el aumento de peso en lactantes y el tratamiento de la diarrea aguda.

Otras propiedades prebióticas

Las bifidobacterias y lactobacilos son reconocidos como promotores de la salud en el intestino grueso y son ampliamente utilizados como probióticos. Estudios previos usando cepas puras

de *Bifidobacterium*, mostraron que éstas metabolizan los GOS, de una manera más marcada y selectiva de la que lo hacen con la inulina o los FOS (Fructooligosacáridos) (Ohtsuka *et al.*, 1989). Por ejemplo, Bouhnik en el 2004 observó un mayor crecimiento en la población de bifidobacterias al usar varias dosis de ingesta de GOS durante una semana, frente al comportamiento de la inulina y los FOS. Adicionalmente, los GOS han mostrado un efecto más marcado de reducción de la adhesión de bacterias enteropatogénicas de *Escherichia coli* al intestino (Shoaf *et al.*, 2006), al compararlos con los otros prebióticos mencionados.

Metabolismo en el colon

Los principales productos de la fermentación de los GOS son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), de los cuales el acético, propiónico y butírico son cuantitativamente los más importantes en el colon. Todos los AGCC se absorben rápidamente en el intestino grueso y estimulan la absorción de agua y sal, son metabolizados por las vellosidades intestinales, el hígado y los músculos, sin aparición en la orina y pequeñas cantidades en las heces. Los AGCC ayudan a mantener la barrera defensiva que constituye la mucosa intestinal contra la invasión de microorganismos (Tzortzis, 2009), el mecanismo de esta barrera lo constituye el bajo pH que impera, gracias a la presencia de los AGCC. Experimentalmente se ha evaluado la inclusión de 4% de GOS en la dieta de lechones, lo que produjo un descenso del pH en el contenido del colon que fue atribuido al aumento significativo en la concentración de AGCC (Tzortzis, 2005).

Estos antecedentes permiten evidenciar los beneficios de los GOS sobre la salud de los consumidores, desde neonatos, a quienes ayuda en su desarrollo intestinal, a personas que padezcan de estreñimiento, en el tratamiento preventivo de cáncer y en el mejoramiento en la absorción de minerales. En general, los GOS ayudan a mantener el bienestar intestinal y la salud de quienes los consumen (Tzortzis 2009, Shoaf *et al.*2006).

1.2.3.3 Producción

La etapa central del proceso de producción de GOS es una reacción enzimática. La materia prima debe ajustarse a las condiciones que dicha reacción exige y posteriormente a esta es preciso adecuar el producto hasta el estado de comercialización, por medio de un proceso de purificación.

Preparación materia prima

Para que la enzima catalice la reacción se requiere que la materia prima empleada contenga lactosa en alta concentración, ya que se utilizan concentraciones cercanas al 40% (w/v) en un medio de *buffer* con un pH que depende del origen de la enzima usada.

La fuente de lactosa más económica es el lactosuero líquido, sin embargo, es necesario retirarle algunas sustancias como materia grasa, minerales y proteína hasta niveles aceptables mediante etapas previas de purificación. La grasa requiere de una etapa de centrifugación, los minerales de una desmineralización y la proteína de una micro o ultrafiltración.

El lactosuero se puede conseguir comercialmente en polvo en estado descremado, desmineralizado o desproteinizado, en estas formas se disuelve en el *buffer* en una proporción tal que se alcance la concentración de lactosa deseada.

Reacción enzimática

La β-galactosidasa hidroliza la lactosa para producir galactosa y glucosa, y posteriormente cataliza la reacción de transgalactosilación, que oligomeriza los galactósidos hasta GOS. Iwasaki *et al.*(1996) han demostrado que la cantidad de GOS generada está relacionada directamente con la cantidad de lactosa inicial y recomiendan concentraciones de lactosa entre 20 y 40% para promover las reacciones de transgalactosilación sobre las de hidrólisis que se dan principalmente a concentraciones bajas de lactosa inicial.

El primer paso de la reacción es el anclaje del sustrato, en este caso la lactosa, al sitio activo de la enzima. Durante la reacción, se considera la lactosa como dividida en dos partes el galactósilo (fracción de la galactosa) y el glucósilo (fracción de la glucosa). La enzima muestra una especificidad muy marcada por sustratos con galactósilos unidos por un enlace glucosídico así como otra menos fuerte por la fracción glucósilo (R_1) (Gosling *et al.*, 2010). Es decir, la enzima puede recibir a la lactosa en su sitio activo por el costado de la glucosa o de la galactosa, inclusive si el sustrato es un GOS, el glucósilo (R_1), puede representar un oligosacárido como se muestra en la Figura .

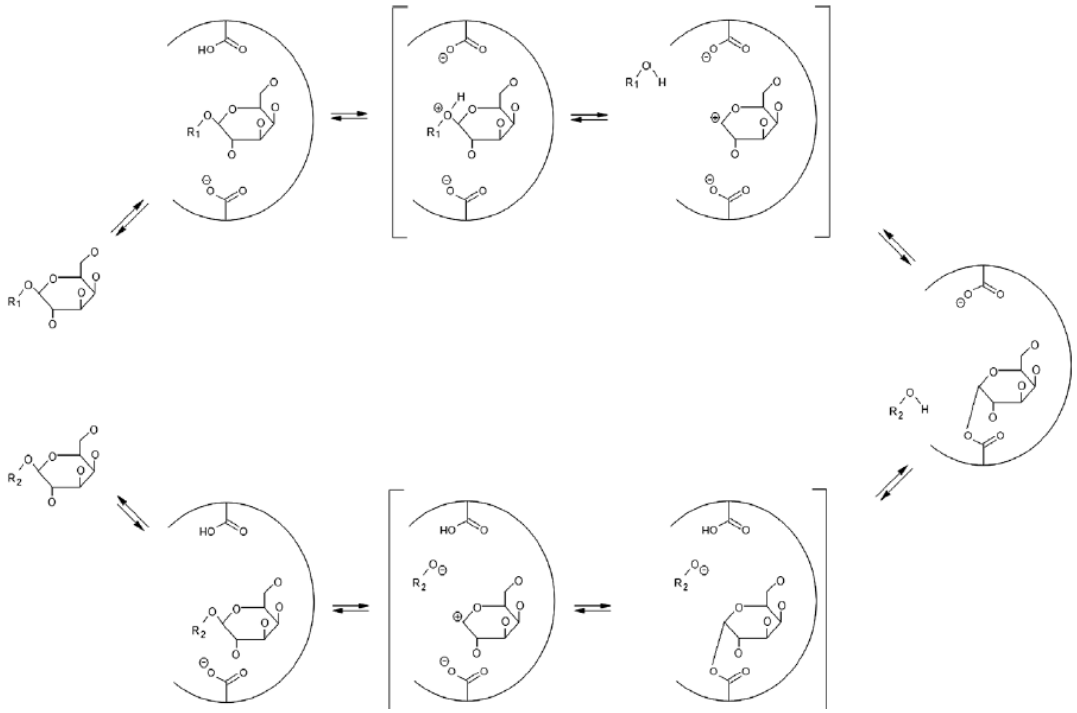


Figura 1. *Mecanismo de reacción para β-galactosidasa. R_1: fracción aglicano del sustrato galactosídico, R_2: receptor nucleofílico del galactósido. (Gosling, A., 2010)*

Las características estructurales de la enzima que afectan el anclaje en el sitio activo incluyen grupos que participan en puentes de hidrógeno, iones sodio unidos electrostáticamente y cadenas laterales de aminoácidos aromáticos, los cuales pueden ayudar a la unión de sustratos de hexosas (Gloster *et al.*, 2004; Hidaka *et al.*, 2002).

Después del anclaje en el sitio activo, la reacción ocurre con un mecanismo que empieza por un enlace covalente entre la enzima y la fracción galactosílica, seguido por una transferencia del galactósilo a un aceptor nucleofílico (Brás *et al.,* 2008; Juers *et al.*, 2001).

La ruta de la reacción puede tomar dos caminos diferentes, si el aceptor galactosílico o nucleofílico es agua (R_2=H) la reacción es de hidrólisis del galactósilo por lo que se produce una galactosa libre llevando a la hidrólisis de la lactosa o de los GOS. De otro lado, si el aceptor galactosílico es otro sacárido (R_2=glucosa, galactosa, lactosa o GOS), la ruta de la reacción conduce a la transferencia del galactósilo y a la síntesis de GOS, como se puede ver en la Figura .

Las β-galactosidasas de diferentes fuentes presentan cambios en la selectividad por el agua o por los sacáridos, lo que conduce a diferentes rendimientos a iguales concentraciones de

lactosa (Prenosil *et al.*1987, Zarate y López-Leiva 1990). De la misma manera, la estructura de los GOS depende de la estructura y los mecanismos empleados por las diferentes enzimas.

Cada β-galactosidasa producirá diferentes distribuciones de tamaño o tipos de GOS dependiendo de su origen; por ejemplo, la enzima de *Bacillus circulans* produce GOS-2 y GOS-3 y en menor cantidad GOS-4 y GOS-5; la de *Kluyveromyces spp*. mayor proporción de GOS-2 y algunos GOS-3, mientras que la de *A. oryzae* mayor cantidad de GOS-3 y una pequeña cantidad de GOS-4. El producto de la reacción por tanto incluirá oligosacáridos con un grado de polimerización (DP) de hasta 8 ó 9 y altas cantidades de monosacáridos y disacáridos, los cuales aportan calorías.

Se debe tener en cuenta que los monosacáridos presentan problemas de inhibición competitiva para la enzima (Vera, C. *et al.*, 2016, Gosling, A. *et al.*, 2010), por ello la eliminación de estos carbohidratos puede contribuir a ampliar las aplicaciones de los GOS purificados en la industria alimentaria y farmacéutica. Entre estas aplicaciones podría estar la inclusión de GOS purificados como ingredientes en alimentos para diabéticos, alimentos especializados para las personas intolerantes a la lactosa y alimentos bajos en calorías.

1.2.3.4 Purificación de GOS

Como se mencionó anteriormente, el producto de la reacción consta principalmente de GOS, agua, lactosa no reaccionante, glucosa y galactosa, sustancias que difieren en tamaño pero que son químicamente muy similares, razón que dificulta su separación para lograr un producto más concentrado. Los productos comerciales varían su concentración de GOS entre el 46 y el 99% (Scott, F., *et al.*, 2016) y las concentraciones del producto de la reacción varían entre 6 y 30% de GOS (Gosling, A. *et al.*, 2010), por esto se hace necesario aplicar etapas de purificación posteriores a la reacción.

En este caso, las operaciones de separación que se han aplicado son: cromatografía (Chilamkurthi *et al.,* 2012, Shoaf *et al.,* 2006, y Huebner *et al.,* 2007, Akpinar *et al.,* 2008, Moravčík *et al.,* 2012), fluidos supercríticos (Montañés *et al.,* 2009(a) y (b)), carbón activado (Hernández *et al.,* 2009, Nobre *et al.,* 2012), precipitación con etanol (Sen *et al.,* 2011), fraccionamiento con membranas (Pinelo *et al.*, 2009, Hernández *et al.,* 2009, Grandison *et al.,* 2002, Botelho *et al.,* 2010) y reactores enzimáticos de membrana (Czermak *et al.,* 2004, Pocedicova *et al.,* 2010, González *et al.,* 2009, Ebrahimi *et al.,* 2010, Engel *et al.,* 2008,

Pruksasri, 2007, Sanz, 2009). En estos dispositivos de reacción se puede dar la separación simultánea de los productos en una unidad alterna o incorporada al reactor, también se puede dar la separación de la enzima y de los subproductos. De otro lado, los sistemas acuosos de dos fases (SADF) (Del Val *et al.,* 2003, Isabel M. *et al.,* 2001), han sido evaluados como un método de separación parcial de GOS, en estos trabajos se lograron mayores rendimientos de trisacáridos y mayor selectividad que en los sistemas convencionales. Otras técnicas modifican las condiciones de reacción para incrementar la concentración de GOS en el producto de reacción, es el caso de aplicación de sistemas enzimáticos mixtos (Splechtna *et al.,* 2001, Sheu *et al.,* 2001), fermentación selectiva (Zhengyi, L. *et al.,* 2008, Goulas *et al.,* 2007, Cheng *et al.,* 2006), y extracción asistida por microondas (Maugard *et al.*, 2003).

La definición de la técnica de purificación a emplear depende en gran medida del costo de la misma, el cual se incrementa en función del grado de pureza logrado. Las técnicas más costosas son las cromatográficas, las que usan fluídos supercríticos, seguidas por las que usan membranas, como los reactores de membranas, después están los sistemas enzimáticos mixtos y la fermentación selectiva. En último renglón están las que usan carbón activado, precipitación con etanol y los SADF.

En los procesos biotecnológicos los costos de la purificación pueden representar los más altos de toda la operación, razón por la cual, se siguen y se seguirán adelantando esfuerzos para mejorar técnica y económicamente esta etapa.

1.2.4 Sistemas acuosos de dos fases (SADF)

1.2.4.1 Generalidades

Los sistemas acuosos de dos fases (SADF) son sistemas que se forman cuando se mezclan dos soluciones acuosas poliméricas o una polimérica y una salina en concentraciones que superan cierto límite, definido por la aparición de la segunda fase. Ambas fases tienen contenidos de agua entre el 85 y el 99%.

Los SADF separan una mezcla de biomoléculas gracias a la afinidad diferencial en cada una de las fases, permitiendo así la separación de la sustancia de interés en una de ellas.

Este tipo de sistemas se utiliza para separar biomoléculas (proteínas, enzimas, ácidos nucleicos) en función de sus propiedades superficiales, del tamaño molecular y la hidrofobicidad (Albertsson *et al.*1990). El aumento del tamaño molecular aumenta la hidrofobicidad de las biomoléculas, por poseer una mayor fracción de carbonos e hidrógenos. La fase superior, en general la polimérica, presenta mayor hidrofobicidad, debido a que este compuesto posee una alta relación de área hidrofóbica a grupos –OH hidrofílicos, lo que favorece la partición de compuestos hidrofóbicos hacia la fase superior. Al aumentar la concentración y/o el peso molecular del polímero disminuye la presencia de sustancias de gran tamaño en la fase superior (Asenjo, J., & Andrews, B., 2011).

De otro lado, los sistemas acuosos de dos fases (SADF) carecen de las desventajas de los sistemas de dos fases de solvente orgánico-agua, (Hatti-Kaul, 2000), en cuanto a la transferencia en la interfase por la diferencia en la tensión superficial y los problemas ambientales que este tipo de solventes traen consigo.

1.2.4.2 Partición en el SADF

La partición en un SADF depende de las características de las fases y de las sustancias a separar. Entre los factores determinantes de la fase polímero están: el tipo de polímero, su peso molecular, la presencia de ciertos grupos (ionizados, hidrofóbicos o bioespecíficos), además de la composición iónica ya que ésta determina el signo y la magnitud del potencial eléctrico interfacial. Entre las propiedades importantes de las sustancias a separar están su tamaño, carga y propiedades hidrofóbicas en la superficie y la presencia de receptores para ligandos bioespecíficos (adjuntos al polímero). La quiralidad de las moléculas también puede afectar la separación (Albertsson *et al.*1990), la cual es una propiedad característica de los carbohidratos.

El uso de un SADF implica adicionar dos sustancias (dos polímeros o polímero y sal) al medio a separar lo que puede resultar en una separación aún más compleja que el sustrato inicial, sin embargo, la separación selectiva de las distintas sustancias entre las fases y la rápida transferencia de masa por la baja tensión interfacial, aunado al bajo costo de los polímeros y sales utilizados, bajo costo de la infraestructura y facilidad de escalado pueden lograr una disminución en los costos de separación (Raja, S., *et al.*2012, Hong Yang *et al.*, 2013).

Los polímeros que se usan con mayor frecuencia son polietilenglicol (PEG) (con pesos moleculares entre 200 y 40000), dextrano (T40, T70, T500), pululano, polipropilenglicol (PPG) y Reppal PES (almidón modificado), mientras que las sales más empleadas son citratos, fosfatos y sulfatos de sodio, potasio o magnesio, y los cloruros de calcio y sodio (Raja *et al.*2010; Iqbal *et al.*, 2016).

1.2.4.3 Termodinámica de los SADF

La termodinámica de los SADF fue descrita por P.A. Albertsson en 1956. Cuando se forma un sistema estable de dos fases, estas coexisten en equilibrio. Por lo tanto, los potenciales químicos (μ) para cada componente i en ambas fases son iguales, y $\Delta\mu = 0$ (Baskir *et al.*, 1989). El potencial químico se puede expresar como una función de la actividad (a_i), del área superficial de la partícula (A), de la tensión interfacial (γ), de la carga de partículas (Z) y del potencial eléctrico de la fase (Ψ); con ello en el equilibrio el potencial puede ser calculado mediante la Ecuación 1.1 (Grilo *et al.*, 2016), donde k, F y N son respectivamente las constantes Boltzman, Faraday y Avogadro y los superíndices S I son relativos a las fases superior e inferior, respectivamente.

$$\Delta\mu_i^{\circ} + kTln\left(\frac{a_i^S}{a_i^I}\right) + A\Delta\gamma + \frac{z_i\ F\ \Delta\Psi}{N} = 0 \qquad \textit{Ecuación 1.1}$$

La eficiencia de la partición de un soluto dado es usualmente evaluada utilizando el coeficiente de partición (K). Este se define como la relación de la concentración de soluto en la fase superior sobre la de la fase inferior. Para establecer una relación entre el coeficiente de partición y el potencial químico, la actividad del soluto (a_i) se define como el producto de un coeficiente de actividad (f_i) por la concentración de soluto (*c*) (Grilo *et al.*, 2016). Entonces la Ecuación 1.1 puede reescribirse así:

$$-k\ T\ln K = \Delta\mu_i^{\circ} + kTln\left(\frac{f_c^S}{f_c^I}\right) + A\Delta\gamma + \frac{z_i\ F\ \Delta\Psi}{N} \qquad \textit{Ecuación 1.2}$$

1.2.4.4 Aplicaciones

Los SADF se han utilizado con éxito para recuperar varias biomoléculas como proteínas, enzimas, aminoácidos, antibióticos, plásmidos, ADN y nano partículas (Iqbal, M., *et al.*2016). Hoy en día se usan ampliamente para productos biofarmacéuticos valiosos, como anticuerpos

monoclonales, factores de crecimiento y hormonas. Recientemente se ha explorado la posibilidad de utilizar los SADF como una alternativa a los métodos existentes de cromatografía para purificar productos biofarmacéuticos. También se han encontrado aplicaciones en técnicas novedosas como fermentación extractiva, SADF con soporte de membrana (MEMEX) y flotación acuosa de dos fases (FADF) (Raja, S., *et al.*2012). El SADF extractivo a gran escala, se está convirtiendo en una herramienta esencial para la purificación de productos biofarmacéuticos como la interleucina, la hormona del crecimiento humano (hGH), el factor de crecimiento similar a la insulina y los anticuerpos monoclonales. El SADF de polímero/sal se ha utilizado para purificar la proteína de unión a interleucina-18 (IL-18BP es un importante regulador del sistema inmune) del sobrenadante de células de ovario de hámster chino (CHO) libre de suero (Rosa *et al.*2010).

Se ha desarrollado un SADF que consistía en PEG 4600 / sulfato de amonio para recuperar y purificar los antagonistas de la hormona de crecimiento recombinante (GHA) del homogeneizado de células de *Escherichia coli* (Rosa *et al.*2010).

La mayoría de antecedentes relacionados con la separación usando SADF, se han dado para proteínas, debido a su alta actividad química y posibilidad de establecer interacciones físicas con sales y polímeros que pueden constituir el SADF. Sin embargo, gracias a la posibilidad de establecer más tipos de interacciones, se ha visto partición preferente para componentes de mezclas con diferentes tamaños, hidrofobicidades, conformaciones, afinidades, relaciones con el medio (Grilo, A., *et al.*, 2016, Albertson, P., *et al.*1990), lo cual se puede dar para mezclas de carbohidratos (Li, X., *et al.*, 2011, Del-Val & Otero, 2003), colorantes (Chethana, S., *et al.*, 2007).

1.2.5 Sistemas acuosos de dos fases (SADF) como medio de reacción

Los procesos enzimáticos pueden presentar baja productividad y generar productos en baja concentración, debido a la inhibición por producto y/o a su inestabilidad frente a las condiciones de reacción, lo que conduce a altos costos en la purificación. Sin embargo, desde hace algunos años se viene investigando en los procesos intensificados que pretenden fusionar las operaciones de síntesis con las operaciones de separación para obtener productos a un menor costo. En este caso los procesos enzimáticos pueden ser integrados con operaciones de separación a través de una bioconversión extractiva o de la recuperación

in situ del producto, y con ello es posible obtener un producto a una alta concentración eludiendo a su vez las posibles limitaciones biológicas. De esta manera, el producto es eliminado continuamente de su sitio de producción, lo que reduce la inhibición de la enzima. Adicionalmente, si la recuperación del producto se hace selectivamente, puede ayudar a lograr una mejor purificación, de una forma rápida y lograr una mayor valoración del producto.

Dentro de las operaciones involucradas en la bioconversión extractiva se tienen la adsorción, filtración de membrana y extracción líquido-líquido (Zijlstra *et al.*, 1998, Mattiasson, 1988). Esta última está diseñada de tal manera que la reacción biocatalítica tiene lugar en una de las fases y los productos se extraen en la otra. En una situación ideal, esto requeriría una separación perfecta del biocatalizador junto con el sustrato en la fase destinada a la bioconversión, y la del producto en la fase de extracción (Benavides *et al.*, 2011).

La bioconversión extractiva utilizando solventes orgánicos como fase de extracción se ha evaluado, sin embargo, los solventes que son buenos extractantes también afectan la actividad de la enzima. Además, una alta tensión interfacial solvente-agua, tiene un efecto desnaturalizante sobre los biocatalizadores. El proceso de bioconversión en SADF se ve facilitado por la baja tensión interfacial, que conduce a la formación de pequeñas gotas durante la mezcla de las fases, con esto se logra minimizar las distancias de migración y promover la transferencia de masa. El biocatalizador se inmoviliza temporalmente en las gotas y puede considerarse como un sistema soluble-inmovilizado (Benavides *et al.*, 2011).

La Figura 1 muestra el concepto de bioconversión extractiva en SADF.

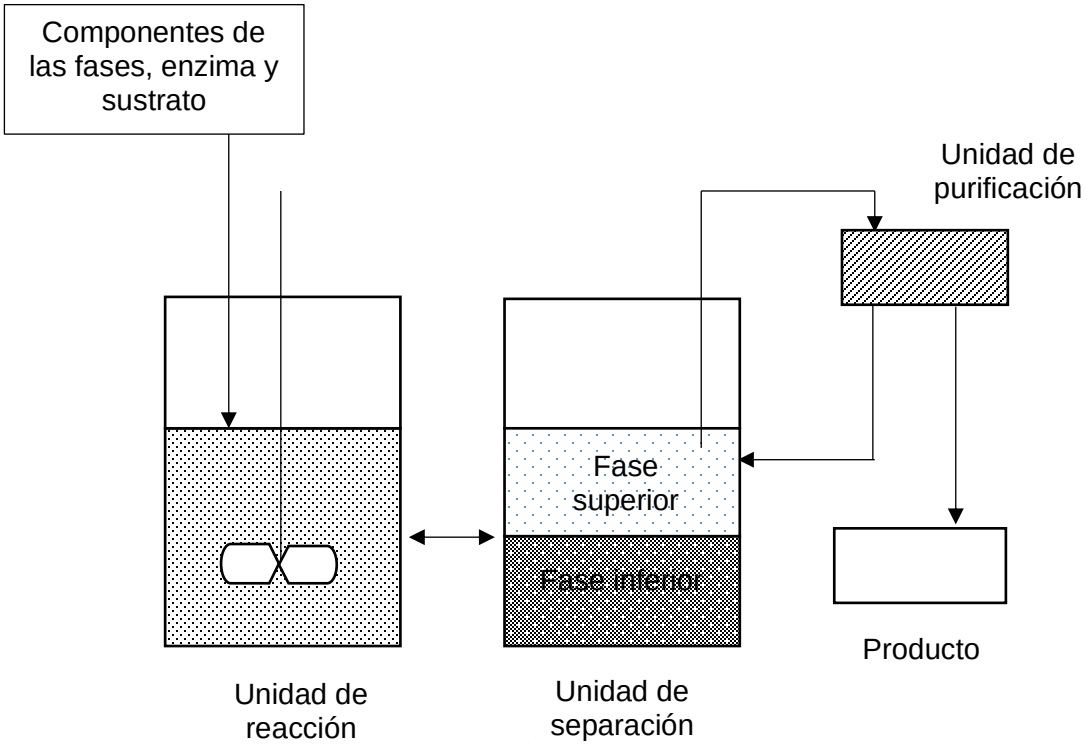


Figura 1 *Esquema para la conversión extractiva en SADF (Hatti-Kaul, 2000).*

1.2.5.1 SADF y GOS

La evaluación de sistemas acuosos de dos fases como medio para la reacción enzimática y separación simultanea de GOS ha sido evaluada solamente por Del Val y Otero en 2003. Allí estudiaron los efectos de los cambios en la composición de las fases (PEG de diferentes pesos moleculares, adición de sal y pH) en el rendimiento y selectividad de la reacción hacia trisacáridos (GOS-3), encontrando que el rendimiento aumentó 33% y la selectividad 21%, con PEG 6000 (9,9%), NaH_2PO_4 (6,6%) y pH 6,5, respecto a la solución acuosa convencional, gracias a diferencias en la partición de azúcares y de la enzima (Del Val y Otero, 2003).

En el trabajo mencionado se definió al fosfato como la sal empleada en el SADF y se descartó al citrato por requerir de altas concentraciones (8,5 a 12,2%) para lograr la formación de dos fases.

Los fosfatos son sales que afectan el medio ambiente, lo que no sucede con los citratos, haciendo de estos una mejor opción, pensando en procesos ecosostenibles. En el trabajo referenciado no se evaluó el efecto de la temperatura y se definió como el mejor pH a 6,5.

1.2.6 Sistemas asistidos por microondas

La irradiación por microondas como fuente de energía no convencional se ha convertido en una tecnología muy útil y popular en la química orgánica, específicamente en la catálisis de reacciones químicas, pero es menos usada en las reacciones enzimáticas (Maugard *et al.*2003). Esto se debe a que la irradiación por microondas se convierte en energía térmica en medios acuosos, debido a las características dieléctricas del agua que producen un rápido calentamiento bajo la acción de este tipo de radiación, lo que a su vez lleva a la desnaturalización de las enzimas y pérdida irreversible de su actividad (Zhao, *et al.*2010).

Por otro lado, la acción de las microondas sobre las reacciones enzimáticas no es solo de carácter térmico, sino que pueden mejorar la actividad de la enzima debido a que éstas poseen elevados momentos dipolares que son susceptibles a la acción de este tipo de radiación (Zhao, *et al.*2010).

La aplicación de microondas en la producción de GOS fue estudiada por Maugard *et al.*(2003) quienes definieron la selectividad como la relación entre GOS producidos/lactosa hidrolizada, la cual aumenta cuando se reduce la actividad de agua de los medios, como por ejemplo mediante el uso de co-solventes. La adición de solvente (hexanol) al llevar a cabo la reacción enzimática con β-galactosidasa inmovilizada, bajo irradiación de microondas dio como resultado un aumento en la producción de GOS. La selectividad para la síntesis de GOS aumentó 217 veces gracias a la acción de la radiación.

La aplicación de microondas en reacciones enzimáticas no solo se ha posibilitado por el uso de solventes orgánicos, ya que se han desarrollado trabajos en medios acuosos asistidos por este tipo de irradiación, sin pérdida de la actividad enzimática, es el caso del trabajo de La Cara *et al.* en 1999, quién evaluó el efecto de la energía de microondas sobre la actividad de una β-galactosidasa termofílica y estableció que a altas concentraciones de la enzima (>50μg/L), no había pérdida de actividad en ensayos llevados a cabo a 70°C durante 60 min. El trabajo de Maugard (2003) utilizó una enzima con una temperatura óptima de 40ºC a las condiciones evaluadas, es importante evaluar enzimas que tengan la capacidad de soportar mayores temperaturas, debido a eventuales incrementos de esta por las microondas, y con concentraciones de enzima diferentes a las ya evaluadas por La Cara *et al.*(1999).

Según los antecedentes al cabo de la reacción en SADF, hay una alta posibilidad de contar con el producto (GOS) en un volumen inferior comparado con la reacción realizada en un

medio convencional, por tanto esta operación se puede convertir en un primer paso dentro de la secuencia de operaciones de purificación. Adicionalmente la partición preferente de monosacáridos por una de las fases hace posible reducir su concentración y con ello disminuir la inhibición en la fase donde se lleva cabo la reacción, para así favorecer la producción de GOS.

El SADF es una alternativa a la inmovilización de la enzima que no presenta los problemas de difusión involucrados en el uso de soportes sólidos y que muestra ventajas propias de la inmovilización, como tener la enzima más “protegida” en una de las fases del SADF, lo cual favorece el mantenimiento de su actividad por más tiempo al evitar los esfuerzos cortantes en su superficie (Mattiasson, B., 1988). Con la aplicación de las microondas se ha visto que se puede incrementar el desempeño del SADF, como medio de separación, así como de la reacción enzimática, representado esto en un incremento en la selectividad del producto. Al probar el efecto de esta radiación sobre un SADF como medio de reacción-separación de GOS, pueden potenciarse las ventajas de los dos métodos por separado.

Dado que se han establecido las mejoras en la producción de GOS en un SADF y con la asistencia de microondas en cuanto a productividad y selectividad, en esta tesis se propone ampliar el análisis del SADF estableciendo el efecto de mayor cantidad de variables, hasta lograr las condiciones optimizadas, tanto de la separación, como de la reacción – separación simultáneas. En cuanto a la acción de las microondas se estableció su efecto sobre las condiciones establecidas como óptimas para la reacción de producción de GOS, la separación de GOS y la reacción – separación simultáneas.

1.3 Referencias

Akpinar, O., Penner, M.H., (2008). Preparation of cellooligosaccharides: comparative study. Journal of Food, Agriculture and Environment 6, 55–61.

Albayrak, N., & Yang, S.-T. (2002). Production of galacto-oligosaccharides from lactose byAspergillus oryzae β-galactosidase immobilized on cotton cloth. Biotechnology and Bioengineering, 77(1), 8–19.

Albertsson P., Johansson G., Tjerneld F. (1990) in: Asenjo J. (Ed.), Separation Process in Biotechnology, Marcel Dekker, New York, pp. 287–327.

Asenjo, J. A., & Andrews, B. A. (2011). Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. Journal of Chromatography A, 1218(49), 8826–8835.

Baskir, J.N., Hatton, T.A., and Suter, U.W. (1989) Protein partition- ing in two-phase aqueous polymer systems. Biotech. Bioeng. 34: 541–558.

Benavides, J., Rito-Palomares, M., & Asenjo, J. A. (2011). Aqueous Two-Phase Systems. Comprehensive Biotechnology, 697 - 713.

Boon, M. a., Janssen, a. E. M., & Van ’t Riet, K. (2000). Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. Enzyme and Microbial Technology, 26(2–4), 271–281.

Botelho-cunha, V. A., & Pinho, M. N. De. (2010). Tailoring the enzymatic synthesis and nanofiltration fractionation of galacto-oligosaccharides. Biochemical engineering journal, 50, 29–36.

Bouhnik Y, Raskine L, Simoneau G, Vicaut E, Neut C, Flourie B, Brouns F, Bornet FR (2004) The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacterias in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. Am J Clin Nutr 80:1658–1664.

Brás, N. F., Moura-Tamames, S. A., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2008). Mechanistic studies on the formation of glycosidase-substrate and glycosidase- inhibitor covalent intermediates. Journal of Computational Chemistry, 29(15), 2565–2574.

Charalampopoulos, D., & Rastall, R. A. (2012). Prebiotics in foods. Current Opinion in Biotechnology, 23(2), 187–191.

Cheng C, Yu M, Cheng T, Sheu D, Duan K, Tai W (2006). Production of High-content Galacto-oligosaccharide by Enzyme Catalysis and Fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnoly Letters. 28(11): 793-797.

Chethana, S., Nayak, C. a., & Raghavarao, K. S. M. S. (2007). Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. Journal of Food Engineering, 81(4), 679–687.

Chilamkurthi, S, Willemsen, J-H, Wielen, LAM van der, Poiesz, E & Ottens, M (2012). High-throughput determination of adsorption equilibria for chromatographic oligosaccharide separations. Journal of Chromatography A, 1239, 22-34.

Corral JM, Banuelos O, Adrio JL, Velasco J (2005) Cloning and characterization of a beta-galactosidase encoding region in *Lactobacillus coryniformis*. Appl Microbiol Biotechnol 73:640–646.

Czermak P., Ebrahimi M., Grau K., Netz S., Sawatzki G.and Pfromm P.H., (2004). Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process, J. Membr. Sci., 232, 85–91.

Davis, L. M. G., (2010). The Bifidogenicity of the Prebiotic Galactooligosaccharides. Dissertations & Theses in Food Science and Technology.Paper 9.

Del Val M., Otero C. (2003). Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. Enzyme Microb Technol 33(1):118–26.

Domingues, L., Lima, N., & Teixeira, J. A. (2005). *Aspergillus nig*er β-galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. Process Biochemistry, 40(3–4), 1151–1154.

Ebrahimi M., Placido L., Engel L., Shams Ashaghi K., Czermak P, (2010). A novel ceramic membrane reactor system for the continuous enzymatic synthesis of oligosaccharides. Desalination 250. 1105–1108.

Engel L., Ebrahimi M., Czermak P. (2008). Membrane chromatography reactor system for the continuous synthesis of galactosyl-oligosaccharides. Desalination 224 46–51.

Engel, L., Schneider, P., Ebrahimi, M., & Czermak, P. (2007). Immobilization of β-Galactosidase in Adsorptive Membranes for the Continuous Production of Galacto-Oligosaccharides from Lactose. The open food science journal, 1, 17–23.

Francesconi, C. F. De M., Machado, M. B., Steinwurz, F., Nones, R. B., Quilici, F. A., Catapani, W. R., … Bafutto, M. (2016). Oral Administration of Exogenous Lactase in Tablets for Patients Diagnosed With Lactose Intolerance Due To Primary Hypolactasia. Arquivos de Gastroenterologia, 53(4), 228–234.

Gargova, S., Pishtijski, I., & Stoilova, I. (2017). Purification and Properties of β -Galactosidase from Aspergillus Oryzae β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment, 9(4), 47–51*

Gonzalez R., Ebrahimi M., Czermak P. (2009). Experimental and Modeling Study of Galactosyl-Oligosaccharides Formation in Continuous Recycle Membrane Reactors (CRMR). The Open Food Science Journal, (2009) 3, 1-9 1.

Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. Food Chemistry, 121(2), 307–318.

Goulas A., Tzortzis G, Gibson G. (2007). Development of a process for the production and purification of α- and β-galactooligosaccharides from Bifidobacterium bifidum NCIMB 41171. International Dairy Journal 17 648–656.

Grandison, A. S., Goulas, A. K., & Rastall, R. A. (2002). The use of dead-end and cross-flow nanofiltration to purify prebiotic oligosaccharides from reaction mixtures, Songklanakarin J. Sci. Technol., 24(Suppl.) : 915-928.

Grilo AL, Raquel Aires-Barros M, Azevedo AM. (2016). Partitioning in aqueous two-phase systems: fundamentals, applications and trends. Sep Purif Rev.;45:68–80.

Hatti-Kaul, R. - editor (2000). Aqueous Two-Phase Systems, methods and prototcols – Methods in Biotechnology, 11. Humana Press, New Jersey.

Hernández O, Ruiz-Matute AI, Olano A, Moreno FJ, Sanz ML (2009). Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. Int Dairy J 19(9):531.

Hidaka, M., Fushinobu, S., Ohtsu, N., Motoshima, H., Matsuzawa, H., Shoun, H., *et al.*(2002). Trimeric crystal structure of the glycoside hydrolase family 42 beta- galactosidase from Thermus thermophilus A4 and the structure of its complex with galactose. Journal of Molecular Biology, 322(1), 79–91.

Hong Yang, A. M. G. (2013). Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation. Journal of Bioprocessing & Biotechniques, 4(1), 1–8.

Huang NP, Voros J, Paul SM, Textor M, Spencer ND. (2002). Biotin-derivatized poly (L-lysine)-g-poly (ethylene glycol): A novel polymeric interface for bioaffinity sensing. Langmuir 18: 220–230.

Huber RE, Kurz G, Wallenfels K (1976) A quantitation of the factors which affect the hydrolase and trangalactosylase activities of b- galactosidase (*E. coli*) on lactose. Biochemistry 15:1994–2001.

Huebner, J., Wehling, R.L., Hutkins, R.W., (2007). Functional activity of commercial prebiotics. International Dairy Journal 17, 770–775.

Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Yuan, Z. (2016). Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. Biological Procedures Online, 18(1), 1–18.

Isabel, M., Hill, C. G., & Qu, I. De. (2001). Selective enzymatic synthesis of 6 -galactosyl lactose by Pectinex Ultra SP in water, (pH 5), *Biotechnology letters*, *23*(23), 1921-1924.

Iwasaki, K., Nakajima, M., Nakao, S. (1996). Galacto-oligosaccharide Production fromLactose by an Enzymic Batch Reaction Using β-Galactosidase. Process Biochem.; 31 (1): 69 – 76.

Juers, D. H., Heightman, T. D., Vasella, A., McCarter, J. D., Mackenzie, L., Withers, S. G., *et al.*(2001). A structural view of the action of Escherichia coli (lacZ) beta- galactosidase. Biochemistry, 40(49), 14781–14794.

Kazemi S, Khayati G, Faezi-Ghasemi M (2016) b-Galactosidase pro- duction by *Aspergillus niger* ATCC 9142 using inexpensive substrates in solid-state fermentation: optimization by orthogonal arrays design. Iran Biomed J 20:287–294.

Klotz, B. (2014). Suero lácteo, clave en la innovación de alimentos. Revista Portafolio. Agosto 3. Cosultado en: https://www.portafolio.co/economia/finanzas/suero-lacteo-clave-innovacion-alimentos-61526, consultado el 10 de Agosto de 2019.

Kokkiligadda, A., & Beniwal, A. (2016). Utilization of Cheese Whey Using Synergistic Immobilization of β-Galactosidase and Saccharomyces cerevisiae Cells in Dual Matrices. Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 179, No. 8, 1469–1484.

La Cara, F., Scarffi, M. R., D'Auria, S., Massa, R., d'Ambrosio, G., Franceschetti, G., Rossi, M. and De Rosa, M. (1999), Different effects of microwave energy and conventional heat on the activity of a thermophilic ß-galactosidase from *Bacillus acidocaldarius*. Bioelectromagnetics, 20: 172–176.

Lamsal, B. P. (2012). Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. Journal of the science of food and agriculture, 92(10), 2020–8.

Levicky R, Horgan A. 2005. Physicochemical perspectives on DNA microarray and biosensor technologies. Trends Biotechnol 23: 143–149.

Lewis, M. (n.d.). GRAS Notice 000510, 2014: Acid lactase from *Aspergillus oryzae* expressed in *Aspergillus niger*.

Li, X., Lian, Z., Dong, B., Xu, Y., Yong, Q., & Yu, S. (2011). Extractive bioconversion of xylan for production of xylobiose and xylotriose using a PEG6000/sodium citrate aqueous two-phase system. Korean Journal of Chemical Engineering, 28(9), 1897–1901.

Martirosyan, D. M., & Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC: What makes a new definition unique? Functional Foods in Health and Disease, 5(6), 209–223.

Mattiasson, B., (1988). Bioconversions in Aqueous Two - Phase Systems : An Alternative to Conventional Immobilization, Methods in enzymology Vol. 137, pp. 657-667. Academic Press..

Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M. , Besson, T. (2003). Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Biotech. Let., 25(8), 623–9.

Montañés F, Fornari T, Stateva RP, Olano A, nez EI (2009). Solubility of carbohydrates in supercritical carbon dioxide with (ethanol + water) cosolvent. J Supercrit Fluids 49(1):16.

Montañés FM, Olano A, Reglero G, nez EI, Fornari T (2009). Supercritical technology as an alternative to fractionate prebiotic galactooligosaccharides. Sep Purif Technol 66(2):383.

Moravčík, J., Gramblička, M.,Wi, L., Vaňková, K., & Polakovič, M. (2012). Influence of the ionic form of a cation-exchange adsorbent on chromatographic separation of galactooligosaccharides. Chemical Papers, 66, 583–588.

Muset, G. & Castells, L.(2017). Valorización del lactosuero. Colección transferencia tecnológica suma valor a un país de ideas. Retrieved from http://lactosuero.com/wp-content/uploads/2019/01/Valorizacion-Lactosuero.pdf

Nagaraj, N., Narayan, a V, Srinivas, N. D., & Raghavarao, K. S. M. S. (2003). Microwave-field-assisted enhanced demixing of aqueous two-phase systems. Analytical Biochemistry, 312(2), 134–140. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531197.

