

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de un sistema mixto de enzimas para la producción de galactooligosacáridos y ácido glucónico a partir de lactosuero como fuente de lactosa

Fabián Rico Rodríguez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá D.C., Colombia

2018

Evaluación de un sistema mixto de enzimas para la producción de galactooligosacáridos y ácido glucónico a partir de lactosuero como fuente de lactosa

Fabián Rico Rodríguez

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ingeniería – Ingeniería Química

Director:

D.Sc Juan Carlos Serrato Bermúdez

Codirectora:

Ph.D. María del Mar Villamiel Guerra

Asesora:

Ph.D. Antonia Montilla Corredera

Línea de Investigación:

Bioprocesos – Reacciones enzimáticas

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

2018

A mis padres, hermanos, sobrinos y a mis amigos que siempre estuvieron allí brindándome su apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo.

Agradecimientos

El presente trabajo pudo llevarse a cabo gracias al apoyo de las instituciones que a continuación se mencionan y a quienes deseo agradecer:

- Departamento administrativo de ciencia, tecnología e innovación, Colciencias; quien a través de la convocatoria 567 de 2012 me otorgó la beca para poder cursar el doctorado.
- A la universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá y al Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, en donde se desarrolló gran parte del proyecto de investigación y quienes proporcionaron instalaciones y equipos necesarios para desarrollar la tesis.
- Al Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación – CIAL – CSIC-UAM, quienes me permitieron mejorar mis habilidades y adquirir conocimientos necesarios para llevar a cabo la última etapa de mi tesis.

Además, deseo agradecer particularmente a las siguientes personas por ser, directa o indirectamente, parte de mi proceso de formación doctoral:

- Al ingeniero Juan Carlos Serrato, que desde el primer momento depositó en mí su confianza para el desarrollo de esta tesis doctoral.
- A la doctora Mar Villamiel, que mostró interés en mi proyecto, durante el cual me aportó conocimiento invaluable y me recibió con los brazos abiertos en su laboratorio.
- A la doctora Antonia Montilla, que apoyó mi proyecto y fue un gran apoyo durante mi estancia de investigación en su laboratorio.
- A Carolina Gutiérrez, Carolina Vega y Carolina Rojas, quienes tuvieron que soportar cada momento de dificultad y con sus sabios consejos me ayudaron a sobrellevar las dificultades en estos años de trabajo.

- A Nerea, quien con su alegría y forma única de ver la vida fue un apoyo invaluable y siempre tuvo una sonrisa y una palabra amable para mí.
- A Ana, con quién compartí muchas horas de trabajo en el laboratorio y me compartió su exquisito musical.
- A Paola, que apoyo el desarrollo de las primeras etapas del proyecto, aportando no solo su ayuda en el laboratorio, sino también su conocimiento de alegría, que siempre la han caracterizado.
- A mis compañeros del posgrado en ingeniería química: Germán, Nevardo, Mario, Astrid, Eliana, Claudia y los demás miembros del posgrado, quienes siempre tuvieron una mano amiga y una palabra de aliento y mostraron alegría y buen humor durante todo mi proceso de formación.
- A mis compañeros del CIAL: Laura, Álvaro, Mayte, Cristina, Paloma y Silvia que me recibieron con los brazos abiertos y me brindaron su amistad incondicional durante mi estancia de investigación en España.
- Y a todos aquellos que de una u otra manera apoyaron mi proceso de formación doctoral.

Resumen

En Colombia se producen grandes cantidades de lactosuero a partir de la industria quesera. Éste contiene cantidades importantes de nutrientes que podrían ser aprovechados a nivel industrial. Sin embargo, la industria nacional no lo utiliza adecuadamente e incluso lo llega tratar como residuo líquido. A partir de la lactosa, el principal constituyente del lactosuero, es posible obtener diferentes compuestos de alto valor agregado, por ejemplo, los galactooligosacáridos (GOS), compuestos reconocidos por su actividad prebiótica. En este trabajo se evaluó la producción de GOS a partir de la lactosa presente en el lactosuero, estudiando el efecto de sus constituyentes sobre la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*, enzima encargada de transformar la lactosa en GOS. Además, se planteó como alternativa la implementación de un sistema multienzimático (β -galactosidasa + glucosa oxidasa) en el que se aprovechara la glucosa para producción de ácido glucónico. Adicionalmente, fue evaluado el efecto de los ultrasonidos de potencia (US) sobre la actividad de ambas enzimas. Se encontró que la dosis empleada de β -galactosidasa para incrementar la actividad de transgalactosilación es más baja que aquella para favorecer la hidrólisis. Además, los monosacáridos y minerales como el calcio y el potasio, presentes en el suero, pueden tener un efecto inhibitorio sobre la producción de GOS a las concentraciones en que se encuentran en el lactosuero. De otro lado, se encontró que la fuente de lactosa más desfavorable fue el permeado de lactosuero, debido a su alto contenido de minerales. En general, el uso de US no afecta significativamente a la actividad de la β -galactosidasa, pero en el caso de la glucosa oxidasa, su actividad se incrementa hasta ocho veces. Se concluye que, a pesar de que el sistema multienzimático es una estrategia viable para la producción de GOS y ácido glucónico, es necesario eliminar los minerales en el sustrato de partida para evitar reducir la actividad de la enzima y los rendimientos de producción.

Palabras clave: Galactooligosacáridos, ácido glucónico, sistema multienzimático, β -galactosidasa, glucosa oxidasa, ultrasonidos.

Abstract

Colombia produces high volumes of whey from cheese industry. The later contains important amounts of nutrients which could be better used in industry. However, national industry does not employ it accurately; moreover, it is frequently disposed as a liquid residue. From lactose, the main constituent of whey, it is possible to synthesize different compounds of industrial value, like galactooligosaccharides (GOS), which are recognised due to their prebiotic activity. In this work the GOS production was evaluated from lactose present in whey, to find the effect of their constituents on β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, the enzyme which converts lactose into GOS. Also, a multienzymatic system (β -galactosidase + glucose oxidase) was proposed to use the glucose released in GOS reaction to produce gluconic acid. Besides, the effect of power ultrasound (US) on enzymatic activities was also evaluated. Results suggest that dose employed for transgalactosylation is much lower than that one used for hydrolysis. Even more, compounds like monosaccharides, potassium and calcium inhibit GOS production at those levels present in cheese whey. On the other hand, whey permeate was found to exert the highest inhibitory effect on GOS production due to their high content of minerals. In general, US has no significant effect on β -galactosidase activity, nonetheless for glucose oxidase an 8-folded effect on gluconic acid production was found. It is concluded that, despite being a viable strategy for GOS and gluconic acid production, multienzymatic system requires mineral removal from the substrate to avoid enzyme activities and yield reduction.

Keywords: Galactooligosaccharides, gluconic acid, multienzymatic system, β -galactosidase, glucose oxidase, ultrasounds.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract	X
Contenido	XI
Lista de figuras	XIV
Lista de tablas	XVII
Lista de símbolos y abreviaturas	XVIII
Introducción	1
1. Estado del arte	7
1.1 Contexto industrial lácteo	7
1.2 Queso	9
1.3 Subproductos de la industria láctea: lactosuero	10
1.3.1 Alternativas de disposición del LaS como residuo	12
1.3.2 Alternativas de aprovechamiento del LaS	14
1.3.3 Alternativas de valorización del LaS	15
1.3.4 Costo y complejidad de la obtención de los productos del LaS.....	18
1.4 Carbohidratos prebióticos: galactooligosacáridos.....	21
1.4.1 β -galactosidasa	23
1.4.2 Síntesis de GOS.....	24
1.4.3 Factores que afectan los rendimientos en la producción de GOS.....	26
1.4.4 Operaciones de separación de GOS	30
1.5 Intensificación de procesos	30
1.5.1 Producción de ácido glucónico	31
1.5.2 Aplicación de US en reacciones enzimáticas.....	35
1.5.3 Aplicaciones de los US	36
1.5.4 Efecto de US sobre las enzimas	36
2. Planteamiento del problema	39
2.1 Problema de investigación	40
2.2 Hipótesis	40
2.3 Objetivos	41