Nasir M., Rehman H., Aziz N., Jabbar M. (2011). Bifidogenicity of galacto-oligosaccharides in diarrhea management of acute malnourished infants and young children. Proceedings of the Nutrition Society, 70, E344.

Nobre C, Teixeira J, Rodrigues L (2012). Fructo-oligosaccharides purification from a fermentative broth using an activated charcoal column. New Biotechnol 29(3):395.

Ohtsuka K, Benno Y, Endo A, Ueda H, Ozawa O, Uchida T, Mitsouka T (1989) Effects of 49galactosyllactose intake on human fecal microflora.Bifidus 2:143–149.

Panesar, R., Panesar, P. S., Singh, R. S., Kennedy, J. F., & Bera, M. B. (2007). Production of lactose-hydrolyzed milk using ethanol permeabilized yeast cells. Food Chemistry, 101(2), 786–790.

Parashar, A., Jin, Y., Mason, B., Chae, M., & Bressler, D. C. (2016). IncoE/S*oration of whey permeate , a dairy effluent , in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. Journal of Dairy Science, 99(3), 1859–1867.

Pinelo, M., Jonsson, G., & Meyer, A. S. (2009). Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance. Separation and Purification Technology, 70(1), 1–11.

Pocedičová, K., Čurda, L., Mišún, D., Dryáková, A., & Diblíková, L. (2010). Preparation of galacto-oligosaccharides using membrane reactor. Journal of Food Engineering, 99(4), 479–484.

Polshettiwar, V. & Varma, R., (2010) - Editors. Aqueous Microwave Assisted Chemistry. Royal Society of Chemistry.

Prenosil, J. E., Stuker, E., & Bourne, J. R. (1987). Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part I: State of Art. Biotechnology and Bioengineering, 30(9), 1019–1025.

Pruksasri S. Production and separation of galacto-oligosaccharides from lactose by β-galactosidase immobilized on nanofiltration membranes, PhD thesis, Ohio State University, Chemical Engineering, 2007.

Rao MV, Dutta SM (1978) Lactase activity of microorganisms. Folia Microbiol 23:210–215

Rosa PAJ, Ferreira IF, Azevedo AM, Aires-Barros MR (2010) Aqueous two-phase systems: a viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. J Chromatogr A 217(16):2296–2305.

Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka, R. (1999) Recent progress on research and applications of non-digestible galactooligosaccharides. International Dairy J (9): 69 – 80.

Sanz J. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by Immobilized β-galactosidase and posterior Chromatographic separation, PhD thesis, Ohio State University, Chemical Engineering, 2009.

Saqib, S., Akram, A., Halim, S. A., & Tassaduq, R. (2017). Sources of β-galactosidase and its applications in food industry. 3 Biotech, 7(1).

Scott, F., Vera, C., & Conejeros, R. (2016). Technical and economic analysis of industrial production of lactose-derived prebiotics with focus on galacto-oligosaccharides. In: Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective. Elsevier Inc.

Sen D. (b), Sarkar A., Gosling A., Gras S., Stevens G., Kentish S., Bhattacharya P., Barber A., Bhattacharjee Ch. (2011), Feasibility study of enzyme immobilization on polymeric membrane: A case study with enzymatically galacto-oligosaccharides production from lactose, Journal of Membrane Science. 378 (1–2) 15: 471-478.

Sen D.(a), Gosling A., Stevens G., Bhattacharya P., Barber A., Kentish S., Bhattacharjee Ch., Gras S.,(2011) Galactosyl oligosaccharide purification by ethanol precipitation, Food Chemistry. (128) (3): 773-777.

Sheu D, Lio P, Chen S, Lin C, Duan K (2001). Production of fructooligosaccharides in high yield using a mixed enzyme system of β-fructofuranosidase and glucose oxidase. Biotechnology Letters. 23 (18): 1499-1503.

Shoaf K, Mulvey GL, Armstrong GD, Hutkins RW. 2006. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. Infect Immun 74:6920–8.

Shoaf, K., Mulvey, G.L., Armstrong, G.D., Hutkins, R.W., 2006. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic Escherichia coli to tissue culture cells. Infection and Immunity 74, 6920–6928.

Silva, A. C., Guimaraes, P. M., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2010). Fermentation of deproteinized cheese whey powder solutions to ethanol by engineered Saccharomyces cerevisiae: effect of supplementation with corn steep liquor and repeated-batch operation with biomass recycling by flocculation. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *37*(9), 973-982.

Splechtna, B., Petzelbauer, I., Baminger, U., Haltrich, D., Kulbe, K. D., & Nidetzky, B. (2001). Production of a lactose-free galacto-oligosaccharide mixture by using selective enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid. Enzyme and microbial technology. Vol. 29, Issue 6-7. 434–440.

Torres, D. P., Goncalves, M., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2010). Galacto oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9, 438-454.

Tzortzis G, Goulas AK, Gee JM, Gibson GR (2005) A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. J Nutr 135:1726–1731

Tzortzis G, Goulas AK, Gibson GR. 2005. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. Appl Microbiol Biotechnol 68(3):412–6.

Tzortzis G and Vulevic J. (2009), Galacto-oligosaccharide, in Prebiotics and Probiotics: Science and Technology, ed. by Charalampopoulos D and Rastall RA. Springer, Guildford. 207–243.

Vera, C., Córdova, A., Aburto, C., Guerrero, C., Suárez, S., & Illanes, A. (2016). Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(12).

Wei, L., Xiaoli, X., Shufen, T., Bing, H., Lin, T., Yi, S., Xiaoxiong, Z. (2009). Effective enzymatic synthesis of lactosucrose and its analogues by β-d-galactosidase from bacillus circulans. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(9), 3927–3933.

Woodley, J. M. (2017). Bioprocess intensification for the effective production of chemical products. Computers and Chemical Engineering, 105, 297–307.

Zarate, S., & Lopez-Leiva, M. H. (1990). Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: A literature review. Journal of Food Protection, 53(3), 262–268.

Zhao, H. (2010). Microwave-assisted enzymatic reactions in aqueous media. In V. Polshettiwar, & R. S. Varma (Eds.), Aqueous microwave assisted chemistry (pp. 123-44). Cambridge: RSC Publishing.

Zhengyi Li, Min Xiao, Lili Lu, Yumei Li, (2008). Production of non-monosaccharide and high-purity galactooligosaccharides by immobilized enzyme catalysis and fermentation with immobilized yeast cells. Process Biochemistry. 43 (8): 896-899.

Zhou, Q. Z. K., & Chen, X. D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β-galactosidase from Kluyveromyces lactis. Biochemical Engineering Journal, 9(1), 33–40.

Zijlstra, G, De Gooijert, C., Trampert, J., (1998). Extractive bioconversions in aqueous two-phase systems. Current opinion in Biotechnology, 9, 171 - 176.

Cibergrafía

https://www.prnewswire.com/news-releases/global-lactase-market-to-reach-us-1647-mn-by-2025---persistence-market-research-676226763.html, consultado el 15 de Agosto de 2019

https://www.globenewswire.com/news-release/2015/01/12/696650/10115085/en/Galacto-Oligosaccharides-GOS-Market-Will-Be-Worth-1-01-Billion-By-2020-New-Report-By-Grand-View-Research-Inc.html, consultado el 5 de Diciembre de 2019

https://www.fedegan.org.co/estadisticas/documentos-de-estadistica, consultado el 21 de Agosto de 2019

https://www.contextoganadero.com/economia/minagricultura-pide-vigilancia-la-importaciones-de-lactosueros, consultado el 28 de Agosto de 2019

2. Evaluación de β-galactosidasas fúngicas en la producción de galactooligosacáridos

2.1 Introducción

Las β-galactosidasas son enzimas que están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se han aislado de una variedad de fuentes animales, vegetales y microbianas (Husain, Q., 2010); sin embargo, sólo unas pocas son reconocidas como seguras por las agencias reguladoras, y por tanto útiles para uso alimentario o farmacéutico (Sanz, J., 2007). A nivel industrial sólo se utilizan las galactosidasas microbianas, principalmente de levaduras (*Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces fragilis*) y fúngicas (*Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*), teniendo estas últimas las ventajas de un bajo precio y una alta estabilidad.

El origen de las enzimas empleadas para la síntesis de GOS determina en gran medida sus propiedades y comportamiento (Panesar, P., & Kumari, S., 2011, Sanz, J., 2007, Guerrero, C., *et al.*, 2013). Así como sucede con todas las enzimas, su acción catalítica depende de temperatura, pH, concentración de enzima y sustrato, y presencia de inhibidores. En este caso, la enzima tiene dos actividades simultáneas: hidrólisis y transgalactosilación (Huber *et al.*, 1976), el ajuste de las condiciones de operación determina cuál de las dos actividades prima sobre la otra y con esto la mayor producción de GOS (Vera *et al.*, 2011). La concentración inicial de lactosa es uno de los factores más determinantes sobre cuál de las dos reacciones es más preponderante, a bajas concentraciones la hidrólisis se favorece, por tener mayor cantidad de moléculas de agua disponibles para desempeñarse como aceptores nucleofílicos, mientras que a altas concentraciones de lactosa aumenta la probabilidad de que dicho aceptor nucleófílico sea un sacárido (Gosling, A., *et al.*, 2010).

Las reacciones de transgalactosilación permiten la síntesis de GOS, siendo la lactosa el donante de la galactosa necesaria en esta reacción (Husain, Q., 2010, Panesar, P. *et al.*, 2010). Cuando la concentración de lactosa es alta, la actividad hidrolítica compite con la

actividad de transgalactosilación, prevaleciendo esta última al comienzo de la reacción (Husain, Q., 2010, Panesar, P. *et al.*, 2010); pero a medida que avanza la reacción, la actividad hidrolítica se vuelve predominante, lo que finalmente conduce a la producción de glucosa y galactosa, siendo esta última un inhibidor competitivo de la enzima (Prenosil *et al.*, 1987, Vera *et al.*, 2011). El mecanismo de síntesis de GOS por transgalactosilación está bien documentado, procediendo en dos pasos consecutivos: la formación del complejo de enzima-galactosilo con la liberación simultánea de glucosa, seguida de la transferencia de la galactosa que hace parte del complejo, hasta un aceptor de galactosa que lleva un grupo hidroxilo. Cuando este aceptor es agua se producirá una hidrólisis y consecuentemente se liberará galactosa, y cuando se trata de carbohidratos se producen derivados galactosilados como los GOS (Prenosil *et al.*, 1987, Vera *et al.*, 2011, Albayrak y Yang, 2002). Las galactosidasas no son específicas con respecto al aceptor de galactosa, por lo que carbohidratos como la fructosa o la sacarosa (Gänzle, M. *et al.*, 2008, Kim, Y. *et al.*, 2006), y también los alcoholes (Irazoqui, G., *et al.*, 2009) pueden actuar como tales, lo que lleva a la síntesis de diferentes compuestos transgalactosilados.

Las diferencias en la estructura de la enzima y/o en el mecanismo de acoplamiento de los azúcares hacen que se logren diferentes distribuciones de productos de síntesis y por tanto varíen tanto el rendimiento de reacción como la selectividad de las β-galactosidasas empleadas (Gosling, A., *et al.*, 2010, Torres, D., *et al.*, 2010).

En este capítulo se evalúa el efecto del tipo de enzima, el pH, la temperatura y la relación enzima-sustrato sobre las reacciones de hidrólisis y transgalactosilación para tres enzimas termoestables de origen fúngico: una muy referenciada en la literatura (Enzeco – *A. oryzae*), y dos con pocos resultados publicados (Maxilact A4 – *A. niger* y E_BGLAN de Megazyme – *A. niger*). Se prefirió las de origen fúngico, por trabajar a temperaturas más altas que las provenientes de levaduras. Esta condición cobrará importancia en los capítulos siguientes debido a la alta concentración de sólidos necesaria para el proceso de producción de GOS y, por tanto, a la mayor solubilidad necesaria, que es lograda a mayores temperaturas. Las tres enzimas son reconocidas como GRAS.

2.2 Materiales y Métodos

Para establecer el desempeño de las enzimas se determinaron sus actividades de hidrólisis con oNPG (orto-nitrofenil β-D-galactopiranósido), sustrato estándar para evaluar esta actividad, así como la actividad de hidrólisis con lactosa, el sustrato de interés. Además, se determinó la actividad de producción de GOS (transgalactosilación) y se definieron las condiciones óptimas de producción de estos para las tres enzimas. El análisis de los resultados de estos ensayos permitió establecer la enzima más conveniente para ser usada en el resto del trabajo.

2.2.1 Materiales

Se evaluaron tres β-galactosidasas, la primera de *Aspergillus oryzae* fue un obsequio de Enzyme Development Corporation (Nueva York, EE. UU.) (Enzeco), las otras dos provenientes de *Aspergillus niger* fueron amablemente donadas por Megazyme (Wicklow, Irlanda) (EB-GLAN) e DSM Colombia (Maxilact A4). El oNPG se adquirió en Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). La lactosa, el fosfato diácido de sodio (NaH_2PO_4), el fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) y los otros productos químicos empleados fueron de grado analítico marca Merck. Los patrones de maltooligosacáridos fueron de marca Sigma-Aldrich.

2.2.2 Ensayos de actividad enzimática

Inicialmente se describe la determinación de la actividad de hidrólisis con oNPG para lactasas fúngicas, lo que permitirá comparar con los valores de las fichas técnicas de las enzimas; posteriormente se presenta la metodología para determinación de la actividad de hidrólisis y cinética con oNPG, para determinar el desempeño de la enzima a baja concentración de sustrato. A continuación, se muestran las mismas pruebas con lactosa para determinar cómo funciona la enzima con este sustrato a baja concentración. Finalmente se presenta la metodología para determinar la actividad y cinética de transgalactosilación, con lactosa a alta concentración.

2.2.2.1 Actividad de hidrólisis con oNPG

Esta prueba de actividad se basa en una hidrólisis de 15 minutos usando como sustrato oNPG a 37 °C y pH 4,5 (*buffer* acetato 0,01 M). Una unidad de actividad de lactasa (ALU, activity lactase units por sus siglas en inglés) se define como la cantidad de enzima que

libera una milimol de o-nitrofenol (oNP) a una velocidad de 1 mmol/min (FAO Corporate Document Repository, 2006), la cuantificación del oNP se hizo por espectrofotometría, determinando la absorbancia a 420 nm y relacionándola con la concentración por medio de una curva de calibración con un coeficiente de correlación superior a 0,99. Se determinó adicionalmente la actividad específica, dada por g de proteína. El contenido de proteína en la enzima se estableció mediante el método de Kjeldahl (Kirk, P., 1950).

2.2.2.2 Cinética de hidrólisis con oNPG

Los ensayos cinéticos de hidrólisis enzimática se llevaron a cabo en un lector multimodal de captura de imágenes Cytation 3 de Biotek, con microplacas de 96 pozos de 200 µl cada uno, la lectura se realizó a una longitud de onda de 420 nm (Held, P. (2007).). La temperatura fue de 40ºC y la concentración de oNPG de 2 mM. La variable de respuesta fue la actividad específica de hidrólisis, definida como µmol de oNP producido por minuto de reacción y por g de proteína en la enzima [µmol oNP. g proteína^{-1}.min^{-1}]. En los ensayos cinéticos se utilizaron cinco valores de pH empleando *buffer* McIlvaine 0,01 M (4; 4,5; 5; 5,5 y 6) y cuatro concentraciones de enzima que se establecieron con base en los resultados de Guío (2015).

Se utilizó la variable E/S*, que es la relación de la masa de proteína en la enzima a la masa del sustrato (oNPG), utilizando como valor de referencia 6,6 g proteína /g oNPG empleado por Guío (2015) para la enzima Lactozym 6500L. Adicionalmente, se probaron dos valores más bajos y uno más alto, para las tres enzimas utilizadas basados en otros antecedentes (Gargova *et al.*, 2017, Huerta *et al.*, 2011), según se puede observar en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 *E/S* relación entre la masa de proteína (g) en la enzima y la masa de oNPG (g) para Enzeco, Maxilact A4 y EBGLAN.*

Enzima	**E/S* [g proteína /g oNPG]**			
	0	**1**	**2**	**3**
Enzeco	2	3	6,6	9,4
EBGLAN				
Maxilact A4				

2.2.2.3 Actividad de hidrólisis con lactosa

La actividad de la β-galactosidasa se determinó usando lactosa 2 mM (0,68 g/L) como sustrato en *buffer* McIlvaine 0,01 M de pH 4,5, la concentración de enzima evaluada fue con la cual se obtuvo una mayor actividad usando oNPG. La mezcla de reacción se introdujo en un matraz de 50 mL, con 25 mL de volumen de trabajo. Durante el ensayo la temperatura se mantuvo a 40ºC y el tiempo de reacción fue de 15 min, al cabo de los cuales cada una de las muestras se calentó a 92ºC durante 10 minutos con un enfriamiento inmediato para detener la reacción. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de glucosa por minuto en las condiciones dadas. La cantidad de glucosa se determinó con HPLC-RI (Rico F., 2018), metodología que se describirá más adelante.

2.2.2.4 Cinética de hidrólisis con lactosa

La cinética de hidrólisis con lactosa se llevó a cabo de la misma manera como se describió en 2.2.2.3., con la diferencia de que la reacción se extendió por 35 minutos, con muestreos periódicos. Cada una de las muestras se calentó a 92ºC durante 10 minutos para detener la reacción y un posterior enfriamiento. La concentración de los azúcares se determinó por HPLC-RI (Rico F., 2018).

2.2.2.5 Actividad de transgalactosilación

La reacción de trangalactosilación se llevó a cabo en erlenmeyers de 50 mL con agitación (120 rpm), el volumen de reacción fue de 25 mL a 40°C. La lactosa se disolvió en *buffer* McIlvaine 0,01 M a pH 4,5, que es un pH que se encuentra dentro del rango óptimo de las enzimas según sus fichas técnicas. La concentración inicial de lactosa (Lo) fue de 400 g/L. La relación enzima-lactosa, E/S (g de enzima / 100 g de lactosa) fue de 0,5 (Vera, C., *et al.*, 2011). El tiempo de reacción fue de 15 minutos, al cabo de este tiempo la enzima se inactivó mediante calentamiento a 92°C durante 10 minutos y un choque térmico posterior. La actividad de transgalactosilación se definió como la cantidad de enzima que cataliza la transgalactosilación de 1 µmol de GOS por minuto a una concentración inicial de lactosa del 40% m/v, pH 4,5 y 40 °C (Rico F., 2018). La concentración de azúcares se determinó por HPLC-RI.

2.2.2.6 Cinética de transgalactosilación

A las tres enzimas se les determinó la actividad periódicamente y en ningún caso esta disminuyó más de 5%. Estas pérdidas de actividad fueron compensadas con un aumento proporcional de la concentración de la enzima en los ensayos.

La conversión de la lactosa se llevó a cabo en erlenmeyers de 50 mL con agitación (120 rpm), el volumen de reacción fue de 25 mL a diferentes temperaturas (40, 50 y 60 °C). La lactosa se disolvió en *buffer* McIlvaine 0,01M a diferentes pH 4,5, 5,0 y 5,5. La concentración inicial de lactosa (Lo) empleada fue 400 g/l. La relación enzima-lactosa, E/S (g de enzima * 100 por g de lactosa) fue de 0,25, 0,5 y 0,75. La reacción se inició mediante la adición de la enzima respectiva según la concentración de lactosa y E/S.

Se hizo seguimiento a la reacción durante 80 minutos, tomando muestras cada 20 minutos y la enzima se inactivó mediante calentamiento en un baño a 92 ° C durante 10 min. y un choque térmico posterior.

Las variables de respuesta fueron la producción de GOS (g/L), calculada por balance de materia, como la diferencia entre la cantidad inicial de lactosa y el resultado de la suma de lactosa, glucosa y galactosa en un tiempo determinado. La productividad de GOS (g/ L.min) se definió como la cantidad de GOS total por volumen de medio de reacción y tiempo de reacción y el rendimiento como la masa de GOS obtenida sobre la masa inicial de lactosa * 100 (%).

Una vez determinadas las actividades de hidrólisis y transgalactosilación y la cinética para las tres enzimas, lo que permite conocer su comportamiento bajo condiciones estándar y compararlo entre ellas y con otras similares, se procedió a definir las condiciones óptimas de producción de GOS.

2.2.3 Optimización en la producción de GOS

La optimización se llevó a cabo bajo las mismas condiciones experimentales empleadas en las pruebas de transgalactosilación y de acuerdo con un diseño de experimentos de superficie de respuesta de Box Behnken de tres factores (pH, T y E/S) y tres niveles como se puede observar en la Tabla 2.2 ($p \leq 0{,}05$).

Tabla 2.2 *Factores y niveles en diseño de experimentos de Box Behnken.*: g de enzima * 100 por g de lactosa*

Factores		
T(ºC)	**pH**	**E/S***
40	4,5	0,25
50	5	0,5
60	5,5	0,75

2.2.4 Métodos Analíticos

Las muestras tomadas durante las pruebas de actividad y cinética enzimática se diluyeron 1:20 con agua desionizada, se filtraron en membranas de acetato de celulosa de 0,22 µm y se almacenaron a 4ºC durante un tiempo inferior a un día, a la espera del análisis de cuantificación de azúcares por HPLC.

Las concentraciones de lactosa, glucosa, galactosa y galactooligosacáridos se determinaron con una columna Transgenomic CHO-411 a 75ºC, operada por un sistema HPLC (Thermo) equipado con un detector Shodex RID-10A. El eluyente fue agua desionizada y desgasificada a un caudal de 0,4 mL/min (Guío, 2015). La cuantificación se hizo apoyada en patrones de maltooligosacáridos, con los cuales se construyeron las curvas de calibración con un coeficiente de correlación superior a 0,99.

2.2.5 Análisis estadístico

Los ensayos de actividad enzimática con oNPG y lactosa se hicieron por triplicado. A estos resultados se les hizo análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de 0,05 empleando el software Minitab 16.

2.3 Resultados y Análisis

Se presentan a continuación los resultados encontrados durante la evaluación de las tres enzimas frente a su actividad de hidrólisis y transgalactosilación, así como de la optimización de su producción de GOS.

2.3.1 Actividad hidrolítica de oNPG

La actividad enzimática de las enzimas Enzeco y Maxilact A4, que se muestran en la Tabla 2.3, está dentro de los valores reportados en sus respectivas fichas técnicas (Anexo 1). La actividad reportada en la ficha técnica para la enzima EBGLAN se determinó con pNPG como sustrato, de tal manera que no es comparable con el obtenido en este trabajo con oNPG y puede explicar la gran diferencia entre los valores.

Tabla 2.3 *Actividad hidrolítica (ALU/g) para las enzimas empleadas. *:este valor está dado para una prueba con pNPG, las demás condiciones del ensayo son iguales.*

Enzima	Contenido de proteína (%)m/m	Actividad (ALU/g) (teórica)	Actividad (ALU/g) (experimental)	Actividad específica (ALU/g de proteína)
Enzeco	39	Min. 100000	105659+/-6754	270921+/-17331 a
Maxilact A4	2,8	Min. 5000	5562+/-399	198643+/-14250 b
EBGLAN	22,6	Min. 54240*	40577+/-5619	179544+/-24863 b

Al comparar la actividad específica de la Tabla 2.3 se encuentra que la enzima Enzeco es más activa que las otras dos, quizá por ser la única obtenida a partir de *A. oryzae*. Esta fuente es más común para enzimas de aplicación industrial que la de *A. niger* (Scott, F., 2016).

2.3.2 Cinética de hidrólisis con oNPG

A continuación, se muestran los resultados de los experimentos que evaluaron el efecto del pH, el tipo de enzima y la relación enzima a sustrato (oNPG) sobre la cinética de hidrólisis.

2.3.2.1 Efecto del pH sobre la hidrólisis con oNPG

Las enzimas provenientes de *Aspergillus oryz*ae y *Aspergillus niger* se caracterizan por presentar un pH apropiado para hidrólisis de oNPG entre 4 y 4,5 (Gargova *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2009; Peña-Montenegro & Sánchez, 2010; Avella *et al.*2011), siendo este un comportamiento característico de las enzimas fúngicas (Cruz, R., *et al.*, 1999). Esto concuerda con los resultados presentados en la Figura 2.1, donde a pH 4 se obtiene la

actividad hidrolítica específica más alta para Enzeco y EB GLAN, para Maxilact lo es al inicio, pero posteriormente el comportamiento cambia.

Al observar la cinética de generación de oNP en la Figura 2.1, se puede apreciar de mejor manera como se va dando este proceso para cada enzima.

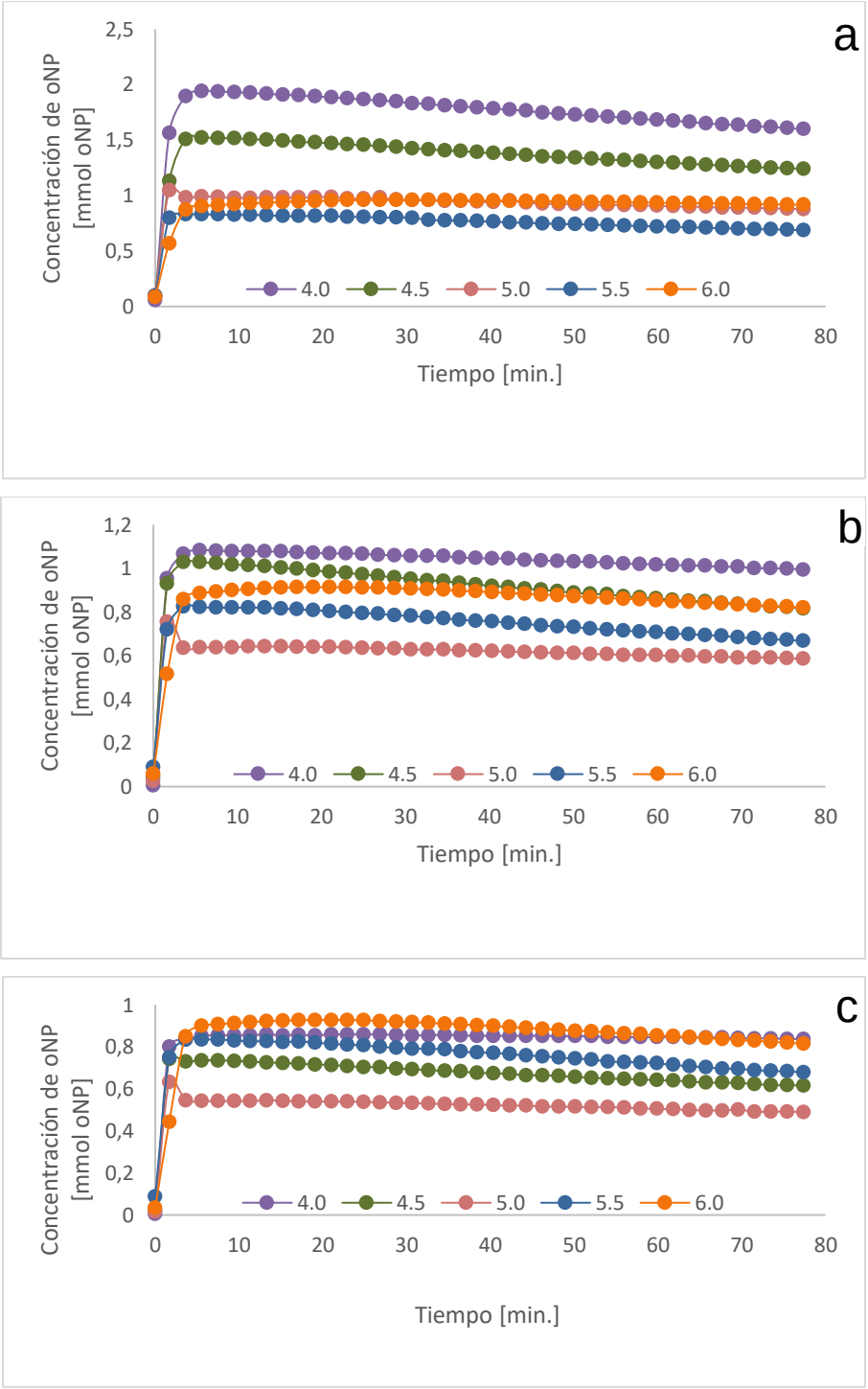


Figura 2.1 *Efecto del pH sobre la concentración de oNP[mmol oNP] para las tres enzimas a) Enzeco, b) EB-GLAN ,c) Maxilact A4 , T=40ºC, E/S*=3 g proteína /g oNPG.*

En la Figura 2.1 se observa la concentración de oNP contra el tiempo para las tres enzimas, Enzeco muestra el mayor valor 1,94 mM oNP (pH 4, t: 5,5 s), EBGLAN 1,09 mM oNP (pH 4, t: 5,5 s) y Maxilact 0,93 mmol oNP (pH 6, t: 21 s).

En la Figura 2.1, se observan los mayores valores de concentración de oNP obtenidos para Enzeco y EBGLAN a pH 4, estos disminuyen a medida que el pH aumenta hasta un valor mínimo (pH 5,5 y 5, respectivamente), a partir del cual la concentración aumenta. Para Maxilact el comportamiento es similar con un valor mínimo a pH 5, sin embargo la máxima concentración de oNP se logra a pH 6. Para esta enzima inicialmente la mayor concentración de oNP también se da para pHs bajos, pero después del segundo tiempo de muestreo el máximo valor de concentración de oNP se da para pH 6. Este comportamiento es similar al reportado por Kim, S., *et al.*(1997), para una lactasa de *K. lactis*, la cual después de alcanzar su máximo a pH de 6,5, disminuye hasta un mínimo a pH 7, para después volver a aumentar.

En la Figura 2.1 se observa cómo se alcanza un máximo en la concentración de oNP antes de los primeros 10 min en la mayoría de los casos, después se da una disminución hasta el final del ensayo. Aparentemente una posible pérdida en la estabilidad del color puede causar tal disminución, como ya fue observado en el trabajo de Held, P. (2007).

En el Anexo 3 se muestra la evolución de la velocidad de reacción, que va disminuyendo con el tiempo similar a lo mostrado por Huerta *et al.*(2011). Esto puede ser causado, porque al principio de la reacción los sitios activos de la enzima están vacíos, pero son rápidamente ocupados por el oNPG ocasionando la reacción y posterior liberación del oNP; sin embargo, la liberación y posterior ocupación del sitio activo para una nueva conversión se tarda más por la continua disminución de la concentración del sustrato, haciendo que cada vez sea más difícil el encuentro de este con los sitios activos de la enzima.

La disminución de la actividad máxima con el aumento de pH es más marcada para la enzima de Enzeco al incrementar el pH de 4 a 4,5, con una disminución aproximada del 30%, mayor que la observada por Gargova,S., *et al.*(2017), quienes tuvieron una disminución aproximada del 10% en la actividad para una enzima de *A. oryzae* al aumentar el pH de 4,5 a 5 (para pH 4, esta enzima proporcionó la máxima actividad en ese trabajo),

mientras que para el pH de 6, el mayor evaluado en dicho trabajo, la disminución superó el 68%. La tendencia observada para Maxilact A4 y EBGLAN es gradual logrando las mayores disminuciones a pH 6, de 48% y 51% respectivamente. De acuerdo con esto, la enzima de *A. oryzae* presenta una mayor actividad, pero también es la más sensible al aumento de pH.

A pesar de que la metodología empleada en la obtención de estos resultados es diferente a la usada para la determinación de la actividad hidrolítica de las enzimas fúngicas (FAO Corporate Document Repository, 2006) mostrada en la Tabla 2.3, ambos presentan el mismo orden de las actividades para las tres enzimas.

2.3.2.2 Efecto del tipo de enzima y E/S* sobre la hidrólisis de oNPG

La relación proteína a sustrato E/S*, se ajustó para normalizar cada enzima en función de su componente activo (la proteína) y así poder comparar sus actividades específicas. Todas las enzimas fúngicas evaluadas exhiben un comportamiento similar, en los tres casos se logra la actividad enzimática más baja con una relación de 9,4 g proteína /g oNPG, que aumenta hasta su máximo valor con un E/S* de 3 para disminuir con proporciones menores (Figura 2.2). Esto puede relacionarse con la forma particular como cada una de ellas recibe el sustrato en sus sitios activos, lo cual está asociado a su estructura y morfología que para el caso de las enzimas de *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*, guardan una similitud morfológica del 81% (Rico- Díaz *et al.*, 2017).

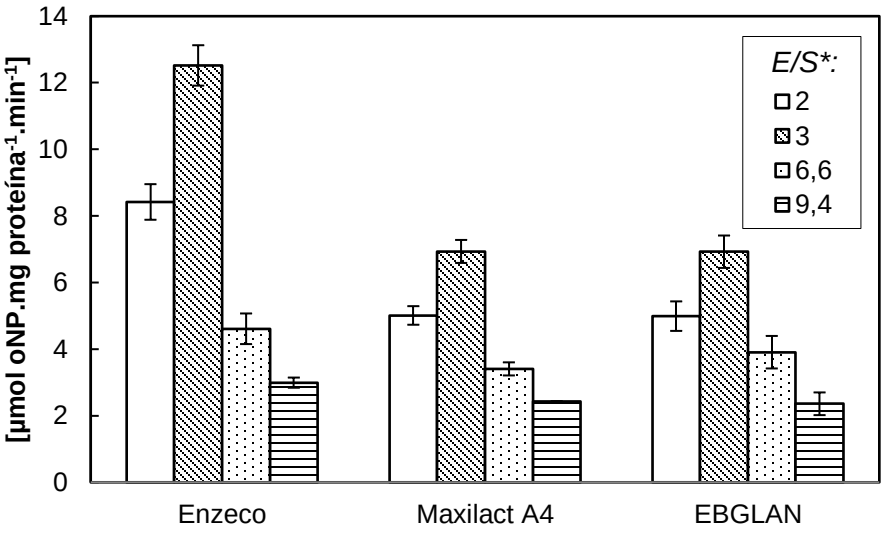


Figura 2.2 *Efecto del tipo de enzima y E/S* sobre la actividad hidrolítica específica [µmol oNP.g proteína^{-1}.min^{-1}] a T=40ºC, 15 min., pH 4.*

Para la enzima Enzeco el valor de la actividad específica máxima fue de 12,52 µmol oNP.mg proteína^{-1}.min^{-1}, comparable con los 16,73 µmol oNP.mg proteína^{-1}.min^{-1} reportados por Gargova *et al* (2017) para un cultivo líquido de la enzima de *Aspergillus oryzae* purificado por ultrafiltración; sin embargo, este medio puede tener otras enzimas con alta actividad hidrolítica que pueden incrementar su actividad.

Seyis *et al.*(2004) obtuvieron aproximadamente 3,4 µmol oNP.mg proteína^{-1}.min^{-1} para una lactasa de *Aspergillus niger*, mientras que en este trabajo las enzimas de ese hongo, EBGLAN y Maxilact A4, presentaron valores de 6,926 y 6,934 µmol oNP.mg proteína^{-1}.min^{-1}, respectivamente (Figura 2.2). La diferencia puede deberse al efecto que tiene el uso de soluciones amortiguadoras diferentes, acetato en el primero y McIlvaine en este trabajo. Adicionalmente, Seyis *et al.* evaluaron la actividad del extracto enzimático, con impurezas que pueden afectar la actividad, mientras que en el presente trabajo se determinó la actividad sobre la enzima comercial purificada, lo cual puede aportar a la diferencia encontrada.

De acuerdo con Guerrero, C. *et al.*(2015) la lactasa de *Aspergillus oryzae* presenta mayores valores de actividad específica que la lactasa de *Aspergillus niger*, lo cual concuerda con este trabajo donde la enzima Enzeco (*Aspergillus oryzae*) presentó los valores mayores de la actividad específica (12,52 µmol oNP.mg proteína^{-1}.min^{-1}) frente a las enzimas EBGLAN y Maxilact A4 (*Aspergillus niger*) (6,926 y 6,934 µmol oNP.mg proteína^{-1}.min^{-1}).

De otro lado, es probable que las diferencias en las condiciones de los ensayos realizados hayan tenido efecto, ya que Gargova *et al.*(2017) llevaron a cabo sus ensayos a 30ºC, 1,6 mM de oNPG y pH 4,8, Seyis *et al.*a 50ºC, 100 mM y pH 5, y Guerrero *et al.*(2015) a 40ºC, 45 mM de oNPG y el pH óptimo de cada enzima; condiciones todas diferentes a las empleadas en este presente trabajo (40°C, 2 mM de oNPG y pH 4), lo que hace difícil su comparación.

2.3.3 Actividad hidrolítica con lactosa

Una vez determinada la capacidad hidrolítica de las enzimas con oNPG como sustrato, se determinó la actividad específica de hidrólisis con lactosa, arrojando los siguientes resultados para cada enzima: Enzeco 1,49 +/-0,065, Maxilact A4 1,30 +/- 0,048 y EBGLAN

1,14 +/- 0,079 [µmol glucosa.mg proteína^{-1}.min^{-1}] (Figura 2.3). Estos resultados presentan algo en común con los obtenidos con oNPG (Figura 2.2) y es el hecho de que la mayor actividad se presenta para Enzeco en ambos sustratos. Nakano, H., *et al.*, (1987) establecieron que a pesar de que la lactosa es el sustrato natural para esta enzima, puede haber sustratos que presentan mayor hidrolizabilidad y por ende mayor actividad de la enzima frente a ese sustrato, según esto el oNPG es más hidrolizable por las enzimas evaluadas que la lactosa, lo cual puede justificar la amplia diferencia de la actividad específica al comparar con la Figura 2.2.

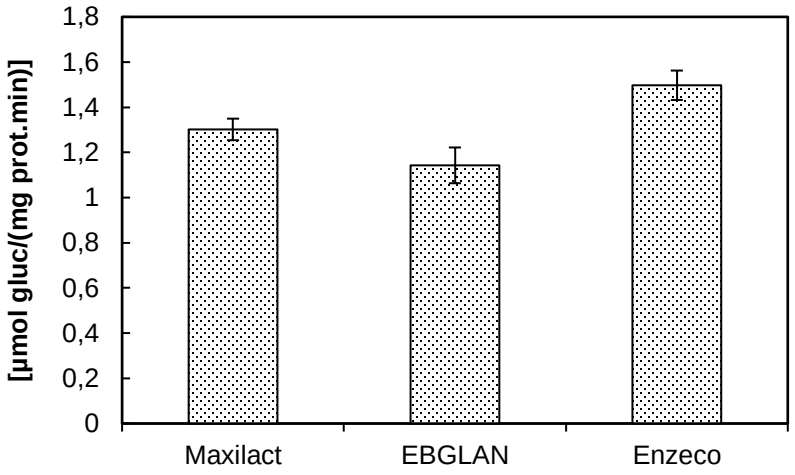


Figura 2.3 *Actividad hidrolítica específica con lactosa [µmol glucosa. mg proteína^{-1}.min^{-1}] a T=40ºC, 15 min., pH 4*

2.3.4 Cinética de hidrólisis con lactosa

En la Figura 2.4 se muestra la cinética de hidrólisis de lactosa para las tres enzimas, allí se puede apreciar que la enzima Enzeco consume casi toda la lactosa (99,4%), mientras que la EBGLAN el 78,6% y la Maxilact A4 el 64,6%. Debido a la baja concentración de lactosa (2 mM o 0,68 g/L) y a la alta actividad hidrolítica de la enzima Enzeco se logra cerca del 100% de hidrólisis, lo que conlleva un alto consumo de lactosa (Figura 2.3 y Tabla 2.3).

Para las tres enzimas se observa que la producción de glucosa y galactosa es proporcional a la lactosa hidrolizada, la menor capacidad de hidrólisis de EBGLAN y Maxilact A4 (Figura 2.4) hacen que se obtenga menos glucosa y galactosa, lo cual es consistente con lo observado en la Tabla 2.3 y la Figura 2.3.