2.3.1	Objetivo general	41
2.3.2	Objetivos específicos.....	41
3.	Materiales y métodos.....	43
3.1	Muestras y reactivos	43
3.2	Caracterización del lactosuero	44
3.2.1	Contenido de humedad	44
3.2.2	Contenido de proteína	44
3.2.3	Contenido de azúcares.....	45
3.2.4	Contenido de materia grasa	45
3.2.5	Contenido de cenizas	45
3.2.6	Contenido de minerales.....	45
3.3	Caracterización enzimática inicial	46
3.3.1	Actividad hidrolítica de la β -gal	46
3.3.2	Actividad hidrolítica y de transgalactosilación	47
3.3.3	Actividad de la glucosa oxidasa	47
3.4	Reacciones enzimáticas	48
3.4.1	Efecto de la presencia de monosacáridos sobre la reacción de transgalactosilación	49
3.4.2	Efecto de los componentes del lactosuero sobre la reacción de transgalactosilación	51
3.4.3	Efecto de minerales y proteína sobre la glucosa oxidasa	52
3.4.4	Producción de GOS en diferentes fuentes de lactosa.....	53
3.4.5	Efecto de un sistema multienzimático sobre la producción de GOS	53
3.4.6	Cuantificación de carbohidratos	56
3.4.7	Tratamiento estadístico de datos.....	56
4.	Resultados y discusión	59
4.1	Caracterización de las materias primas	59
4.2	Actividad enzimática	60
4.2.1	Actividad hidrolítica	60
4.2.2	Actividad galactosil transferasa	61
4.3	Cinética característica de producción de GOS.....	62
4.4	Efecto de los constituyentes del LaS sobre la β -gal	64
4.4.1	Proteínas y sales.....	64
4.4.2	Carbohidratos.....	75
4.4.3	Efecto de los US sobre la producción enzimática de GOS	83
4.5	Oxidación de la glucosa a ácido glucónico.....	85
4.6	Producción de GOS y de ácido glucónico en un sistema enzimático mixto	87
4.7	Sistemas multienzimáticos con otras fuentes de lactosa.....	91
4.7.1	Efecto de los US sobre el sistema multienzimático.....	92
4.7.2	Efecto de la fuente de lactosa	95
4.7.3	Efecto de los US sobre las enzimas.	101
4.8	Rendimientos de producción de GOS.....	104
5.	Conclusiones y recomendaciones	107
5.1	Conclusiones	107
5.2	Recomendaciones	108
Anexo A:	Otras alternativas para el aprovechamiento del lactosuero	111

Anexo B: Ficha técnica del lactosuero	113
Anexo C: Perfil cromatográfico de la reacción de producción de GOS – Tecnicas de cuantificación	117
Anexo D. Cinéticas de producción de GOS en las diferentes etapas del proyecto	122
Bibliografía	139

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. (a) Exportaciones mundiales de productos lácteos y queso, cantidad y precio, (b) Exportaciones colombianas de productos lácteos, cantidad y precio.	10
Figura 1-2. β -galactosidasa de diferentes orígenes.	24
Figura 1-3. Mecanismo de acción sugerido para la β -galactosidasa.	25
Figura 1-4. Estructura de (a) la glucosa oxidasa recombinante de <i>A. niger</i> y de (b) la catalasa de <i>E. coli</i>	34
Figura 4-1. Actividad hidrolítica de la β -galactosidasa como función de la temperatura y del pH en presencia de o-NPG.	60
Figura 4-2. Actividades de hidrólisis y galactosil transferasa de la β -gal de <i>K. lactis</i> a diferentes concentraciones de enzima.	62
Figura 4-3. Cinética de la producción enzimática de GOS a partir de lactosa y β -gal (HA-lactase 5200).	63
Figura 4-4. Producción de GOS en presencia de proteína de LaS.	65
Figura 4-5. Producción de GOS a partir de lactosa en presencia de proteína de lactosuero a 60 minutos de reacción.	66
Figura 4-6. Producción de GOS en presencia de cloruro de sodio.	67
Figura 4-7. Producción de GOS a partir de lactosa en presencia de cloruro de sodio a 60 minutos.	68
Figura 4-8. Efecto del cloruro de sodio sobre la actividad de transgalactosilación de la β -gal.	69
Figura 4-9. Producción de GOS en presencia de cloruro de potasio.	70
Figura 4-10. Producción de GOS a partir de lactosa en presencia de cloruro de potasio a 60 minutos.	71

Figura 4-11. Actividad de transgalactosilación de la β -gal en presencia de cloruro de potasio.	72
Figura 4-12. Cinética de producción de GOS a 40% de lactosa inicial en presencia de cloruro de calcio.	74
Figura 4-13. Evolución del contenido en carbohidratos durante la reacción de hidrólisis y transgalactosilación de lactosa en presencia y ausencia de galactosa y glucosa.	76
Figura 4-14. Graficas de superficie de respuesta para la producción de GOS.	79
Figura 4-15. Optimización de la relación azúcares en la producción de GOS.	81
Figura 4-16. Producción de GOS en: (a) lactosa; (b) Per; (c) LaS con diferentes amplitudes de US.	84
Figura 4-17. Cinéticas de consumo de glucosa (a) y producción de ácido glucónico (b) en presencia de proteínas de suero, sodio y potasio.	86
Figura 4-18. Cinéticas de producción de ácido glucónico (a) y consumo de glucosa (b) en presencia de US. (\circ) 0% US, (\square) 10% US, (\diamond) 20% US, (Δ) 30% US).	87
Figura 4-19. Cinética de los sistemas multienzimáticos a 40 °C, pH de 7,0; dosis de β -gal 1,7 U/mL y Gox 3,2 U/mL.	90
Figura 4-20. Producción de glucosa con un sistema multienzimáticos secuencial.	93
Figura 4-21. Producción de ácido glucónico en los sistemas multienzimáticos.	94
Figura 4-22. Producción de GOS en los sistemas multienzimáticos.	96
Figura 4-23. Score plot (a) y loading plot (b) obtenido mediante PCA de las reacciones de transgalactosilación. 1= Lactosa; 2= Permeado, 3= Lactosuero y 4 = Lactosa + Proteína.	100
Figura 4-24. Espectro de fluorescencia para a) β -gal (HA-Lactase) and b) Gox (Gluzyme BG10000) correspondientes a producción convencional y con US de GOS y ácido glucónico.	102
Figura 4-25. Variación (%) de la actividad enzimática para β -gal y Gox después de 60 y 300 minutos de tratamiento con US.	104
Anexo A1. Alternativas de aprovechamiento de la glucosa en la obtención de GOS.	111
Anexo C1. Perfil cromatográfico HPLC_RID de una reacción enzimática de producción de GOS.	117

Anexo C2. Perfil GC-FID de las oximas trimetilsililadas de los carbohidratos obtenidos por síntesis enzimática.....	121
Anexo D1. Consumo de lactosa en la producción de GOS en presencia de lactosuero.	122
Anexo D2. Producción de glucosa durante la transgalactosilación en presencia de proteína de lactosuero	123
Anexo D3. Producción de galactosa durante la transgalactosilación en presencia de proteína de lactosuero.	124
Anexo D4. Producción de GOS en presencia de proteína de lactosuero.	125
Anexo D5. Consumo de lactosa en presencia de cloruro de sodio.....	126
Anexo D6. Producción de glucosa durante la transgalactosilación en presencia de cloruro de sodio.	127
Anexo D7. Producción de galactosa durante la transgalactosilación en presencia de cloruro de sodio.	128
Anexo D8. Producción de GOS en presencia de cloruro de sodio.	129
Anexo D9. Consumo de lactosa durante la transgalactosilación en presencia de cloruro de potasio.....	130
Anexo D10. Producción de glucosa durante la transgalactosilación en presencia de cloruro de potasio.	131
Anexo D11. Producción de galactosa durante la transgalactosilación en presencia de cloruro de potasio.	132
Anexo D12. Producción de GOS durante la transgalactosilación en presencia de cloruro de potasio.....	133
Anexo D13. Reacción de transgalactosilación en presencia de cloruro de magnesio. ..	134
Anexo D14. Producción de GOS en: (a) lactosa; (b) Permeado; (c) lactosuero y diferentes amplitudes de US (—○— 0% US ---□--- 15% US -▲- 30% US)	135
Anexo D15. Consumo de lactosa en los sistemas multienzimáticos.....	136
Anexo D16. Producción de galactosa en los sistemas multi-enzimáticos.....	137