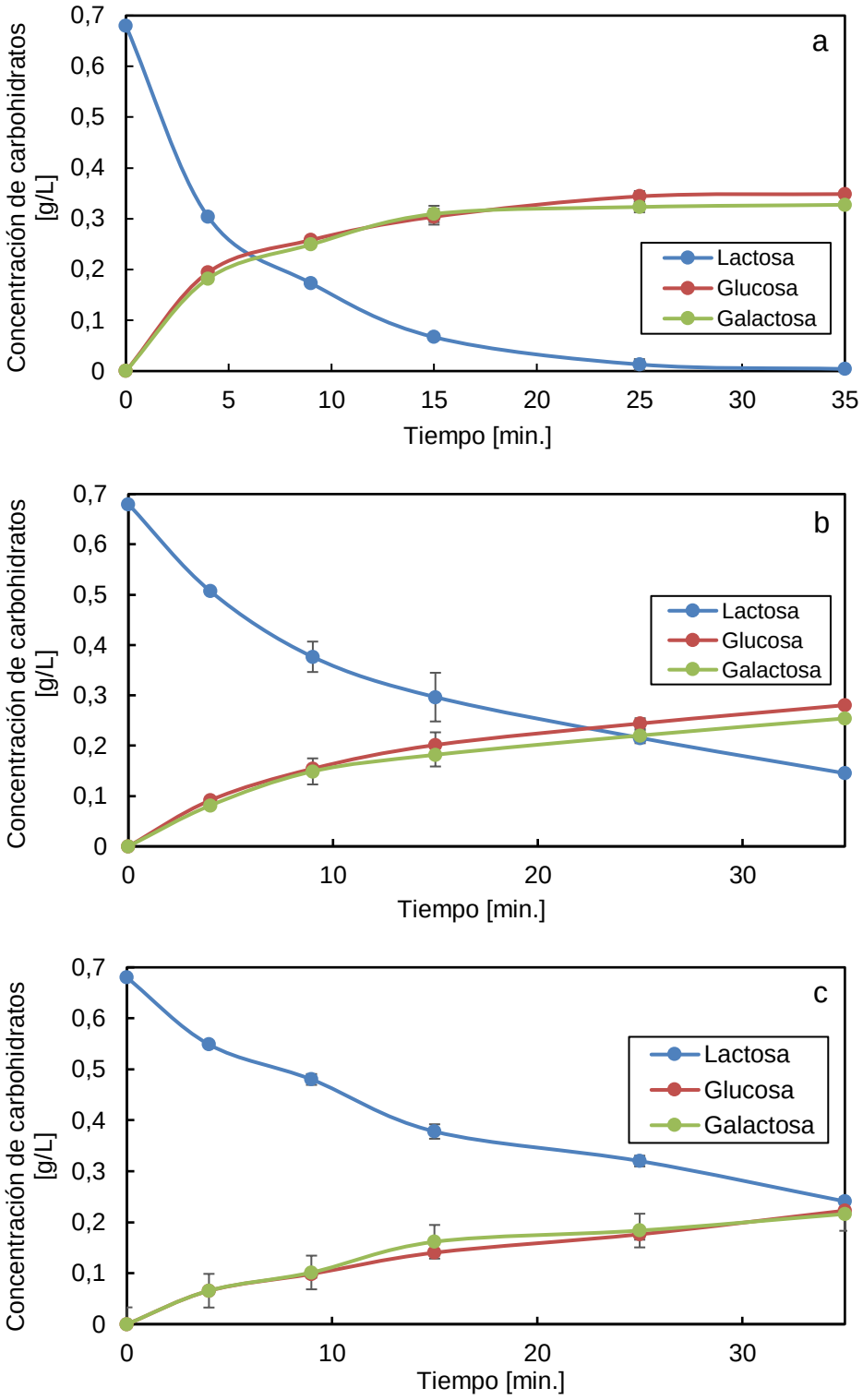


Figura 2.4 *Hidrólisis de lactosa vs tiempo para a) Enzeco, b) EBGLAN y c) Maxilact A4. pH 4, T=40ºC, E/S*=3 g proteína /g oNPG.*

2.3.5 Actividad de transgalactosilación

Después de haber establecido la capacidad hidrolítica de las enzimas, es muy importante definir su capacidad de transgalactosilación ya que con ella se obtiene el producto de interés; por tanto, el balance entre estas dos actividades definirá el rendimiento en la producción de GOS. A continuación, se presentan las actividades de transgalactosilación determinadas (Tabla 2.4).

Tabla 2.4 *Actividad de transgalactosilación (µmol de GOS.min^{-1}.g enzima^{-1}) para una concentración inicial de lactosa del 40% m/m, pH 4,5 y 40 ° C, para las enzimas empleadas*

Enzima	Actividad de transgalactosilación (µmol de GOS.min^{-1}. g enzima^{-1})	Actividad específica de transgalactosilación (µmol de GOS.min^{-1}. g proteína^{-1})
Enzeco	31576,10 +/-928	80964,36+/-2379 a
Maxilact A4	2050,39+/-113	73228,36+/-4028 b
EBGLAN	17721,52+/-644	78413,82+/-2849 ab

Las actividades específicas de transgalactosilación de EBGLAN no presenta diferencias significativas con Enzeco y Maxilact A4, mientras que entre ellas si se presentan tales diferencias (Tabla 2.4), por lo que se presume que su origen fúngico común determina este comportamiento (Torres, D., *et al.*2010).

La capacidad hidrolítica de Enzeco (*A. oryzae*) es mayor, ya sea con oNPG o con lactosa como sustrato, al compararla con EBGLAN y Maxilact A4 (*A. niger*), por tanto el origen de la enzima puede marcar la diferencia en cuanto a la reacción de hidrólisis en los dos casos. Esta diferencia no se observa en la reacción de transgalactosilación.

2.3.6 Cinética de transgalactosilación

Los GOS son el resultado de reacciones simultáneas de generación (transgalactosilación) y consumo (hidrólisis) de GOS, esto hace muy importante establecer el momento de máxima producción a través del seguimiento del comportamiento cinético. Para las tres enzimas se hizo tal seguimiento y se estableció que en el minuto 80 se lograba la máxima producción de GOS, después de esto la hidrólisis prima sobre la transgalactosilación, provocando la disminución en la concentración de GOS totales.

Las altas concentraciones iniciales de lactosa favorecen las reacciones de transgalactosilación sobre las de hidrólisis; en este caso se utilizaron 400 g/L, la concentración sugerida en muchos trabajos para proporcionar las mejores condiciones para la mayor producción de GOS (Gosling, A., *et al.*, 2010, Torres, D., *et al.*, 2010).

De esta lactosa inicial solamente un porcentaje es aprovechado, Enzeco y EBGLAN transformaron el 51% de la lactosa inicial y Maxilact A4 el 47% (Figura 2.5a). Neri D. *et al.*(2009) e Iwasaki K. *et al.*(1996), reportaron valores de conversión de lactosa para enzimas de *Aspergillus oryzae*, de 56 y 55% respectivamente, pero con concentraciones iniciales de lactosa de 500 y 571 g/L a 40ºC, valores mayores que el evaluado en este trabajo.

De otro lado, la producción de GOS para Enzeco fue de 107,69+/- 3,24 g/L, para Maxilact A4, 96,15+/-2,23 g/L y para EBGLAN 99,84 +/-2,1 g/L (Figura 2.5). Rico-Díaz *et al.*(2017), afirman que las enzimas de *Aspergillus oryzae* presentan mayor producción de GOS que las correspondientes a *Aspergillus niger*, con las cuales se ha obtenido 48 g/L de GOS pero con concentraciones iniciales de lactosa de 300 g/L (Toba & Adachi, 1978).

Maxilact A4 exhibió la menor capacidad hidrolítica de las tres enzimas empleadas; como se puede apreciar en la Figura 2.5, el consumo de lactosa es el menor y como consecuencia produce menos glucosa y galactosa, por lo que a pesar de poseer la misma actividad de transgalactosilación de las otras enzimas, la menor galactosa disponible implicó una menor producción de GOS. EBGLAN hidroliza más lactosa que Maxilact A4 y por ende produce más glucosa y galactosa. La producción de GOS no presenta diferencias significativas entre estas dos enzimas, probablemente porque a pesar de que EBGLAN posee mayor cantidad de galactosa disponible para la generación de GOS, tal diferencia no es muy grande, y al requerirse de dos moléculas de galactosa para formar una molécula de GOS3 y de tres moléculas de galactosa para formar una de GOS4, los GOS totales generados no marcan una diferencia significativa.

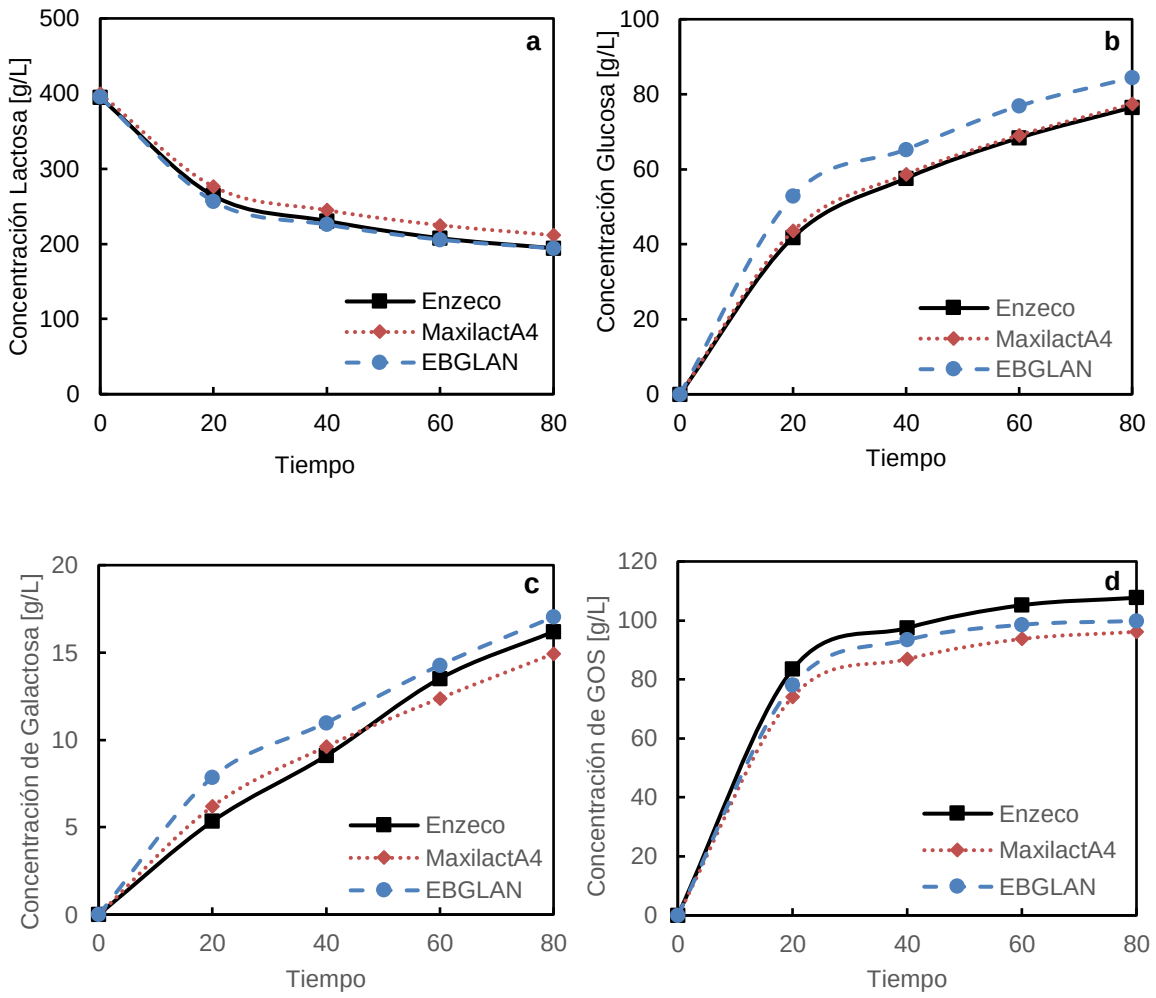


Figura 2.5 *Cinética de la reacción de transgalactosilación para Enzeco, Maxilact A4 y EBGLAN a las mejores condiciones evaluadas para cada una de ellas. a) Lactosa, b) Glucosa, c) Galactosa y d) GOS*

La cantidad de GOS que se produce por las reacciones enzimáticas con β-galactosidasas, es el resultado de un balance entre la reacción de hidrólisis y la de transgalactosilación,. La enzima Enzeco mostró el mejor balance de estas actividades, para lograr la mayor concentración de GOS totales (107,69+/- 3,24 g/L).

2.3.7 Optimización de la producción, el rendimiento y la productividad, para las tres enzimas.

En la Tabla 2.5 las condiciones de reacción mostradas son el pH, la temperatura y las concentraciones de enzima y de sustrato, que son de gran importancia para enzimas fúngicas. Los valores de pH y temperatura que reportan mejores resultados son del orden de 4 – 5 para el pH y 50 – 60 ºC para la temperatura (Prenosil *et al.*, 1987; Iwasaki *et al.*,

1996; Boon *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2006; Gaur *et al.*, 2006; Matella & Dolan, 2006; Neri *et al.*, 2009; Czermak *et al.*, 2004; Ebrahimi *et al.*, 2006).

La temperatura puede aumentar la solubilidad de la lactosa, que es baja a temperatura ambiente (220 g/L a 25°C) (White J., 2000). Por esta razón, varias investigaciones se han dirigido al descubrimiento y caracterización de enzimas termoestables (Chen *et al.*, 2008, Hatzinikolaou *et al.*, 2005, Park *et al.*, 2008,). Estas enzimas permiten que los procesos funcionen a temperaturas elevadas y, por lo tanto, con una lactosa inicial más concentrada, lo que a su vez puede aumentar la concentración máxima de GOS lograda.

La posibilidad de operar a temperaturas más altas utilizando enzimas termoestables también ofrece la ventaja de limitar el potencial de contaminación microbiana dentro del proceso. Sin embargo, los aumentos en los rendimientos deberán equilibrarse con la mayor pérdida de actividad enzimática a temperaturas más altas (Gosling, A., *et al.*2010). Se ha demostrado que las reacciones de Maillard entre las cadenas laterales amínicas de la enzima y los azúcares se vuelven significativas inactivando enzimas termoestables a 80ºC o más (Bruins, M., *et al.*, 2003).

El pH ha sido bastante reconocido por afectar la cinética de hidrólisis de lactosa y de síntesis de GOS por β-galactosidasas de *E. coli* (Huber *et al.*, 1976). Esto sugiere que puede ser posible controlar selectivamente las tasas de síntesis y degradación de GOS variando el pH del medio de reacción, aumentando así los rendimientos de GOS. Sin embargo, esta puede ser una característica que varía entre diferentes enzimas, similarmente al efecto de la temperatura sobre el rendimiento. Muchos estudios también han encontrado valores óptimos de pH similares para la síntesis de GOS y la hidrólisis de galactósidos (Hsu, C. *et al*, 2006; Hsu C. *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2008). Este fue el caso de la β-galactosidasa de *Sulfolobus solfataricus*, que mostró un pH óptimo para la síntesis de GOS a 6.0, cercano al óptimo para la hidrólisis del oNPG a pH 6.5 (Park *et al.*, 2008). Adicionalmente, según Iwasaki *et al.*(1996) las concentraciones de sustrato para una alta producción de GOS están entre 20 – 50% m/v.

Tabla 2.5 *Productividad y rendimiento de GOS., Lo: Concentración inicial de lactosa (g/L). P: Productividad de GOS (g/L*h). Y: Rendimiento de GOS(%)= Concentración de GOS (g/L)/Lo.*

Fuente de la enzima	pH	T (ºC)	Lo (g/L)	P (g GOS/L*h)	Y (g GOS/g Lo*100)	Fuente
Enzeco - Ao	4,5	55	395	81	27	Este trabajo
EBGLAN - An	5	55	400	72	24	Este trabajo
Maxilact A4 - An	5	55	395	75	25	Este trabajo
A. niger	7	40	2-30	-	16	Toba y Adachi (1978),
A. oryzae	4,5	40	380	24	31	Iwasaki *et al.*1996.
A. oryzae	4,5	40	500	-	52	Neri *et al.*(2009)
A. oryzae	4,5-6,5	40-60	100-475	-	10-35	Vera *et al.*(2011).
A. oryzae	4,5	40	43-270	-	22	Matella y Dolan (2006).

Observando la Tabla 2.5, los trabajos donde una o más de estas condiciones son muy diferentes a los valores sugeridos reportan valores inferiores de rendimiento de GOS (Toba & Adachi, 1978; Vera *et al.*, 2011; Matella & Dolan, 2006). En los trabajos de Iwasaki *et al.*(1996) y Neri *et al.*(2009), a pesar de trabajar a una baja temperatura (40ºC), se logra el mayor rendimiento debido a la elevada concentración de lactosa usada, 57 y 50% m/v, respectivamente.

Esto es un indicativo de que la concentración de lactosa es una variable de suma importancia para lograr la máxima producción de GOS (Mahoney, *et al.*1998, Gosling, A., *et al.*2010, Torres, D., *et al.*2010). Esta dependencia de la concentración inicial de lactosa tiene al menos dos factores contribuyentes: una mayor disponibilidad de aceptores de galactosilo de sacáridos y una menor disponibilidad de agua. El primero aumenta la tasa de síntesis de GOS y el último disminuye la hidrólisis de lactosa y de GOS, esto hace que usar altas concentraciones iniciales de lactosa promueva la síntesis de GOS (Cruz-Guerrero, 2006, Chen, S. *et al.*, 2001; Maugard, T. *et al.*, 2003).

Los resultados de la optimización usando el diseño de Box Behnken se muestran en la Tabla 2.6 y Figura 2.6, de acuerdo con estos la enzima Enzeco, logra el mayor rendimiento y productividad de GOS (28% y 1,38 g. $L^{-1}.min^{-1}$ respectivamente), a T= 54,3 ºC, pH=4,6 y

E/S =0,39. Esto es una consecuencia del buen balance de las actividades de hidrólisis y transgalactosilación, para esta enzima, como se discutió anteriormente.

Tabla 2.6 *Resultados de la optimización usando el software Minitab 16.*: productividad tomada a los 80 min.*

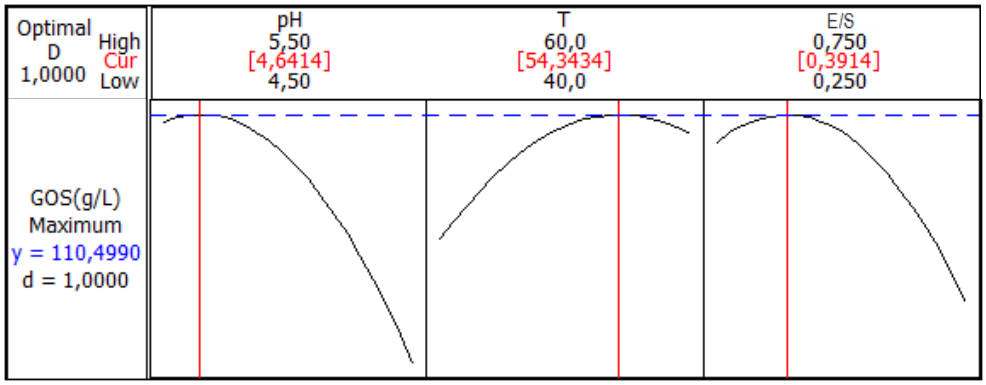
Enzima	GOS (g/L)	Productividad* (g/L.min)	Rendimiento % (GOS/Lo)	Topt ºC	pH opt	E/S opt
Enzeco	110,5	1,38	28	54,3	4,6	0,39
Maxilact A4	99,9	1,25	25	53,9	4,8	0,54
EBGLAN	95,8	1,2	24	51,7	4,8	0,52

Las condiciones optimizadas obtenidas para Enzeco, observadas en la Figura 2.6 pH 4,6, T=54ºC y E/S=0,39, se validaron experimentalmente. El rendimiento así obtenido fue de 29,2%, la productividad de 1,36 g. $L^{-1}.min^{-1}$ y la producción de 107,69 g. L^{-1}, estos resultados no presentan diferencias significativas con los optimizados por Minitab 16 (Tabla 2.6 fila 2).

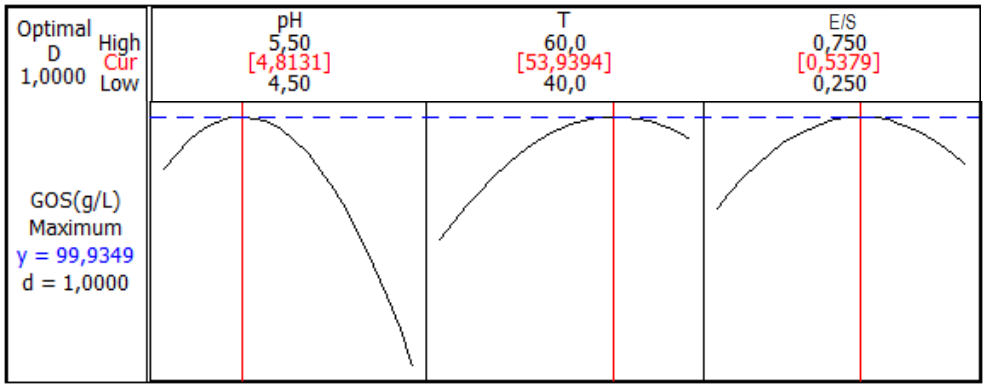
Los resultados de la Figura 2.6 concuerdan con lo encontrado en otros trabajos (Iwasaki *et al.*, 1996, Matella & Dolan, 2006; Neri *et al.*, 2009, Vera, C. *et al.*2011), donde las enzimas de *A. oryzae*, se destacan en la producción de GOS y con rendimientos similares a los obtenidos en este trabajo.

El mejor desempeño en las pruebas cinéticas, respaldan los resultados de mayor producción de GOS para esta enzima, por esta razón fue la seleccionada para el resto del trabajo que se presentará en los próximos capítulos.

a)



b)



c)

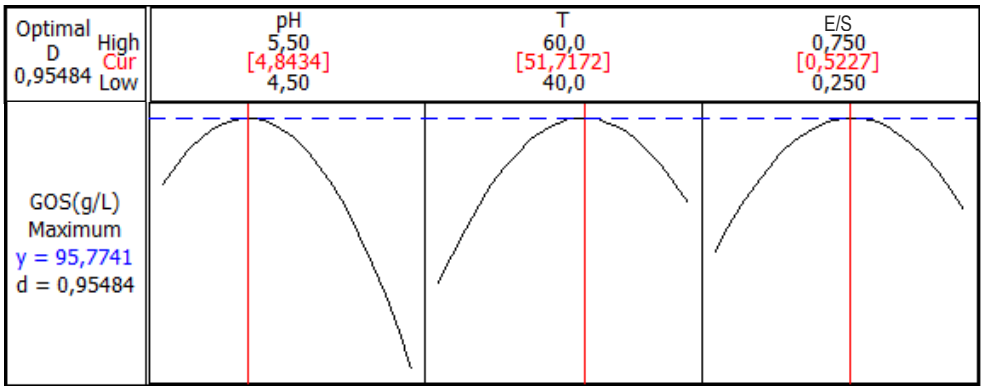


Figura 2.6. *Gráfica de optimización de producción de GOS (g/L) con Minitab 16, para las enzimas a) Enzeco , b) Maxilact , c) EBGLAN.*

2.4 Conclusiones

Se definieron las propiedades hidrolíticas para tres β-galactosidasas comerciales, Enzeco, Maxilact A4 y EBGLAN, usando como sustratos oNPG y lactosa. La enzima Enzeco presentó la mayor actividad hidrolítica específica con oNPG, seguido por EBGLAN y Maxilact A4 que presentaron el mismo valor.

La actividad hidrolítica específica con lactosa presentó un comportamiento similar al obtenido con oNPG, Enzeco presenta el mayor valor y las otras dos enzimas un valor menor y similar entre ellas.

La actividad de transgalactosilación específica se evaluó para las tres enzimas y no se encontraron diferencias significativas, lo que implica una capacidad similar de síntesis de GOS para ellas.

Se evaluó la producción de galactooligosacáridos usando las tres β-galactosidasas comerciales logrando rendimientos de producción de GOS de 27% m/m, 25% y 24% para las enzimas Enzeco, Maxilact A4 y EBGLAN, respectivamente.

Las condiciones optimizadas obtenidas para Enzeco, fueron pH 4,6, T=54ºC y E/S=0,39, bajo las cuales la producción, el rendimiento y la productividad de GOS fueron 107,7 g/L, 29,2% y 1,36 g. $L^{-1}.min^{-1}$ respectivamente, en el mismo orden los resultados optimizados por Minitab 16 fueron 110,5 g/L, 28% y 1,38 $g.L^{-1}.min^{-1}$, que no son estadísticamente diferentes a los experimentales.

La lactasa de Enzeco presenta los mejores resultados para las pruebas de hidrólisis con ONPG, lactosa y de producción de GOS respecto a las otras dos evaluadas por lo que fue elegida para el trabajo posterior.

2.5 Referencias

Albayrak, N., & Yang, S.-T. (2002). Production of galacto-oligosaccharides from lactose byAspergillus oryzae β-galactosidase immobilized on cotton cloth. Biotechnology and Bioengineering, 77(1), 8–19.

Avella, N.; Solano C.; Castro G. (2011).Comparación de la producción de galactooligosacáridos (gos) a partir de lactosuero en polvo y lactosa usando Aspergillus oryzae y enzima β-galactosidasa libre, (2011). Tesis de pregrado, Ingeniería de Alimentos, Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia.

Boon, M. a., Janssen, a. E. M., & Van ’t Riet, K. (2000). Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. Enzyme and Microbial Technology, 26(2–4), 271–281.

Bruins, M. E., Van Hellemond, E. W., Janssen, A. E. M., & Boom, R. M. (2003). Maillard reactions and increased enzyme inactivation during oligosaccharide synthesis by a hyperthermophilic glycosidase. Biotechnology and Bioengineering, 81(5), 546–552.

Charalampopoulos, D., & Rastall, R. A. (2012). Prebiotics in foods. Current Opinion in Biotechnology, 23(2), 187–191.

Chen, S. X., Wei, D. Z., & Hu, Z. H. (2001). Synthesis of galacto-oligosaccharides in AOT/isooctane reverse micelles by β-galactosidase. Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic, 16(2), 109–114.

Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Zhao, J., Tian, F., & Zhang, H. (2008). Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from Bacillus stearothermophilus. Journal of Dairy Science, 91(5), 1751–1758.

Cheng, C.-C., Yu, M.-C., Cheng, T.-C., Sheu, D.-C., Duan, K.-J., & Tai, W.-L. (2006). Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with Kluyveromyces marxianus. Biotechnology Letters, 28(11), 793–7.

Cruz, R., Cruz, V. D., Belote, J. G., Khenayfes, M. de O., Dorta, C., & Oliveira, L. H. dos S. (1999). Properties of a new fungal b-galactosidase with potential application in the dairy industry. Revista de Microbiologia, 30(3), 265–271.

Cruz-Guerrero, A. E., Gómez-Ruiz, L., Viniegra-González, G., Bárzana, E., & García-Garibay, M. (2006). Influence of water activity in the synthesis of galactooligosaccharides produced by a hyperthermophilic beta-glycosidase in an organic medium. Biotechnology and Bioengineering, 93(6), 1123–1129.

Czermak, P., Ebrahimi, M., Grau, K., Netz, S., Sawatzki, G., & Pfromm, P. H. (2004). Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process, 232, 85–91.

Ebrahimi, M., Gonzalez, R., & Czermak, P. (2006). Experimental and theoretical study of Galactosyl – Oligosaccharides formation in CRMR by thermostable mesophilic enzymes, 200(September), 686–688.

FAO Corporate Document Repository, 2006. Specific methods, Enzyme preparations in, http://www.fao.org/docrep/009/a0691e/A0691E07.htm, consultado 03/03/2015.

Gänzle, M. G., Haase, G., & Jelen, P. (2008). Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. International Dairy Journal, 18(7), 685–694.

Gargova, S., Pishtijski, I., & Stoilova, I. (2017). Purification and Properties of β -Galactosidase from Aspergillus Oryzae j3-galactosidase from *Aspergillus oryzae*, 2818(July).

Gaur, R., Pant, H., Jain, R., & Khare, S. K. (2006). Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized Aspergillus oryzae β-galactosidase. Food Chemistry, 97(3), 426–430.

Gloster, T. M., Roberts, S., Ducros, V. M. A., Perugino, G., Rossi, M., Hoos, R., Davies, G. J. (2004). Structural studies of the β-glycosidase from Sulfolobus solfataricus in complex with covalently and noncovalently bound inhibitors. Biochemistry, 43(20), 6101–6109.

Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. Food Chemistry, 121(2), 307–318.

Guerrero, C., Vera, C., Conejeros, R., & Illanes, A. (2015). Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β-galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. Enzyme and Microbial Technology, 70.

Guío, F (2015). Evaluación de la producción de galactooligosacáridos a partir de materias primas lácteas con β-galactosidasa inmovilizada, Tesis de Maestría en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia.

Hatzinikolaou, D. G., Katsifas, E., Mamma, D., Karagouni, A. D., Christakopoulos, P., & Kekos, D. (2005). Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by a thermostable beta-galactosidase from *Aspergillus niger*. Biochemical Engineering Journal, 24(2), 161–172.

Held, P. (2007). Kinetic Analysis of β -Galactosidase Activity using the PowerWave TM HT and Gen5 TM Data Analysis Software.

Hsu, C. A., Lee, S. L., & Chou, C. C. (2007). Enzymatic production of galactooligosaccharides by beta-galactosidase from bifidobacterium longum BCRC 15708. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(6), 2225–2230.

Hsu, C. A., Yu, R. C., & Chou, C. C. (2006). Purification and characterization of a sodium-stimulated beta-galactosidase from Bifidobacterium longum CCRC 15708. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22(4), 355–361.

Huber RE, Kurz G, Wallenfels K (1976) A quantitation of the factors which affect the hydrolase and trangalactosylase activities of b- galactosidase (*E. coli*) on lactose. Biochemistry 15:1994–2001.

Huerta, L. M., Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L., & Illanes, A. (2011). Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized β-galactosidases from *Aspergillus oryzae.* Process Biochemistry, 46(1), 245–252.

Husain, Q. (2010). β Galactosidases and their potential applications : a review, 30(August 2009), 41–62.

Iwasaki, K., Nakajima, M., Nakao, S. Galacto-oligosaccharide Production fromLactose by an Enzymic Batch Reaction Using β-Galactosidase. Process Biochem.1996; 31 (1): 69 – 76.

Ji, E.-S., Park, N.-H., & Oh, D.-K. (2005). Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant beta-galactosidase from Thermotoga maritima. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(5), 759–764.

Kim, S. H., Lim, K. P., & Kim, H. S. (1997). Differences in the Hydrolysis of Lactose and Other Substrates by β-D-Galactosidase from Kluyveromyces lactis. Journal of Dairy Science, 80(10), 2264–2269.

Kim, Y. S., Park, C. S., & Oh, D. K. (2006). Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable β-galactosidase from Sulfolobus solfataricus. Enzyme and Microbial Technology, 39(4), 903–908.

Kirk, P. (1950). Kjeldahl method for total nitrogen. Analytical Chemistry, 22(2), 354-358.

Mahoney, R. R. (1998). Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. Food Chemistry, 63(2), 147–154.

Matella NJ, Dolan KD, Lee YS. 2006. Comparison of galactooligosaccharide production in free-enzyme ultrafiltration and in immobilized-enzyme systems. J Food Sci 71(7):C363–8.

Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M. D., & Besson, T. (2003). Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized beta-galactosidase from Kluyveromyces lactis. Biotechnology Letters, 25(8), 623–9.

Nakano, H., Takenishi, S., & Watanabe, Y. (1987). Substrate Specificity of Several β-Galactosidases toward a Series of β-l,4-Linked Galactooligosaccharides. Agricultural and Biological Chemistry, 51(8), 2267–2269.

Neri, D. F. M., Balcão, V. M., Dourado, F. O. Q., Oliveira, J. M. B., Carvalho, L. B., & Teixeira, J. a. (2009). Galactooligosaccharides production by β-galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane–polyaniline particles. Reactive and Functional Polymers, 69(4), 246–251.

Pan, C., Hu, B., Li, W., Sun, Y., Ye, H., & Zeng, X. (2009). Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β-d-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe3O4–chitosan nanoparticles. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 61(3–4), 208–215.

Panesar, P. S., Kumari, S., & Panesar, R. (2010). Potential applications of immobilized β-galactosidase in food processing industries. Enzyme Research.

Panesar, R., Panesar, P. S., Singh, R. S., Kennedy, J. F., & Bera, M. B. (2007). Production of lactose-hydrolyzed milk using ethanol permeabilized yeast cells. Food Chemistry, 101(2), 786–790.

Park, H. Y., Kim, H. J., Lee, J. K., Kim, D., & Oh, D. K. (2008). Galactooligosaccharide production by a thermostable beta-galactosidase from Sulfolobus solfataricus. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(8), 1553–1558.

Peña-Montenegro, T., Sánchez, O. (2010). Producción de galactooligosacáridos empleando células libres de Aspergillus oryzae UA1, Tesis de pregrado, Ingeniería Química, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

Prenosil, J. E., Stuker, E., & Bourne, J. R. (1987). Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part I: State of Art. Biotechnology and Bioengineering, 30(9), 1019–1025.

Rico Rodríguez, F. (2018). Evaluación de un sistema mixto de enzimas para la producción de galactooligosacáridos y ácido glucónico a partir de lactosuero como fuente de lactosa. Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia.

Rico-Díaz, A., Ramírez-Escudero, M., Vizoso-Vázquez, Á., Cerdán, M. E., Becerra, M., & Sanz-Aparicio, J. (2017). Structural features of Aspergillus niger β-galactosidase define its activity against glycoside linkages. FEBS Journal, 284(12), 1815–1829.

Sanz J., 2009. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by Immobilized β-galactosidase and posterior Chromatographic separation. PhD thesis, Ohio State University, Chemical Engineering.

Scott, F., Vera, C., & Conejeros, R. (2016). Technical and economic analysis of industrial production of lactose-derived prebiotics with focus on galacto-oligosaccharides. Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective. Elsevier Inc.

Seyis, I., & Aksoz, N. (2004). Production of Lactase by Trichoderma sp., Food Technol. Biotechnol. 42 (2) 121–124.

Toba T, Adachi S. 1978. Hydrolysis of lactose by microbial beta-galactosidases—formation of oligosaccharides with special reference to 2-0-beta-D-galactopyranosyl-D-glucose. J Dairy Sci 61(1):33–8.

Torres, D. P. M., & Gonc, P. F. (2010). Galacto-Oligosaccharides : Production , Properties , Applications , and Significance as Prebiotics. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9, 438–454.

Vera, C., Guerrero, C., & Illanes, A. (2011). Determination of the transgalactosylation activity of Aspergillus oryzae b -galactosidase : effect of pH , temperature , and galactose and glucose concentrations. Carbohydrate Research, 346(6), 745–752.

White, J. S. (2000). Sugar, special sugars. In Kirk-othmer encyclopedia of chemical technology.

Cibergrafía

https://www.prnewswire.com/news-releases/global-lactase-market-to-reach-us-1647-mn-by-2025---persistence-market-research-676226763.html, consultado el 15 de Agosto de 2019

3. Evaluación de un sistema acuoso de dos fases (SADF) para la separación de galactooligosacáridos (GOS)

3.1 Introducción

En 1896, Martinus Willem Beijerinck encontró accidentalmente un sistema acuoso de dos fases (SADF) mientras mezclaba una solución acuosa de almidón y gelatina. Sin embargo, su aplicación real fue descubierta por Albertsson, quien estableció que los SADF proporcionan un enfoque alternativo y eficiente para la purificación de biomoléculas mediante su reparto entre dos fases líquidas (Albertsson, P., 1971).

Estos sistemas se pueden formar mezclando una variedad de componentes en agua, siendo los sistemas de dos soluciones poliméricas y de solución polimérica – solución salina (fosfatos, sulfatos o citratos) los que han incrementado su uso y a los que se ha dedicado mucho esfuerzo investigativo como técnica de separación (Iqbal, M., *et al.*2016, Hatti-Kaul R., 2000). Este método tiene ventajas sobre las técnicas de extracción convencionales, por ejemplo: ser respetuoso con el medio ambiente, tener bajo costo, poseer capacidad de operación continua, facilidad de escalamiento y buena eficiencia para muchos tipos de separación especialmente para la concentración y purificación de biomoléculas (Grilo, A., *et al.*2016, Yau, Y., *et al.*2015, Hatti-Kaul R., 2000).

Los SADF se fundamentan en los conceptos de extracción líquido-líquido de la ingeniería química clásica extrapolados a la purificación de productos biológicos. Sin embargo, en un proceso convencional la presencia de solventes orgánicos y/o condiciones del proceso (alta temperatura o presión) a menudo impiden el uso de la extracción líquido-líquido ya que podría dañar los productos biológicos, por ello la ventaja de los SADF es que pueden ser formados utilizando componentes biodegradables y biocompatibles (polímeros y sales)

en un entorno acuoso no perjudicial. Se ha reportado que para la purificación de biomoléculas las características más importantes de los SADF son la baja tensión interfacial y el alto contenido de agua que preserva la actividad de las moléculas biológicas (Albertsson, P. *et al.*, 1990, Iqbal, M., *et al.*2016).

Los sistemas sal-polímero presentan ventajas sobre los sistemas polímero-polímero ya que poseen mayores diferencias en densidad, mayor selectividad, menor viscosidad, menor costo y rápida separación de fases (Perumalsamy *et al.*2007, Murugesan *et al.,* 2005, De Oliveira *et al.*,2008, Carvalho *et al.*, 2008).

Convencionalmente en los SADF se usan sales inorgánicas como fosfatos y sulfatos; sin embargo, las altas concentraciones de estas causan problemas ambientales (Banik, R., *et al.*2003). Recientemente, Raja & Murty (2013), Nagaraj & Iyyaswami (2013), Murugesan *et al.,* (2005), De Oliveira *et al.*(2008) y Carvalho *et al.*(2008) han utilizado el citrato como un sustituto de las sales de fosfato y sulfato para formar un sistema acuoso de dos fases con PEG. Debido a que los citratos son biodegradables y no tóxicos, los sistemas PEG + citrato podrían formar sistemas de dos fases acuosos ambientalmente seguros, que son más adecuados para la extracción de materiales biológicos (Raja, S., & Murty, V. R., 2012, Perumalsamy *et al.*2007).

Algunas aplicaciones de los SADF PEG/citrato se han desarrollado para la purificación de biomoléculas como la penicilina acilasa (Marcos, J., *et al.*2002), hexoquinasa (Oliveira, G., *et al.*, 2003), α amilasa (Zhi, W., *et al.*, 2004), tripsina bovina (Tubío, G. *et al.*2007), proteasas (Porto, T., *et al.*2008), anticuerpos humanos (Azevedo, A., *et al.*2009), glicomacropéptidos (Da Silva, C., *et al.*2009), lectinas (Porto, C., *et al.*2011), bioconversión extractiva de xilano (Li, X., *et al.*2011) y la eliminación de colorantes textiles (Ivetic, D., *et al.*2013).

Con estos ejemplos se puede apreciar que los SADF han sido usados en gran medida para la recuperación de proteínas, inclusive a gran escala (Hatti-Kaul R., 2000, Nagaraja, V. & Iyyaswami, R., 2013, Yuan, H., *et al.,* 2015). Esto sucede por sus características superficiales, que se ven afectadas por variables como el peso molecular del polímero y la presencia de una sal adicional, entre otras. Hay más variables que pueden afectar la partición de una sustancia en un SADF como el pH, la concentración de la sal y del polímero y la temperatura principalmente (Iqbal *et al.*2016), afectando a su vez las

propiedades superficiales, eléctricas y de afinidad de las sustancias a separar, las cuales poseen propiedades intrínsecas que determinan su partición, como su conformación, su tamaño e hidrofobicidad (Albertsson P., *et al.*1990).

Las cantidades de PEG y citrato, en este caso, definen la formación de las dos fases, cuando se supera el límite establecido por la curva binodal. En esa zona, la proporción entre polímero y sal define el volumen de cada fase y la longitud de la línea de reparto (LLR). La LLR se ha utilizado para estudiar sistemas acuosos de dos fases, por estar directamente relacionada con el rendimiento del sistema (Grilo, A., *et al.*, 2016).

La LLR es una medida de cuán amplia es la región de dos fases, o en otras palabras, cuán incompatibles son los dos componentes formadores de las dos fases. Para aplicaciones analíticas, el diagrama de fases y en particular la LLR son útiles para obtener la partición en la fase deseada con el volumen de fase más bajo posible. El objetivo es concentrar el producto tanto como sea posible para lograr una reducción de costos (Grilo, A., *et al.*, 2016). A medida que aumenta la concentración de PEG y citrato de sodio, la composición de la mezcla se ubica en la zona bifásica más lejos de la curva binodal, lo que implica un incremento en LLR (Ver Figura 3.2), a su vez esto incrementa la hidrofobicidad, por el aumento de sólidos y la menor disponibilidad de agua; siendo este el factor más determinante en la partición de proteínas (enzimas) (Andrews, B., *et al.*2005, Asenjo, J., *et al.*2011). Los carbohidratos también presentan diferentes hidrofobicidades según su tamaño y número de grupos hidroxilo (Buttersack, C., 2017, Aeberhardt, K. *et al.*, 2005), lo que los hace susceptibles de ser separados mediante un SADF.

Las mezclas de carbohidratos de diferentes tamaños, diferentes hidrofobicidades y propiedades superficiales, como la mezcla de sacáridos (mono a pentasacáridos) que se obtienen en la producción enzimática de GOS, pueden ser sometidas a separación por SADF, con perspectivas interesantes.

Por tanto, después de haber definido la enzima más conveniente para el desarrollo del trabajo en el capítulo anterior, en este se evalúa la capacidad del SADF como medio de separación de GOS, empleando una mezcla comercial de estos y posteriormente se modifican las condiciones del proceso para lograr la optimización del mismo.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Materiales

El polietilenglicol (PEG) (peso molecular 4000, 6000, 20000) y el citrato de sodio usados son marca Sigma-Aldrich. Vivinal® GOS fue una donación de Friesland Campina Domo (Holanda), su composición se puede observar en el Anexo 4. El ácido cítrico y el fosfato dibásico de sodio son marca Merck. El reactivo Bradford marca Panreac.

3.2.2 Análisis

La cuantificación de azúcares por HPLC se hizo acorde con lo descrito en el numeral 2.2.4. Las determinaciones de proteína se hicieron de acuerdo con el método de Bradford (Bradford, 1976). En el Anexo 5, aparece la curva de calibración de Bradford, con la que se calculó la concentración de la proteína de la enzima en las fases del SADF.

3.2.3 Ensayos preliminares para definir el tiempo de separación de fases, el efecto del área de transferencia, la centrifugación y la agitación

El correcto funcionamiento de un SADF depende de varios factores; sin embargo, dos aspectos clave son la separación de fases y el establecimiento del equilibrio químico. Por tanto, antes de explorar el efecto de otras variables sobre la separación fue necesario establecer el tiempo necesario para que estas dos cosas sucedieran.

De otro lado, también se determinó como afectaba la agitación a la obtención del equilibrio, el área de transferencia a la separación y la centrifugación como una forma de acelerar la separación de fases.

El SADF para estos ensayos se preparó mezclando dos soluciones de 50% de PEG 6000 y citrato de sodio en buffer McIlvaine de pH 5, hasta lograr una concentración en la solución resultante de PEG 6000 (10%) y citrato de sodio (12%), esta mezcla incluyó también Vivinal GOS (15%) y buffer McIlvaine de pH 5. Las concentraciones de PEG y citrato de sodio empleadas están próximas a la línea binodal y garantizan la formación de dos fases, de acuerdo con los resultados del equilibrio PEG-citrato de sodio de Murugesan *et al.*(2005),

Perumalsamy *et al.*, (2007) y Raja & Murty, (2013). La disolución de los sólidos se hizo con ayuda de calentamiento y agitación.

Para establecer el efecto del área de transferencia, se depositó el SADF descrito anteriormente en tubos falcon de volúmenes distintos (15 y 50 mL), que corresponden a 186 y 630 mm^2 de área transversal, respectivamente.

Posteriormente se hizo muestreo a tres tiempos 2, 4 y 6 h, todos los ensayos se evaluaron a dos condiciones: con agitación orbital (120 rpm) y sin ella, estos experimentos se llevaron a cabo por triplicado, a una temperatura de 40ºC.

Justo después de disolver los componentes en los tubos falcon, estos se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min. para provocar la separación de fases. La obtención del equilibrio se evidenció con la medición de la concentración de los carbohidratos en ambas fases en los tiempos evaluados (2, 4 y 6 h).

3.2.4 Variables de respuesta

Los componentes del medio posterior a la transgalactosilación de la lactosa para la producción de GOS son, además de estos últimos: lactosa residual, glucosa y galactosa. En un SADF aplicable a la separación de este medio, los productos se repartirán entre las dos fases acuosas, por lo que la situación ideal es obtener la totalidad de los GOS en una de ellas y el resto de componentes en la otra, siendo el objetivo más importante separar los monosacáridos de los GOS.

Es pertinente mencionar que según algunos antecedentes (Chen & Wang, 1991; Del Val & Otero, 2003; Hong Yang *et al.*, 2013; Naganagouda, & Mulimani, 2008) y ensayos preliminares realizados, la enzima junto con la lactosa y los GOS se ubican en la fase inferior en mayor proporción. Por ello, es conveniente ubicar preferencialmente a los monosacáridos en la fase superior y con ello evitar la inhibición de la enzima.

Teniendo esta situación en mente, se definió $K_{GOS.LAC}$ como la relación entre la concentración de GOS y lactosa en la fase superior y la fase inferior, mostrando así la preferencia de esos compuestos por alguna de las fases:

$$K_{GOS-LAC} = \frac{C_{GOS-LAC\ S}}{C_{GOS-LAC\ I}}$$ *Ecuación 3.1*

Adicionalmente se definió la selectividad $S_{MONO.T}$ como la relación entre la concentración de monosacáridos en la fase superior y la concentración total de sólidos en la misma fase, mostrando que tan selectiva es la separación de los monosacáridos en la fase superior.

$$S_{MONO\ S} = \frac{C_{MONO\ S}}{C_{MONO-LAC-GOS\ S}}$$ *Ecuación 3.2*

Finalmente, se creó la variable R para mostrar matemáticamente las dos situaciones deseadas: una partición preferencial de los GOS y la lactosa ($K_{GOS.LAC}$) en una de las fases, y que los monosacáridos sean el componente preferencial en la fase superior. Por tanto, R se define a continuación:

$$R = \frac{K_{GOS-LAC}}{S_{MONO\ S}} = \frac{\frac{C_{GOS-LAC\ S}}{C_{GOS-LAC\ I}}}{\frac{C_{MONO\ S}}{C_{MONO-LAC-GOS\ S}}}$$ *Ecuación 3.3*

Valores altos de R, representan alta concentración de GOS y lactosa en la fase superior junto con baja concentración de GOS y lactosa en la fase inferior, además de baja concentración de monosacáridos en la fase superior.

Por esta razón, se debe minimizar R de tal manera que se promueva incrementar la concentración de GOS y lactosa en la fase inferior (con la enzima) y de los monosacáridos salientes en la fase superior. Estos últimos son necesarios para la síntesis de GOS y son generados a su vez en la fase inferior por la enzima, pero su exceso trae consigo problemas de inhibición, por lo cual conviene su migración parcial hacia la fase superior.

Adicionalmente se determinó la relación de volúmenes (RV) como el cociente entre los volúmenes de la fase superior y de la fase inferior.

3.2.5 Planeación experimental

El desarrollo experimental descrito en la Figura 3.1, se basó en la metodología propuesta por Raja *et al.*, 2011 y empleada por Glyk *et al.,* 2015, Carvalho *et al.*, 2018 y Garai & Kumar, 2013 para la optimización de diferentes SADF. De acuerdo con esta metodología, se aplicó un diseño de experimentos Plackett-Burman de tamizado, de 12 tratamientos por

duplicado (PB-12 x 2) para seleccionar las variables del SADF que influyen significativamente sobre R.

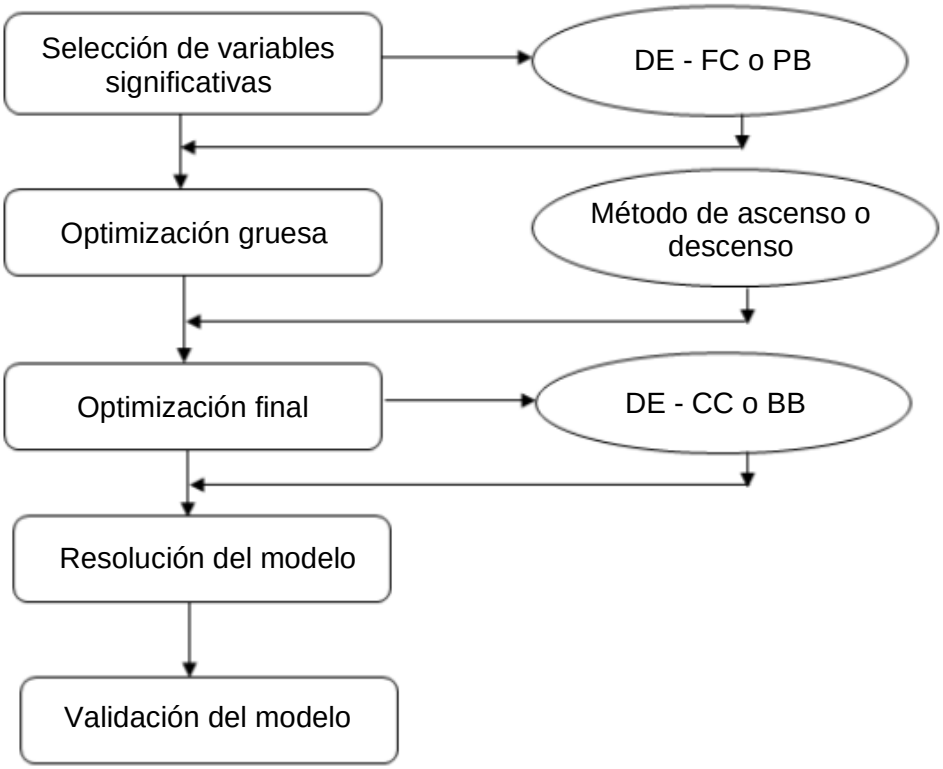


Figura 3.1 *Esquema de desarrollo experimental. DE: Diseño de experimentos, FC: Factorial completo, PB:Plackett.Burman, CC: Central compuesto, BB: Box Behnken. Adaptado de (Raja et al., 2012a)*

Los intervalos de las variables a evaluar aparecen en la Tabla 3.1. El pH debe ser cercano al de operación de la enzima que se seleccionó en el capítulo dos, es decir entre 4,5 y 5; La temperatura evaluada tiene como límite superior el valor óptimo para la enzima (55ºC) y como límite inferior la temperatura ambiente (25ºC), este intervalo cubre valores evaluados en otros trabajos (Carvalho *et al.*, 2008, Ahmad, A., *et al.*2008, Glyk, A., *et al.*2015). De acuerdo con la revisión bibliográfica y la disponibilidad, se estableció que el peso molecular mínimo del PEG seria 6000 y 20000 como el máximo. Las concentraciones de citrato de sodio y PEG se definieron con base en los antecedentes (Raja & Murty, 2013, Nagaraja & Iyyaswami, 2013, Murugesan *et al.*, 2005, De Oliveira *et al.*, 2008, Carvalho *et al.*, 2008) y la concentración de GOS se estableció con base en las concentraciones logradas en la reacción enzimática, descrita en el capítulo anterior.

Tabla 3.1 *Condiciones evaluadas en el diseño de experimentos de Plackett-Burman.*:los valores entre paréntesis corresponden a la masa en g de cada sustancia.*

pH	T (ºC)	MW PEG	PEG(%) (g)	Citrato de sodio(%)(g)	GOS(%) (g)
4,5 – 5,5	25 - 55	6000 - 20000	10 – 14 (1,6 – 2,24)*	12 – 16 (1,92 – 2,56)	8 – 24 (1,28 – 3,84)

Las variables significativas definidas por medio del PB-12 (concentración de PEG y de citrato de sodio), se utilizaron para realizar una optimización gruesa por medio de un diseño factorial (2^2 x 2) que se describe a continuación:

El equilibrio de fases para este sistema (PEG-citrato de sodio) a diferentes pesos moleculares de PEG (600, 1000, 2000, 4000, 6000) se muestra en la Figura 3.2; para evaluar la separación se definieron tres zonas dentro del diagrama para cada peso molecular de PEG (4000 y 6000), enmarcadas por un rectángulo rojo. Al principio de la experimentación relacionada con el SADF se contaba con PEG 20000 y 6000; sin embargo, posteriormente se adquirió PEG 4000 cuyo uso puede facilitar la manipulación por impartir menos viscosidad en la fase superior, por esta razón se decidió utilizarlo en los ensayos posteriores. Las tres zonas se distribuyeron a lo largo de la curva binodal correspondiente a cada peso molecular, del lado de la zona de dos fases. La zona de optimización se definió como aquella en la que se encuentra el menor valor de R.

Se encontró que para disminuir el valor de R es necesario aumentar la temperatura; sin embargo, el máximo posible es la temperatura óptima de operación de la enzima (55ºC) por lo que esa fue la temperatura empleada en estos ensayos.

Como se mostrará más adelante, el peso molecular del polietilenglicol (MW PEG) no es una variable significativa en este proceso; por tanto, modificar su valor no afecta el valor de R.

Con la zona de optimización definida, se aplicó un diseño central compuesto de superficie de respuesta para la optimización final, cuyo resultado fue validado experimentalmente.

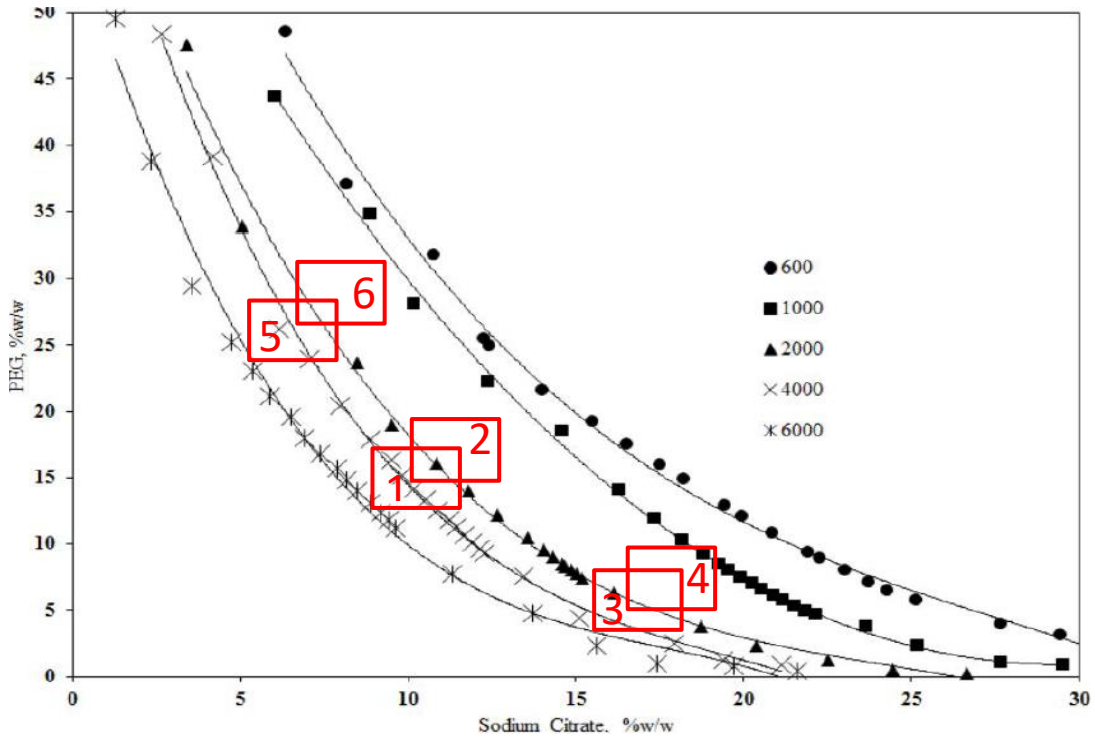


Figura 3.2 *Zonas de evaluación próximas de la curva binodal para MWPEG 6000 y 4000 Da (basada en Raja & Murty, 2013)*

3.2.6 Tratamiento estadístico

El tratamiento de los datos se hizo con ayuda de Microsoft Excel y el análisis estadístico de los mismos se hizo con el software Minitab 16. El nivel de significancia empleado en los análisis fue de 0,05.

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 Efecto del área de transferencia sobre la separación

No se encontraron diferencias significativas en los coeficientes de partición para ninguno de los carbohidratos sometidos a separación con las dos áreas de transferencia evaluadas, lo que implica que la transferencia de estos azúcares entre las fases no se vio afectada por el cambio de área Figura 3.3. Esto permitió definir que las pruebas de separación posteriores se realizarían en los tubos falcon de 15 mL (186 mm^2), con los cuales se logra un ahorro en el uso de materiales.

En la Figura 3.3 se puede apreciar que todos los coeficientes de distribución de los carbohidratos son inferiores a uno, lo que implica una mayor tendencia a permanecer en la fase inferior, resultados que son similares a los encontrados en el trabajo de Del-Val & Otero (2003). Sin embargo, existe una diferencia aprovechable en los coeficientes de reparto de la glucosa y los demás compuestos, así como los de la lactosa y la galactosa con los de los GOS, lo que puede permitir una separación diferencial.

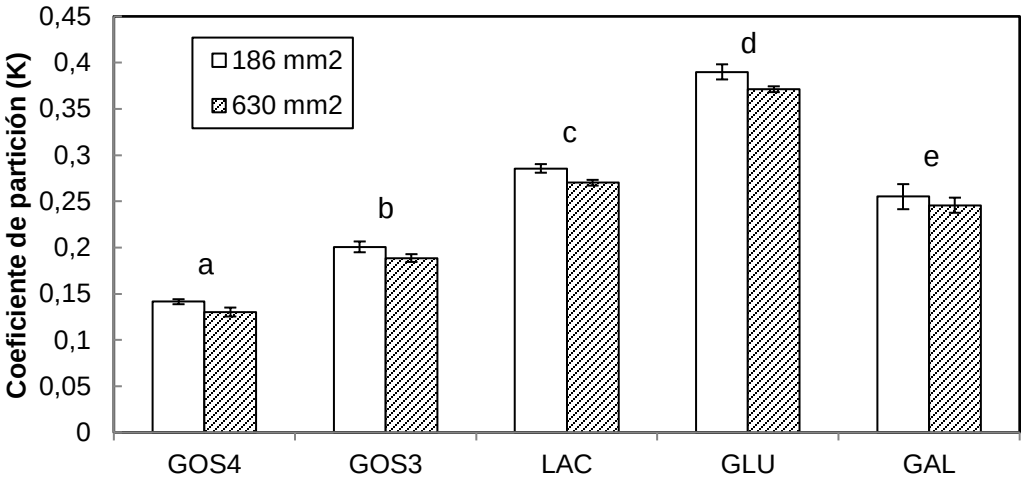


Figura 3.3 *Coeficiente de partición (K) para GOS4, GOS3, lactosa, glucosa y galactosa para áreas de transferencia de 186 y 630 mm^2.*

Los GOS3 presentan un coeficiente de partición cercano de 0,2 mientras que para Del-Val & Otero (2003) están entre 0,14 y 0,38; el de la lactosa fue cercano a 0,3 y para el trabajo citado están entre 0,24 y 0,39. Finalmente, para los monosacáridos Del-Val & Otero obtuvieron para glucosa valores de 0,25 – 0,67 frente a 0,39 en este trabajo y para galactosa 0,22-0,58 comparado con 0,24; así mismo Chen & Cheng (1991) determinaron coeficientes de 0,69 para ambos monosacáridos, pero a diferentes concentraciones de PEG y citrato de sodio, lo cual afecta el resultado. En general, los coeficientes de partición de este trabajo están dentro de los intervalos encontrados por otros trabajos, lo que hace suponer un comportamiento similar en cuanto a la partición.

Como se ha comentado previamente, la partición en un SADF depende entre otras variables de la hidrofobicidad, el tamaño y la carga electrostática del o los solutos. Según esto la diferencia de tamaño entre la mezcla de monosacáridos, disacáridos y GOS, podría explicar parcialmente lo observado en la Figura 3.3, donde los solutos de mayor tamaño

(lactosa y GOS), tienden a permanecer más en la fase inferior que contiene al compuesto de menor tamaño (el citrato de sodio es de menor tamaño que el PEG), lo cual puede hacer que los monosacáridos tiendan más hacia la fase superior con el polímero. Este fenómeno es reportado por Ahmad, A., *et al. (*2008), y por Hemavathi, A., & Raghavarao, K. (2011), quienes aducen que este efecto es por el volumen libre disponible, que es menor en la fase superior, debido al mayor tamaño del PEG en relación con el del citrato de sodio, dando una más fácil cabida a moléculas pequeñas, como las de monosacáridos, en la fase superior, que a moléculas de mayor tamaño (lactosa y GOS).

De otro lado, la diferencia de hidrofobicidades entre los componentes de la mezcla comercial de GOS también ayuda a explicar el comportamiento de la Figura 3.3. De acuerdo con Buttersack, C. (2017) y Aeberhardt, K. *et al.*(2005), los monosacáridos presentan mayores hidrofobicidades que la lactosa y esta que los GOS. Este comportamiento se explica por la relación inversa de esta propiedad con el número de grupos hidroxilos y el número de hidratación. Teniendo en cuenta que este último es superior para los oligosacáridos en comparación con la lactosa y los monosacáridos (los valores reportados para los números de hidratación para monosacáridos, disacáridos, trisacáridos y pentasacáridos son 8,48, 14,9, 21,3 y 34,16 respectivamente, Aeberhardt, K. *et al.*(2005)), se puede decir que los GOS presentan los menores valores de hidrofobicidad en comparación con los otros compuestos. Adicionalmente, la fase polimérica presenta mayor hidrofobicidad que la fase salina (Andrews, B. *et al.*2005, Andrews, B. *et al.*, 2010), por ello es más afín con los monosacáridos (más hidrófobos), lo que justifica su mayor tendencia a la fase superior y con ella mayores coeficientes de reparto (Hatti-Kaul R., 2000).

La diferencia de la partición entre glucosa y galactosa puede atribuirse a su diferencia en la polaridad, por la diferente distribución de los grupos hidroxilo respecto al plano ecuatorial de cada una de las aldohexosas, lo cual podría marcar una diferencia en su distribución entre las fases (Simons, J., *et al.*2009) gracias a la diferente distribución de cargas entre las soluciones de PEG y citrato de sodio. Adicionalmente es necesario considerar que este último se ioniza débilmente en solución acuosa. Este fenómeno no es equivalente para los GOS y la lactosa ya que no presentan una formación de cargas parciales.

La suma de todos los fenómenos mencionados puede explicar las diferencias en los coeficientes de reparto que se mencionaron anteriormente.

3.3.2 Determinación del tiempo necesario para alcanzar el equilibrio

El tiempo de duración del proceso de separación debe ser posterior al tiempo necesario para lograr el equilibrio, donde se obtiene una separación completa de fases e invariancia de la concentración de las especies químicas involucradas. La Figura 3.4 permite establecer que no hay diferencia significativa en el coeficiente de partición para cada una de las sustancias en los tres tiempos evaluados, 2, 4 o 6 h; esto implica que el tiempo necesario para lograr el equilibrio de fases es menor a 2 h y por tanto este será el tiempo empleado para el proceso de separación para el resto del trabajo.

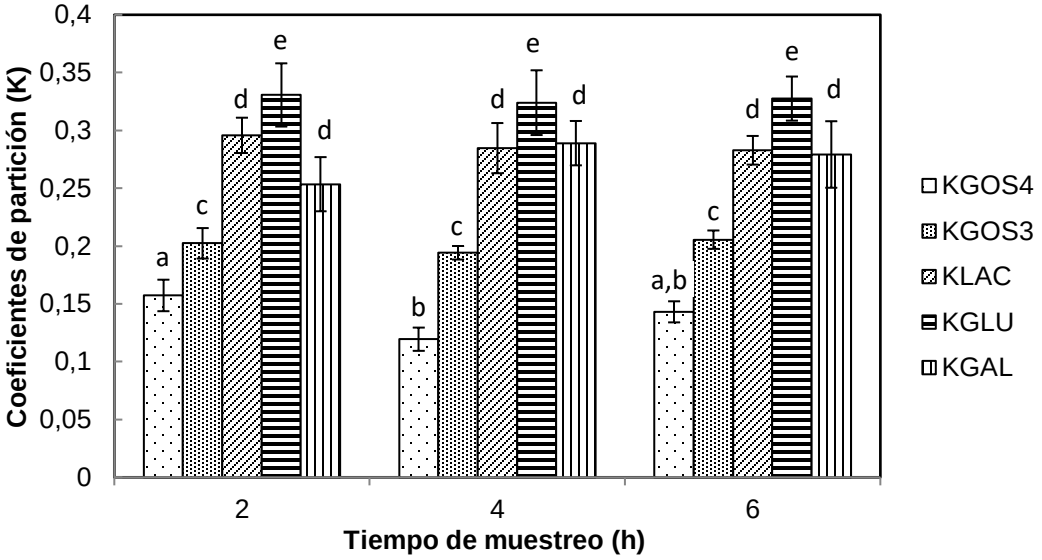


Figura 3.4*. Coeficiente de partición (K) para GOS4, GOS3, lactosa, glucosa y galactosa a diferentes tiempos de muestreo, 2, 4, y 6 h.*

3.3.3 Efecto de la agitación y la centrifugación sobre el coeficiente de partición

El efecto de estas operaciones sobre la separación se muestra únicamente mediante los resultados para GOS3; sin embargo, estos son similares para las demás especies químicas presentes. De la Figura 3.5 se infiere que el tiempo del experimento es lo suficientemente largo como para superar la resistencias a la transferencia de masa por lo

cual el efecto de agitación no incide en los resultados experimentales observados. De igual forma, se ve que la centrifugación aplicada inmediatamente después de haber hecho la mezcla de los componentes del SADF no afecta significativamente el coeficiente de partición ya sea con o sin agitación.

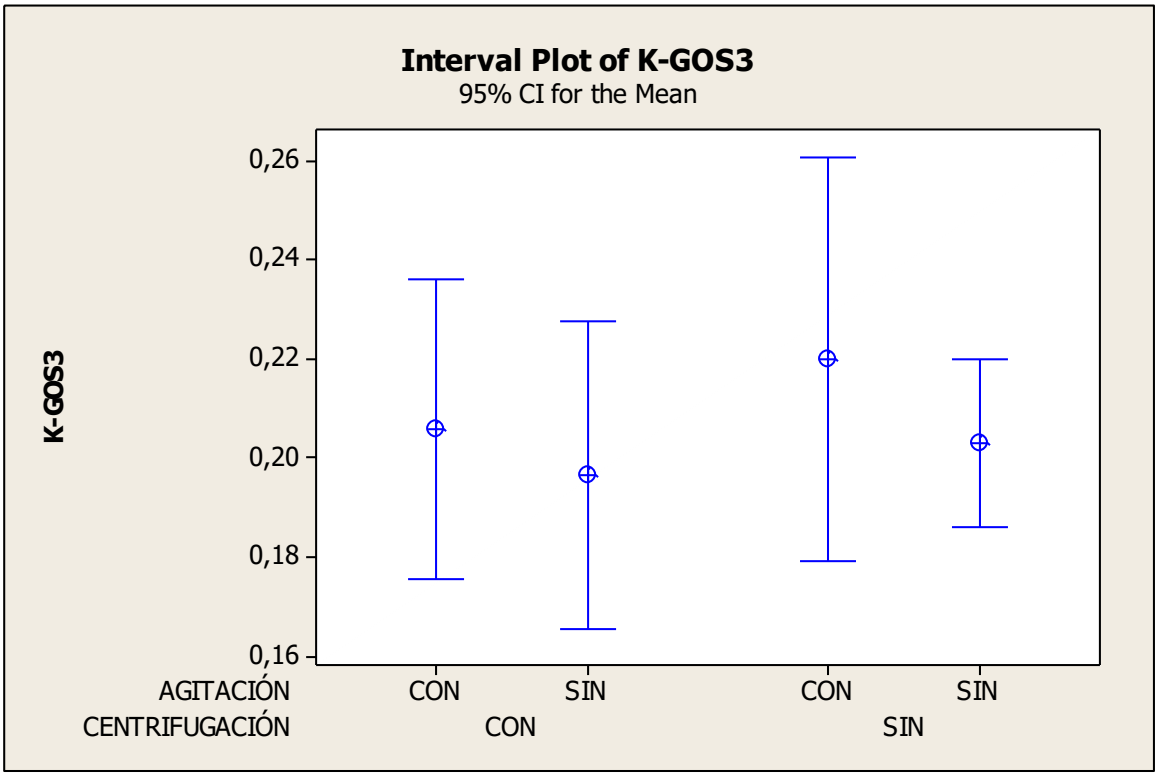


***Figura 3.5**. Grafica de caja – efecto de la agitación y la centrifugación sobre el coeficiente de partición para*

Gráfica de intervalos de KGOS3

En conclusión, como resultado de estos ensayos preliminares se definió que en adelante los experimentos se llevarán a cabo en tubos falcon de 15 mL, sin agitación, por un tiempo de 2 h y sin centrifugación.

3.3.4 Selección de variables

Después de realizar el proceso de selección de variables cuyos resultados se muestran en la Figura 3.6, se encontró que las variables que afectan significativamente (y de forma inversa) a la variable de respuesta R son las concentraciones de PEG, citrato de sodio y la temperatura, siendo frecuente encontrar este hecho para las dos primeras variables en

otros trabajos de optimización de SADF (Glyk, A., *et al.*2015, Garai, D.& Kumar, V., 2013, Ahmad, A., *et al.*2008).

A pesar que el pH resultó no poseer un efecto significativo para este proceso, es una variable importante para la enzima, cuya partición depende de este por afectar a sus propiedades superficiales, su conformación y punto isoeléctrico de una forma marcada (Naganagouda, & Mulimani, 2008, Dhoot, S., *et al.*2007); sin embargo, para la optimización gruesa el pH se fijó en 4,5 debido a que es el óptimo para la enzima definida en el capítulo anterior. Adicionalmente la concentración de GOS seleccionada fue 8% (1,28g).

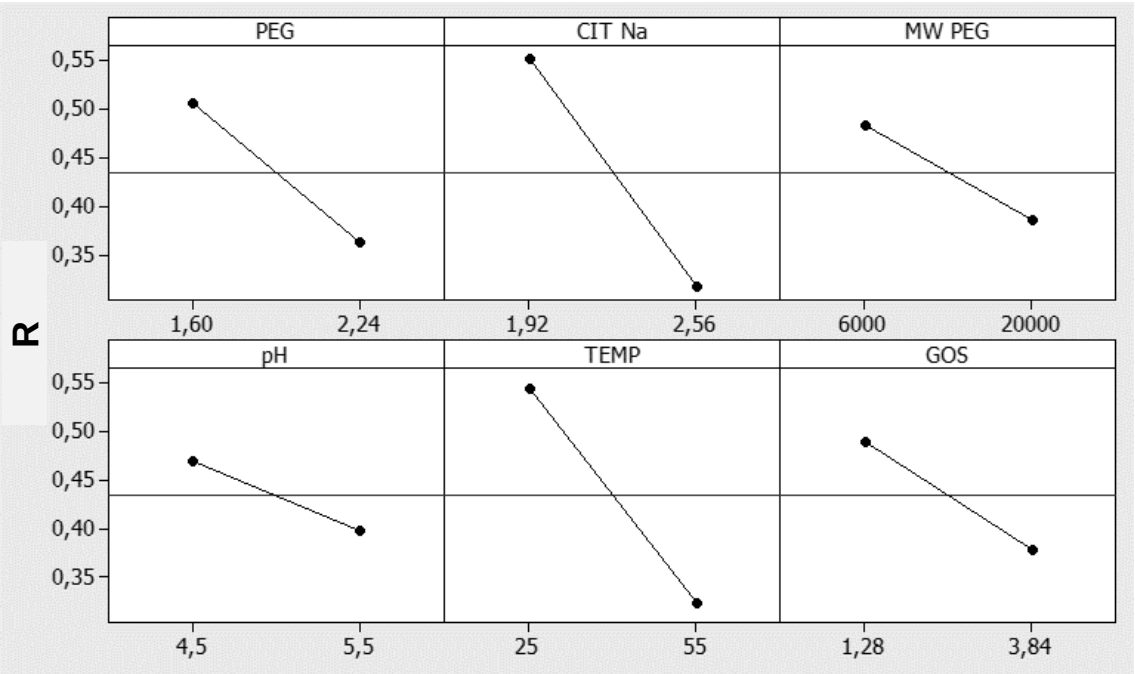


Figura 3.6*. Efectos principales del diseño de tamizado sobre R. PEG (%), Citrato de sodio (CIT Na) (%), peso molecular de PEG (MW PEG) (kDa)), Temperatura (ºC), GOS(g).*

El efecto de las variables manipuladas en el PB12*2, sobre la relación de volúmenes (RV) se puede apreciar en el Anexo 2. Este efecto es similar al observado para R, con la diferencia que el aumento de la concentración de PEG incrementa RV, lo cual es previsible sabiendo que con esto aumenta el volumen de la fase superior. El incremento del volumen de la fase superior y/o reducción del volumen de la fase inferior, disminuyen las concentraciones en la fase superior.

A su vez, el aumento en la concentración de GOS y lactosa en la fase inferior y/o la disminución de la concentración de las mismas especies en la fase superior, favorecen la minimización de R. Simultáneamente el aumento de la fuerza iónica, como sucede en la fase inferior por la presencia de citrato de sodio, mejora la migración de compuestos de bajo peso molecular hacia la fase de polímero (Benavides & Rito-Palomares, 2008), esto también ayuda a minimizar R.

3.3.5 Optimización gruesa

Habiendo establecido las variables significativas como resultado del diseño de experimentos de tamizado, se evaluó el SADF en seis zonas que fueron distribuidas uniformemente a lo largo del intervalo de concentraciones de PEG y citrato de sodio en las vecindades de la curva binodal, como se puede apreciar en la Figura 3.2. En cada zona se evaluó un diseño factorial 2^2, los dos factores son las concentraciones de PEG y citrato de sodio, las condiciones de cada uno de los tratamientos aparecen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 *Condiciones evaluadas en la optimización gruesa, factorial 2^2 en las seis zonas definidas.*

	pH	T(ºC)	GOS(%)	MW PEG	PEG(%)	Citrato de sodio(%)
Zona 1	4,5	55	8	6000	9,4 – 12,5	9,4 – 12,5
Zona 2				4000	11 - 14	11 - 14
Zona 3				6000	3 - 6	17 - 20
Zona 4				4000	5 - 8	16 - 19
Zona 5				6000	26 - 29	5 - 8
Zona 6				4000	28 - 31	6 - 9

Los resultados de la separación con el SADF se muestran en la Figura 3.2 para cada zona evaluada, allí se puede ver como las zonas 5 y 6 (bajo contenido de citrato y alto de PEG, con PEG6000 y PEG4000, respectivamente), presentan los valores más bajos para $R = K_{GOS\,LAC}./\ S_{MONO.S}$, que es lo que se pretende. Por esta razón se definió la zona 6, como la zona sobre la que se debe centrar la optimización final, lo cual implica el uso de PEG 4000 en esa fase.

En el anexo 3 se puede ver como varía RV en las seis zonas, para las zonas 3 y 4 se dan los valores menores, para 1 y 2 valores intermedios y para 5 y 6 los más elevados. De tal

manera que la minimización de R se ve favorecida por valores altos de RV, donde las altas concentraciones de PEG y bajas de citrato de sodio, aumentan el volumen de la fase superior y disminuyen el de la fase inferior.

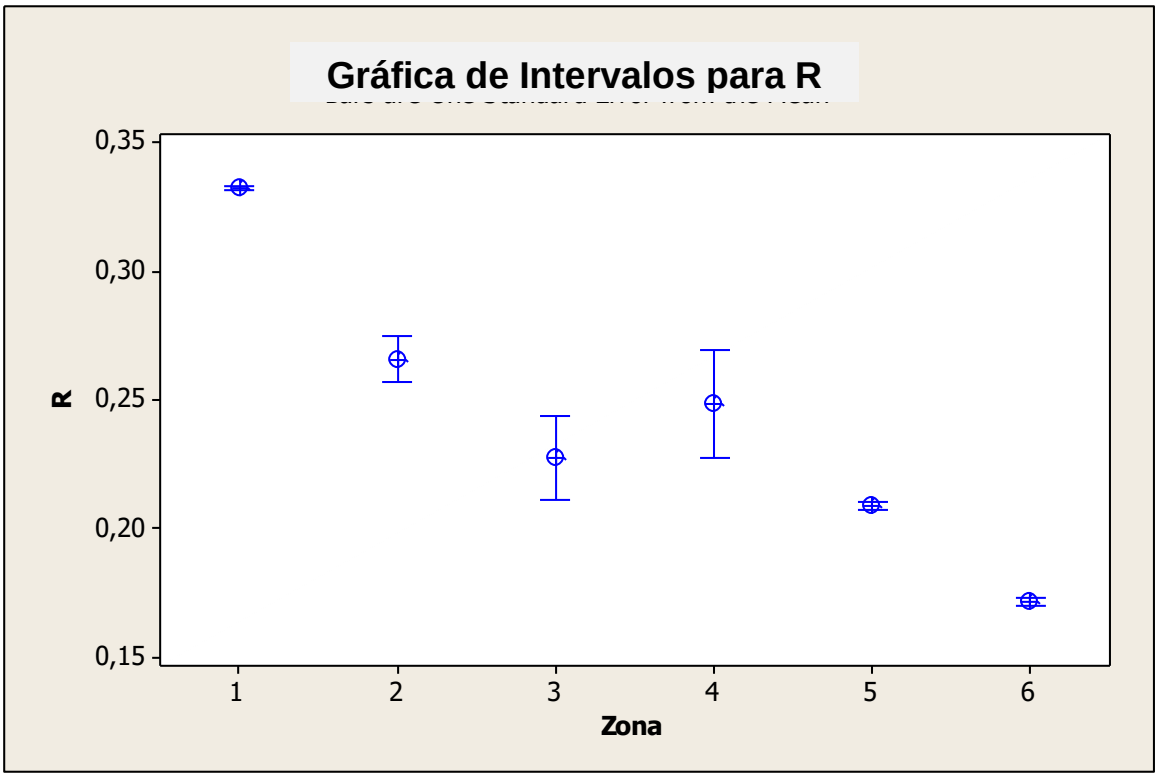


***Figura 3.7**. Gráfica de intervalos para $R = K_{GOS.LAC}$ / $S_{MONO.S}$ en las 6 zonas.*

3.3.6 Optimización final

La optimización final se realizó por medio de un diseño central compuesto con las siguientes condiciones: pH: 4,5, temperatura: 55ºC, [GOS]: 8% y PEG4000; el intervalo de las variables fue el siguiente: [PEG]: 28-31% y [Citrato de Na]: 6-9%. En la

Figura 3.8 se muestra la superficie de respuesta para R en función de las variables analizadas, en ella se puede ver que existe un mínimo en las siguientes condiciones: [PEG]: 29,56% y [Citrato de sodio]: 7,39%, que produjeron un valor minimizado de $R = 0{,}1678$.

La definición de las concentraciones de PEG y de citrato de sodio como variables significativas para la optimización es el resultado del efecto más marcado de estas variables sobre R y K, lo cual es común para la optimización de extracciones por SADF (Ahmad *et al.*, 2008, Carvalho *et al.*, 2018). El aumento de la concentración de PEG y/o citrato de sodio implica el aumento de la longitud de la línea de reparto (LLR), esto quiere decir que hay mayor cantidad de sólidos y por ende menor cantidad de agua, es decir se incrementa la hidrofobicidad de las fases (Benavides, J. & Rito-Palomares, M., 2008).

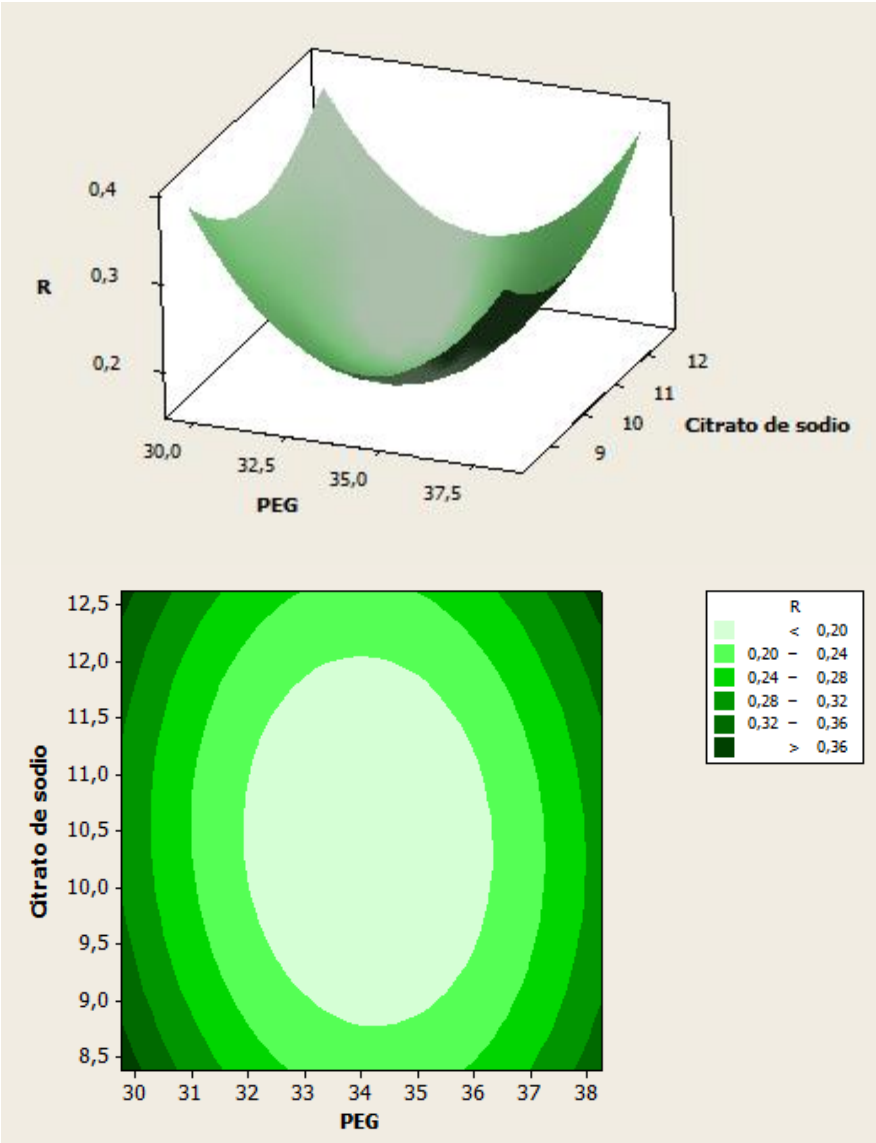


***Figura 3.8**. Optimización de* $R = K_{GOS.LAC} \ / \ S_{MONO.S}$

En el caso de las condiciones optimizadas la alta concentración de PEG, produce un aumento de la LLR y a su vez la menor cantidad de agua disponible incrementa su hidrofobicidad, confirmando el hecho de que esta y la LLR son proporcionales (Raja, S., & Murty, V., 2012)

Es importante resaltar que el valor de R disminuyó a medida que se realizó el proceso de optimización, en la etapa de selección de variables se logró un valor de 0,32, luego en la

optimización gruesa 0,18 y finalmente en la optimización final 0,1678, logrando una disminución total aproximada del 50%.