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Composición media de minerales del LaS líquido (mg/100 g).....	11
Tabla 1-2. Tipos de tratamientos empleados en la disposición del LaS a nivel industrial	13
Tabla 1-3. Costo del suero y de sus posibles derivados	20
Tabla 1-4. Oligosacáridos con potencial prebiótico.....	22
Tabla 3-1. Condiciones generales de reacción para la obtención de GOS	48
Tabla 3-2. Resumen reacciones enzimáticas planteadas en el proyecto.....	49
Tabla 3-3. Diseño experimental para determinación del efecto de monosacáridos en el proceso de transgalactosilación de la lactosa.....	50
Tabla 3-4. Diseño experimental para determinación del efecto de proteína y minerales en el proceso de transgalactosilación de lactosa.....	51
Tabla 3-5. Diseño experimental efecto de fuente de lactosa e intensidad de US sobre la producción de GOS.....	55
Tabla 4-1. Composición proximal del LaS	59
Tabla 4-2. Actividad galactosil transferasa (kU/g) de β -gal en presencia de cloruro de calcio.	75
Tabla 4-3. ANOVA para la superficie de respuesta de la producción de GOS.....	78
Tabla 4-4. Interacciones entre β -gal y los componentes del lactosuero.....	82
Tabla 4-5. ANOVA para producción de GOS con diferentes fuentes de lactosa y diferentes amplitudes de US.....	97
Tabla 4-6. ANOVA para producción de ácido glucónico con diferentes fuentes de lactosa y diferentes amplitudes de US.....	98
Tabla 4-7. Rendimientos de producción de GOS y ácido glucónico.....	105

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
U_H	Actividad hidrolítica	U/g	
U_T	Actividad galactosil transferasa	U/g	

Abreviaturas

Abreviatura	Término
a.u.	Unidades de absorbancia
β -gal	Beta-galactosidasa
DP	Degree of polymerisation
FDA	Food and Drug Administration
Gal	Galactosa
Glc	Ácido glucónico
Glu	Glucosa
GOS	Galactooligosacáridos
Gox	Glucosa oxidasa
GRAS	Generally recognised as safe
Lac	Lactosa
La+P	Mezcla de lactosa y proteínas de lactosuero
LaS	Lactosuero

Abreviatura Término

Per	Permeado de lactosuero
-----	------------------------

US	Ultrasonidos
----	--------------

Introducción

En las últimas décadas la demanda de alimentos funcionales que además de nutrir tengan beneficios para la salud, ha crecido de forma notable a nivel mundial. Por otra parte, el estilo de vida actual cada vez más agitado, requiere de una producción de alimentos nutricionalmente más completos y poco procesados [1]. En este aspecto en particular, la industria de alimentos tiene un gran reto ya que, además de cumplir con parámetros de calidad sensorial, debe elaborar productos con las propiedades nutricionales deseadas.

La industria láctea colombiana ha tenido un importante crecimiento en los últimos años, debido, entre otros factores, a la diversificación y aumento del consumo de este tipo de productos y a las nuevas políticas de libre comercio implementadas por el gobierno [2]. La industria láctea produce una amplia gama de productos de alta demanda comercializados en todo el mundo que, según reportes de la FAO [3], en 2014 superaron los 700 millones de toneladas. Además, el comportamiento de las exportaciones de productos lácteos se encuentra en una época de crecimiento constante [4], donde las exportaciones de leche y derivados lácteos superaron los 84.000 millones de dólares en el año 2014.

Esta misma industria genera una gran cantidad de residuos que requieren un manejo adecuado, de lo contrario pueden contaminar fuentes de agua cercanas a las industrias. Uno de los subproductos generados en mayor cantidad es el lactosuero, producido durante la elaboración del queso que, a pesar de ser considerado como un residuo de poco valor, contiene compuestos de aplicación industrial, entre ellos, las proteínas y la lactosa [5]. Al ser un residuo líquido, el lactosuero requiere alternativas diferentes a su vertido; dentro de estas alternativas se encuentra la concentración o la venta para ser empleado en la alimentación animal [5]. Existe normativa nacional que regula los parámetros y valores permisibles en los vertimientos a cuerpos de agua superficiales y alcantarillado público para evitar niveles elevados de contaminación.

El lactosuero (LaS) posee altas cantidades de nutrientes que contribuyen al incremento de la demanda química de oxígeno (DQO) (79.000 mg/L) si el suero se vierte directamente; por esta razón, se han planteado alternativas para usarlo en diferentes industrias. En el presente trabajo se propone la producción de galactooligosacáridos (GOS) como alternativa de valorización del lactosuero.

Los GOS son cadenas de galactosa (entre 2 y 9 unidades), que pueden o no estar unidas a una glucosa terminal. Son escasamente digeridos en el intestino delgado y llegan al colon donde son metabolizados selectivamente por bacterias de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, considerándose como prebióticos [6]. Se encuentran naturalmente, en cantidades mínimas, en la leche humana y bovina, aunque se pueden obtener a través de procesos de fermentación [7] o por síntesis enzimática usando β -galactosidasa (β -gal) de origen microbiano [8]. El consumo frecuente de GOS permite que los microorganismos probióticos regulen el pH del intestino, ya que producen ácidos grasos de cadena corta que favorecen el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales [9], entre otros efectos comprobados. Además, los GOS tienen propiedades tecnológicas como mejoradores del sabor, baja sensación dulce, son incoloros y estables en amplios rangos de pH y temperatura, por lo que se pueden emplear en numerosas aplicaciones en la industria alimentaria [10].

Los GOS son producidos con materias primas de bajo costo, comparado con otros oligosacáridos como los fructooligosacáridos (FOS), producidos a partir de jarabes ricos en fructosa o molasas de caña azucarera [11], [12].

La reacción de transgalactosilación (oligomerización de monómeros de galactosa) es una reacción cinéticamente controlada, con la desventaja de que existe una competencia entre la hidrólisis y la transgalactosilación, en la cual la hidrólisis está termodinámicamente favorecida [13]. Sin embargo, bajo condiciones de alta concentración de lactosa el equilibrio se desplaza hacia la transgalactosilación, produciendo polímeros a partir de la D-glucosa y la D-galactosa, o simplemente realizando una transferencia interna de la galactosa de la posición 4 a la posición 6 de la glucosa, formando la alolactosa, donde no hay una liberación de la glucosa [10]. A pesar del cambio en el equilibrio de la reacción, se ha encontrado que la generación de monosacáridos (glucosa y la galactosa) inhibe la reacción de transgalactosilación reduciendo los rendimientos de producción. Los rendimientos reportados para la síntesis de GOS son bajos (el rendimiento típico está

estimado entre 30% y 40%) [14] si se comparan con los obtenidos en la producción de oligosacáridos como los FOS (con valores cercanos a 70%) [15], esto puede ser en parte debido a la inhibición ejercida por la glucosa y la galactosa generadas durante la reacción, así como a la preferencia de la enzima por la hidrólisis de la lactosa.

Dado que un mercado potencial para este tipo de productos es el de alimentos para diabéticos, para personas intolerantes a la lactosa y alimentos con bajo aporte calórico, se requiere que estos sean producidos con una alta pureza [16]; así, las operaciones de purificación de los GOS son una etapa crítica y un aspecto de gran relevancia para su comercialización [17]. Estas operaciones han empleado diversas técnicas que buscan reducir sus impurezas (ej. micro y nanofiltración) [18], o separación con solventes como etanol que logran una recuperación del 97,5% de GOS [17]; sin embargo, estas operaciones son costosas y/o requieren demasiado tiempo para su realización.

Además, a partir de los productos intermedios de la reacción de transgalactosilación, como la glucosa, es posible producir otros compuestos de interés industrial. Al ser un azúcar no deseado de la transgalactosilación que se genera en cantidades importantes, la glucosa puede ser empleada para producir ácido glucónico, un ácido producido por oxidación enzimática con glucosa oxidasa [19]. Este ácido es de gran valor industrial por su funcionalidad no solo en la industria de alimentos, sino en otras industrias como la farmacéutica, textil y de curtiembres [20].

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, el aprovechamiento del LaS para la producción de GOS es una estrategia que requiere mejorar sus condiciones de proceso para hacerla más atractiva en comparación con la producción de otros oligosacáridos. Por tanto, el objetivo de esta tesis fue: **“evaluar un sistema mixto de enzimas para producir GOS y ácido glucónico e incrementar los rendimientos en la reacción de transgalactosilación a partir del lactosuero como fuente de lactosa”**. Para este fin, se propuso el estudio de un sistema multienzimático que sea capaz de aprovechar la glucosa producida y oxidarla a ácido glucónico. Este proceso se llevó a cabo utilizando β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y glucosa oxidasa de *Aspergillus oryzae*.

Para poder dar solución a este problema, se plantearon las siguientes etapas:

- I) estudiar el posible efecto inhibitorio causado por: a) los monosacáridos glucosa y galactosa, b) la proteína y c) los minerales (sodio, potasio, calcio y magnesio) presentes naturalmente en el lactosuero;
- II) evaluar la cinética de producción de GOS en lactosa, permeado y en lactosuero una vez ajustadas las mejores condiciones de producción y
- III) evaluar la efectividad de un sistema multienzimático en la producción de GOS y ácido glucónico y realizar la comparación de las cinéticas obtenidas.

Para presentar los resultados de esta investigación, se dividió este documento en tres capítulos adicionales a la Introducción y las Conclusiones.

En el *capítulo 1*, estado del arte, se hace una revisión bibliográfica de la síntesis de GOS y ácido glucónico, materias primas, tipos de enzimas empleadas, condiciones de reacción y aspectos relevantes a tener en cuenta para abordar de una forma clara el problema de investigación.

En el *capítulo 2* se presenta la descripción del problema, justificación y el planteamiento del problema, exponiendo de manera concreta las razones para abordar el tema. Adicionalmente se presentan de forma explícita los objetivos planteados en esta investigación.

El *capítulo 3* muestra la metodología que se empleó para llevar a cabo cada uno de los objetivos propuestos. En éste se describen las actividades realizadas y los métodos empleados, así como las técnicas usadas para el análisis de la información y demás aspectos operacionales y estadísticos tenidos en cuenta en el desarrollo de la investigación.

En el *capítulo 4* se presentan los resultados y análisis de los ensayos, mostrando las respuestas a las variables analizadas. Se muestra el efecto de los monosacáridos adicionados por separado y en combinación (a través de una superficie de respuesta) desde el inicio de la reacción de transgalactosilación sobre la producción de GOS. Adicionalmente, se presenta la discusión sobre el efecto de los minerales y la proteína, en las relaciones presentes en el LaS con respecto a la lactosa, sobre la actividad enzimática de la β -galactosidasa. Una vez conocido el efecto que los constituyentes del LaS y los productos de reacción tienen sobre la enzima y la producción de GOS, se evaluó también el efecto de estos últimos sobre la actividad de la glucosa oxidasa. Para finalizar este

capítulo, se muestran el efecto de diferentes fuentes de lactosa y la aplicación de ultrasonidos de potencia (US) sobre la producción de GOS.

Finalmente, se presentan las conclusiones obtenidas de la investigación realizada y las recomendaciones para el desarrollo de futuras investigaciones en el tema.

Adicional a la información relacionada con la investigación se muestra en los anexos información complementaria a la presentada en los capítulos, así como la relacionada con eventos científicos y publicaciones realizadas.

1. Estado del arte

La necesidad de satisfacer las demandas de los mercados, cada vez más especializados, hace que la industria se encuentre en la búsqueda constante de nuevas y mejores alternativas de procesamiento. Sumado a esto, políticas ambientales y costos de producción hacen necesario diseñar operaciones que optimicen los procesos manteniendo estándares de calidad. A este respecto, la industria de alimentos e ingredientes alimentarios es un área que presenta grandes retos. Particularmente, procesos como la producción de GOS, es una estrategia a la cual se ha prestado mucha atención. Sin embargo, es necesario estudiar aún más el proceso con el fin de mejorar los rendimientos de producción y, en lo posible, optimizar la purificación de las mezclas de carbohidratos obtenidas. Los GOS se obtienen a partir de la lactosa, cuya fuente más abundante es el LaS; a pesar de que la lactosa es su componente mayoritario, diversos estudios han sugerido que la presencia de otros constituyentes del LaS podrían tener efectos sobre la reacción y por ende en los rendimientos de producción. A continuación, se presentan algunos de los aspectos más relevantes sobre el estado del arte para contextualizar de una mejor manera la investigación realizada.

1.1 Contexto industrial lácteo

La leche es un fluido secretado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos; ésta constituye el primer alimento de todo mamífero recién nacido [21]; además, proporciona a la cría casi todos los nutrientes necesarios para mantenerla viva (carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales) [22] y la provee de diferentes compuestos con actividad biológica [23] (péptidos antimicrobianos, hormonas y factores de crecimiento), que además son de interés en la industria de alimentos [9]. El hombre ha aprovechado diferentes tipos de leche (vaca, cabra, oveja, yegua, camella), sin embargo, la leche de vaca es la de mayor consumo a nivel mundial. La composición fisicoquímica y las propiedades nutricionales de esta leche, junto a su disponibilidad, han hecho que sea

incluida en la dieta humana y que sea usada como materia prima para la obtención de otros tipos de alimentos.

A partir de la leche se produce una amplia gama de productos (leche fresca, leche en polvo, mantequilla, crema de leche, quesos, arequipe, yogures, entre otros) que poseen una alta demanda y se comercializan en todo el mundo. Según informes de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la producción mundial de leche para el año 2014 fue de 792 millones de toneladas. De acuerdo con el *International Trade Center* [4], las exportaciones de leche y derivados lácteos a nivel mundial fueron de 43,5 millones de toneladas de productos que representaron un valor comercial de 89000 millones de dólares en el año 2016, de esta cantidad; 26,5 millones de dólares corresponden a exportaciones de quesos frescos y madurados.

De acuerdo con Proexport Colombia [24], en el país es posible encontrar leche de vaca con composición diferente, aunque todas de excelente calidad, aspecto que se ve relacionado con la geografía de las diferentes regiones en las que se produce. Se ha encontrado que la leche colombiana presenta un alto contenido de proteína (3,56%), mayor que el contenido en leches producidas en países como Nueva Zelanda (3,52%) y Alemania (3,41%), lo que permite rendimientos más altos al emplearla para la elaboración de productos como el queso. Según reportes del sistema de estadísticas agropecuarias - AgroNet, del Ministerio de Agricultura [2], Colombia produjo en 2016 una cantidad de leche de 6,9 millones de toneladas, destinadas tanto a envasado como leche líquida (Leche pasteurizada y UAT) como a procesamiento; sin embargo, las exportaciones fueron solamente de 318 toneladas de productos lácteos y el resto fue destinado al consumo interno. Cabe resaltar que el sector lechero en Colombia aportó en este mismo año el 2,8% del PIB, convirtiéndolo en un importante sector de la economía nacional junto con el café, principal producto agropecuario de exportación en Colombia. Cabe resaltar que el sector industrial lácteo es responsable del 2% del empleo total nacional y 3,18% del empleo proveniente de ganadería láctea con más de 24.000 empleos directos [25].

A pesar de que Colombia es el cuarto productor de leche en Latinoamérica, después de Brasil, Argentina y México; el país se encuentra en franca competencia por los precios de importación de leches provenientes de Estados Unidos o Argentina. Esto se ha visto agravado por la entrada en vigencia de tratados de libre comercio, lo que disminuye el precio pagado al productor [26].

1.2 Queso

Uno de los diferentes productos derivados de la leche es el queso, obtenido a partir de la precipitación, el corte y el prensado de la cuajada, que puede ser o no sometido a maduración en presencia de microorganismos específicos. Alrededor del mundo existen alrededor de 2.000 variedades de queso que se clasifican de acuerdo a su origen, forma de obtención (coagulación ácida, enzimática o su combinación), textura y consistencia, contenido de grasa, entre otros parámetros [22]. Solamente en Colombia se elaboran 8 tipos de quesos frescos, además del queso Paipa, que es un queso semi-madurado y el queso costeño que es un queso con alto contenido de sal.

El queso es el derivado lácteo que presenta menores rendimientos: del total de leche empleada para el proceso solo el 13% se convierte en queso, es decir, por cada 10 kg de leche empleada se obtiene solamente 1,3 kg de queso, aunque este porcentaje puede variar dependiendo del tipo de queso elaborado [27]; el 87% restante se convierte en LaS que, como se explicará a continuación, constituye un problema de contaminación ambiental debido a las dificultades que presenta su eliminación.