3.3.7 Modelo de Optimización

El modelo mostrado a continuación, ajusta los datos experimentales con un R^2 ajustado de 94,91%.

$$R = \frac{K_{GOS.LAC}}{S_{MONO\ T}} = 27{,}9932 - 1{,}8164 * P - 0{,}2625 * C + 0{,}0304 * P^2 + 0{,}0130 * C^2 + 0{,}0024 * P * C \qquad \textit{Ecuación 3.4}$$

Donde P y C son las concentraciones de PEG y Citrato de sodio respectivamente.

3.3.8 Validación del Modelo

Se llevó a cabo la validación experimental del modelo, a las condiciones establecidas en la optimización final: pH: 4,5, temperatura: 55ºC, [GOS]: 8%, PEG4000, [PEG]: 29,56% y [Citrato de Na]: 7,39%. A estas condiciones el valor resultante de R fue de 0,162, que resulta ser 3,5% menor que el predicho por el modelo.

En la Tabla 3.3 se muestran las concentraciones de los carbohidratos en las condiciones óptimas para la validación experimental del modelo optimizado. Observando los promedios de la tabla en mención, la glucosa presenta una concentración promedio total de 18,07 mg/g totales de mezcla, lo que implica que después de la separación en promedio el 84% (15,18 mg/g) se queda en la fase inferior; mientras que el restante (2,89 mg/g) migra hacia la fase superior. Para la reacción que se evaluará posteriormente, es conveniente evitar la presencia de la glucosa, por su capacidad inhibidora sobre la enzima a usar (β-galactosidasa), la cual se ubica preferentemente en la fase inferior. Esto hace que la disminución de la concentración de glucosa (16%) en la fase inferior con el proceso de separación disminuya el riesgo de alcanzar los valores de inhibición de la reacción enzimática que para la glucosa están entre 18 y 19 mg/g (Vera *et al.*2011).

Tabla 3.3 *Resultado de la validación experimental del modelo optimizado. GLU: Glucosa, GAL: Galactosa, S: fase superior, I: fase inferior.*

[PEG] %	[CIT Na] %	$R = K_{GOS\ LAC\ T} / S_{MONO\ S}$	$K_{GOS\ LAC}$	$S_{MONO\ S}$	GLU TOTAL	GAL TOTAL	GLU S	GLU I	GAL S	GAL I
29,50	7,50	0,1610	0,0456	0,3666	18,4761	1,6128	0,1376	0,8624	0,1146	0,8854

		0,1584	0,0570	0,3596	16,8941	1,4321	0,1609	0,8391	0,1239	0,8761
		0,1662	0,0593	0,3569	18,8468	1,6547	0,1812	0,8188	0,1677	0,8323
PROMEDIOS		0,1619	0,0540	0,3610	18,0723	1,5665	0,1599	0,8401	0,1354	0,8646
DESVIACIONES		0,003985	0,0073	0,0049	1,03703	0,118305	0,021789	0,021789	0,02835	0,03663

De manera análoga sucede con la galactosa, en una concentración total promedio de 1,57 mg/g, cuyo 14% (0,22 mg/g) va a la fase superior y el 86% (1,35 mg/g) a la inferior. Para el caso de la galactosa la inhibición se da a partir de cualquier valor en la concentración (Vera *et al.*2011).

El valor promedio de los coeficientes de partición de GOS-lactosa (columna 4 de la Tabla 3.3), es de 0,054 +/- 0,0073, esto indica que el 94,9% de la mezcla GOS-lactosa permanece en la fase inferior. Esto implica que el proceso de separación remueve muy poco sustrato de la fase donde se realiza la reacción enzimática y por tanto le afecta débilmente.

La distribución observada de los carbohidratos en las dos fases es una consecuencia de la suma de varios efectos. El primero y quizá más importante, la hidrofobicidad diferencial de las fases y los carbohidratos, la fase PEG (soluto de mayor tamaño), más hidrófoba, es más afín a los monosacáridos, por efecto estérico. Consecuentemente los GOS y lactosa, de mayor tamaño que los monosacáridos, prefieren la fase citrato de sodio (soluto de menor tamaño), más hidrofílica. Simultáneamente las cargas parciales (dipolos) formadas alrededor del plano ecuatorial de los monosacáridos, por la desigual distribución de los grupos hidroxilos en torno a este, provocan una distribución desigual entre glucosa y galactosa.

Por otro lado los valores de RV para las condiciones optimizadas validadas, fueron de 4,03+/- 0,06, lo que implica un volumen de la fase superior cuatro veces mayor al de la inferior. Un volumen bajo en esta fase con alta concentración de GOS facilita la labor de purificación posterior, por tener un menor volumen para tratar.

La optimización llevada a cabo permitió encontrar las condiciones que conducen a la minimización de R, lo cual implica una fase inferior con lactosa disponible para la reacción junto con GOS parcialmente separados de los monosacáridos. Estos migraron parcialmente a la fase superior, lo cual es conveniente pensando en la inhibición de la

enzima en el capítulo 4 y puede justificar la aplicación del SADF en el sistema simultáneo de reacción-separación.

3.4 Conclusiones

Las variables que afectaron significativamente la separación de la mezcla comercial de GOS (Vivinal ®) empleando un sistema acuoso de dos fases (SADF) fueron: la concentración de citrato de sodio, la temperatura y la concentración de PEG.

El proceso de optimización logró una reducción de R del 49,7%, obteniendo un valor mínimo final de 0,1678 para R.

Las mejores condiciones para la separación de la mezcla de GOS comercial empleada son pH: 4,5, temperatura: 55ºC, [GOS]: 8%, PEG4000, [PEG]: 29,56% y [Citrato de Na]: 7,39%, los resultados en estas condiciones fueron validados experimentalmente con un error pequeño.

El proceso de separación logró que la mayoría de lactosa y GOS permanecieran en la fase inferior (94,9% m/m), retirando a su vez una parte de los monosacáridos hacia la fase superior (16% de la glucosa y 14% de la galactosa), lo que permite disminuir parcialmente la inhibición enzimática.

Las relativamente altas relaciones de volumen, con los consecuentes volúmenes pequeños de la fase salina, favorecen la purificación posterior de GOS.

3.5 Referencias

Aeberhardt, K., De Saint Laumer, J. Y., Bouquerand, P. E., & Normand, V. (2005). Ultrasonic wave spectroscopy study of sugar oligomers and polysaccharides in aqueous solutions: The hydration length concept. International Journal of Biological Macromolecules, 36(5), 275–282.

Ahmad, A. L., Derek, C. J. C., & Zulkali, M. M. D. (2008). Optimization of thaumatin extraction by aqueous two-phase system () using response surface methodology (RSM). Separation and Purification Technology, 62(3), 702–708.

Albertsson, P.A. (1971) Partition of Cell Particles and Macromolecules, 2nd Ed.; Almqvist and Wiksell: Stockholm

Albertsson P., Johansson G., Tjerneld F. (1990) in: Asenjo J. (Ed.), Separation Process in Biotechnology, Marcel Dekker, New York, pp. 287–327.

Andrews, B. A., Schmidt, A. S., & Asenjo, J. A. (2005). Correlation for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: Effect of surface hydrophobicity and charge. Biotechnology and Bioengineering, 90(3), 380–390.

Andrews, B. A., & Asenjo, J. A. (2010). Theoretical and experimental evaluation of hydrophobicity of proteins to predict their partitioning behavior in aqueous two phase systems: A review. Separation Science and Technology, 45(15), 2165–2170.

Banik, R. M., Santhiagu, A., Kanari, B., Sabarinath, C., & Upadhyay, S. N. (2003). Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems, (Albertsson 1971), 337–348.

Baskir, J.N., Hatton, T.A., and Suter, U.W. (1989) Protein partition- ing in two-phase aqueous polymer systems. Biotech. Bioeng. 34: 541–558.

Benavides, J. & Rito-Palomares, M., (2008). Aplicación genérica de sistemas de dos fases acuosas Polietilénglicol – sal para el desarrollo de procesos de recuperación primaria de compuestos biológicos. Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 7, No. 2, 99-111.

Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254.

Buttersack, C. (2017). Hydrophobicity of carbohydrates and related hydroxy compounds. Carbohydrate Research, 446–447, 101–112.

Carvalho, C. P., Coimbra, J. S. R., Costa, I. A. F., Minim, L. A., Cristina, M., & Silva, L. H. M. (2008). INFLUENCE OF THE TEMPERATURE AND TYPE OF SALT ON THE PHASE EQUILIBRIUM OF PEG 1500 + Artigo, 31(2), 209–213.

Carvalho, J. De, Renann, P., França, L. De, & Souza, T. (2018). Optimized extraction of polygalacturonase from Aspergillus aculeatus URM4953 by aqueous two-phase systems PEG / Citrate. Journal of Molecular Liquids, 263, 81–88.

Chen, J., Cheng, W.,(1991). Lactose Hydrolysis by β-Galactosidase in Aqueous Two-Phase Systems. Journal of Fermentation & Bioengineering 71(3), 168–175.

Czermak P., Ebrahimi M., Grau K., Netz S., Sawatzki G.and Pfromm P.H., 2004. Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process, J. Membr. Sci., 232, 85–91.

De Araújo, R. F. F., Porto, T. S., Martins, D. B. G., Dutra, R. F., Porto, A. L. F., & Filho, J. L. de L. (2011). Partitioning of lactate dehydrogenase from bovine heart crude extract by polyethylene glycol-citrate aqueous two-phase systems. Fluid Phase Equilibria, 301(1), 46–50.

De Oliveira, R. M., Dos Reis Coimbra, J. S., Minim, L. A., Da Silva, L. H. M., & Fontes, M. P. F. (2008). Liquid-liquid equilibria of biphasic systems composed of sodium citrate + polyethylene(glycol) 1500 or 4000 at different temperatures. Journal of Chemical and Engineering Data, 53(4), 895–899.

Del Val M., Otero C. 2003. Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. Enzyme Microb Technol 33(1):118–26.

Dhoot, S. B., Dalal, J. M., & Gaikar, V. G. (2007). Purification of glucose oxidase and β-galactosidase by partitioning in a PEG-salt aqueous two-phase system in the presence of PEG-derivatives. Separation Science and Technology, 42(8), 1859–1881.

Garai, D., & Kumar, V. (2013). Aqueous two phase extraction of alkaline fungal xylanase in PEG/phosphate system: Optimization by Box-Behnken design approach. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2(2), 125–131.

Glyk, A., Solle, D., Scheper, T., & Beutel, S. (2015). Optimization of PEG-salt aqueous two-phase systems by design of experiments. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 149, 12–21.

Grilo, A. L., Aires-Barros, M. R., & Azevedo, A. M. (2016). Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Fundamentals, Applications and Trends. Separation and Purification Reviews, 45(1), 68–80.

Hatti-Kaul, R. - editor (2000). Aqueous Two-Phase Systems, methods and prototcols – Methods in Biotechnology, 11. Humana Press, New Jersey.

Hemavathi, A. B., & Raghavarao, K. S. M. S. (2011). Differential partitioning of β-galactosidase and β-glucosidase using aqueous two phase extraction. Process Biochemistry, 46(3), 649–655.

Hong Yang, A. M. G. (2013). Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation. Journal of Bioprocessing & Biotechniques, 4(1), 1–8.

Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., … Yuan, Z. (2016). Aqueous two-phase system (): an overview and advances in its applications. Biological Procedures Online, 18(1), 1–18.

Iwasaki, K., Nakajima, M., Nakao, S. Galacto-oligosaccharide Production fromLactose by an Enzymic Batch Reaction Using β-Galactosidase. Process Biochem.1996; 31 (1): 69 – 76.

Johansson, H., & Karlstrom, G. (1997). Temperature-induced phase partitioning of peptides in water solutions of ethylene oxide and propylene oxide random copolymers, 315–325

Murugesan, T., & Perumalsamy, M. (2005). Liquid-liquid equilibria of poly(ethylene glycol) 2000 + sodium citrate + water at (25, 30, 35, 40, and 45) °C. Journal of Chemical and Engineering Data, 50(4), 1392–1395.

Naganagouda, K., & Mulimani, V. H. (2008). Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of Aspergillus *oryzae* α-galactosidase. Process Biochemistry, 43(11), 1293–1299.

Nagaraja, V. H., & Iyyaswami, R. (2013). Phase Demixing Studies in Aqueous Two-Phase System With Polyethylene Glycol (Peg) and Sodium Citrate. Chemical Engineering Communications, 200(10), 1293–1308.

Perumalsamy, M., Bathmalakshmi, A., & Murugesan, T. (2007). Experiment and correlation of liquid-liquid equilibria of an aqueous salt polymer system containing PEG6000 + sodium citrate. Journal of Chemical and Engineering Data, 52(4), 1186–1188.

Pruksasri S. (2007). Production and separation of galacto-oligosaccharides from lactose by β-galactosidase immobilized on nanofiltration membranes, PhD thesis, Ohio State University, Chemical Engineering.

Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., & Ramesh, V. (2012a). Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. Science and Technology, 1(1), 7–16.

Raja, S., & Murty, V. R. (2012b). Development and Evaluation of Environmentally Benign Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Proteins from Tannery Waste Water. ISRN Chemical Engineering, 2012, 1–9.

Raja, S., & Murty, V. R. (2013). Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing PEG + Sodium Citrate + Water at various pH. Journal of Chemical Science and Technology, 2(4), 169–174.

Simons, J., Cocinero, E., Stanca-Kaposta, E., Davis, B., Gamblin, D. (2009). Hydrophilic and hydrophobic carbohydrate interactions. Lasers for science facility programme, chemistry (5).

Splechtna, B., Petzelbauer, I., Baminger, U., Haltrich, D., Kulbe, K. D., & Nidetzky, B. (2001). Production of a lactose-free galacto-oligosaccharide mixture by using selective enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid. Enzyme and microbial technology. Vol. 29, Issue 6-7. 434–440.

Treybal, R., (1988). Operaciones de Transferencia de Masa, 2 ed. México.

Vera, C., Guerrero, C., & Illanes, A. (2011). Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* b -galactosidase : effect of pH , temperature , and galactose and glucose concentrations. Carbohydrate Research, 346(6), 745–752.

Yau, Y. K., Ooi, C. W., Ng, E.-P., Lan, J. C.-W., Ling, T. C., & Show, P. L. (2015). Current applications of different type of aqueous two-phase systems. Bioresources and Bioprocessing, 2(1), 49.

Yuan, H., Liu, Y., Wei, W., Zhao, Y., Yuan, H., Liu, Y., … Zhao, Y. (2015). Phase Separation Behavior and System Properties of Aqueous Two-Phase Systems with Polyethylene Glycol and Different Salts: Experiment and Correlation. Journal of Fluids, 2015, 1–10.

4. Optimización de las condiciones de producción de galactooligosacáridos (GOS) usando un sistema acuoso de dos fases (SADF)

4.1 Introducción

La baja productividad es uno de los problemas más comúnmente observados en los procesos biotecnológicos debido a la inhibición, toxicidad e inestabilidad del producto final (Hatti-Kaul, R., 2000), siendo esto aplicable para muchas reacciones enzimáticas especialmente por la presencia de inhibidores. De otro lado, aproximadamente el 60-90% del costo de un producto biológico está asociado con las operaciones de purificación implicadas (Banik, R., *et al.*, 2003). Por ello, los procesos intensificados se plantean como una metodología para contrarrestar la inhibición en reacciones enzimáticas, además de lograr una reducción notable en el tamaño de los equipos, el consumo de energía o la generación de residuos, alcanzando un objetivo de producción determinado (Reay D. *et al.*2013).

Un ejemplo de esos procesos es la bioconversión extractiva o recuperación *in situ* del producto, en el cual se integran la reacción biológica con los procesos de separación para incrementar el rendimiento del producto y disminuir problemas de inhibición y costos (Yau, Y., *et al.,* 2015, Sinha, J., *et al.*, 2000).

En este trabajo se plantea la obtención de una alta concentración de producto final aprovechando la baja tensión interfacial, la posibilidad de operación en continuo, la separación selectiva y la biocompatibilidad que son características de los SADF (Hatti-Kaul, R., 2000, Banik, R., *et al.*, 2003). Esta estrategia implica la eliminación continua de

algunos productos de la reacción, mientras simultáneamente se realiza su producción (Sinha, J., *et al.*, 2000, Raja, S., *et al.*2012).

En los capítulos anteriores se definió la enzima más apropiada y sus mejores condiciones de operación, y posteriormente se establecieron las condiciones óptimas para un SADF como estrategia de separación de una mezcla comercial de GOS. En consecuencia, a continuación, se plantea un proceso intensificado de producción de GOS y separación por SADF simultánea.

Las variables que afectan los SADF como medios de reacción-separación simultánea son las concentraciones de polímero, sal, lactosa, enzima, peso molecular del polímero, pH, temperatura y agitación.

El uso de un polímero de mayor PM, hace que sea necesaria una menor cantidad de este para producir la separación de fases, también produce una disminución del coeficiente de reparto, debido a un efecto estérico en la fase polimérica, como consecuencia del mayor tamaño del polímero (Iqbal, M., *et al.* 2016).

La temperatura determina propiedades de transporte como densidad y viscosidad, las cuales afectan la velocidad de movimiento del polímero y el citrato de sodio para la separación de fases y de los solutos para lograr su partición entre las fases.

El pH del SADF puede alterar la carga y las propiedades superficiales de los solutos, lo que afecta la partición de las biomoléculas. La carga neta de la proteína (enzima) se vuelve negativa para un pH más alto que el punto isoeléctrico (pI), positiva si es menor que pI y si el pH es igual a pI, la carga neta será cero (Raja, S., *et al.*2012). La partición de una biomolécula cargada negativamente en un sistema de pH más alto aumenta el coeficiente de partición y la biomolécula objetivo prefiere la fase superior (Iqbal, M., *et al.*2016). Para el caso de los carbohidratos no se ha encontrado un efecto del pH sobre su hidrofobicidad o su carga electrostática.

Adicionalmente, algunas de las variables que definen el comportamiento de los SADF también afectan las reacciones enzimáticas como la temperatura y el pH; además de la concentración de la enzima, de sustrato y la agitación (Doran, P., 1995). Por tanto, para establecer el comportamiento de un SADF reactivo es preciso evaluar el efecto de todas

las variables señaladas, ya que no se ha establecido sus consecuencias sobre el proceso propuesto.

La información obtenida en los capítulos anteriores y en ensayos previos permitió establecer intervalos adecuados para las ocho variables importantes del SADF reactivo. A pesar de ello, fue necesario modificar las condiciones de separación definidas en el capítulo 3, específicamente la concentración de PEG ya que la alta concentración de lactosa (alrededor del 40%) necesaria para la reacción, provocó precipitación y dificultad de formación de las dos fases. Sin embargo, a partir de esos intervalos, se aplicó una metodología de optimización con la que se encontró un punto óptimo del proceso de reacción-separación que fue validado experimentalmente.

Aunque la producción de GOS en un SADF fue estudiada en el trabajo de Del Val, M., & Otero, C. (2003), las condiciones en las que se realizó el trabajo no son las más adecuadas para la producción de GOS, ya que emplearon un coctel enzimático poco selectivo con concentraciones bajas de lactosa (200 g/L aproximadamente). Adicionalmente, el SADF empleó sales de fosfato que son menos amigables con el medio ambiente. En consecuencia, en este trabajo se realizó una exploración exhaustiva del efecto de algunas variables sobre la reacción, la separación y finalmente sobre el proceso intensificado.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Materiales

Los materiales usados son los mismos detallados en los numerales 2.2.1 y 3.2.1.

4.2.2 Análisis

La preparación de las muestras para el análisis por HPLC se hizo como lo muestra el numeral 2.2.4, pero en este caso para la determinación de las concentraciones de lactosa, glucosa, galactosa y galactooligosacáridos se usó otra columna de cromatografía en otras condiciones. La columna fue una Benson BP100Na (Poliestireno divinil benceno sulfonado Na+) a 80ºC, operada por un sistema HPLC (Thermo) equipado con un detector Shodex RID-10A. El eluyente fue agua desionizada y desgasificada a un caudal de 0,5 mL/min (Vera *et al.*, 2011). La cuantificación se apoyó en patrones de maltooligosacáridos, con los

cuales se construyeron las curvas de calibración con un coeficiente de correlación superior a 0,99. Las determinaciones de proteína se hicieron de acuerdo a lo expuesto en el numeral 3.2.2.

4.2.3 Partición de la enzima

Para determinar la repartición de la enzima en las fases del SADF se estableció como indicador el coeficiente de partición de la proteína, debido a que la enzima es la única proteína comprometida en el proceso. Dicho coeficiente se definió como la concentración de proteína en la fase superior sobre la concentración de proteína en la fase inferior. Las condiciones del SADF fueron: PEG 4000 (10%), citrato de sodio (8%), estas cantidades se establecieron con base en ensayos preliminares, como medio de disolución se usó *buffer* McIlvaine (0,01M) (65,5%), de pH 4,5 y con agitación de 120 rpm.

4.2.4 Ensayos preliminares para definir el efecto de la concentración de citrato de sodio, PEG y temperatura sobre la distribución de la lactosa en alta concentración.

Debido a las altas concentraciones de lactosa necesarias para la producción de GOS y a la necesidad que el SADF esté ubicado en la zona de dos fases y que no se presente precipitación fue necesario disminuir las concentraciones de polímero y sal que se encontraron en el capítulo anterior. Por tanto, las concentraciones de PEG evaluadas fueron 9, 10, y 11%, las de citrato 7, 8 y 9% y la de lactosa del 32%. La preparación se llevó a cabo disolviendo una solución de 50% m/m de PEG 4000 en buffer McIlvaine (0,01 M, pH 4,5), con una solución 50% m/m de citrato de sodio en buffer McIlvaine (0,01 M, pH 4,5), para posteriormente adicionar la lactosa. Aunque se evaluó la concentración de lactosa obtenida en el capítulo 2 (40%), se presentó su precipitación por lo que fue necesario disminuir su valor a 32%, condiciones en las cuales se verificó la formación de dos fases. La solución se completó con buffer McIlvaine (0,01M) de pH 4,5 y la mezcla de los sólidos se hizo con ayuda de calentamiento y agitación hasta la disolución de todos los componentes. El SADF se preparó en tubos Falcon de 15 mL. Los tubos se dejaron en reposo en un baño a dos temperaturas: 25 y 55ºC, tomando muestras al cabo de 2 h y con agitación de 120 rpm

4.2.5 Variables de respuesta

Las variables de respuesta establecidas en este capítulo son las definidas en 2.2.2.5 para la reacción, es decir la producción de GOS (g/L) calculada por balance de materia, como la diferencia entre la cantidad inicial de lactosa y el resultado de la suma de lactosa, glucosa y galactosa en un tiempo determinado. La productividad de GOS (g/ L.min) se definió como la cantidad de GOS total por volumen de medio de reacción y tiempo de reacción y el rendimiento como la masa de GOS obtenida sobre la masa inicial de lactosa * 100 (%). La conversión definida como el porcentaje de lactosa que reacciona y la selectividad definida como el porcentaje del producto de interés respecto al total de productos generado. Para la separación las variables fueron definidas en 3.2.4, (R y la relación de volúmenes de las fases (RV)).

4.2.6 Planeación experimental

De manera similar a la planeación experimental propuesta en 3.2.5 y de acuerdo con la Figura 3.1, se aplicó un diseño de experimentos de tamizado Plackett-Burman de 12 tratamientos con tres repeticiones en el punto central (PB-12 + 3), para seleccionar las variables significativas entre las ocho mencionadas anteriormente.

El detalle del diseño experimental empleado se encuentra en la Tabla 4.1. Los intervalos definidos allí para el pH, la temperatura, MW PEG, la agitación y la concentración de enzima son los valores definidos como óptimos en los capítulos 2 y 3. Los intervalos para las concentraciones de lactosa inicial, PEG y citrato de sodio se definieron gracias a ensayos previos.

Tabla 4.1 *Tratamientos del diseño de experimentos Plackett-Burman 12 + 3 repeticiones en el punto central..*

Tratamiento	pH	Temperatura (ºC)	Concent. Inic. lactosa(%m/v)	Citrato de Sodio (%m/m)	PEG (%m/m)	MW PEG (Da)	Agitación (RPM)	Enzima (mg/g lactosa inicial)
1	5,5	40	35	6,29	6,26	20000	0	0,68
2	5,5	60	35	4,87	7,7	20000	0	1
3	4,5	40	25	6,29	7,7	20000	0	1
4	5,5	60	25	6,29	6,26	4000	0	1
5	5,5	40	25	4,87	7,7	20000	200	0,68

6	4,5	40	35	6,29	7,7	4000	200	1
7	5	50	30	5,58	6,98	12000	100	0,84
8	4,5	60	25	4,87	6,26	20000	200	1
9	5	50	30	5,58	6,98	12000	100	0,84
10	4,5	40	25	4,87	6,26	4000	0	0,68
11	4,5	60	35	6,29	6,26	20000	200	0,68
12	5	50	30	5,58	6,98	12000	100	0,84
13	5,5	60	25	6,29	7,7	4000	200	0,68
14	4,5	60	35	4,87	7,7	4000	0	0,68
15	5,5	40	35	4,87	6,26	4000	200	1

Según la metodología expuesta en 3.2.5, habiendo establecido las variables significativas definidas en el PB-12+3, se procedió a hacer la optimización gruesa, para la cual se aplicó un diseño factorial (2^3 + 3), con las tres variables significativas establecidas en el PB. Basados en los resultados de la optimización gruesa se aplicó un diseño Box Behnken (BB) de superficie de respuesta para la optimización final, y para finalizar se definió un modelo de optimización que fue validado experimentalmente.

4.2.7 Tratamiento estadístico

El tratamiento de los datos se hizo con ayuda de Microsoft Excel y el análisis estadístico de los mismos se hizo con el software Minitab 16. El nivel de significancia empleado en los análisis fue de 0,05.

4.3 Resultados y Análisis

4.3.1 Análisis preliminar de la partición de la enzima

El coeficiente de partición de la enzima en las condiciones evaluadas (citrato de sodio 8%, PEG 10%, lactosa 32% y T:54ºC) fue de 0,12 +/- 0,01, lo que implica que entre el 87 y el 89% de la enzima se encuentra en la fase inferior, lo cual favorece la reacción en esa fase. Este resultado coincide con lo encontrado por Silva *et al.,*1997, para una lactasa de *Aspergillus oryzae*, en condiciones similares y puede ser aprovechado para lograr una buena producción de GOS.

4.3.2 Efecto de la concentración de citrato de sodio, PEG y temperatura sobre la distribución de la lactosa en alta concentración

El efecto de la temperatura y las concentraciones de PEG y citrato de sodio sobre la distribución de la lactosa en concentraciones elevadas (32%) en un sistema acuoso de dos fases, se puede apreciar en la Figura 4.1; allí se muestra el comportamiento del coeficiente de reparto para tres parejas de concentraciones citrato-PEG a dos temperaturas. De acuerdo con el análisis estadístico realizado (ANOVA), que aparece en el Anexo 2c, se puede afirmar que la temperatura no tiene efecto significativo sobre la distribución de la lactosa en las dos fases.

De igual forma, se observa que el coeficiente de partición de la lactosa es inversamente proporcional a las concentraciones de PEG y citrato de sodio. En consecuencia, para obtener la mayor concentración del disacárido en la fase inferior, donde se encuentra la mayor parte de la enzima, y de esta forma favorecer la reacción de formación de GOS; se debe aumentar la concentración de PEG y citrato. Por tanto, se evaluaron concentraciones superiores a 9% para citrato de sodio y a 11% para PEG pero se presentó precipitación de la lactosa, para concentraciones de ésta entre 25 y 35% como consecuencia de un exceso de sólidos respecto al solvente (*buffe*r).

Por tanto, fue necesario limitar las concentraciones de citrato y PEG en valores que garanticen la ubicación del sistema en la zona de dos fases de la curva binodal; con la información anterior y algunos ensayos preliminares se definieron las concentraciones que aparecen en la Tabla 4.1.

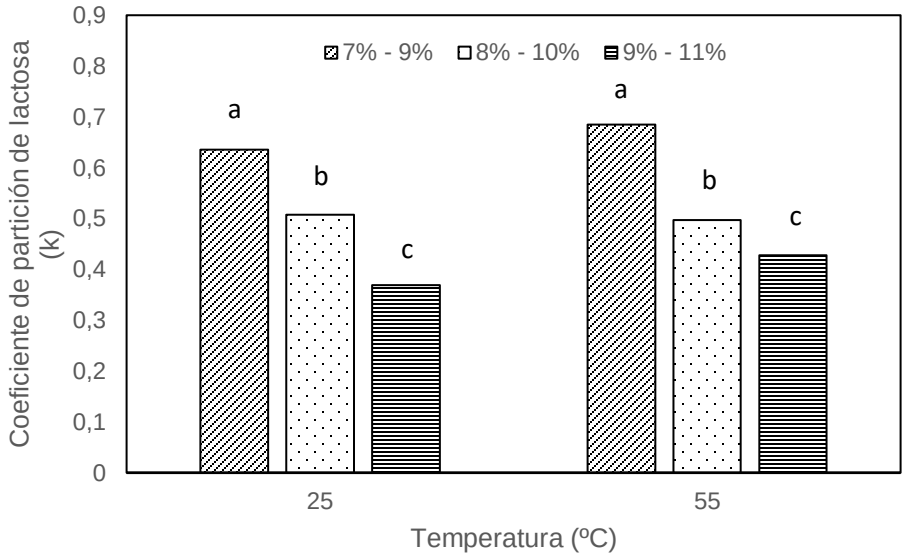


Figura 4.1 *Coeficiente de partición de lactosa a 25 y 55°C y a diferentes concentraciones (%) de citrato de sodio – PEG.*

4.3.3 Selección de variables

En la Figura 4.2 se muestra el diagrama de Pareto para los resultados obtenidos en el diseño de experimentos de Plackett – Burman planteado, allí se aprecia que las variables significativas para el SADF reactivo son el pH, la concentración inicial de lactosa (Lo) y la concentración de enzima, y que mientras que la concentración de enzima y el pH tienen una relación directa sobre R, la concentración de lactosa tiene relación inversa (Figura 4.3). Estas variables difieren de las encontradas como significativas para la separación (capítulo 3) que fueron la temperatura y las concentraciones de PEG y citrato de sodio.

Por tanto, las variables que afectan la reacción ejercen una influencia mucho mayor que la de las variables implicadas en la separación, por lo que se puede inferir que la reacción de producción de GOS es el fenómeno controlante, frente a la separación de estos.

Esto puede ser explicado por diversos fenómenos entre los que se pueden mencionar los siguientes: las bajas concentraciones de PEG y citrato de sodio empleadas provocan bajas viscosidades en ambas fases y bajos tiempos de separación de estas. Además, permiten una fácil movilidad del sustrato hacia la enzima en el seno de la fase salina, que es la de menor viscosidad y mayor densidad (Yuan, H., *et al.*2015); lo que hace que la reacción no

se vea muy afectada. Adicionalmente, el pequeño volumen libre en la fase salina producido por la alta concentración de solutos (Benavides, J., & Rito-Palomares, M., 2004) hace que las sustancias de mayor tamaño como los GOS, migren preferencialmente hacia la fase superior, lo que perjudica su permanencia en la fase inferior.

Adicionalmente, la presencia de la lactosa hizo que fuera necesario desplazar las concentraciones de PEG y citrato desde su punto óptimo para la separación (zona 6 mencionada en el capítulo 3), a valores cercanos a la zona 1 en donde la separación se ve muy afectada. En ese mismo sentido, como no fue posible combinar las condiciones óptimas para la separación y para la reacción encontradas anteriormente, se explica a su vez porqué primaron las variables correspondientes a la reacción y muestra que el compromiso entre la reacción y la separación depende de las concentraciones de PEG y citrato empleadas.

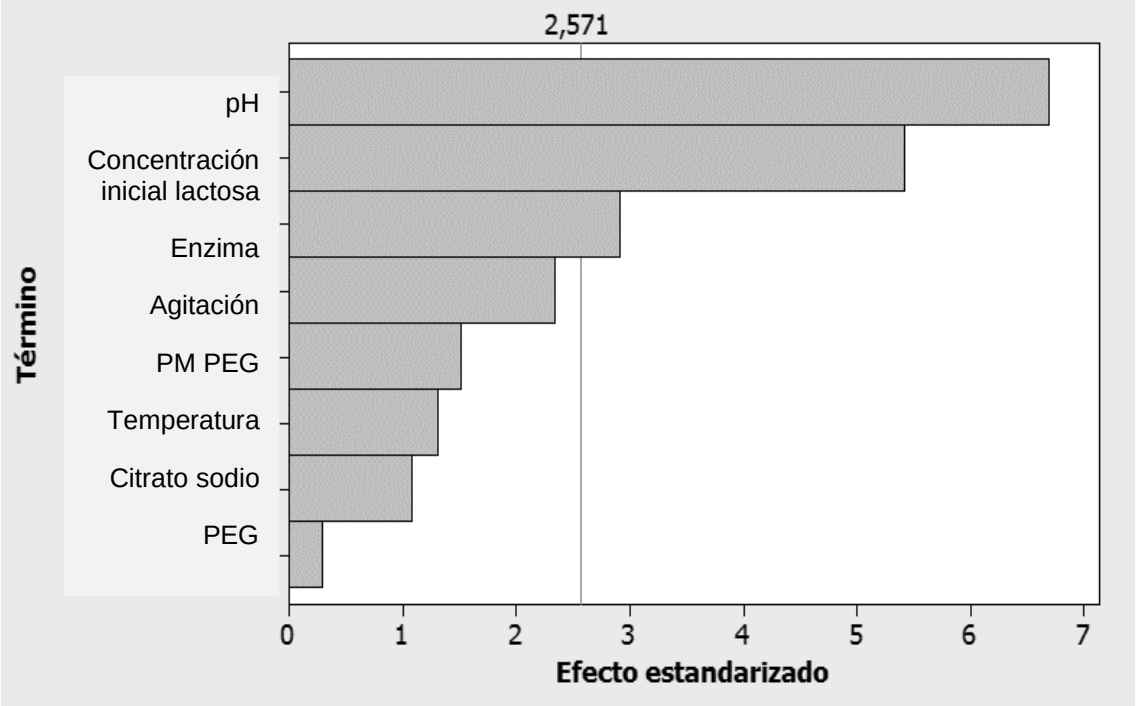


Figura 4.2 *Diagrama de Pareto de efectos estandarizados del diseño de experimentos de Plackett-Burman, para R.*

De otro lado, en el Anexo 6 se analiza el efecto de las variables evaluadas sobre RV encontrando que la única variable que afecta la respuesta es la concentración de PEG. Sin

embargo, en este capítulo esa concentración se mantuvo constante debido a que anteriormente se demostró que no tiene un efecto significativo sobre R, y a la imposibilidad de usar mayores concentraciones de PEG ya que causaban precipitación de lactosa; en consecuencia la LLR y por tanto la separación quedó determinada.

4.3.4 Partición de la enzima en las fases del SADF

En la Tabla 4.2 se observa la repartición de la enzima para los 15 tratamientos del PB, según la cual entre el 81 y el 98 % de esta se concentró en la fase inferior.

A pesar que emplearon una sal diferente a la de este trabajo y mayores concentraciones de polímero y sal, lo que implica mayores valores de LLR; los coeficientes de la Tabla 4.2 son similares a la $K_{\alpha-galactosidasa}$ reportada por Naganagouda y Mulimani (2008) de 0,156, quienes recuperan una enzima del mismo origen (*Aspergillus oryzae)* mediante un ATPS formado por [PEG]=12%, [Fosfato de potasio]=11,9% y PEG4000 a pH 5. Es necesario considerar que el citrato de sodio tiene una interacción más débil con los segmentos de PEG que el fosfato de potasio, lo que hace que el citrato induzca mejor la separación de fases que el fosfato (Carvalho, C., *et al.*2008).

Tabla 4.2 *Coeficientes de partición de la enzima y fracción de reparto entre las fases superior (FS) e inferior (FI), para los tratamientos de PB-12+3.*

Tratamiento	pH	K-enzima	Fracción de enzima en FS	Fracción de enzima en FI
1	5,5	0,188	0,158	0,842
2	5,5	0,191	0,161	0,839
3	4,5	0,026	0,025	0,975
4	5,5	0,129	0,114	0,886
5	5,5	0,198	0,165	0,835
6	4,5	0,047	0,045	0,955
7	5	0,102	0,092	0,908
8	4,5	0,064	0,060	0,940
9	5	0,092	0,084	0,916
10	4,5	0,053	0,051	0,949
11	4,5	0,033	0,032	0,968
12	5	0,104	0,095	0,905
13	5,5	0,118	0,106	0,894

14	4,5	0,073	0,068	0,932
15	5,5	0,238	0,192	0,808

*et al.*La distribución de la enzima en las fases se ve influenciada por los factores anteriormente mencionados: hidrofobicidad, carga electrostática, tamaño, entre otros; siendo la primera la que causa el efecto más importante (Banik, R., *et al.*, 2003). En consecuencia, la hidrofilicidad de la enzima (Naganagouda y Mulimani, 2008) provoca que se oriente hacia la fase inferior (salina), más hidrofílica. De otro lado, la carga neta de la enzima también contribuye, ya que a pH mayores a su punto isoeléctrico (4,6) (Urrutia, P., *et al.* 2013, Tanaka, Y. *et al.*, 1975) esta es negativa y se orienta hacia la fase polimérica, mientras que para pHs inferiores la carga neta es positiva y tiende hacia la fase salina (Iqbal *et al.*2016). Como consecuencia de esos fenómenos los experimentos 3, 6, 8, 10, 11 y 14 con pH 4,5, presentan los menores coeficientes de partición de la enzima, es decir ésta se orienta hacia la fase salina en comparación con los otros.

4.3.5 Optimización gruesa

La optimización gruesa se llevó a cabo aplicando un diseño factorial 2^3 con las tres variables definidas en la etapa anterior (PB) y aprovechando la información recogida anteriormente se definieron los siguientes niveles para cada variable: concentración inicial de lactosa (Lo): 20 y 35%, concentración de enzima: 0.4 y 0.6 mg enzima/g Lo, pH: 4.5 y 5.5. Adicionalmente, se mantuvieron constantes las siguientes condiciones: temperatura: 54°C, citrato de sodio: 5.6%, PEG: 6.9 %, MW PEG: 4000 Da, agitación: 120 rpm. Los resultados de esta optimización se muestran en la Figura 4.3.

Como se mencionó previamente, el efecto del pH sobre la separación de cualquier biomolécula en un SADF se da en virtud de la carga superficial de la misma. Sin embargo, los carbohidratos no poseen carga (De Brito Cardoso, *et al.*, 2013) lo que hace que el pH no afecte su separación, resultado que concuerda con lo encontrado en el capítulo 3 y que se puede observar en la Figura 4.3.

A pesar de su efecto aparentemente irrelevante (Figura 4.3), la importancia del pH para la reacción hace que no sea conveniente descartarlo para la optimización final.