Según el *International Trade Center* [4], entre los años 2009 y 2013 el mercado mundial (Figura 1-1a) de quesos tuvo un crecimiento del 20%, y en el 2013 se comercializaron 5'879.338 de toneladas de queso, en sus diferentes variedades (quesos frescos y madurados). Para ese mismo año, las exportaciones colombianas alcanzaron las 8.136 toneladas de productos lácteos (Figura 1-1b), de las cuales sólo 258 toneladas correspondieron a quesos de diferentes variedades, con un valor de 1.230.000 USD, que, aunque fue menor que las reportadas en los años anteriores (2.121.000 USD para 2012 y 2.062.000 USD para 2011) [4], representa una cantidad importante de leche empleada para su elaboración. Adicionalmente, para el mismo año el Consejo Nacional Lácteo [28] reportó una producción formal de 15.669 toneladas de queso en diferentes variedades y presentaciones, para los cuales se requirieron en promedio 120.257 toneladas de leche fresca para su producción, generando durante 104.859 toneladas de LaS. En los últimos años se encontró una disminución en los valores de las exportaciones, debido principalmente a que el consumo interno de lácteos aumentó, evidenciado también por el incremento en las importaciones de productos lácteos procesados, cuyo precio incrementó en un 144% con respecto a importaciones hechas en el 2008 [2].

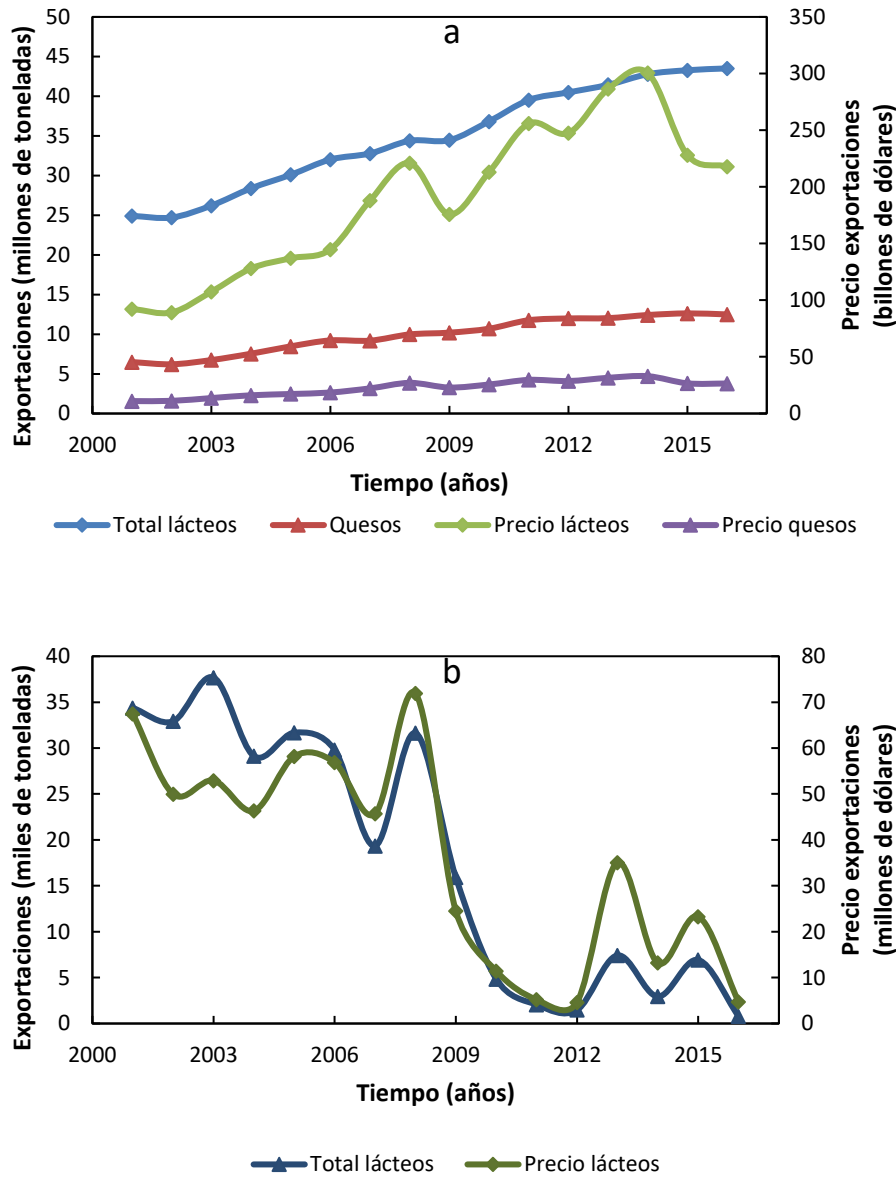


Figura 1-1. (a) Exportaciones mundiales de productos lácteos y queso, cantidad y precio, (b) Exportaciones colombianas de productos lácteos, cantidad y precio.

Fuente: Ministerio de Agricultura de Colombia [2], Trademap [4].

1.3 Subproductos de la industria láctea: lactosuero

Es posible encontrar gran cantidad de empresas dedicadas al procesamiento de productos lácteos alrededor del mundo y, junto con ellas, también es posible hallar

diferentes tipos de residuos generados durante los procesos, cada uno de ellos con composición y requerimientos de disposición específicos por provenir de diferentes etapas del proceso. Sin embargo, entre los principales residuos generados se encuentran los efluentes de las operaciones de higienización [29], que corresponden a residuos de la leche, soluciones con jabones, desinfectantes y otras sustancias de uso diario; además de estos, se encuentra el ya mencionado LaS proveniente de los procesos de obtención de quesos, mantequilla y caseína [30].

Aunque la mayor parte del LaS es agua, posee componentes orgánicos importantes que deben ser eliminados para evitar contaminación (carbohidratos, proteínas, grasa). Esta composición le confiere al LaS la posibilidad de ser aprovechado como ingrediente en la elaboración de otros productos, o como materia prima para la obtención de derivados de interés industrial.

En principio, el LaS es el líquido verde-amarillo resultante de la precipitación y remoción/eliminación de la fracción proteica (caseína) de la leche durante la elaboración del queso [31]. Después del agua, el mayor constituyente del LaS es la lactosa, que se encuentra en concentraciones entre 39 y 60 g/L; seguido de la grasa (0,99 – 10,88 g/L), la proteína (1,4 y 8,0 g/L) y los minerales (Tabla 1-1). El LaS puede ser obtenido de leche de cualquier origen, siendo la leche de vaca la más popular en los países occidentales [5]. Aunque sin importar el tipo o el origen del queso que se produzca, las fábricas generan importantes cantidades de suero que representan un impacto significativo en el ambiente [32].

La industria láctea produce diferentes tipos de suero que varían según el queso que se elabore, así, se puede obtener suero dulce de la coagulación enzimática de la leche, suero ácido obtenidos por coagulación ácida y suero salado que es obtenido después del formado y prensado de los quesos [33]. Como ya se mencionó, la producción de queso en Colombia es bastante importante y a ella está asociada una gran obtención de LaS.

Tabla 1-1. Composición media de minerales del LaS líquido (mg/100 g).

Mineral	Calcio	Hierro	Magnesio	Fósforo	Potasio	Sodio	Zinc
LaS dulce	47	0.06	8	46	161	54	0.13
LaS ácido	103	0.08	10	78	143	48	0.43

Fuente: USDA [34]

Por otro lado, el LaS posee una alta demanda en el país, pues es empleado tanto en preparaciones alimenticias como no alimenticias. Para la industria de alimentos LaSla resolución 2310 de 1986 [35] expedida por el Ministerio de Salud de Colombia regula el uso del LaS como materia prima, permitiendo adicionarlo en productos como la mantequilla de suero, algunos tipos de queso, arequipe, manjar blanco, postres y helados, previa higienización. Para este propósito, en el año 2013 se importaron en Colombia 12418 toneladas de LaS (tanto dulce como ácido) concentrado y en polvo, siendo los principales proveedores Estados Unidos, Argentina y Francia [4].

El precio estimado de las importaciones de LaS fue de 11.5 millones de dólares; es decir aproximadamente 0.92 USD por kg de producto. Cabe resaltar que las importaciones nacionales de LaS doblaron el valor de 2009, cuando se importaron apenas 4672 toneladas [4]. A pesar de las diversas aplicaciones del LaS en la industria nacional, la mayoría de las empresas lácteas colombianas eliminan este subproducto de manera inadecuada como vertimiento en corrientes de agua generando contaminación.