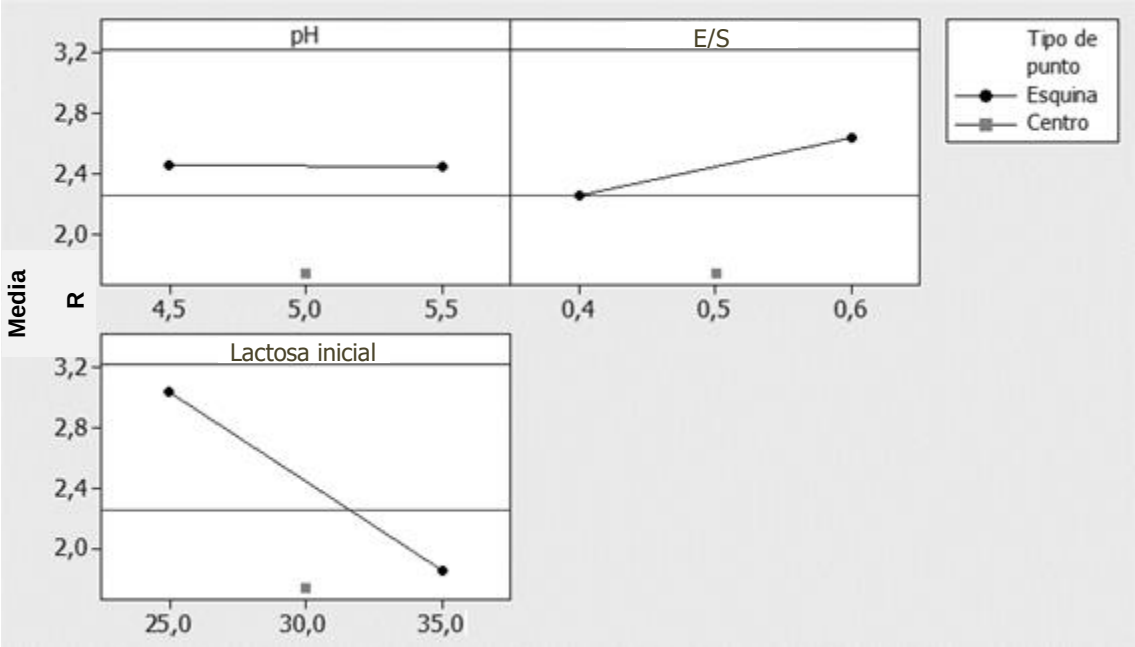


Figura 4.3 *Gráfica de efectos principales del Diseño factorial 2^3+3, para R.*

La partición de los azúcares no se vió afectada por las variables manipuladas (pH, lactosa inicial y E/S), se logró un máximo del 85% de los GOS en la fase inferior y 42% de los monosacáridos en la superior, mientras que el RV osciló entre 0,25 y 0,38. Estos valores se usarán como referencia en los análisis posteriores.

Finalmente, se observa la conveniencia de reducir E/S y de aumentar la concentración de lactosa inicial. Para lograr esto ultimo, sin precipitación de lactosa se emplearon soluciones sobresaturadas, como se presenta en la literatura (Walstra, P. *et al.*, 2006, Vera, C., *et al.*, 2012).

4.3.6 Optimización final

En la optimización final se utilizaron concentraciones de enzima menores a los presentados en la optimización gruesa (0,2 – 0,4 [g de enzima/100 g de lactosa inicial]) y concentraciones de lactosa superiores a las evaluadas en la etapa anterior, 35 – 45% m/v, el pH se evaluó entre 4,5 y 5,5. Las otras condiciones para los ensayos fueron: temperatura: 54°C, citrato de sodio: 5.6%, PEG: 6.9 %, MW PEG: 4000 Da, agitación: 120 rpm.

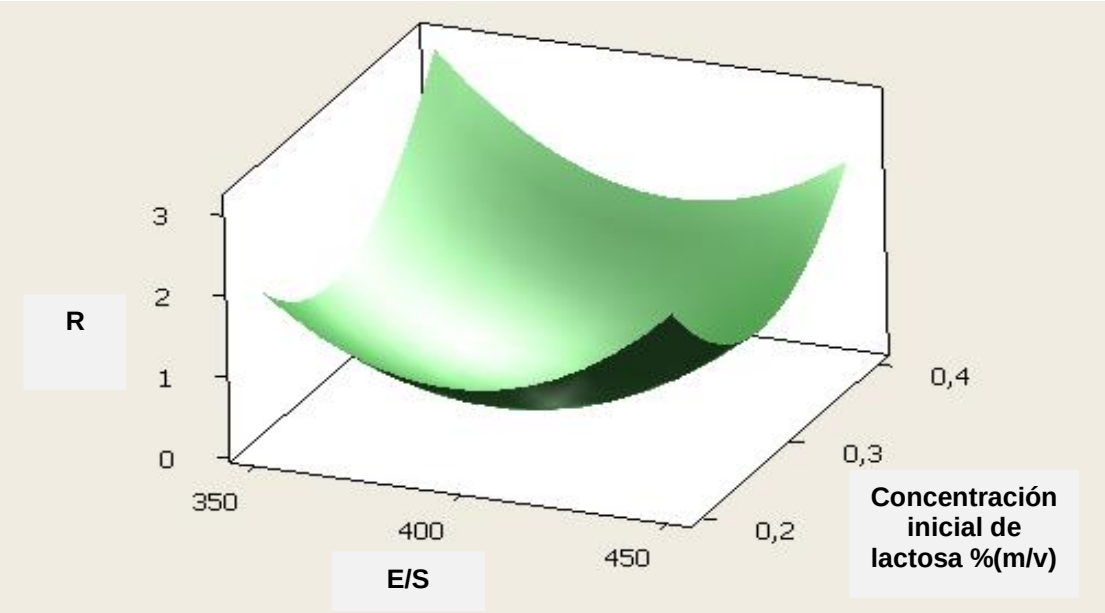


Figura 4.4 *Superficie de respuesta para la minimización de R, según el diseño de experimentos de Box Behnken*

De manera similar a lo observado en la optimización gruesa la partición de los azúcares no se vió afectada por las variables manipuladas (pH, lactosa inicial y E/S); se logró un máximo del 93% de los GOS en la fase inferior y 32% de los monosacáridos en la superior. El aumento de la concentración de GOS en la fase inferior, respecto a la optimización gruesa, se debió al aumento en la concentración de lactosa que como se mostró en el capitulo 2 promueve la producción de GOS. Adicionalmente, una fase superior menos hidrófoba respecto a la empleada en la optimización gruesa por la mayor concentración de sólidos presente (Benavides, J., & Rito-Palomares, M., 2008), hace que menos monosacáridos migren a la fase superior.

La RV osciló entre 0,13 y 0,22, la disminución de este parámetro respecto a la optimización gruesa es causada por el aumento en la concentración de lactosa en la fase inferior, que incrementa el volumen de esta fase.

La minimización que se muestra en la Figura 4.4 permitió obtener un R de 0,55 para las siguientes condiciones: concentración inicial de lactosa (Lo): 41,26% m/v, concentración de enzima: 0,32 mg enzima/g Lo y pH 4,5. Adicionalmente, en la Tabla 4.3 se presenta la

comparación de varios indicadores del proceso convencional y del SADF reactivo en la fase inferior y para el proceso global (considerando las dos fases).

Tabla 4.3 *Comparación de producción de GOS en un medio de reacción convencional y un SADF.*: datos del primer capítulo de este documento. FI: fase inferior.*

	GOS (g/L)	Productividad GOS (g/L.min)	Conversión (%)	Rendimiento (%)	Selectividad (%)
SADF reactivo FI	91,318	11,415	0,418	0,191	0,657
SADF reactivo global	81,077	10,135	0,295	0,204	0,630
Medio convencional*	107,690	81,6	0,467	0,272	0,361

Alli se puede observar que todos los indicadores son mayores en la fase inferior comparada con el sistema global, exceptuando el rendimiento. Esto es consecuencia de que la mayor parte (87%) de la producción de GOS se realizó en la fase inferior, ya que como se mostró previamente más del 80% de la enzima se encuentra alli, haciendo que la producción y conversión sean mayores.

Sin embargo, en cualquiera de los casos esos valores son inferiores a los obtenidos en el capítulo 2 para el proceso convencional de reacción, excepto para la selectividad que aumentó considerablemente. Esta mayor selectividad puede ser explicada por la migración de compuestos de bajo peso molecular (monosacáridos) hacia la fase polimérica ocasionada, entre otras cosas, por la mayor fuerza iónica de la fase salina (Benavides & Rito-Palomares, 2008).

La mayor producción de GOS en el sistema convencional respecto al SADF, provoca mayor conversión y rendimiento. De otro lado, la disminución de la productividad del SADF reactivo se debe a que el tiempo de reacción aumentó de 80 min a 480 min. Sin embargo, la comparación de este valor en el mismo tiempo de reacción (80 min) para la fase inferior, global y convencional (11,415, 10,135 y 80,544 $g.L^{-1}.h^{-1}$, respectivamente) es un indicio de que algún factor está afectando negativamente a la reacción enzimática, por ejemplo la presencia de otras sustancias ajenas a esta (PEG y citrato de sodio), que en un medio muy concentrado, pueden afectar.

La mayor concentración de lactosa empleada en comparación con el capítulo 3 hace que se logren niveles de monosacáridos mayores que los observados dicho capítulo. Por ello, aunque se logró que el 20% de la glucosa y el 16% de la galactosa fueran removidos hacia la fase superior, esta separación no fue suficiente para evitar los efectos inhibitorios sobre la enzima y en consecuencia los resultados del sistema integrado resultan menores al convencional. En ese sentido, las bajas concentraciones de sal y polímero empleadas en el SADF para poder adicionar altas concentraciones de lactosa hicieron que la separación no fuera tan efectiva.

En las condiciones optimizadas, los valores de glucosa y galactosa en la fase inferior fueron de 42 mg/g y 7 mg/g respectivamente, que superan los niveles límite de inhibición de la enzima por estos azúcares (18 mg/g y 0 mg/g, Vera C. *et al.* 2011), lo cual pudo provocar la disminución en la producción y rendimiento de GOS en la fase inferior para el sistema de reacción – separación. Entre tanto, en la fase superior dichas concentraciones fueron 13 mg/g y 5 mg/g, con bajas concentraciones de lactosa (72 g/L) y de enzima lo que hace que la producción de GOS en esta fase sea baja, y por tanto su contribución a los indicadores globales de reacción no sea muy importante.

Desde otro punto de vista, el aumento en la viscosidad en ambas fases, por la cantidad y naturaleza de los solutos disueltos, crea una resistencia adicional a los fenómenos de transferencia de calor y masa, que inciden en la disminución en los indicadores del proceso para el SADF reactivo respecto al medio convencional. Adicionalmente, la presencia de sales e iones en la fase de reacción puede disminuir la producción de GOS como ya ha sido observado en otros trabajos del grupo de investigación (Rosales, J., 2020) y por del-Val & Otero, 2003.

Las bajas RV que se presentan en este capítulo frente al anterior, como consecuencia de las bajas concentraciones de PEG y citrato, provocan una fase inferior en un mayor volumen que en el capítulo 3. Fase que como se mencionó anteriormente tiene una menor concentración de GOS que la correspondiente para la reacción en medio convencional.

Finalmente, en la Tabla 4.4 se muestra la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los de del-Val y Otero. Aunque los resultados de ese trabajo fueron logrados con una enzima y condiciones diferentes, menos adecuadas para la producción de GOS,

y emplearon un SADF compuesto por PEG y fosfato, es el único antecedente comparable que se encontró en la literatura. En la tabla mencionada se puede observar que se logró una mayor conversión de la lactosa debido a que la concentración inicial empleada fue mucho mayor, lo que redundó a su vez en una mayor producción de GOS. La selectividad hacia GOS3 es menor que la obtenida por del-Val & Otero, con una enzima diferente, la enzima de *Aspergillus oryzae*, usada en el presente trabajo, produce principalmente GOS3 y GOS4, además de pequeñas cantidades de GOS5 y GOS6 que hacen que la selectividad hacia GOS3 disminuya.

Tabla 4.4 *Comparación de dos trabajos de producción de GOS usando un SADF como medio de reacción.*

	del Val & Otero, (2003)	**Presente trabajo**
Tiempo de reacción (h)	8	8
Temperatura (ºC)	45	54
Concent. Inicial de lactosa (g/L)	236,7	412
GOS3 (g/L)	56,7	84
Selectividad GOS3 en la fase	70	61
Conversión (%m/m)	34	42

4.3.7 Modelo de Optimización

A continuación se muestra el modelo encontrado con la información recogida, este posee un r^2 ajustado de 83,03%.

$$R = \frac{K_{GOS.LAC}}{S_{MONO\ T}} = 46{,}174 - 0{,}417326 * L - 118{,}025 * E + 21{,}0947 * P + 0{,}000431818 * L^2 + 112{,}879 * E^2 - 3{,}12105 * P^2 - 0{,}0545189 * L * E + 0{,}0174131 * L * P + 14{,}9694 * E * P$$

Ecuación 4.1

Donde L es concentración de lactosa, P es el pH y E es la concentración de enzima.

4.3.8 Validación del Modelo

Se llevó a cabo la validación experimental del modelo, a las condiciones establecidas en la optimización final: temperatura: 54°C, [Citrato de sodio]: 5.6%, [PEG]: 6.9 %, MW PEG: 4000 Da, agitación: 120 rpm, pH: 4.5, concentración inicial de lactosa (Lo): 41,26% m/v y concentración de enzima: 0,32 mg enzima / g lactosa inicial. A estas condiciones el valor

resultante de R fue de 0,583+/-0,041, que resulta ser 6% mayor que el predicho por el modelo.

4.4 Conclusiones

Se exploraron ocho variables del SADF reactivo para la producción de GOS de las cuales el pH, la concentración inicial de lactosa (Lo) y la relación enzima sustrato (E/S) son estadísticamente significativas.

Entre el 80 y 97% de la enzima empleada se encuentra en la fase inferior del SADF (rica en citrato de sodio), debido principalmente a su carga positiva en el pH de trabajo.

La optimización final permitió obtener un R mínimo de 0,55, con una concentración inicial de lactosa (Lo) de 41,26% m/v, una relación enzima sustrato de 0,32 mg enzima / g Lo, pH 4,5, como variables manipuladas. Esta minimización generó un modelo que fue validado experimentalmente y produjo un R de 0,583 +/-0,041, 6% mayor que el predicho por el modelo.

Haciendo la comparación del medio acuoso convencional de reacción frente al SADF, se puede apreciar una disminución del 15%, 86%, 10% y 30% en la producción, la productividad, la conversión y el rendimiento de GOS respectivamente. La única respuesta que se incrementó fue la selectividad (82%).

El sistema de reacción-separación propuesto provocó una migración del 27% de los monosacáridos generados en la fase salina hacia la polimérica; esto no resultó suficiente para evitar la inhibición de la reacción y produjo una disminución en la producción y el rendimiento de GOS.

La fase salina que contiene la mayor parte del producto de reacción posee un volumen menor en comparación con el proceso convencional, pero a más baja concentración.

4.5 Referencias

Aeberhardt, K., De Saint Laumer, J. Y., Bouquerand, P. E., & Normand, V. (2005). Ultrasonic wave spectroscopy study of sugar oligomers and polysaccharides in aqueous

solutions: The hydration length concept. International Journal of Biological Macromolecules, 36(5), 275–282.

Albertsson P., Johansson G., Tjerneld F. (1990) in: Asenjo J. (Ed.), Separation Process in Biotechnology, Marcel Dekker, New York, pp. 287–327.

Andrews, B. , Schmidt, A. and Asenjo, J. (2005), Correlation for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: Effect of surface hydrophobicity and charge. Biotechnol. Bioeng., 90: 380-390.

Asenjo, J. A., & Andrews, B. A. (2011). Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. Journal of Chromatography A, 1218(49), 8826–8835.

Azevedo, A. M., Gomes, A. G., Rosa, P. A. J., Ferreira, I. F., Pisco, A. M. M. O., & Aires-Barros, M. R. (2009). Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. Separation and Purification Technology, 65(1), 14–21.

Banik, R. M., Santhiagu, A., Kanari, B., Sabarinath, C., & Upadhyay, S. N. (2003). Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems, (Albertsson 1971), 337–348.

Baskir, J.N., Hatton, T.A., and Suter, U.W. (1989) Protein partition- ing in two-phase aqueous polymer systems. Biotech. Bioeng. 34: 541–558.

Benavides, J., & Rito-Palomares, M. (2004). Bioprocess intensification: A potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from Porphyridium cruentum. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 807(1), 33–38.

Benavides J, Rito-Palomares M (2008) Practical Experiences from the Development of Aqueous Two-Phase Processes for the Recovery of High Value Biological Products. J Chem Technol Biot 83: 133-142.

Benavides, J., Rito-Palomares, M., & Asenjo, J. A. (2011). Aqueous Two-Phase Systems. Comprehensive Biotechnology.

Boon, M. a., Janssen, a. E. M., & Van ’t Riet, K. (2000). Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. Enzyme and Microbial Technology, 26(2–4), 271–281.

Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254.

Buttersack, C. (2017). Hydrophobicity of carbohydrates and related hydroxy compounds. Carbohydrate Research, 446–447, 101–112.

Carvalho, C. P., Coimbra, J. S. R., Costa, I. A. F., Minim, L. A., Cristina, M., & Silva, L. H. M. (2008). INFLUENCE OF THE TEMPERATURE AND TYPE OF SALT ON THE PHASE EQUILIBRIUM OF PEG 1500 + Artigo, 31(2), 209–213.

Carvalho, J. De, Renann, P., França, L. De, & Souza, T. (2018). Optimized extraction of polygalacturonase from Aspergillus aculeatus URM4953 by aqueous two-phase systems PEG / Citrate. Journal of Molecular Liquids, 263, 81–88.

Chavez-Santoscoy, A., Benavides, J., Vermaas, W., & Rito-Palomares, M. (2010). Application of Aqueous two-phase systems for the potential extractive Fermentation of Cyanobacterial products. Chemical Engineering and Technology, 33(1), 177–182.

Chen, J, Wang, C., (1991). Lactose Hydrolysis by β-Galactosidase in Aqueous Two-Phase Systems, 71(3), 168–175.

Chen, C. W., & Yeh, C. (2003). Synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles, 33, 497–507.

Czermak P., Ebrahimi M., Grau K., Netz S., Sawatzki G.and Pfromm P.H., 2004. Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process, J. Membr. Sci., 232, 85–91.

Doran, P. (1995). Principios de Ingeniería de los bioprocesos. Editorial Acribia S.A, Zaragoza, España. (Traducido 1998)

Czermak P., Ebrahimi M., Grau K., Netz S., Sawatzki G.and Pfromm P.H., 2004. Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process, J. Membr. Sci., 232, 85–91.

Da Silva, C. A. S., Coimbra, J. S. R., Rojas, E. E. G., & Teixeira, J. A. C. (2009). Partitioning of glycomacropeptide in aqueous two-phase systems. Process Biochemistry, 44(11), 1213–1216.

De Brito Cardoso, G., Mourão, T., Pereira, F. M., Freire, M. G., Fricks, A. T., Soares, C. M. F., & Lima, Á. S. (2013). Aqueous two-phase systems based on acetonitrile and carbohydrates and their application to the extraction of vanillin. Separation and Purification Technology, 104, 106–113.

De Oliveira, R. M., Dos Reis Coimbra, J. S., Minim, L. A., Da Silva, L. H. M., & Fontes, M. P. F. (2008). Liquid-liquid equilibria of biphasic systems composed of sodium citrate + polyethylene(glycol) 1500 or 4000 at different temperatures. Journal of Chemical and Engineering Data, 53(4), 895–899.

Del Val M., Otero C. 2003. Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. Enzyme Microb Technol 33(1):118–26.

Doran, P. (1995). Principios de Ingeniería de los bioprocesos. Editorial Acribia S.A, Zaragoza, España. (Traducido 1998)

Garai, D., & Kumar, V. (2013). Aqueous two phase extraction of alkaline fungal xylanase in PEG/phosphate system: Optimization by Box-Behnken design approach. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2(2), 125–131.

Glyk, A., Solle, D., Scheper, T., & Beutel, S. (2015). Optimization of PEG-salt aqueous two-phase systems by design of experiments. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 149, 12–21.

Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. Food Chemistry, 121(2), 307–318.

Grilo, A. L., Aires-Barros, M. R., & Azevedo, A. M. (2016). Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Fundamentals, Applications and Trends. Separation and Purification Reviews, 45(1), 68–80.

Hatti-Kaul, R. - editor (2000). Aqueous Two-Phase Systems, methods and prototcols – Methods in Biotechnology, 11. Humana Press, New Jersey.

Hong Yang, A. M. G. (2013). Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation. Journal of Bioprocessing & Biotechniques, 4(1), 1–8.

Huerta, L. M., Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L., & Illanes, A. (2011). Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized β-galactosidases from Aspergillus oryzae. Process Biochemistry, 46(1), 245–252.

Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Yuan, Z. (2016). Aqueous two-phase system (SADF): an overview and advances in its applications. Biological Procedures Online, 18(1), 1–18.

Isabel, M., Hill, C. G., & Qu, I. De. (2001). Selective enzymatic synthesis of 6 -galactosyl lactose by Pectinex Ultra SP in water, (pH 5), 1921–1924.

Ivetic, D., Sciban, M., Vasic, V., Kukic, D., Prodanovic, J.,Antov, M., (2013). Evaluation of possibility of textile dye removal from wastewater by aqueous two-phase extraction. Desalination and water treatment, 51(7-9), 1603-1608.

Iwasaki, K., Nakajima, M., Nakao, S. Galacto-oligosaccharide Production fromLactose by an Enzymic Batch Reaction Using β-Galactosidase. Process Biochem.1996; 31 (1): 69 – 76.

Johansson, H., & Karlstrom, G. (1997). Temperature-induced phase partitioning of peptides in water solutions of ethylene oxide and propylene oxide random copolymers, 315–325.

Kaul, R. & Mattiasson, B. (1986). Extractive bioconversion in aqueous two-phase systems. Production of prednisolone from hydrocortisone using Arthrobacter simplex as catalyst Appl Microbiol Biotechnol. 24: 259.

Li, X., Lian, Z., Dong, B., Xu, Y., Yong, Q., & Yu, S. (2011). Extractive bioconversion of xylan for production of xylobiose and xylotriose using a PEG6000/sodium citrate aqueous two-phase system. Korean Journal of Chemical Engineering, 28(9), 1897–1901.

Mahoney, R. R. (1998). Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. Food Chemistry, 63(2), 147–154.

Marcos, J., Fonseca, P., Ramalho, M.,Cabral, J. (2002) “Application of surface response analysis to the optimization of penicillin acylase purification in aqueous two-phase systems,” Enzyme and Microbial Technology, 31, 7, 1006–1014.

Mattiasson, B. (1988). Bioconversions in aqueous two phase systems: an alternative to conventional immobilization. Methods in Enzymology, Academic Press inc. Vol 137, 657–667.

Montañés F, Fornari T, Stateva RP, Olano A, nez EI (2009). Solubility of carbohydrates in supercritical carbon dioxide with (ethanol + water) cosolvent. J Supercrit Fluids 49(1):16.

Murugesan, T., & Perumalsamy, M. (2005). Liquid-liquid equilibria of poly(ethylene glycol) 2000 + sodium citrate + water at (25, 30, 35, 40, and 45) °C. Journal of Chemical and Engineering Data, 50(4), 1392–1395.

Naganagouda, K., & Mulimani, V. H. (2008). Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α-galactosidase. Process Biochemistry, 43(11), 1293–1299.

Nagaraj, V. H., & Iyyaswami, R. (2013). Phase Demixing Studies in Aqueous Two-Phase System With Polyethylene Glycol (Peg) and Sodium Citrate. Chemical Engineering Communications, 200(10), 1293–1308.

Oliveira, G., Silva, D., Roberto, I., Vitolo, M., Pessoa, A. (2003). Partition behavior and partial purification of hexokinase in aqueous two-phase polyethylene glycol/citrate systems,” Applied Biochemistry and Biotechnology A, 108, 1–3, 787–798.

Perumalsamy, M., Bathmalakshmi, A., & Murugesan, T. (2007). Experiment and correlation of liquid-liquid equilibria of an aqueous salt polymer system containing PEG6000 + sodium citrate. Journal of Chemical and Engineering Data, 52(4), 1186–1188.

Porto, T. S., Medeiros e Silva, G. M., Porto, C. S., Cavalcanti, M. T. H., Neto, B. B., Lima-Filho, J. L., Pessoa, A. (2008). Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 47(4), 716–721.

Prenosil, J. E., Stuker, E., & Bourne, J. R. (1987). Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part I: State of Art. Biotechnology and Bioengineering, 30(9), 1019–1025.

Pruksasri S. Production and separation of galacto-oligosaccharides from lactose by β-galactosidase immobilized on nanofiltration membranes, PhD thesis, Ohio State University, Chemical Engineering, 2007.

Raja, S., & Murty, V. R. (2013). Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing PEG + Sodium Citrate + Water at various pH. Journal of Chemical Science and Technology, 2(4), 169–174.

Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., & Ramesh, V. (2012). Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. Science and Technology, 1(1), 7–16.

Reay, D., Ramshaw, C., Harvey A. (2013). Process Intensification: Engineering for Efficiency, Sustainability and Flexibility, second edition. Butterworth-Heinemann Editors.

Sakai, T., Tsuji, H., Shibata, S., Hayakawa, K., & Matsumoto, K. (2008). Repeated-batch production of galactooligosaccharides from lactose at high concentration by using alginate-immobilized cells of Sporobolomyces singularis YIT 10047. The Journal of General and Applied Microbiology, 54(5), 285–293.

Silva, Maria Estela, Pellogia, Cássia, Piza, Francisco Assis Toledo, & Franco, Telma Teixeira. (1997). Purificação de três diferentes beta-galactosidades microbianas por

partição em sistemas de duas fases aquosas. Food Science and Technology, 17(3), 219-223.

Sinha, J., Dey, P. K., & Panda, T. (2000). Aqueous two-phase: The system of choice for extractive fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 54(4), 476–486.

Splechtna, B., Petzelbauer, I., Baminger, U., Haltrich, D., Kulbe, K. D., & Nidetzky, B. (2001). Production of a lactose-free galacto-oligosaccharide mixture by using selective enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid. Enzyme and microbial technology. Vol. 29, Issue 6-7. 434–440.

Tanaka, Y., Kagamiishi, A., Kiuchi, A., Horiuchi, T., 1975. Purification and Properties of β-Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. Journal of Biochemistry 77(1?):241-7.

Tjerneld, F. , Persson, I. and Lee, J. M. (1991), Enzymatic cellulose hydrolysis in an attrition bioreactor combined with an aqueous two-phase system. Biotechnol. Bioeng., 37: 876-882.

Torres, D. P. M., & Gonc, P. F. (2010). Galacto-Oligosaccharides : Production , Properties, Applications , and Significance as Prebiotics. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9, 438–454.

Tubío, G., Nerli, B., & Picó, G. (2007). Partitioning features of bovine trypsin and α-chymotrypsin in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 852(1–2), 244–249.

Urrutia, P., Rodriguez-Colinas, B., Fernandez-Arrojo, L., Ballesteros, A. O., Wilson, L., Illanes, A., & Plou, F. J. (2013). Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(5).

Vera, C., Guerrero, C., & Illanes, A. (2011). Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β-galactosidase : effect of pH , temperature , and galactose and glucose concentrations. Carbohydrate Research, 346(6), 745–752.

Vera, C., Guerrero, C., Conejeros, R., & Illanes, A. (2012). Synthesis of galacto-oligosaccharides by β-galactosidase from Aspergillus oryzae using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. Enzyme and Microbial Technology, 50(3), 188–194.

Walstra P, Wouter J, Geurts T. (2006). Dairy Science and Technology. second ed. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group; p. 17–26.

Yuan, H., Liu, Y., Wei, W., Zhao, Y., Yuan, H., Liu, Y., … Zhao, Y. (2015). Phase Separation Behavior and System Properties of Aqueous Two-Phase Systems with Polyethylene Glycol and Different Salts: Experiment and Correlation. Journal of Fluids, 2015, 1–10.

Zhi, W., Song, J., Bi, J., & Ouyang, F. (2004). Partial purification of α-amylase from culture supernatant of Bacillus subtilis in aqueous two-phase systems. Bioprocess and Biosystems Engineering, 27(1), 3–7.

Zijlstra, G, De Gooijert, C., Trampert, J., (1998). Extractive bioconversions in aqueous two-phase systems. Current opinion in Biotechnology, 9, 171 - 176.

5. Evaluación del efecto de la radiación de microondas en un sistema acuoso de dos fases (SADF) para la producción de galactooligosacáridos (GOS)

5.1 Introducción

El campo electromagnético de las microondas provoca la rotación de las moléculas polares; sin embargo, dado que la rotación molecular es mucho más lenta que el cambio del campo eléctrico, la fricción intermolecular resultante convierte parte de la energía electromagnética en energía térmica (Zhao, H., 2010); razón por la cual la irradiación de microondas a menudo se denomina calentamiento dieléctrico (Kappe, C., & Dallinger, D., 2009). Esta irradiación puede servir además como fuente de energía alternativa para iniciar reacciones químicas (Adam, D., 2003) y puede aumentar las velocidades de reacción a través de ese efecto térmico. La constante dieléctrica, es decir, la capacidad de una especie de ser polarizada por un campo eléctrico determina la capacidad de un medio para absorber energía de microondas. Los disolventes polares como agua¸ metanol y dimetilformamida son susceptibles de calentarse rápidamente bajo la acción de este tipo de ondas, mientras que los no polares como el hexano, el tolueno y el éter dietílico son básicamente "inertes" a esta radiación (Zhao, H., 2010).

Las microondas también pueden causar efectos no térmicos (de la Hoz, A, *et al.*, 2005). A pesar que muchos estudios los han abordado, continúa la controversia con respecto a la medida en que tales efectos realmente existen, en parte porque muchas aplicaciones usaban hornos de microondas domésticos que no permitían un buen control de la

temperatura; sin embargo, en la actualidad este problema esta superado gracias a la disponibilidad comercial de reactores de microondas equipados con controles de temperatura y presión *in situ* (Zhao, H., 2010). Muchos investigadores proponen la existencia de efectos no térmicos ya que los grupos funcionales polares absorben más energía de las microondas que otros grupos químicos, liberando posteriormente esta energía en la solución circundante. Por lo tanto, los grupos funcionales tienen mayor reactividad con reactivos adyacentes en condiciones de irradiación de microondas que en condiciones de calentamiento convencionales a la misma temperatura (Zhao, H., 2010).

Se han obtenido algunos resultados en los cuales no existe el efecto de las microondas sobre las reacciones enzimáticas en medio acuoso, por ejemplo el trabajo de Ward, T., *et al.* (1975) quienes sometieron a irradiación de microondas a 2450 MHz y 25ºC preparaciones enzimáticas con glucosa 6-fosfato dehidrogenasa, adenilato quinasa y NADPH citocromo c reductasa cuya actividad no presentó diferencia con la reacción control, y el de Yeargers, E., *et al.* (1975) quienes establecieron que las actividades de la lisozima y la tripsina sometidas a microondas eran comparables con las obtenidas con calentamiento convencional, lo que implica que la actividad enzimática en soluciones acuosas no es afectada por la radiación.

Por el contrario, tambien hay resultados como los de Gelo-Pujic *et al.*, 1997, quienes llevaron a cabo la hidrólisis de almidón en agua con γ-amilasa a 60°C obteniendo un rendimiento del 98% de D-glucosa en 15 minutos bajo irradiación de microondas, y uno de tan solo 55% en el mismo tiempo y a la misma temperatura; el de La Cara, F., *et al.* 1999b con alcohol deshidrogenasa termofílica expuesta a radiación de microondas que sugirió la presencia de un efecto no térmico de estas en las propiedades estructurales y funcionales de la enzima, y finalmente el de La Cara, F., *et al.* 1999a en donde la irradiación por microondas a bajas concentraciones de β-galactosidasa termófílica (*Bacillus acidocaldarius*) en soluciones acuosas, produjo una inactivación irreversible de la enzima a 70°C mientras que estos efectos no se observaron con calentamiento convencional. Los efectos de las microondas y del calentamiento convencional desaparecieron a altas concentraciones de enzima, superiores a 50 mg/mL.

El efecto de la radiación de microondas se ha observado en algunos procesos que emplean sistemas acuosos de dos fases (SADF) especialmente acelerando la separación de las

fases (Nagaraj, N., *et al.* 2003). Por ejemplo, en la extracción de antioxidantes y compuestos fenólicos a partir de residuos de la industria vinícola, empleando un SADF formado por una solución acuosa de acetona y otra de citrato de sodio (Dang, Y., *et al.* 2013) donde se aumentó el rendimiento y la velocidad de la extracción, y en la extracción de antioxidantes a partir de *Dalbergia odorifera* empleando un SADF (25% de etanol y 20% de fosfato de potasio) en donde los rendimientos aumentaron entre 2,3 a 2,48 veces con respecto a la extracción convencional.

Los resultados presentados permiten establecer que el efecto de las microondas sobre las reacciones enzimáticas depende en gran medida de la concentración de enzima, de la intensidad de la radiación y del contenido de agua del medio de reacción (Gelo-Pujic *et al.*, 1997, La Cara, F., *et al.* 1999a, 1999b). En general, el efecto de las microondas sobre la capacidad de separación de los SADF ha sido positivo (Nagaraj, N., *et al.* 2003, Dang, Y., *et al.* 2013); sin embargo, es importante resaltar que ese efecto sobre un sistema simultáneo de reacción separación por SADF no ha sido evaluado previamente.

Por tanto, en este capítulo se evaluó el efecto de la intensidad de las microondas y la agitación sobre las condiciones óptimas de reacción-separación (SADF) simultáneas para la producción de GOS encontradas en el capítulo anterior.

5.2 Materiales y Métodos

A continuación se presenta la metodología empleada para la evaluación del efecto de las microondas sobre las condiciones establecidas en los capítulos 2, 3 y 4.

5.2.1 Materiales

Los materiales usados están reportados en los numerales 2.2.1 y 3.2.1.

5.2.2 Métodos

Para establecer el efecto de la radiación de microondas sobre la reacción enzimática de producción de GOS, sobre la separación de estos mediante SADF y finalmente sobre el proceso integrado de reacción-separación se emplearon las mejores condiciones para cada una de estas etapas que fueron definidas respectivamente en los capítulos 2, 3 y 4.

Con este fin se empleó un equipo Milestone Microwave extractor ETHOS X con control de temperatura y agitación magnética, que se encuentra ubicado en el laboratorio de la planta de lácteos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional. Este equipo se ajustó para trabajar a diferentes condiciones: temperatura constante, potencia de radiación constante y con presencia o ausencia de agitación.

5.2.2.1 Variables de respuesta

Las variables de respuestas establecidas en este capítulo son las definidas en 2.2.2.5 para las correspondientes a la reacción y en 3.2.4 para las de la separación.

5.2.2.2 Efecto de los microondas sobre la reacción de producción de GOS

El efecto de los microondas sobre las variables de respuesta correspondientes a la reacción de trangalactosilacion se determinó siguiendo dos metodologías diferentes: a temperatura y a potencia constante, adicionalmente se evaluó el efecto de la agitación.

La reacción se realizó en el equipo de microondas citado, que cuenta con doce recipientes tubulares de teflón de 4 cm de diámetro interno y 16 cm de alto, de los cuales se llenaron seis intercaladamente con un volumen de reacción de 40 mL. El medio de reacción fue lactosa diluida en *buffer* Mcilvaine 0,01 M. Las condiciones para los ensayos fueron T= 54ºC, pH=4,6 y una relación E/S=0,39. Se hicieron pruebas con y sin microondas, y con (120 rpm) y sin agitación para establecer los efectos respectivos.

Reacción sin microondas.

La reacción se inició mediante la adición de la enzima al medio descrito anteriormente de acuerdo al valor de E/S optimizado en el capítulo 2 (T= 54ºC, pH=4,6 y E/S=0,39) , y se monitoreó durante 80 minutos mediante la toma de muestras cada 20 minutos. Al finalizar este tiempo, la enzima se inactivó mediante calentamiento en un baño de agua a 92°C durante 10 min. y un enfriamiento inmediato posterior.

Reacción con microondas a potencia constante.

Se emplearon las mismas condiciones mencionadas en el párrafo anterior. El calentamiento del medio de reacción se hizo durante 90 s con una potencia de 550W, con lo cual se alcanzó una temperatura de 54ºC, a continuación se adicionó la cantidad de

enzima respectiva, y se sometió el medio de reacción a radiación de microondas (170W) durante 20 min, la temperatura osciló entre 52 y 57ºC. Posteriormente se hizo el muestreo y se repitió la secuencia hasta completar el tiempo de reacción (80 min). La potencia empleada en el segundo paso fue establecida mediante pruebas preliminares, logrando que la temperatura del volumen de reacción (40 mL) se encontrara en el intervalo mencionado anteriormente, que es apropiado para la enzima y muy cercano al óptimo establecido en el Capítulo 2.

Reacción con microondas a temperatura constante

Para estos ensayos se fijó la temperatura en 54ºC y el equipo reguló la potencia de irradiación para mantener dicho parámetro constante. Las condiciones de aplicación de la enzima y del muestreo fueron iguales a las descritas para la reacción a potencia constante.

5.2.2.3 Efecto de las microondas sobre la separación de GOS en el SADF

Separación sin microondas

Se preparó un SADF disolviendo PEG 4000 (29,56%) y citrato de sodio (7,39%) para separar una mezcla comercial de GOS (Vivinal GOS al 8%) disuelta en *buffer* McIlvaine de pH 4,5 (55,05%). Para cada experimento se prepararon 40 mL de la mezcla del SADF con GOS, los sólidos se disolvieron con ayuda de calentamiento y agitación. Los tubos con dicha mezcla se mantuvieron en un baño a una temperatura de 54+/-0,5ºC durante 2h, con agitación (120 rpm) y sin ella, a la espera de la separación de fases. Al cabo de este tiempo se hizo el muestreo para posterior análisis.

Separación con microondas a potencia constante

Para la separación bajo el efecto de las microondas a potencia constante, esta se ajustó a 150W durante dos horas, en este caso también se hizo con agitación (120 rpm) y sin ella. La temperatura se mantuvo en 54+/-3ºC, durante las dos horas de reacción.

Separación con microondas a temperatura constante

Para el ensayo a temperatura constante, esta se ajustó a 54+/-0,5ºC, por dos horas de ensayo, con presencia y ausencia de agitación (120 rpm).

5.2.2.4 Reacción de reacción-separación de GOS asistida por microondas

Reacción-separación sin microondas

El SADF se preparó disolviendo PEG 4000 (6,9%), citrato de sodio (5,6%) y lactosa (41,26%), en *buffer* McIlvaine (0,01M) (46,24%) de pH 4,5. El volumen total de reacción fue de 40 mL. Para dar inicio a la reacción a los tubos cargados con el medio se les aplicó la enzima siguiendo una relación E/S de 0,32 mg enzima / g Lo, en un baño a 54+/-0,5ºC, agitación de 120 rpm en un caso y sin ella en otro. Se hizo muestreo a los 0, 30, 60, 120, 240 y 480 min.

Reacción-separación con microondas a potencia constante

En este caso, la potencia se ajustó a 150W durante las 8 h que duró la reacción, realizando el proceso con agitación (120 rpm) y sin ella. Los muestreos se hicieron de la misma manera que para el caso sin microondas.

Reacción-separación con microondas a temperatura constante

Para este ensayo la temperatura se ajustó en 54+/-0,5ºC durante las 8 h que duró la reacción, los ensayos se hicieron sin y con agitación (120 rpm). Los muestreos se hicieron de la misma manera que para el caso sin microondas.

5.2.3 Análisis

El análisis y cuantificación de azúcares y la determinación de la proteína se llevó a cabo de la misma forma descrita en 4.2.2.

5.2.4 Tratamiento estadístico

El tratamiento de los datos se hizo con ayuda de Microsoft Excel y el análisis estadístico de los mismos se hizo con un ANOVA mediante el software Minitab 16. El nivel de significancia empleado en los análisis fue de 0.05.

5.3 Resultados y Análisis

5.3.1 Efecto de los microondas sobre la reacción de producción de GOS

En las Figura 5.1, Figura 5.2 y Figura 5.3 se muestra el efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constantes sobre parámetros como la producción de GOS, la productividad, la conversión, el rendimiento y la selectividad de GOS comparadas con el proceso de reacción convencional. No se observó ningún efecto de dicha aplicación sobre los parámetros de reacción mencionados, excepto sobre el rendimiento para el cual se presenta una ligera diferencia (2% menor) en los tratamientos con aplicación de microondas a potencia constante.

Según los resultados mostrados en el capítulo 2, el desempeño de la β-galactosidasa de *Aspergillus oryzae* varía con la temperatura en el intervalo de valores empleados en estos ensayos (52-57ºC). Esto concuerda con los resultados de Vera *et al.* 2011 quienes observan un descenso en la actividad de transgalactosilación para temperaturas menores a 55ºC, mientras que para temperaturas entre 55 y 60ºC es aproximadamente constante. Esto podría explicar la pequeña variación del rendimiento causada por los cambios en la temperatura en los experimentos a potencia constante, donde se alcanzan momentáneamente valores inferiores a 55ºC.

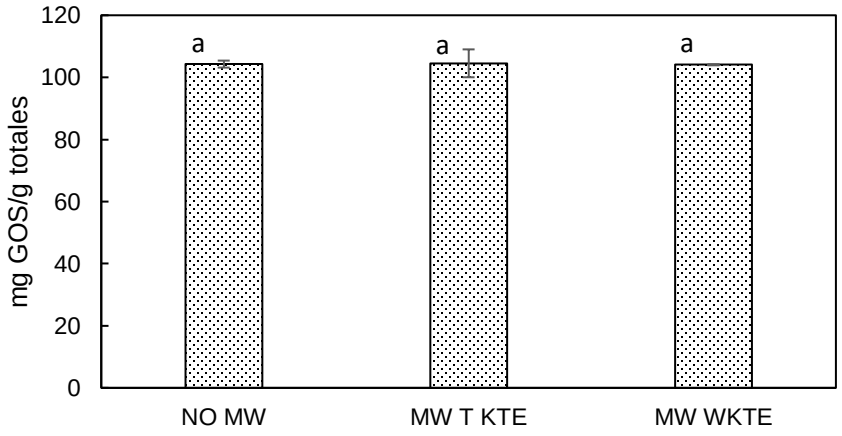


Figura 5.1 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante sobre la producción de GOS (mg/g). NO MW: Reacción convencional, MW T KTE: con la acción de microondas a temperatura constante, MW W KTE: con la acción de microondas a potencia constante.*

Parte de la investigación acerca del efecto de las microondas sobre las actividades enzimáticas en soluciones acuosas *buffer* no ha encontrado un resultado efectivo (Horikoshi, S., *et al.,* 2019), pero algunos investigadores han indicado la existencia de un efecto no térmico de las microondas basados en el hecho de que las proteínas tienen altos momentos dipolares y por lo tanto son muy susceptibles a esa radiación (Kushwah, P., *et al.* 2013, La Cara, *et al.*, 1999a), a pesar de esto tal efecto no se evidenció en este trabajo quizá por la baja concentración de enzima evaluada (La Cara, *et al.*, (1999a)). Aunque los carbohidratos no poseen momentos dipolares marcados como las proteínas, los monosacáridos tienen un momento dipolar bajo, lo cual explica la baja incidencia de las microondas en los experimentos realizados.

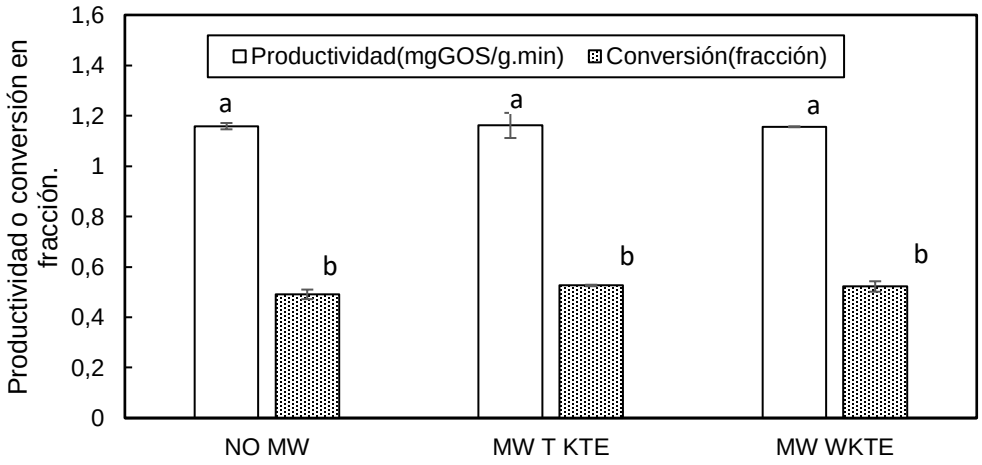


Figura 5.2 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante sobre la productividad de GOS (mg/g.min) y la conversión (fracción). NO MW: Reacción convencional, MW T KTE: con la acción de microondas a temperatura constante, MW W KTE: con la acción de microondas a potencia constante.*

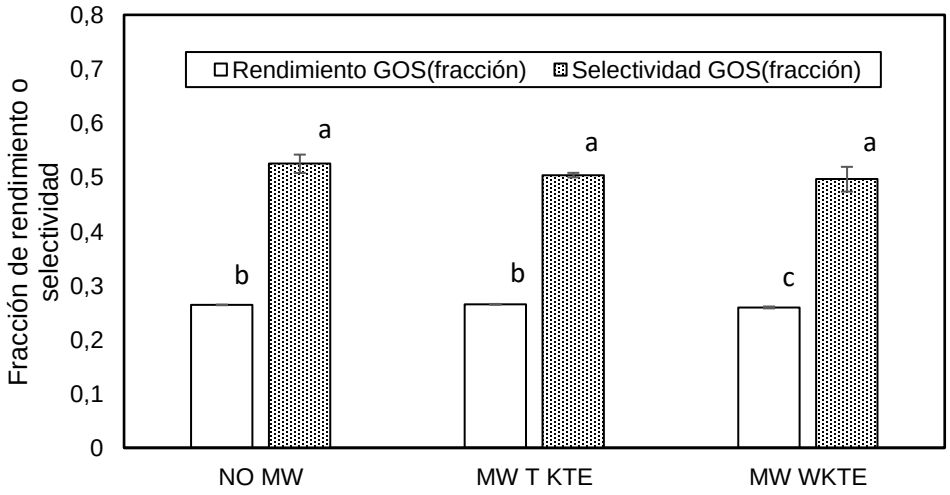


Figura 5.3 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante sobre el rendimiento de GOS (fracción) y la selectividad (fracción). NO MW: Reacción convencional, MW T KTE: con la acción de microondas a temperatura constante, MW W KTE: con la acción de microondas a potencia constante.*

La aplicación de las microondas (a temperatura y potencia constantes) en la reacción de transgalactosilación tuvo como resultado la obtención de GOS de mayor tamaño. En la reacción convencional la producción de GOS 4, 5 y 6 como porcentaje de los GOS totales fue de 29 +/- 0,4 %, mientras que con microondas a temperatura constante fue de 31,3 +/- 0,1 % y a potencia constante de 29,8+/- 0,3 %, significativamente diferentes entre sí. Como se mencionó en el capitulo 2, en el proceso de producción de GOS la β galactosidasa tiene dos actividades diferentes, la transgalactosilación para la producción de GOS y la hidrolisis que ocasiona la ruptura de la lactosa y la disminución de la concentración de GOS formados, especialmente hacia el final de la reacción. Por tanto, la inactivación de la enzima despues de un tiempo de exposición a las microondas podría explicar estos resultados ya que una vez formados los GOS la inactivación impide su hidrólisis, como ya ha sido reportado por Kamerke C. *et al.* (2012) con una β-galactosidasa termoestable. La vibración molecular en el agua, causada por la microondas puede dificultar su unión con el complejo enzima-sustrato (E-Gal), que conduce a la hidrólisis, provocando una prevalencia de la transgalactosilación sobre la primera.

Respecto a la diferencia encontrada en los dos tratamientos con aplicación de microondas, se puede apreciar un porcentaje superior de GOS de mayor peso molecular, para el caso de temperatura constante, lo cual puede estar relacionado con la pérdida de actividad de la enzima, debida a la variación de temperatura, como la comentada para la disminución del rendimiento en el caso del proceso a potencia constante.

En el Anexo 7 aparecen las cinéticas de producción de GOS en medio convencional sin microondas, con microondas a temperatura constante y con microondas a potencia constante. Se puede observar que no hay diferencias muy importantes entre las tres cinéticas, exceptuando una conversión un poco mayor (3%) de la lactosa con el empleo de microondas.

5.3.2 Efecto de las microondas sobre la separación de GOS

El SADF compuesto por PEG – citrato de sodio evaluado en este trabajo se caracteriza por presentar la solución polimérica en la fase superior y la salina en la fase inferior, manteniendo en todos los experimentos una relación volumétrica (RV) de fases de aproximadamente $V_{FS}/V_{FI} = 4{:}\,1$, que no cambió durante las pruebas. (V_{FS}=Volumen fase superior, V_{FI}=Volumen fase inferior).

Los resultados mostrados en la Figura 5.4 dejan ver que no hubo un efecto de la aplicación de microondas para ninguna de las metodologías empleadas y que la agitación solo afectó a los experimentos donde se hizo la separación convencional, es decir, sin microondas logrando un R menor en comparación (0,18+/-0,015). La diferencia con los resultados obtenidos en el capítulo 3 donde la agitación no fue una variable significativa para la separación convencional puede deberse al diferente tipo de agitación empleado, en primer caso orbital y en el segundo magnética.

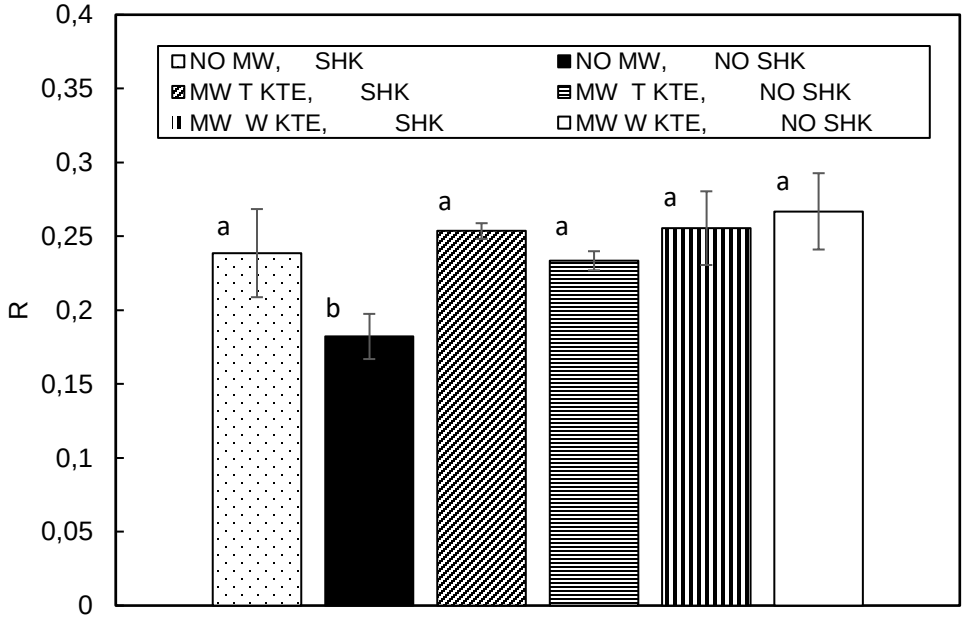


Figura 5.4 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante y de la agitación sobre R.. NO MW: Reacción convencional, MW T KTE: con la acción de microondas a temperatura constante, MW W KTE: con la acción de microondas a potencia constante. SHK: con agitación, NO SHK: sin agitación.*

En el cálculo de R de la Figura 5.4 las concentraciones de GOS y lactosa en la fase inferior y la de monosacáridos en la fase superior no se ven afectadas por ningún tratamiento, mientras que la concentración de GOS y lactosa en la fase superior sí, en particular para

el tratamiento sin microondas y sin agitación cuyos valores son los más bajos. Información más detallada de las masas de los carbohidratos en cada fase y para cada tratamiento se encuentra en el Anexo 8. En general, sin agitación las microondas aumentan R mientras que con agitación el efecto no es significativo.

Una pequeña transferencia de masa desde la fase inferior puede producir un aumento importante en la concentración de la fase superior, ya que la fase inferior tiene un volumen significativamente mayor a la de la superior, como lo representa un RV de entre 0,13 y 0,22. Adicionalmente, la definición de R en la ecuación 3.3 hace que las concentraciones de GOS y lactosa en la fase superior tengan un impacto muy importante sobre R, logrando que pequeños aumentos de esas concentraciones ocasionen un aumento mayor en R. A diferencia del menor efecto de la concentración de monosacáridos en esa fase (cuyo efecto es opuesto).

Por tanto, el hecho de que los tratamientos sin microondas y sin agitación presenten los menores valores de R, puede implicar que la radiación y la agitación incentivan el paso de GOS, lactosa y monosacáridos hacia la fase superior (especialmente estos últimos), probablemente porque estos factores ayudan a disminuir la resistencia interfacial a la transferencia de masa de esos compuestos desde la fase inferior a la superior. Sin embargo, el paso de lactosa a la fase superior perjudica la reacción de transgalactosilación que se da principalmente en la fase salina y no es conveniente para el proceso de producción de GOS.

En el SADF preparado para la separación de los GOS coexisten dos fases acuosas de composiciones, viscosidades y conductividades diferentes; en consecuencia, sus propiedades dieléctricas difieren (Schubert, H., Regier, M., 2005). Sin embargo, debido a la alta cantidad de agua presente en ellas, el efecto de la radiación por microondas sobre estas matrices se ve reflejado en la generación de calor gracias al alto momento dipolar del agua.

De igual forma, el factor de disipación ($\varepsilon'' / \varepsilon'$) es una propiedad eléctrica que relaciona el factor de pérdida (ε'') con la constante dieléctrica (ε'). El primero determina la conversión de la energía de las microondas a energía térmica y la segunda refleja la capacidad del material para almacenar la energía proveniente de las ondas. Por tanto, los altos valores

del factor de disipación para soluciones acuosas implican que su temperatura aumenta más fácilmente por la acción de las microondas (Mello *et al.*, 2014).

Adicionalmente, el factor de disipación de la fase inferior, por presentar mayor conductividad eléctrica, es mayor con respecto al de la fase superior (Schubert, H., Regier, M., 2005) y a su vez la fase superior al ser más hidrófoba (más concentrada en sólidos), es menos susceptible al calentamiento, y por ende presenta menor factor de disipación. Esta diferencia entre los factores de disipación pudo causar un diferencial de temperatura entre las fases, lo que a su vez pudo disminuir la densidad y viscosidad de la fase inferior y aumentar los coeficientes de transferencia de masa de los solutos involucrados. Sin embargo, el transporte de los monosacáridos hacia la fase superior se pudo ver atenuado por interacciones dipolares con los iones de la fase salina, lo que puede explicar el aumento de R con la presencia de las microondas. Además, la agitación promueve el transporte de todos los compuestos superando este último fenómeno haciendo que los monosacáridos también se transporten a la fase polimérica.

5.3.3 Proceso intensificado para la producción de GOS asistido por microondas

En la Figura 5.5 se muestra que la concentración de GOS, lactosa y monosacáridos en la fase inferior al término del proceso es considerablemente mayor que la de la fase superior para los tratamientos sin microondas. En otras palabras, y como se mostró anteriormente, las microondas parecen favorecer el paso de estas sustancias hacia la fase superior y con ello el aumento de los coeficientes de partición y a su vez de R. Este comportamiento es contrario a la separación deseada y por tanto la aplicación de microondas no es conveniente para el proceso intensificado para la producción de GOS.

Aunque la agitación no tuvo efecto significativo para el proceso intensificado estudiado en el capítulo 4, la diferente forma de aplicación en el caso de las microondas, pudo causar un efecto convectivo mayor en la fase inferior, que sumado al efecto de las microondas pudo potenciarla. Esto puede ayudar a explicar la igualdad en concentración de las tres especies involucradas en las dos fases en el tratamiento a potencia constante y sin agitación

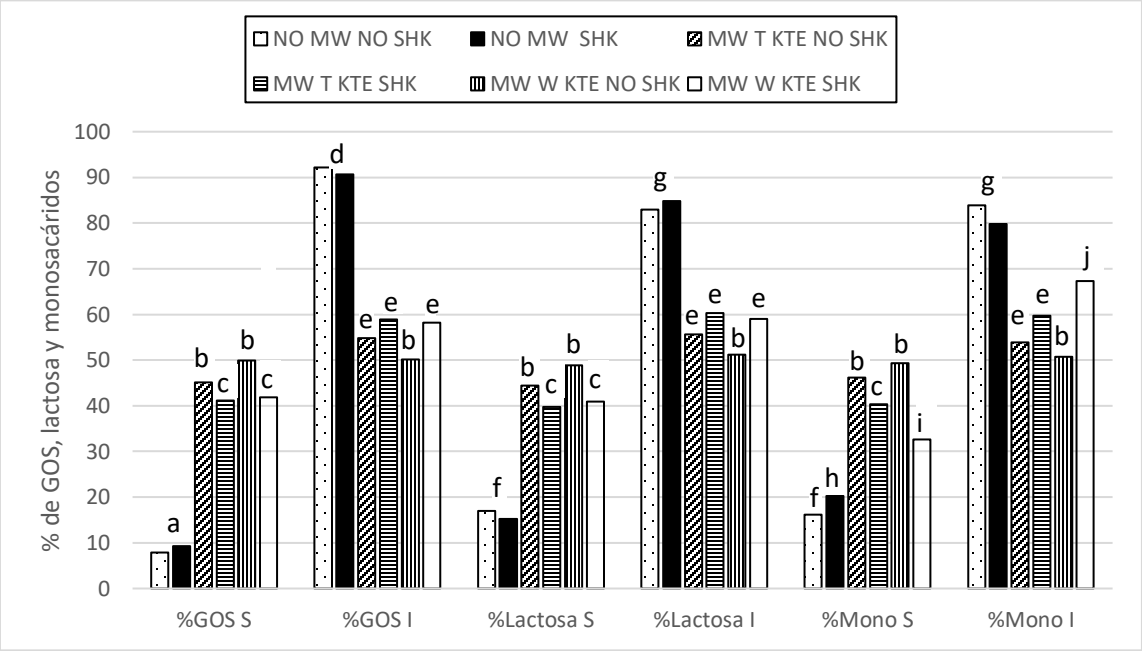


Figura 5.5 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante y de la agitación sobre la distribución de GOS, lactosa Y monosacáridos en las dos fases del SADF, superior(S), e inferior (I). NO MW: Reacción convencional, MW T KTE: con la acción de microondas a temperatura constante, MW W KTE: con la acción de microondas a potencia constante. SHK: con agitación, NO SHK: sin agitación.*

La producción de GOS depende en gran medida de las particularidades de la β-galactosidasa empleada. En este trabajo se utilizó una enzima comercial (Enzeco), cuyo origen es *Aspergillus oryzae*, a las condiciones establecidas como óptimas en la integración de la reacción y la separación desarrollada en el capítulo 4 que fueron: pH 4,5, agitación 120 rpm, E/S:0,32 mg enzima / g Lo, T: 55ºC, PEG 4000 (6,9%), citrato de sodio (5,6%), lactosa inicial (Lo) (41,26%) y *buffer* McIlvaine (0,01M) (46,24%). La distribución de la enzima en las fases se vio un poco reducida por la radiación, así entre el 78 y 85% de la enzima permaneció en la fase inferior en todos los tratamientos llevados a cabo, mientras que en los resultados del capítulo 4 entre el 80 y 97% permaneció en la fase inferior, lo que obviamente afecta los resultados del proceso.

En la Figura 5.6 se aprecia cómo la acción de las microondas disminuyó la producción de GOS entre un 50 y 60% en la fase inferior; una menor cantidad de enzima en esta fase salina sumado a una posible disminución de la actividad de ésta por el largo tiempo de exposición a las microondas (Kamerke *et al.*, 2012) podrían explicar esta situación. Esto sumado a que las microondas hacen que parte de la lactosa migre a la fase superior disminuyendo su concentración en la fase donde se producen los GOS. Esa migración puede observarse en la información consignada en el Anexo 9. De otro lado no se observa ningún efecto de la agitación en ninguno de los tres casos (sin MW, con MW a temperatura y potencia constantes).

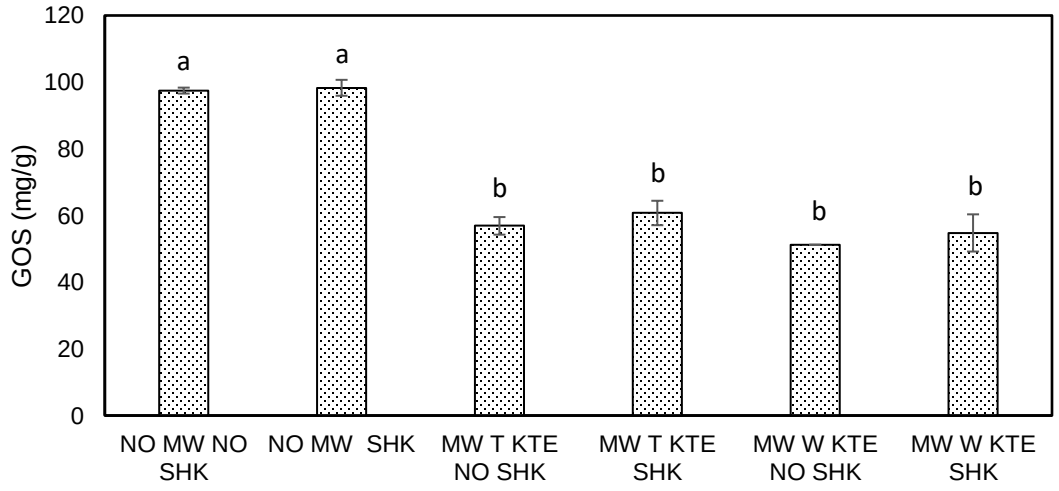


Figura 5.6 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante y de la agitación sobre la producción de GOS en un SADF como medio de reacción. Las concentraciones presentadas corresponden a la fase inferior. NO MW: Reacción convencional, MW T KTE: con la acción de microondas a temperatura constante, MW W KTE: con la acción de microondas a potencia constante. SHK: con agitación, NO SHK: sin agitación.*

La Figura 5.7 muestra que la aplicación de la radiación disminuyó la productividad, el rendimiento de GOS y la conversión hacia GOS, como consecuencia de la menor disponibilidad de lactosa para la reacción con la aplicación de las microondas, así como por la migración de GOS a la fase polimérica, bajo la acción de esas ondas.

Es importante resaltar adicionalmente que para los dos sistemas con aplicación de la radiación (temperatura y potencia constantes), los GOS producidos resultaron ser de mayor grado de polimerización (GOS4, GOS5 y GOS6).

et al.

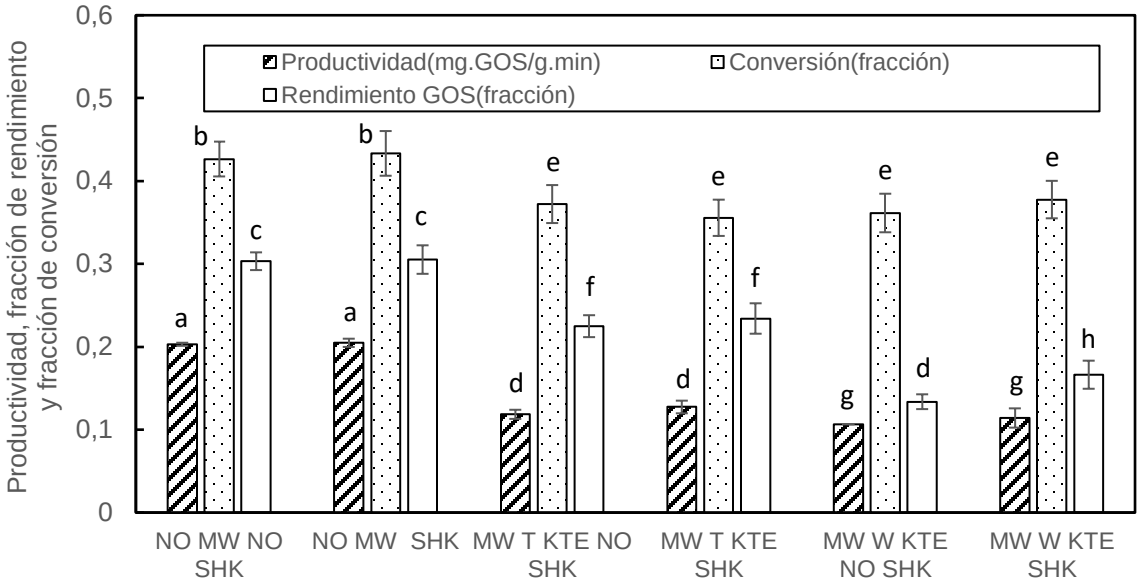


Figura 5.7 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante y de la agitación sobre la productividad de GOS, la conversión y el rendimiento de GOS. Las concentraciones presentadas corresponden a la fase inferior. NO MW: Calentamiento convencional, MW T KTE: con la acción de microondas a temperatura constante, MW W KTE: con la acción de microondas a potencia constante. SHK: con agitación, NO SHK: sin agitación.*

En la Figura 5.8 se muestra que R incrementa su valor con la aplicación de la radiación por microondas (a T y W constantes) y que la agitación no tiene un efecto significativo lo que concuerda con los resultados mencionados en el numeral anterior.

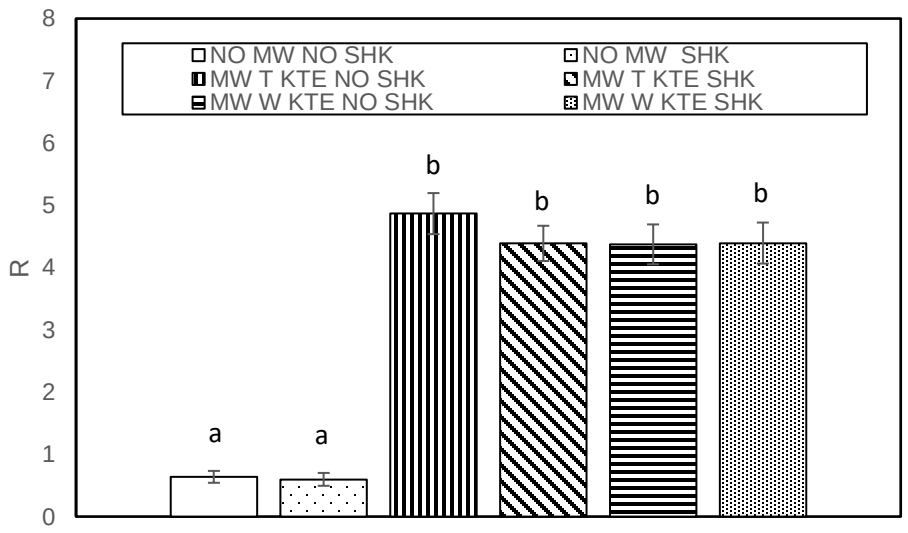


Figura 5.8 *Efecto de la aplicación de microondas a temperatura y potencia constante y de la agitación sobre R, en la reacción –separación de GOS. Las concentraciones presentadas corresponden a la fase inferior. NO MW: Reacción convencional, MW T KTE: con la acción de microondas a temperatura constante, MW W KTE: con la acción de microondas a potencia constante. SHK: con agitación, NO SHK: sin agitación.*

5.4 Conclusiones

Se evaluó el efecto de la radiación por microondas a temperatura y potencia constantes y de la agitación sobre la reacción enzimática de producción de GOS en un medio acuoso convencional, cuyas condiciones óptimas se definieron el Capítulo 2. No se encontró ningún efecto de la radiación y la agitación sobre la producción, productividad, conversión y selectividad para ninguno de los sistemas. Se encontró una disminución del rendimiento de GOS, para el caso de aplicación de MW a potencia constante. Para los dos sistemas con aplicación de la radiación (temperatura y potencia constantes), los GOS producidos resultaron de mayor grado de polimerización (GOS4, GOS5 y GOS6).

Se estableció el efecto de las microondas sobre la separación de una mezcla comercial de GOS usando un SADF formado por PEG (polietilenglicol) (29,56%) y citrato de sodio (7,39%), usando como variable de respuesta R. Las microondas así como la agitación tienen un efecto no deseado de incremento de R, como consecuencia del paso selectivo de GOS principalmente y lactosa en menor medida desde la fase inferior del SADF hacia la superior. De tal manera que el SADF sin microondas y sin agitación proporcionó el menor valor de R, es decir una mejor separación.

Se determinó el efecto de las microondas sobre la reacción-separación de GOS simultáneas, se encontró que la radiación a temperatura y potencia constantes hace disminuir la producción de GOS, productividad, conversión y rendimiento, debido a la actividad hidrolítica de la enzima sobre los GOS, motivada por la acción de las ondas por un tiempo de 8h. De otro lado respecto a la variable de respuesta R para la separación, durante el proceso simultáneo reacción-separación, esta se incrementó entre 7 y 8 veces como consecuencia de la transferencia preferencial de GOS hacia la fase superior, debida a las microondas, lo cual es perjudicial para la separación deseada.

5.5 Referencias

Adam, D. (2003). Out of the kitchen. Nature, 421(6923), 571–572.

Albertsson P., Johansson G., Tjerneld F. (1990) in: Asenjo J. (Ed.), Separation Process in Biotechnology, Marcel Dekker, New York, pp. 287–327.

Asenjo, J. A., & Andrews, B. A. (2011). Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. Journal of Chromatography A, 1218(49), 8826–8835.

Benavides J, Rito-Palomares M (2008) Practical Experiences from the Development of Aqueous Two-Phase Processes for the Recovery of High Value Biological Products. J Chem Technol Biot 83: 133-142.

Dang, Y.-Y., Zhang, H., & Xiu, Z.-L. (2013). Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolics from grape (Vitis vinifera) seed. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, (August).

De la Hoz A., Díaz-Ortiz A., Moreno A., 2005. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. Chem Soc Rev., 34(2):164-78.

Del Val M., Otero C. 2003. Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. Enzyme Microb Technol 33(1):118–26.

Gelo-Pujic, M., Guibe´ -Jampel, E., Loupy, A., Galema S., Mathe´, D., 1996. J. Chem. Soc. Perkin Trans.,1, 2777–2780.

Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. Food Chemistry, 121(2), 307–318.

Horikoshi, S., Nakamura, K., Yashiro, M., Kadomatsu, K., & Serpone, N. (2019). Probing the effect(s) of the microwaves' electromagnetic fields in enzymatic reactions. Scientific Reports, 9(1), 1–11.

Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., … Yuan, Z. (2016). Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. Biological Procedures Online, 18(1), 1–18.

Kamerke, C., Pattky, M., Huhn, C., & Elling, L. (2012). Synthesis of UDP-activated oligosaccharides with commercial β-galactosidase from Bacillus circulans under microwave irradiation. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 79, 27–34.

Kappe, C. O., & Dallinger, D. (2009). Controlled microwave heating in modern organic synthesis: Highlights from the 2004-2008 literature. Molecular Diversity, 13(2), 71–193.

Kushwah, P. (2013). Effect of Microwave Radiation on Growth, Enzyme Activity (Amylase and Pectinase), and/or Exopolysaccharide Production in Bacillus subtilis, Streptococcus mutans, Xanthomonas campestris and Pectobacterium carotovora. British Microbiology Research Journal, 3(4), 645–653.

La Cara F, D'Auria S, Scarfì MR, Zeni O, Massa R, d'Ambrosio G, Franceschetti G, De Rosa M, Rossi M. (1999b). Microwave exposure effect on a Thermophilic Alcohol Dehydrogenase. Protein and Peptide Letters, 6 (3), 155-162.

La Cara, F., Scarfi, M. R., D'Auria, S., Massa, R., D'Ambrosio, G., Franceschetti, G., De Rosa, M. (1999a). Different effects of microwave energy and conventional heat on the

activity of a thermophilic β-galactosidase from Bacillus acidocaldarius. Bioelectromagnetics, 20(3), 172–176.

Mattiasson, B. (1988). Bioconversions in aqueous two phase systems: an alternative to conventional immobilization. Methods in Enzymology, Academic Press inc. Vol 137, 657–667.

Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M. D., & Besson, T. (2003). Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized beta-galactosidase from Kluyveromyces lactis. Biotechnology Letters, 25(8), 623–629.

Mello, P., Barin, J., Guarnieri, R., 2014. Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis, Chapter 2 - Microwave Heating, Editor: Érico Marlon de Moraes Flores, Elsevier.

Nagaraj, N., Narayan, a V, Srinivas, N. D., & Raghavarao, K. S. M. S. (2003). Microwave-field-assisted enhanced demixing of aqueous two-phase systems. Analytical Biochemistry, 312(2), 134–140.

Polshettiwar, V. & Varma, R., (2010) - Editors. Aqueous Microwave Assisted Chemistry. Royal Society of Chemistry.

Schubert, H., Regier, M., (editors) 2005. Microwave Processing of Food, edited by. CRC Press.

Vera, C., Guerrero, C., & Illanes, A. (2011). Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β-galactosidase : effect of pH , temperature , and galactose and glucose concentrations. Carbohydrate Research, 346(6), 745–752.

Ward, T., Allis J., Elder, A. (1975) Measure of Enzymatic Activity Coincident with 2450 MHz Microwave Exposure, Journal of Microwave Power, 10:3, 315-323,

Yeargers, E., Langley, J., Sheppard, A., Huddleston, G., 1975. Effects of microwave radiation of enzymes. Ann N Y Acad Sci. 28;247:301-4.

Zhao, H. (2010), Microwave-assisted enzymatic reactions in aqueous media, Ch. 5 in Aqueous Microwave Assisted Chemistry.

6. Conclusiones

Se evaluó la producción de galactooligosacáridos usando las tres β-galactosidasas comerciales logrando rendimientos de producción de GOS de 27% m/m, 25% y 24% para las enzimas Enzeco, Maxilact A4 y EBGLAN, respectivamente.

Las condiciones optimizadas obtenidas para Enzeco, fueron pH 4,6, T=54ºC y E/S=0,39, bajo las cuales la producción, el rendimiento y la productividad de GOS fueron 107,7 g/L, 27,2% y 1,36 g. $L^{-1}.min^{-1}$ respectivamente en el mismo orden los resultados optimizados por Minitab 16 fueron 110,5 g/L, 28% y 1,38 g. $L^{-1}.min^{-1}$, que no son estadísticamente diferentes a los experimentales.

La lactasa de Enzeco presentó los mejores resultados para las pruebas de hidrólisis con ONPG, lactosa y de producción de GOS respecto a las otras dos evaluadas.

La optimización gruesa del SADF permitió definir una zona limitada por [PEG]=28-31%, [Citrato Na]=6-9%, PEG4000, dentro de la cual se llevó a cabo la optimización final que produjo un valor de $R = 0{,}1678$, para [PEG]: 29,56% y [Citrato de Na]: 7,39%. Este resultado se validó experimentalmente dando como resultado $R = 0{,}162$, 3,5% menor que el determinado por el modelo optimizado.

Se logró una partición de lactosa y GOS preferencialmente hacia la fase inferior (94,9% m/m), adicionalmente se retiró un porcentaje de glucosa (16%) y galactosa (14%) que ayuda a disminuir la inhibición de la enzima en la fase inferior.

Los ensayos de tamizaje en la fase de reacción-separación permitieron establecer que entre el 80 y 97% de la enzima se ubica en la fase inferior del SADF (rica en citrato de sodio), debido principalmente a la carga positiva de esta, a valores de pH inferiores a su punto isoeléctrico (4,6).

La optimización final permitió obtener un R mínimo de 0,55, con una concentración inicial de lactosa (Lo) de 41,26% m/v, una relación enzima sustrato de 0,32 mg enzima / g Lo, pH 4,5, como variables manipuladas. Esta minimización generó un modelo que fue validado experimentalmente y produjo un R de 0,583 +/-0,041, 6% mayor que el predicho por el modelo.

Haciendo la comparación del medio acuoso convencional de reacción frente al SADF, se puede apreciar una disminución del 15%, 86%, 10% y 30% en la producción, la productividad, la conversión y el rendimiento de GOS respectivamente, debido a varias razones, las concentraciones de lactosa en cada fase por separado son menores que la total del medio acuoso, esto como se sabe disminuye los GOS producidos, al tratar de aumentar esta concentración para igualarla a la del medio convencional, se presenta el inconveniente de alcanzar la saturación y producir precipitación, con el aumento simultáneo de la viscosidad y los consecuentes problemas de transferencia. La única respuesta que se incrementó fue la selectividad (82%)

Se estableció el efecto de las microondas sobre la separación de una mezcla comercial de GOS usando un SADF formado por PEG (29,56%) y citrato de sodio (7,39%), usando como variable de respuesta R. Las microondas así como la agitación tienen un efecto no deseado de incremento de R como consecuencia del paso selectivo de GOS principalmente y lactosa en menor medida desde la fase inferior del SADF hacia la superior. De tal manera que el SADF sin microondas y sin agitación proporcionó el menor valor de R, es decir una mejor separación.

Se determinó el efecto de las microondas sobre la reacción-separación de GOS simultáneas, se encontró que la radiación a temperatura y potencia constantes hace disminuir la producción de GOS, productividad, conversión y rendimiento, debido a la actividad hidrolítica de la enzima sobre los GOS, motivada por la acción de las ondas por un tiempo de 8h. De otro lado respecto a la variable de respuesta R para la separación, durante el proceso simultáneo reacción-separación, esta se incrementó entre 7 y 8 veces como consecuencia de la transferencia preferencial de GOS hacia la fase superior, debida a las microondas, lo cual es perjudicial para la separación deseada. Adicionalmente, para los dos sistemas con aplicación de la radiación (temperatura y potencia constantes), los GOS producidos resultaron de mayor grado de polimerización (GOS4, GOS5 y GOS6).

7. Recomendaciones

Se sugiere evaluar un sistema de SADF en cascada donde sea posible tomar la fase inferior y someterla a contacto con una nueva fase superior fresca para lograr mayor transferencia de monosacáridos.

Evaluar el proceso de reacción optimizado para las tres enzimas en escala mayor.

Ajustar las condiciones de reacción-separación favoreciendo más la segunda etapa, es decir trabajar con mayores valores de LLR y una poca menor cantidad de lactosa (por razones de precipitación).

Valdría la pena evaluar PEG de menor peso molecular, pero con un sistema de cuantificación diferente, o por lo menos un sistema cromatográfico que opere con columnas diferentes, que no presenten los problemas de obstrucción de estas, que se presentaron en este trabajo.

8. Anexos

Anexo 1. Fichas técnicas de las enzimas comerciales

Anexo 2. ANOVA

Anexo 3. Actividades enzimáticas

Anexo 4. Composición de Vivinal® GOS

Anexo 5. Curva de Calibración de Bradford

Anexo 6. Diagrama de Pareto del PB 12+3 para RV

Anexo 7. Masas de los carbohidratos en cada fase y para cada tratamiento de las separaciones por SADF asistidas por microondas. Repartición de GOS, lactosa y monosacáridos en las dos fases.

Anexo 8. Masas de los carbohidratos en cada fase y para cada tratamiento de la reacción - separación simultánea asistida por microondas.

Anexo 1 Fichas técnicas de las enzimas comerciales

a) Enzeco

Enzyme Development Corporation
505 8th Avenue, Suite 1500, New York, NY 10018
(212) 736-1580
E-mail: info@EnzymeDevelopment.com

ENZECO® FUNGAL LACTASE CONCENTRATE

TECHNICAL DATA SHEET

DESCRIPTION
An acid optimum, GRAS (Generally Recognized Safe – GRN No. 90), food grade β-D-galactoside galactohydrolase derived from the microorganism *Aspergillus oryzae*.

PHYSICAL CHARACTERISTICS
White to light tan powder, readily soluble in water.

ENZYMATIC CHARACTERISTICS
This product has a pH optimum of between 4.5 and 5.0, both on lactose and on ONPG substrates with extreme stability over pH range of 4.0 and 7.5. The temperature optimum is 55° C (131° F) at both pH 4.5 and 6.5 both on ONPG and lactose substrates. When this enzyme is used below 50° C (122° F), it is extremely stable.
Cations, such as sodium, potassium, calcium and magnesium have no noticeable effect on the activity of this enzyme. Copper ion has a slight inhibitory effect on the activity. Galactose has a strong inhibitory effect on the activity of this enzyme.

ASSAY METHOD
Standardized using the FCC ALU assay procedure conducted at 4.5 pH and 37° C (99° F). One unit of enzyme activity will liberate one μ-M of onitrophenol per minute under the conditions of the assay (Current revision of FCC).

OTHER SPECIFICATION PARAMETERS

Activity:	95,000 - 120,000 ALU/g
pH of 2% solution:	6.0 - 8.0
Moisture:	Not more than 7%
Lead (meets FCC):	Not more than 5 ppm
Microbiological Data (meets FCC)	
APC:	Not more than 50,000/g
Coliform:	Not more than 30/g
E.Coli:	Negative/25 g
Salmonella:	Negative/25 g

Contains: Enzyme, mannitol, di-calcium phosphate, sodium citrate.

STORAGE
Store at or below 15° C (59° F), in a closed container.

HANDLING PRECAUTIONS
Avoid the formation of aerosol and dust of the product. Repeated inhalation of enzyme aerosol or dust may cause sensitization and may cause allergic type reactions in sensitized individuals. For detailed information please refer to the Safety Data Sheet (SDS).

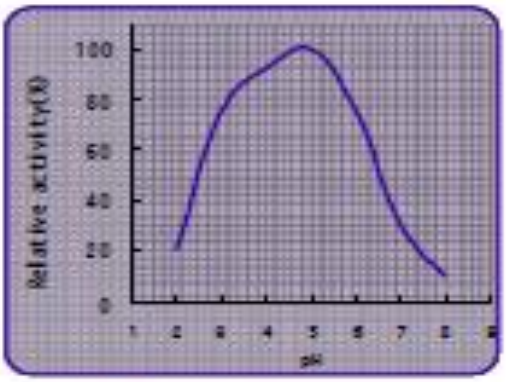
3-5205-000 - graphs
11 / 2018

These suggestions and data are based on information we believe to be reliable. They are offered in good faith, but without guarantee since conditions and methods of use of our products are beyond our control. Suggestions for use of our products should not be understood as recommendations that they be used in violation of any patents or government regulations.