La industria láctea está en constante crecimiento lo que conlleva un incremento en la cantidad de efluentes que genera [36] que, en 2012 fueron 84700 toneladas [37], encontrándose alto contenido de grasa y lactosa provenientes del LaS, considerado el principal responsable del incremento de la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda biológica de oxígeno (DBO) de las aguas de vertimiento [5], [32]. Por tanto, una disposición inadecuada del LaS puede causar un exceso en el consumo de oxígeno y posterior toxicidad en el agua, así como impermeabilización y eutrofización de suelos [31]. Este panorama requiere la búsqueda de alternativas para disponer del LaS que den valor agregado y, reducir una de las mayores fuentes de contaminación de la industria alimentaria colombiana.

1.3.1 Alternativas de disposición del LaS como residuo

En Colombia, la mayor parte del LaS es vertido a ríos y quebradas sin realizar tratamiento previo, adicionalmente, son muy pocas las empresas que poseen la infraestructura para transformarlo en otros productos [38]. En este sentido, la legislación nacional colombiana, en la resolución 0631 de 2015 reglamenta “los parámetros y valores límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de agua superficiales y a los sistemas de alcantarillado público [...]”, con el fin de controlar el DQO de los residuos de

las industrias. Esta norma es de gran importancia para la industria al regular la composición de los vertimientos, en este caso de la industria quesera; particularmente, los componentes del LaS contienen un DQO elevado (79000 mg/L) cuando el suero se vierte directamente a las fuentes de agua.

El LaS es un residuo líquido y como tal se ha buscado su manejo y disposición con alternativas de bajo costo [5], [39]. Aunque algunas de las alternativas nos son amigables con el medio ambiente son las que más se emplean en el país, como el vertimiento en ríos aledaños y la disposición en los sistemas de aguas residuales de los municipios, otras para su aprovechamiento son la concentración y la venta para ser empleado en la alimentación animal [5]. Algunos de los tratamientos empleados para la disposición del LaS sobre los cuales se ha trabajado se muestran en la Tabla 1-2.

Aunque varios de los métodos van dirigidos a controlar de manera eficiente la contaminación causada por el LaS, disminuyendo los niveles de compuestos orgánicos en los vertimientos, el costo de estos procesos es elevado si se compara con el beneficio que de este podría obtenerse obtiene. En Colombia, los residuos líquidos provenientes de las fábricas son tratados de la misma manera sin importar su origen, con procesos de tratamiento que incluyen operaciones de coagulación-floculación [40]–[42], entre otros, por lo que los subproductos de la industria de alimentos no son aprovechados en su totalidad.

Tabla 1-2. Tipos de tratamientos empleados en la disposición del LaS a nivel industrial

Tipo de tratamiento	Técnica	Porcentaje de reducción de contaminantes	Concentración final del vertimiento
Biológico	Digestión anaeróbica	81 – 98% del DQO en reactor anaerobio de flujo ascendente	0,74 - 5 g L ⁻¹ [43]
		94.6 – 96.4% del DQO En reactor continuo de tanque agitado	No mostrado [44]
	Digestión aeróbica	≈ 89% del DQO en reactor de lotes secuenciales 94 – 97% del DQO en sistema de lodos activados	33 mg L ⁻¹ [45], [46] 0,45 g L ⁻¹ [47]
Fisicoquímico	Coagulación/floculación y precipitación	≈ 50% del DQO con sales de Fe y suero diluido.	1,8 mg L ⁻¹ [48]
	Procesos oxidativos	≈ 80% con peróxido de hidrógeno y Fe ³⁺	20 mg L ⁻¹ [49]
Construcción de humedales	Uso de plantas y microorganismos	76% del DQO con suero sin dilución	No mostrado [50]

Para reducir los contenidos de materia orgánica en vertimientos de la industria láctea, se han planteado alternativas para disponer el LaS y usarlo en el sector agropecuario. A continuación se describen algunas de estas alternativas.

1.3.2 Alternativas de aprovechamiento del LaS

Para ser aprovechado como ingrediente en las industrias alimentaria y farmacéutica, la principal forma de comercialización del LaS es en polvo. Las operaciones para su pulverización son sencillas, requiriendo una concentración seguida de una pulverización, lo que convierte al LaS en una materia prima versátil y de fácil acceso. Además, el empleo de operaciones previas de separación permite obtener productos derivados del LaS como concentrados de proteínas del LaS, hidrolizados de proteína, LaS desmineralizado, lactosa, galactosa y glucosa [51]. De las operaciones de separar las proteínas de suero se origina un nuevo residuo, el permeado (Per), rico en lactosa y sales minerales.

El bajo costo del LaS en polvo (0,92 USD/kg) permite que sea utilizado como adulterante de leche fresca debido a que no es fácilmente detectado a través de las pruebas de rutina en los laboratorios de control de calidad, pues éste es un constituyente natural de la leche [52]. La práctica común consiste en adicionar agua a la leche, y para compensar la reducción de los sólidos de leche se adiciona LaS en polvo [53]. Además de la adulteración de la leche fresca, otra técnica que se utiliza es la adición de sólidos a la leche en polvo. En ambos casos, las principales materias adulterantes son el suero en polvo y la sacarosa o la maltodextrina, que no aportan sabores extraños a la leche adulterada [54].

El LaS puede ser aprovechado en el sector agrícola para la elaboración de abonos y compostajes para diferentes cultivos [32], también en la elaboración de ensilajes y alimentos para bovinos y porcinos [55], [56]. Además, existen alternativas de aprovechamiento industrial del LaS. Junto con el amplio uso en la industria láctea y la diversidad de procesos en los que sus componentes pueden ser empleados, es posible usar el LaS (líquido, concentrado o en polvo) como materia prima en diferentes productos. En la industria de los alimentos infantiles y para lactantes, es quizás, donde mayor uso tiene el LaS. En Colombia, se permite su uso como ingrediente y/o vehículo de nutrientes en alimentos deshidratados (fórmulas infantiles) y alimentos esterilizados (compotas y

papillas), en cantidades que no superen 1,8 g de proteína por cada 100 calorías utilizables [57]. El uso de LaS es justificado en este tipo de alimentos debido a su similitud con las proteínas de la leche materna en niños lactantes con problemas de asimilación de alguno de sus componentes [38], [58].

Otro campo en el que el LaS tiene aplicación es el de los productos cárnicos. Su uso está permitido en Colombia como extensor cárnico para aplicaciones en polvo, según las Buenas Prácticas de Manufactura se puede usar un máximo de aporte de proteína láctea de 6% [59]. También se han realizado trabajos para evaluar su capacidad generadora de color, por ejemplo, Wójciak, Karwowska y Daltowsky [60], usaron el LaS junto con semillas de mostaza como aditivo para mejorar el color rojo en la elaboración de salchichas y evitar el uso de nitritos, encontrando que su uso en polvo, en concentraciones de hasta 1%, genera efectos favorables en el color.

A la par, el LaS ha sido usado como vehículo de sustancias bioactivas y/o microorganismos benéficos susceptibles a los ácidos estomacales, a través de procesos de emulsificación [61], encapsulación, microencapsulación y nanoencapsulación empleándolo solo o en mezcla con sustancias como alginatos [62].

Además de la posibilidad de uso del LaS como ingrediente, existen otras posibilidades para darle utilidad. A continuación, se mencionan algunos trabajos realizados en este tema.

1.3.3 Alternativas de valorización del LaS

Con el fin de generar valor agregado a partir del LaS, se han realizado estudios que evalúan la viabilidad de éste como sustrato para la obtención de productos de interés en la industria.

1.3.3.1 Producción de biomasa

Se han realizado trabajos acerca de la producción de biomasa de microorganismos que presentan interés industrial usando el LaS como sustrato para el crecimiento de bacterias (*Lactobacillus* y *Lactococcus*) o levaduras (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*) [63], aunque también se reportan trabajos sobre crecimiento de algas (*Scenedemus*

obliquus o *Chlorella protothecoides*) para producción de lípidos [64], pigmentos [65], biodiesel [66], entre otros.