Enzyme Development Corporation
505 8th Avenue, Suite 1500, New York, NY 10018

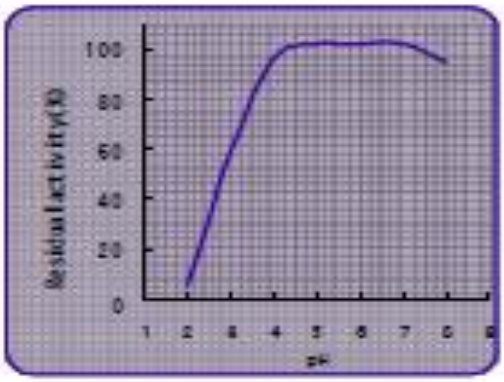
Enzeco® Fungal Lactase Concentrate pH and Temperature graphs

Fig.1 Effect of pH on activity



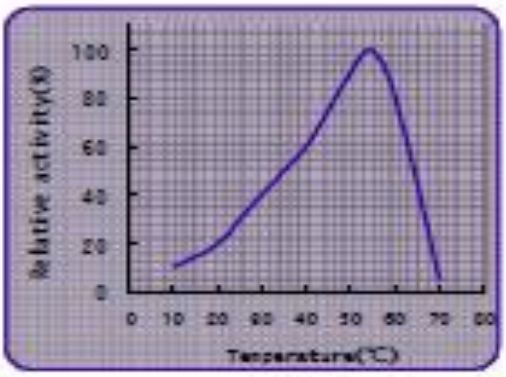
Reaction temp. : 37°C
Reaction time : 10 minutes

Fig.2 Effect of pH on stability



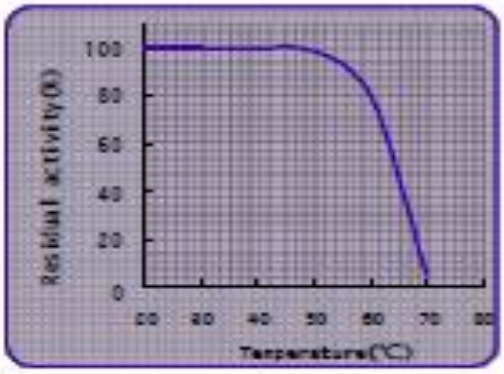
Enzyme conc. : 1%
Temperature : 37°C
Incubation time : 1 hour

Fig.3 Effect of temperature on activity



Reaction pH : 4.5
Reaction time : 10 minutes

Fig.4 Effect of temperature on stability



Enzyme conc. : 1%
Incubation time : 30 minutes

EDC code # 3-6206-000

These suggestions and data are based on information we believe to be reliable. They are offered in good faith, but without guarantee since conditions and methods of use of our products are beyond our control. Suggestions for use of our products should not be understood as recommendations that they be used in violation of any patents or government regulations.

b) EBGLAN (Megazyme)

Megazyme

β-GALACTOSIDASE from *Aspergillus niger* (Lot 140801a)

E-BGLAN **09/14**
(EC 3.2.1.23) beta-D-galactoside galactohydrolase
CAZy GH Family 35

PROPERTIES

1. ELECTROPHORETIC PURITY:
- Single band on isoelectric focusing.

2. SPECIFIC ACTIVITY AND LEVEL OF OTHER ACTIVITIES:

Substrate	Specific Activity (U/mg Protein)
p-NP-β-galactoside	240.0
p-NP-α-galactoside	0.0002
p-NP-α-L-arabinofuranoside	0.50
p-NP-α-L-arabinopyranoside	0.17
p-NP-α-glucoside	0.006
p-NP-β-glucoside	0.001
p-NP-β-xyloside	0.02
p-NP-β-mannoside	0.002
Ceralpha (α-amylase)	0.008
Sucrose (invertase)	0.006
Maltose (maltase)	0.008

Protein concentration was determined by absorbance at 280 nm.

3. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES:

pH Optima:	4.5
pH Stability:	3.0-8.0
Temperature Optima:	60°C
Temperature Stability:	< 70°C

4. STORAGE CONDITIONS:
The enzyme is supplied as an ammonium sulphate suspension in 0.02% sodium azide and should be stored at 4°C.

For the assay, enzyme preparation is diluted in 0.1M sodium acetate buffer pH 4.5 containing BSA (0.5 mg/mL). If BSA is excluded from the buffer lower activities are obtained.

The concentration of enzyme as supplied is approximately 4,000 U/mL.

c) MAXILACT A4

Hoja de Especificación de Producto

MAXILACT® A4

Número de producto	14407

Propiedades físicas

Descripción	Maxilact® A4 es una preparación de lactasa acidada líquida (β-galactosidase) derivada de la cepa seleccionada de *Aspergillus niger*. El producto tiene certificación Kosher y Halal.
Color	De marrón muy claro a marrón.
Aspecto	Claro a opalescente.

Propiedades químicas

Actividad	≥ 5000 ALU/g
pH	4.3 - 4.7
Glicerol	≥ 50% (p/p)
Cloruro sódico	60 - 120 g/l
Benzoato de Sodio	las huellas de arrastre de proceso de fabricación (< 50 ppm)
Metales pesados	≤ 30 ppm (como Pb)
Plomo	≤ 5.0 ppm
Arsénico	≤ 3.0 ppm
Cadmio	≤ 0.5 ppm
Mercurio	≤ 0.5 ppm

Propiedades microbiológicas

Recuento en placas estándar	≤ 100 en 1 ml
Levaduras	≤ 10 en 1 ml
Hongos	≤ 10 en 1 ml
Bacterias anaeroblas reductoras de sulfito	≤ 30 en 1 ml
Coliformes	≤ 1 en 1 ml
Salmonella	ausente en 25 ml
Staphylococcus aureus	ausente en 1 ml
Escherichia coli	ausente en 25 ml
Listeria monocytogenes	ausente en 25 ml
Actividad antibiótica	ausente según ensayo
Micotoxinas	ausente según ensayo

El producto cumple con las especificaciones de pureza dictaminadas por la Comisión de Especialistas Asociados de la FAO/WHO para Aditivos Alimenticios (JECFA), con las especificaciones del Código Químico para la Alimentación (FCC) y con las normas de las Enzimas Alimenticias de la Comisión Científica de la Alimentación (SCF) de los EU.
El producto es de libre venta y apto para uso en la industria alimentaria.

Datos de estabilidad

El producto debe estar almacenado en los contenedores originales, sellados. La temperatura de almacenaje recomendada es de 4 -
Página 1 de 2

8°C. Si se almacena bajo estas condiciones la vida útil será de 6 meses y la pérdida de actividad será menor al 5% por año.

Aunque se ha prestado el debido cuidado para asegurarse que la información proporcionada en este documento es exacta, nada de lo en él contenido puede interpretarse que implica cualquier tipo de afirmación o garantía por la cual asumamos responsabilidad legal, incluyendo, sin limitación, cualquier garantía sobre la exactitud, vigencia o integridad de dicha información, o sobre la no infracción de los derechos de la propiedad intelectual de terceros. El contenido del presente documento está sujeto a cambios sin previo aviso. Se ruega ponerse en contacto con nosotros para obtener la última versión del presente documento o para información adicional. Puesto que las fórmulas del producto del usuario, sus específicas aplicaciones de uso, y las condiciones de uso están fuera de nuestro control, no damos ninguna garantía ni afirmación sobre los resultados que se puedan obtener por el usuario. Es responsabilidad del usuario determinar la idoneidad de nuestros productos para sus fines específicos así como la legalidad del uso que el usuario se propone dar a nuestros productos.

DSM Food Specialties B.V. | A. Fleminglaan 1 | 2613 AX Delft | Países Bajos | info.foodi@dsm.com | Marca Comercial Registrada 27235314

Date of Issue:11/1/2011

Anexo 2 ANOVA

a) ANOVA actividad hidrolítica específica con lactosa

ANOVA unidireccional: Maxilact; EBGLAN; Enzeco

```
Fuente  GL      SC      MC     F      P
Factor   2  0,0384  0,0192  1,52  0,292
Error    6  0,0755  0,0126
Total    8  0,1139

S = 0,1122   R-cuad. = 33,67%   R-cuad.(ajustado) = 11,57%


                                ICs de 95% individuales para la media
                                basados en Desv.Est. agrupada
Nivel     N   Media  Desv.Est.  --------+---------+---------+---------+-
Maxilact  3  1,3018     0,0478              (------------*-------------)
EBGLAN  3  1,1428     0,1408  (------------*------------)
Enzeco    3  1,2372     0,1252          (------------*------------)
                                --------+---------+---------+---------+-
                                      1,08      1,20      1,32      1,44

Desv.Est. agrupada = 0,1122


Agrupar información utilizando el método de Tukey

          N   Media  Agrupación
Maxilact  3  1,3018  A
Enzeco    3  1,2372  A
EBGLAN  3  1,1428  A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
```

b) ANOVA actividad hidrolítica con lactosa

One-way ANOVA: Maxilact_1; EBGLAN_1; Enzeco_1

```
Source  DF      SS      MS       F      P
Factor   2  298475  149238  131,80  0,000
Error    6    6794    1132
Total    8  305269

S = 33,65   R-Sq = 97,77%   R-Sq(adj) = 97,03%


                              Individual 95% CIs For Mean Based on
                              Pooled StDev
Level       N    Mean  StDev  -+---------+---------+---------+--------
Maxilact_1  3   36,45   1,34  (--*---)
EBGLAN_1  3  258,27  31,82                (--*--)
Enzeco_1    3  482,52  48,81                                (--*--)
                              -+---------+---------+---------+--------
                               0       150       300       450

Pooled StDev = 33,65


Grouping Information Using Tukey Method

            N    Mean  Grouping
Enzeco_1    3  482,52  A
EBGLAN_1  3  258,27    B
Maxilact_1  3   36,45      C

Means that do not share a letter are significantly different.
```

c) ANOVA Efecto de las concentraciones de Citrato de sodio, PEG y temperatura sobre el coeficiente de reparto

wo-way ANOVA: k versus Temp_1; cit Na/PEG

```
Source       DF        SS         MS      F      P
Temp_1        1  0,003128  0,0031282   4,28  0,084
cit Na/PEG    2  0,138959  0,0694793  95,10  0,000
Interaction   2  0,002728  0,0013639   1,87  0,234
Error         6  0,004383  0,0007306
Total        11  0,149198

S = 0,02703   R-Sq = 97,06%   R-Sq(adj) = 94,61%

                  Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
Temp_1      Mean  ---------+---------+---------+---------+
25      0,504237  (----------*---------)
55      0,536528              (----------*---------)
                  ---------+---------+---------+---------+
                         0,500     0,525     0,550     0,575

                  Individual 95% CIs For Mean Based on
cit               Pooled StDev
Na/PEG      Mean  ---+---------+---------+---------+------
07-09   0,660279                           (--*--)
08-10   0,502314            (--*---)
09-11   0,398554  (--*--)
                  ---+---------+---------+---------+------
                   0,40      0,50      0,60      0,70
```

Anexo 3 Velocidades de reacción enzimática

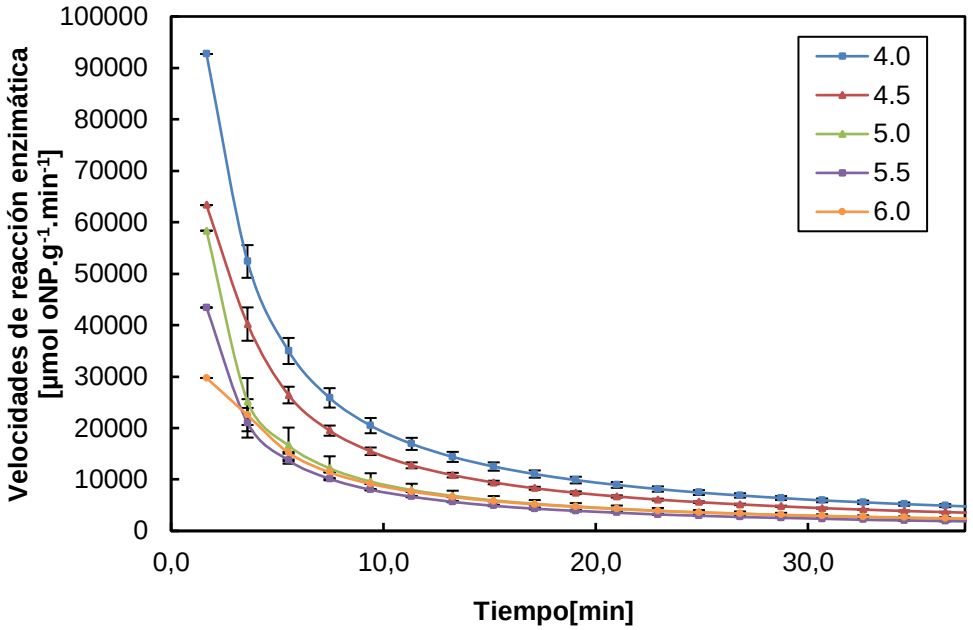


Figura A3.1 *Actividad enzimática de Enzeco*

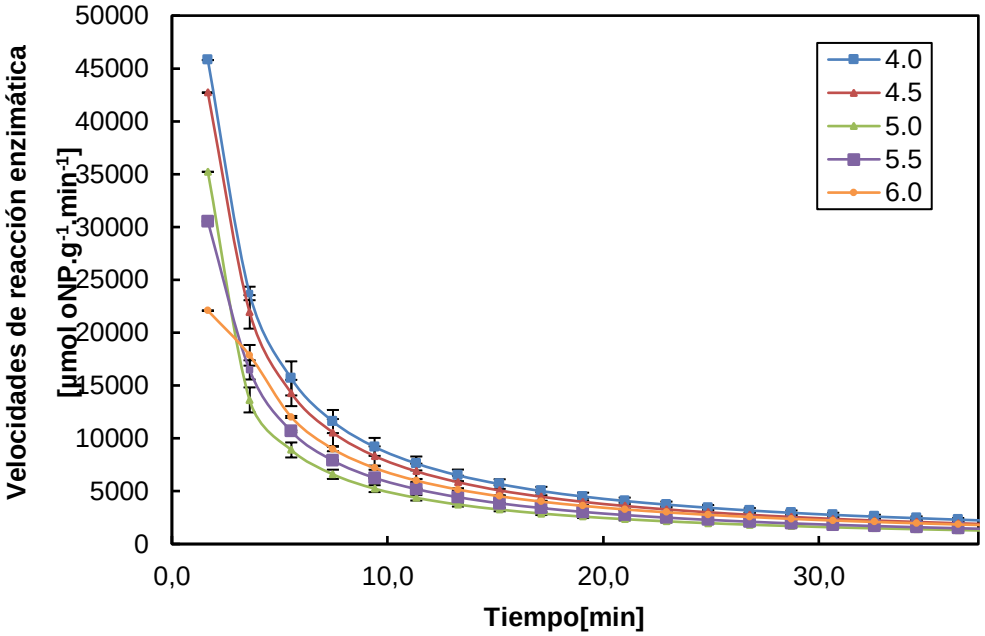


Figura A3.2 *Actividad enzimática de EBGLAN*

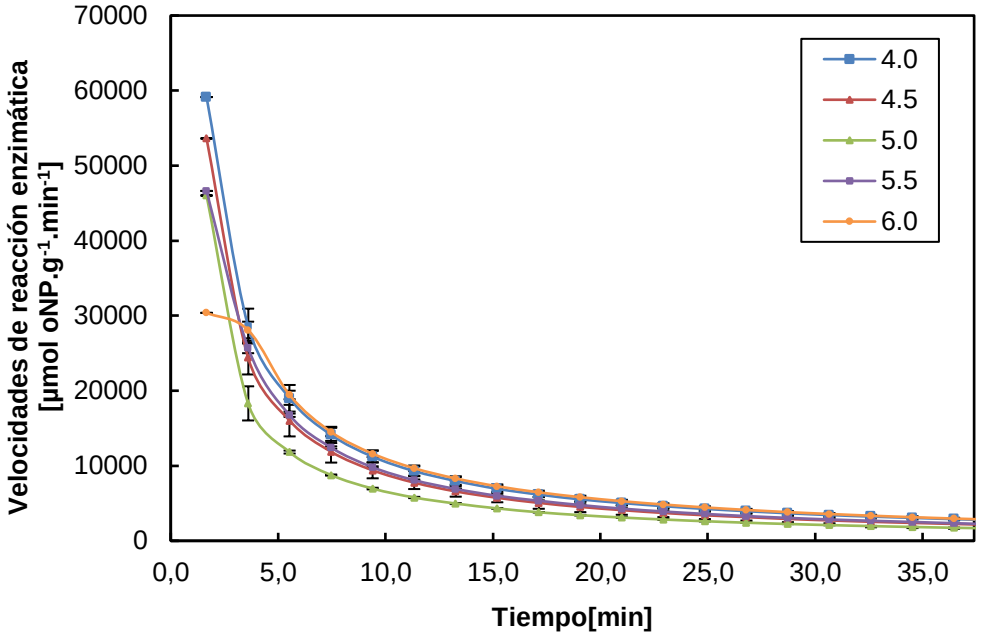


Figura A3.3 *Actividad enzimática de Maxilact A4*

Anexo 4 Composición de Vivinal® GOS

Vivinal® GOS Syrup
product data sheet

Typical analysis*

Chemical	
Dry matter (dm)	75%
Galacto-oligosaccharides	59% on dm
Nitrogen	Max. 0.032% on dm
Sulphated ash	Max. 0.2% on dm
Lactose	27% on dm
Glucose	19% on dm
Galactose	1% on dm
Nitrite	Max. 2 ppm on dm
pH	3.2

Microbiological	
Total plate count 30°C	Max. 500 cfu/g
Enterobacteriaceae	Absent in 1g
E. coli	Absent in 5g
Yeasts	Max. 15 cfu/g
Moulds	Max. 15 cfu/g
Staphylococci coagulase-positive	Absent in 1g
Salmonella	Absent in 125g

Sensoric	
Appearance	Clear to slightly yellowish syrup
Taste	Slightly sweet

Minerals (mg/100g)	
Calcium	Max. 1
Sodium	Max. 3
Magnesium	Max. 0.1
Potassium	Max. 2
Chloride	Max. 5
Phosphorus	Max. 1

Nutritional	
Energy (kcal/100g)**	240
Total fat (g/100g)	0
Saturated (g/100g)	0
Trans (g/100g)	0
Cholesterol (mg/100g)	0
Total carbohydrate (g/100g)	75.2
Galacto-oligosaccharides (g/100g)	44.3
Lactose (g/100g)	15.8
Glucose (g/100g)	14.3
Galactose (g/100g)	0.8
Fibre (g/100g)**	30.6
Total Protein (g/ 100g)	0

DP composition (on weight percentage of oligosaccharide)	
DP2 (other than lactose) (%)	31
DP3 (%)	38
DP4 (%)	18
DP5 (%)	8
DP6 and higher (%)	5
Total (%)	100

* Please refer to the specifications for guaranteed limits.
** According to EU legislation (EU/1169/2011)

As with any organic material, there may be some variation in the nutritional composition. The preceding values are being supplied to aid in development work, but should not be used solely to determine nutrient labelling. Analysis of nutrients as they occur in final products may be required by the Code of Federal Regulations, Title 21, section 101.9.

References

1. Ben XM, Li J, et al. World J Gastroenterol 2008;14(42):6540-6548.
2. Rinaldi S, Morrison R, et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2008;46(1):82-88.
3. Williams T, Choe Y, et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2010;50(5):563-568.
4. Sierra C, Bernal MJ, et al. Eur J Nutr 2006;45:133-139.
5. Cazorla C, Kapilai A, et al. Dairy Nutr Rev 2008;8(4):245-258.
6. Schmelzle H, Wilms S, et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003;36(3):343-351.
7. Arslanoglu S, Moro GE, et al. J Nutr 2007;137(11):2420-2424.
8. Scholz K, Moody GA, et al. Infect Immun 1984;45(2):432-436.
9. Bauer-Zierlein A, Tai EA, et al. Pediatr Allergy Immunol 2006;17(2):134-140.
10. Sinclair HR, de SJ, et al. J Agric Food Chem 2000;48(8):3413-3416.
11. Wiese M, Morris BR, et al. J Agric Food Chem 2010;58(12):7156-7160.
12. Wolmer C, Martin BJR, et al. Br J Nutr 2012;107(12):1821-1831.
13. van den Heuvel EG, Schaafsma MJC, et al. J Nutr 2000;130(12):2938-2942.

Potential consumer benefits are not to be considered as health claims. They should be considered as potential leads that might be developed into health claims complying with the local legal requirements.

FrieslandCampina Domo
Central office
Stationsplein 4
3818 LE Amersfoort
The Netherlands
Tel: +31 (0)33 713 33 33

FrieslandCampina Ingredients
Regional sales office Asia-Pacific
3 Temasek Avenue
#11-01 Centennial Tower
Singapore 039190
Tel: +65 6580 8163

FrieslandCampina Ingredients
Regional sales office China
2506, West tower of Twin Towers
B12 Jianguomenwai Ave, Chaoyang Dist.
Beijing, 100022, China
Tel: +86 10 6566 6099

FrieslandCampina Ingredients
Regional sales office North America
611 S. Paramus Road, Suite 422
Paramus, NJ 07652, USA
Tel: +1 201 655 7786

FrieslandCampina Ingredients
Regional sales office Latin America
Rua dos Canários 65
Vinhedo, SP
13280 000 Brazil
Tel: +55 19 3886 6820

Please visit www.domo.nl, www.vivinalgos.com or email info.domo@frieslandcampina.com

The information contained herein is, to the best of our knowledge, correct. The data outlined and the statements are intended only as a source of information. No warranties, express or implied, are made. On the basis of this information it is suggested that you evaluate the product on a laboratory scale prior to use in a finished product. The information contained herein should not be construed as permission for violation of patent rights.

V1201-EU-GB

Anexo 5 Curva de calibración de Bradford

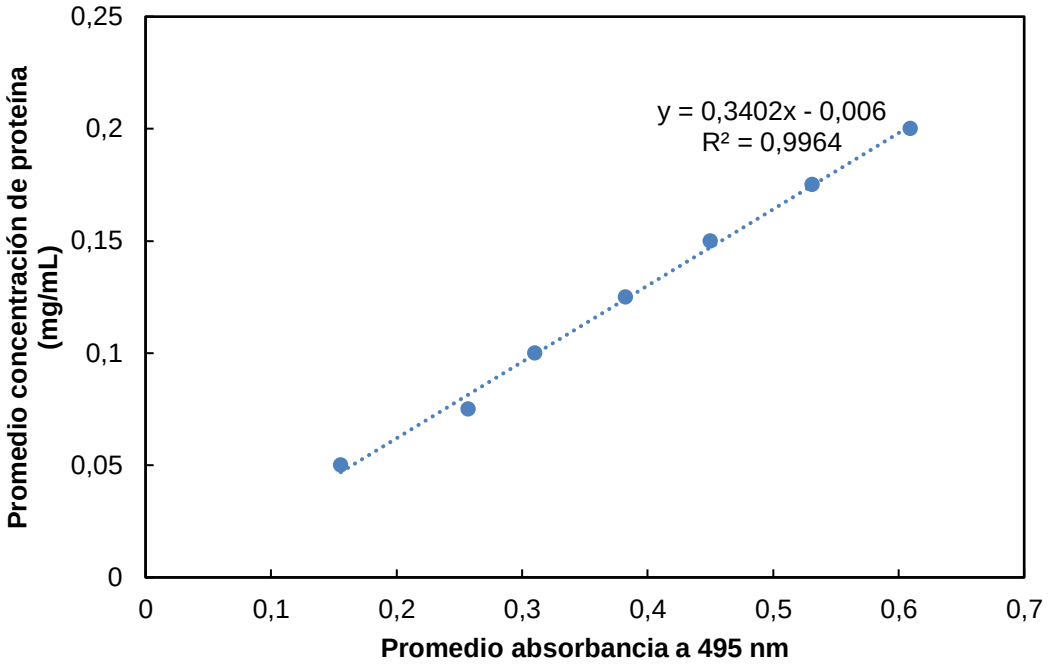


Figura A6.1 *Curva de calibración de Bradford*

Promedio Absorbancia a 495 nm	Promedio Concentración proteína (mg/mL)
0,1555	0,05
0,257	0,075
0,31	0,1
0,3825	0,125
0,45	0,15
0,531	0,175
0,6095	0,2

Anexo 6 Diagrama de Pareto del PB 12+3 para RV

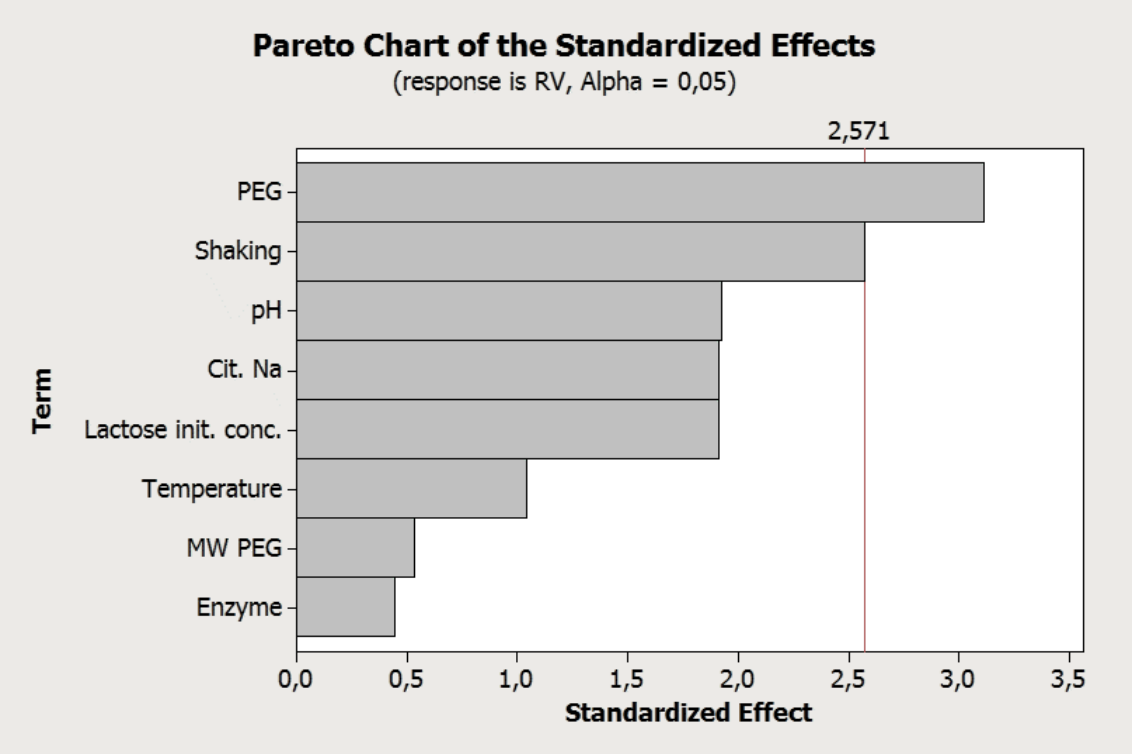
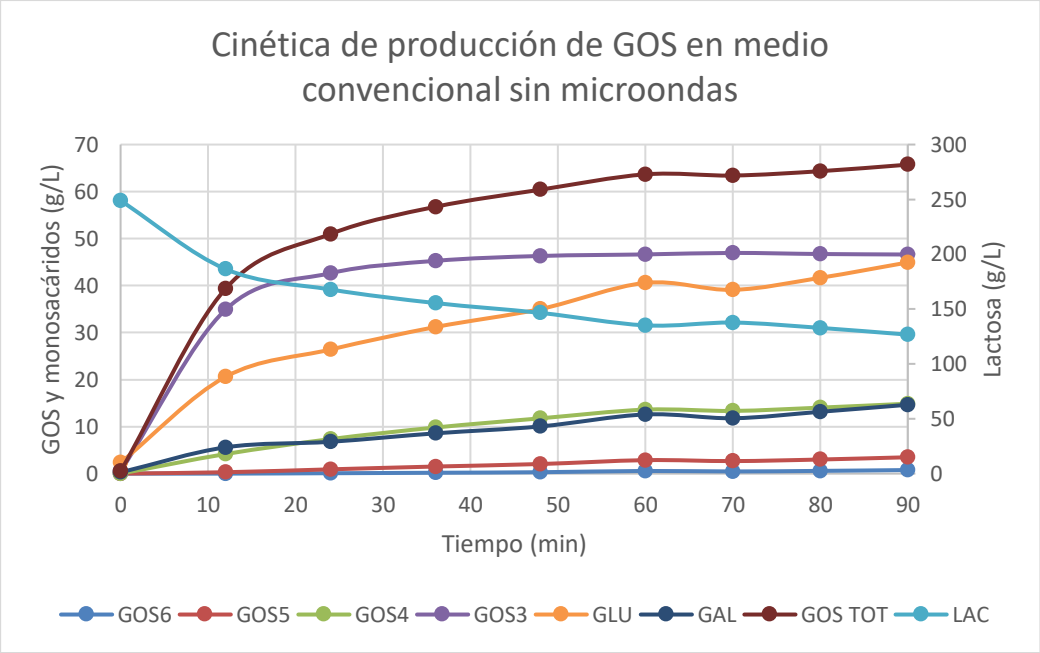
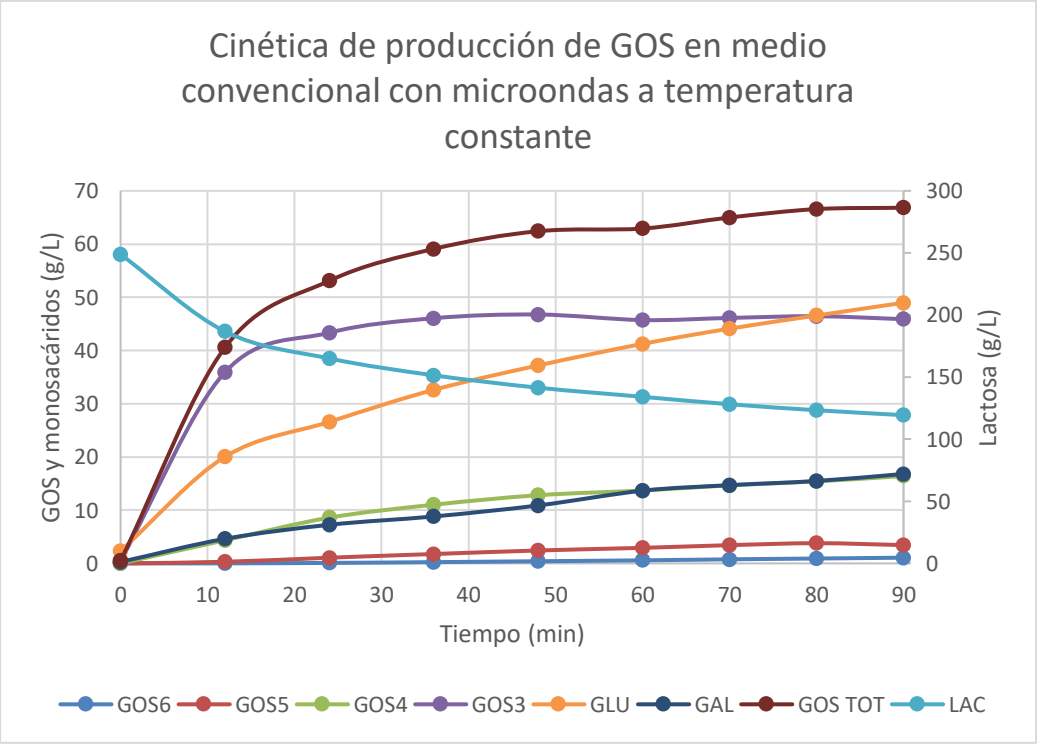
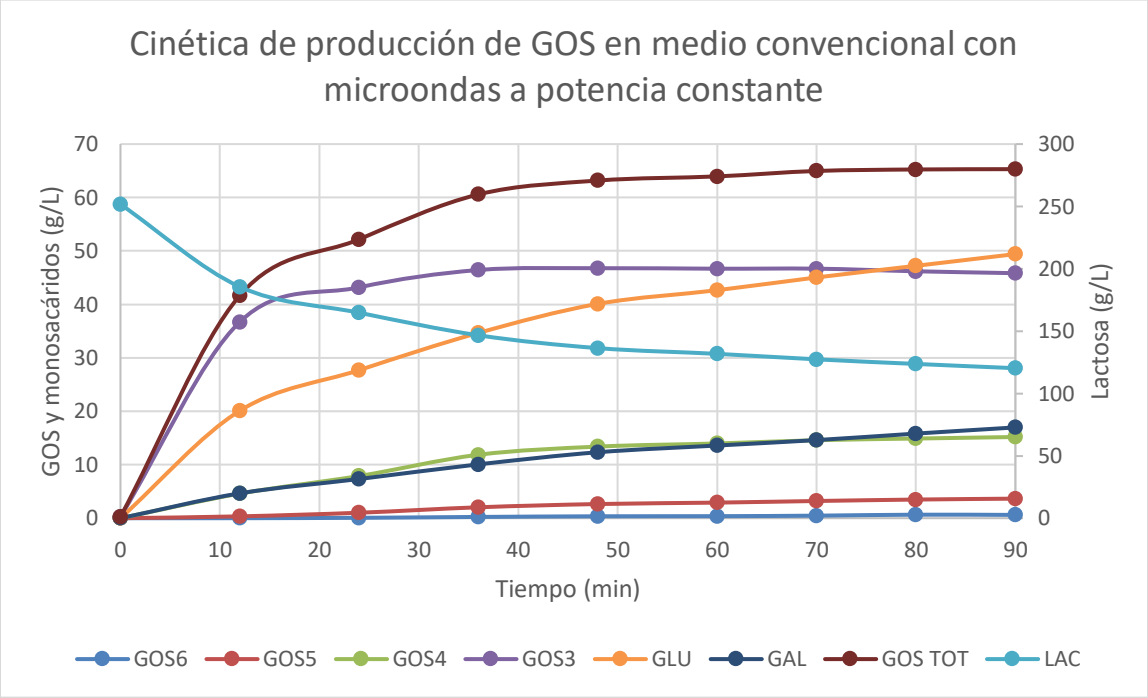


Figura A7.1 *Diagrama de Pareto del PB 12+3 para RV*

Anexo 7 Efecto de diferentes tipos de irradiación de microondas (temperatura constante y a potencia constante) sobre la cinética de producción de GOS



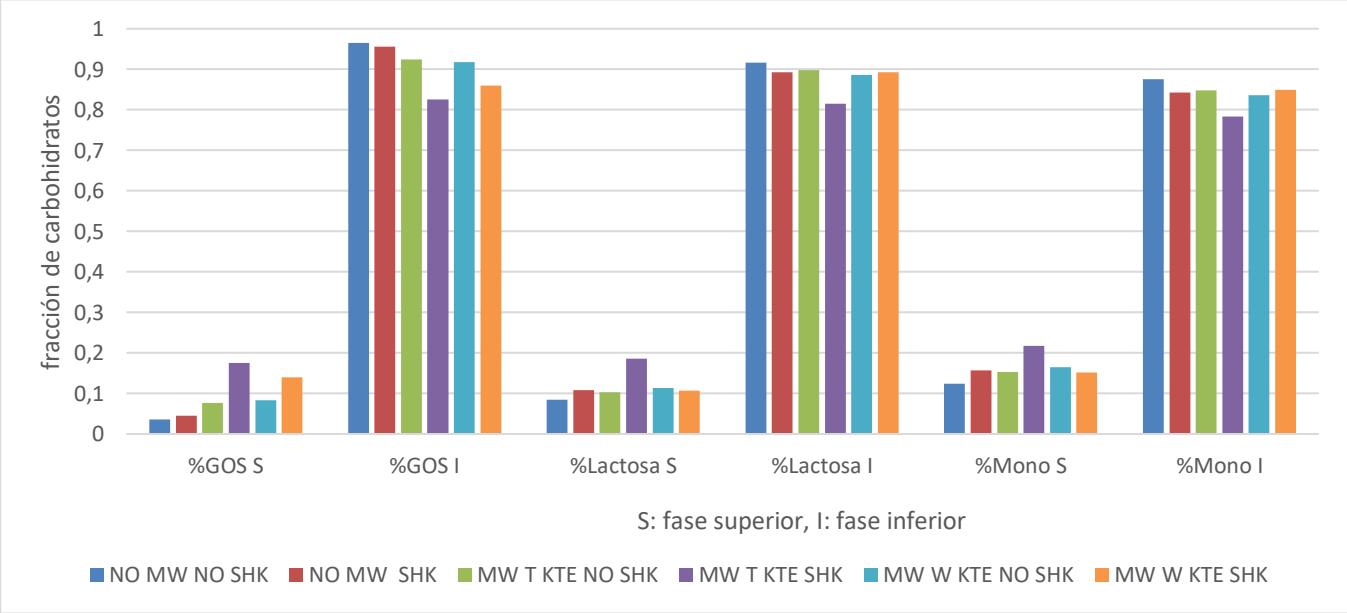



Cinética de producción de GOS en medio convencional con microondas a potencia constante
GOS y monosacáridos (g/L)
Lactosa (g/L)
Tiempo (min)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
0
10
20
30
40
50
60
70
0
50
100
150
200
250
300
GOS6
GOS5
GOS4
GOS3
GLU
GAL
GOS TOT
LAC

Anexo 8 Masas de los carbohidratos en cada fase y para cada tratamiento de las separaciones por SADF asistidas por microondas. Repartición de GOS, lactosa y monosacáridos en las dos fases

	MASA (mg) EN LA FASE SUPERIOR						
	GOS5	GOS4	GOS3	LAC	ALLAC	GLU	GAL
NO MW NO SHK	0,03309897	0,5121462	1,74100317	167,539409	2,48399472	127,432702	10,9918455
NO MW SHK	0,02370961	0,56520366	2,10716752	213,049246	3,28859653	158,560908	19,2779398
MW T KTE NO SHK	0,96763586	1,60831902	2,4897229	205,968725	3,51638185	155,092403	10,5438142
MW T KTE SHK	0	3,75500177	6,48385225	385,079448	7,23028069	222,772095	20,5101608
MW W KTE NO SHK	1,03456231	1,73630557	2,73846515	228,754878	3,83628575	167,490811	12,0304028
MW W KTE SHK	0,95701981	2,06407856	2,95764491	214,997138	3,94273601	156,627487	11,672106

	MASA (mg) EN LA FASE INFERIOR						
	GOS5	GOS4	GOS3	LAC	ALLAC	GLU	GAL
NO MW NO SHK	3,8782647	18,3735377	41,3826416	1793,3227	56,4571917	875,908547	99,9429164
NO MW SHK	5,22000617	15,4557006	37,6304889	1735,86442	54,6548305	853,315399	100,986385
MW T KTE NO SHK	5,12945533	15,5982842	40,7369833	1802,04307	35,3855561	847,202611	73,7170371
MW T KTE SHK	4,00643704	13,9117542	29,9651083	1686,85104	33,4761361	808,80108	67,7996714
MW W KTE NO SHK	4,51701843	15,7070373	42,8520687	1772,82587	35,2426316	836,408362	74,8253043
MW W KTE SHK	4,04946936	14,1081255	24,5093964	1784,98914	34,4504224	870,012206	74,6630328



Anexo 9 Masas de los carbohidratos en cada fase y para cada tratamiento de la reacción - separación simultánea asistida por microondas.

	MASA (g) EN LA FASE SUPERIOR					
	GOS4,5,6	GOS3	Lactosa	Alolactosa	Glucosa	Galactosa
NO MW NO SHK	2,49238799	5,81557198	37,8123162	0,15646574	9,74494358	1,43446843
NO MW SHK	3,03030091	7,07070213	32,8014755	0,20518334	12,690843	2,05609063
MW T KTE NO SHK	14,0627464	32,8130749	100,244375	0,88935996	24,9671459	6,2562268
MW T KTE SHK	9,79286161	22,8500104	101,861564	0,67232698	19,8221243	4,89034106
MW W KTE NO SHK	4,93295849	11,5102365	170,115662	1,60701551	6,91036157	0,79721563
MW W KTE SHK	6,93915403	16,1913594	84,0047994	0,41590144	9,9382574	1,34070545

	MASA (g) EN LA FASE INFERIOR					
	GOS4,5,6	GOS3	Lactosa	Alolactosa	Glucosa	Galactosa
NO MW NO SHK	29,2400079	68,226685	184,266714	2,64442329	47,5637369	10,6022787
NO MW SHK	29,4913334	68,8131114	182,481579	3,16064125	47,6227603	10,5759797
MW T KTE NO SHK	17,0690128	39,8276966	125,380029	2,07583431	29,2337087	7,18078979
MW T KTE SHK	14,0272108	32,7301585	154,649837	2,0747317	27,7708009	8,85803307
MW W KTE NO SHK	4,96293838	11,5801895	178,099171	1,55549027	7,14075815	0,78800224
MW W KTE SHK	15,2477745	35,5781404	204,959366	2,12266983	20,1252227	3,13664901