El principal inconveniente que presenta esta alternativa es la necesidad de enriquecimiento del LaS debido a las necesidades nutricionales (azúcares, aminoácidos, vitaminas, minerales y oligoelementos) del microorganismo de interés. Entre los compuestos que se utilizan para suplementar el LaS se encuentran, azúcares simples (glucosa, fructosa) como fuente extra de carbono [31], [67]; extracto de levadura, harina de soya o sales de amonio como fuentes de nitrógeno; sulfato de manganeso, sulfato de magnesio, carbonato de calcio, otros minerales y vitaminas del complejo B, entre otros

1.3.3.2 Producción de ácido láctico

Se calcula que el 90% del ácido láctico producido a nivel mundial se obtiene por métodos biotecnológicos [68]–[71]. El ácido láctico es un ácido orgánico de tres carbonos que presenta dos isómeros activos (L y D) producidos en algunos casos de manera selectiva. El primero es el más importante a nivel biológico ya que puede ser metabolizado por el ser humano [72]. El ácido láctico es considerado por la FDA como GRAS y es utilizado ampliamente para aplicaciones en farmacología, en textiles y alimentos [73]. En la industria alimentaria tiene actividad acidulante y preservante ya que es capaz de reducir el pH inhibiendo el crecimiento de microorganismos con la ventaja de no conferir olores ni sabores extraños a los alimentos. También se ha utilizado ampliamente como materia prima en la elaboración de polímeros biodegradables (ácido poliláctico) usados principalmente como empaques/envases [74].

El costo del ácido láctico en Colombia es bajo, menor a 6.000 COP/Kg, y aunque es un producto de uso masivo en la industria, su producción presenta inconvenientes como la suplementación del medio para obtener rendimientos aceptables (11-52 kg/m³ de medio) [68], [75], [76] o las operaciones de separación necesarias para su producción, que según Gonzales *et al.* [71] representan el 86% de su costo total.

1.3.3.3 Producción de etanol

Una alternativa que podría presentar interesantes réditos económicos es la fermentación alcohólica del LaS porque reduce en un 75% su DQO, aunque el producto requiere de un tratamiento posterior de purificación [51]. Cuando se hace a partir del LaS, la fermentación puede realizarse con *Kluyveromyces marxianus* o *Kluyveromyces fragilis*,

debido a su capacidad de hidrolizar la lactosa (rendimientos de conversión de lactosa en etanol de hasta 53%), utilizando hasta un 95% de la lactosa del LaS [38], [51]. En el trabajo realizado por Gabardo *et al.* [77] se encontró un rendimiento del 51% en la conversión de lactosa a etanol usando células inmovilizadas de *K. marxianus* y *K. fragilis* en un reactor continuo. La producción industrial de etanol a partir de LaS se ha realizado con éxito en países como Irlanda y Nueva Zelanda, aunque se requiere de la aplicación de mejores tecnologías que hagan el proceso más eficiente y atractivo económicamente [78]. A pesar de la posibilidad de producir etanol del LaS a escala industrial, se debe tener en cuenta que también se produce industrialmente a partir de otras fuentes ricas en monosacáridos, por lo que se necesita evaluar la relación costo-beneficio de este producto. En Colombia el etanol tiene un costo de 2228,07 COP, lo que permite concluir que el LaS debería ser empleado en otras alternativas que generen mayor valor.

1.3.3.4 Producción de hidrógeno

El hidrógeno es un recurso energético considerado como energía limpia al no emitir dióxido de carbono y no contaminar suelos o fuentes subterráneas de agua; ha sido objeto de estudio como otra alternativa para el manejo del LaS [79]. La fermentación para obtención del hidrógeno se puede realizar a través de la producción de ácido acético, por microorganismos mesófilos o termófilos bajo condiciones de luz u oscuridad controladas [80]. La producción de hidrógeno puede ser llevada a cabo principalmente a través de tres rutas metabólicas: la rutas del ácido propiónico, ácido butírico o etanol [81]. Una de las ventajas que tiene esta fermentación, es que debido a su baja solubilidad, el hidrógeno puede ser fácilmente separado del medio de fermentación y ser directamente usado para producir electricidad a través de celdas combustibles [31]. Se estima que el rendimiento máximo en la producción de hidrógeno a partir de glucosa es de $11,6 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ [82]. Actualmente se ha trabajado mucho sobre el tema, sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no permiten considerar esta alternativa para una producción masificada de energía debido a sus bajos rendimientos. Además, aspectos como el origen del inóculo, periodos de adaptación de la biomasa y condiciones de operación de la fermentación aún deben ser estudiados con mayor profundidad [81], [83].

1.3.3.5 Producción de galactooligosacáridos

Los galactooligosacáridos (GOS) son moléculas constituidas por unidades de galactosa con grado de polimerización (DP) entre 2 y 9, unidas a una glucosa terminal.

Son considerados como prebióticos al ser metabolizados selectivamente en el intestino grueso por bacterias del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* [6]. Se encuentran naturalmente en la leche humana y bovina en cantidades muy pequeñas [23], [84] y pueden ser obtenidos por fermentación [7] o por síntesis enzimática usando β -galactosidasa [8]. Entre los beneficios relacionados con el consumo de GOS, se pueden mencionar la mejora en la colonización de la microbiota intestinal en niños lactantes, atribuida a la presencia de los oligosacáridos de leche humana (HMO) en la leche materna. Además, en adultos, se ha asociado el consumo de GOS con la reducción del riesgo de cáncer de colon y fortificación del sistema inmune [85]. El consumo de alimentos ricos en GOS permite que las bifidobacterias produzcan ácidos grasos de cadena corta como el butírico y propiónico, que favorecen el crecimiento y diferenciación de células epiteliales *in vivo* [9]. Otros efectos probados clínicamente incluyen una mejora en la absorción de minerales, reducción del riesgo de arteriosclerosis, alivio de la constipación, reducción del riesgo de diarrea asociada con infecciones gastrointestinales y reducción de los niveles de colesterol [86]–[89]. Un aspecto a resaltar en cuanto a la producción de GOS es el bajo costo de las materias primas y el alto valor del producto terminado (Tabla 1-3) comparado con el de otros oligosacáridos como los fructooligosacáridos (FOS), que son producidos a partir de jarabes ricos en fructosa, materia prima más costosa [11], [12]. Además de las propiedades beneficiosas para la salud, los GOS presentan propiedades fisicoquímicas deseables en la industria. Dentro de estas ventajas destaca la mejora en el sabor, el aporte de un ligero sabor dulce, ser incoloros y estables a amplios rangos de pH y a temperaturas de horneado [10].

1.3.4 Costo y complejidad de la obtención de los productos del LaS

En la Tabla 1-3 se encuentran los precios aproximados de venta (sin impuestos) de diferentes productos que pueden ser obtenidos a partir del LaS, desde el LaS en polvo que solo requiere para su obtención un secado por atomización, con un costo de producción bajo, pasando por productos como la biomasa bacteriana liofilizada y la biomasa fúngica, donde se requieren procesos de separación, secado y liofilización; o derivados del LaS más elaborados como etanol o ácido láctico, que requieren de operaciones largas y/o costosas para su separación, lo que incrementa considerablemente su costo de producción. Por otro lado se tienen los GOS, que poseen un alto valor comercial y son de gran interés debido a los beneficios que presentan para la salud humana, además que es

posible comercializarlos con diferentes grados de pureza dependiendo de la población a la que se dirija el producto [10].

Alternativas como las bacteriocinas, conservantes obtenidos a partir de algunas bacterias acidolácticas con creciente demanda, tienen un costo en el mercado que puede alcanzar los 100 USD por kilogramo con una pureza de 99%. También, el pululano, un polímero extracelular con demanda creciente debido a su aplicabilidad en diferentes industrias tiene un costo por kilogramo de 11,0 USD. En el caso del β -glucano, su precio varía con su pureza y dependiendo de si su origen es vegetal o microbiano, siendo más elevado en este último caso, entre 1,0 y 30,0 USD/kg. El ácido glucónico comercializado en su forma ácida o como sales de calcio, sodio o zinc, tiene un precio por kilogramo de 7,0 USD con una pureza de 99%.

Aparte de requerir procesos económicamente rentables, es necesario aplicar procesos que sean capaces de utilizar eficientemente los altos volúmenes de LaS generados en la industria láctea, por lo que la tecnología empleada para aprovecharlos debe cumplir con características como:

- No afectar considerablemente el medio ambiente,
- El costo del proceso de manejo y/o disposición sea bajo o nulo y
- Que brinde la posibilidad de obtener un valor agregado.

En la Tabla 1-3 se puede observar que el rendimiento de producción para hidrógeno por litro de suero lácteo es menor que los demás productos listados, si se evalúa además su valor comercial, sería necesario utilizar altas cantidades de LaS para producir hidrógeno en cantidades que puedan suplir una demanda comercial. También se observa que los rendimientos estimados más altos son para GOS, ácido láctico y etanol, sin embargo, el etanol y el ácido láctico presentan un costo bajo, y si se tiene en cuenta las operaciones de separación requeridas, es un producto que en el mercado local no sería viable producir.

Tabla 1-3. Costo del suero y de sus posibles derivados

Producto	Precio (COP)	Rendimiento (g/kg LaS)	Pureza del producto	Fuente	Complejidad del proceso de obtención*
LaS líquido	70,00 /L	-	100%	Fedegan (Col)	-
LaS en polvo	2.933,88 /kg	71.4	100%	Trademap	Baja
Disposición – Tratamientos anaeróbicos	- 10.000,00/L	-	-	Quiminet (Col)	Baja
Hidrógeno energético	7.315,14 /kg	2.34	100	National renewable energy laboratory (EU)	Media
Biomasa fúngica (<i>Saccharomyces sp.</i>) Liofilizada	10.612,00/kg	13.3	99%	Makro S.A (Col)	Media
Biomasa bacteriana (Bacterias acidolácticas) Liofilizada	21.990,00 /kg	15.5	99%	Centro Agrolechero (Col)	Media
Etanol	1.644,41 /L	24.5	99.50%	Fedebiocombus ti-bles (Col)	Alta
Ácido láctico (Grado alimentario)	5.220,88 /L	31.1	85%	Quiminet (Col)	Alta
GOS	27.054,90 /kg	21.9	50%	Clasado (UK)	Alta

*La complejidad del proceso de separación se refiere a la facilidad y cantidad de procesos requeridos para obtener el producto con la pureza requerida para su comercialización.

Por otro lado, aunque poseen menores rendimientos, pero un mejor precio, la biomasa de levadura y la biomasa bacteriana tienen interesantes valores de comercialización; sin embargo, la operación de liofilización que se requiere es costosa, lo que limita considerablemente una producción en masa de estas a partir del LaS. En este

sentido, el aprovechamiento de LaS en Colombia para la producción enzimática de GOS se constituye en una alternativa viable para la industria láctea, permitiendo reducir los volúmenes de sustancias vertidas a cuencas hidrográficas aledañas, reducir los índices de contaminación (DQO y DBO) causados por la carga orgánica presente en el suero y a su vez utilizar tecnologías accesibles para la producción de una materia prima de alto valor agregado e interés industrial y con interesantes perspectivas a nivel tecnológico y nutricional al proveer a las industrias alimentaria y farmacéutica de una materia prima que aporta grandes beneficios para la salud. En los siguientes apartados se indicarán los aspectos relacionados con los compuestos prebióticos y particularmente se incluye la información más relevante de la producción de GOS.

1.4 Carbohidratos prebióticos: galactooligosacáridos

Los carbohidratos prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles y suelen ser carbohidratos de cadena corta, entre los que están los oligosacáridos formados por 3-10 unidades de monosacáridos [9]. Los prebióticos son capaces de estimular selectivamente el crecimiento y/o el metabolismo de determinados grupos de bacterias que habitan en el intestino humano [90], [91]. De acuerdo con la FAO [92], un compuesto prebiótico debe cumplir con tres requisitos, el primero es la capacidad de resistir la degradación de los ácidos estomacales y no ser digerido en el intestino delgado, el segundo corresponde a poder ser fermentado por microorganismos intestinales y el tercero ser capaz de estimular de manera selectiva el crecimiento de microorganismos benéficos (*Lactobacillus sp*, *Bifidobacterium sp*, *Streptococcus sp*, entre otros). En la actualidad, existen muy pocos compuestos aceptados como prebióticos, entre ellos están la inulina, los FOS, la lactulosa y los GOS (Tabla 1-4). Las diferencias químicas entre ellos incluyen la longitud de la cadena, la composición en monosacáridos, el tipo de enlace y el grado de ramificación-[87]. Su resistencia a la degradación enzimática en el tracto digestivo humano radica en la incapacidad de los humanos de degradar ciertos enlaces glicosídicos, que permite que los oligosacáridos lleguen intactos al intestino grueso donde son fermentados por las bifidobacterias y algunas especies de lactobacilos [93], [94] para producir ácidos grasos de cadena corta que favorecen el crecimiento y diferenciación de células epiteliales *in vivo* [9].

Además de los oligosacáridos mencionados en la Tabla 1-4, existen otros que son obtenidos por hidrólisis enzimática de polisacáridos como el almidón; entre ellos se encuentran los isomaltoligosacáridos [89].

De un valor aproximado de 30 billones de dólares de ventas anuales de alimentos funcionales en los Estados Unidos, el 15,8% (4,74 mil millones de dólares) corresponde a la comercialización de alimentos destinados a fortalecer la flora intestinal (prebióticos y probióticos). Los mercados especializados en este tipo de productos proyectan ventas cercanas a 8,7 mil millones de dólares para el 2024 [95].

Tabla 1-4. Oligosacáridos con potencial prebiótico

Fuente	Oligosacárido	Composición
Plantas	Inulina – Fructooligosacáridos	Fructosa – Glucosa (t)
Leche	Galactooligosacáridos Lactulosa	Galactosa – Glucosa (t) Galactosa – Fructosa (t)
Almidones	Isomaltoligosacáridos	Glucosa – Glucosa (t)
Lactosa- sacarosa	Lactosacarosa	Galactosa – Fructosa - Glucosa
Soya	Soya-oligosacáridos	Galactosa – Glucosa (t) – Fructosa (t)
Plantas	Xilooligosacáridos	Xilosa – Xilosa (t)

Fuente: Cardelle *et al.* [6], Mussatto y Mancilha [87] y Paiboon *et al.* [89]
(t) Azúcar terminal

En el mercado mundial es posible encontrar GOS con diferentes grados de pureza (entre 50 y 99%), aspecto importante debido al interés de emplearlos en fórmulas para personas con diabetes, intolerantes a la lactosa o que simplemente requieren de consumo de alimentos de bajo aporte calórico. Los GOS son producidos a partir de caldos ricos en lactosa por síntesis enzimática con β -galactosidasa proveniente principalmente de *Bifidobacterium bifidum*, *Aspergillus oryzae* o *Kluyveromyces lactis* [23], [96]. Una ventaja que presentan los GOS sobre los demás oligosacáridos es la variedad en los oligómeros obtenidos durante la transgalactosilación (tri-, tetra-, penta-, hexa- GOS), en los que el tipo de unión glicosídica incide muy directamente en el efecto sobre la microbiota intestinal [97]. Algunas de las marcas comerciales de GOS actualmente disponibles son OLIGOMATE 5® (enlaces $\beta(1-6)$) y VIVINALGOS® (enlaces $\beta(1-4)$), que utilizan enzimas de *A. oryzae* y *Bacillus circulans*, respectivamente; y BIMUNO® (enlaces $\beta(1-3)$), elaborado con *B. bifidum*. Todos ellos tienen GOS con diferentes DP, aunque el porcentaje en que se

encuentran depende de factores como la fuente de la enzima, la concentración de lactosa y la temperatura empleados en su producción [13]. .

1.4.1 β -galactosidasa

Las reacciones de transgalactosilación para la producción de GOS son catalizadas por la enzima β -galactosidasa siendo la lactosa el sustrato [6], [91], [98]. La β -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23), también conocida como lactasa, está presente en gran variedad de fuentes naturales (plantas, animales, bacterias, mohos y levaduras). Sin embargo, la mayor parte de la producción de esta enzima es proveniente de *A. oryzae* y *K. lactis* [96].

La β -galactosidasa se emplea principalmente para la hidrólisis de la lactosa (en glucosa y galactosa) con el fin de facilitar la digestibilidad de la leche a la vez que aumenta su poder edulcorante y el de sus derivados. La β -galactosidasa, al igual que otras glicosidasas, realiza una doble función, la primera corresponde a la hidrólisis de la lactosa y la segunda a la formación de oligómeros a partir de los azúcares simples [99], razón por la cual su uso se ha extendido a la producción de GOS aprovechando su actividad transgalactosidasa [100], [101].

La estructura de la β -galactosidasa varía ampliamente dependiendo del microorganismo de origen (Figura 1-2), encontrándose estructuras monoméricas para el caso de los géneros *Penicillium*, triméricas para *Thermus thermophilus* o tetraméricas para *Escherichia coli*. A pesar de estas diferencias estructurales, se han encontrado nueve aminoácidos comunes, así como sodio o magnesio relacionados con el sitio activo de la β -galactosidasa [15].

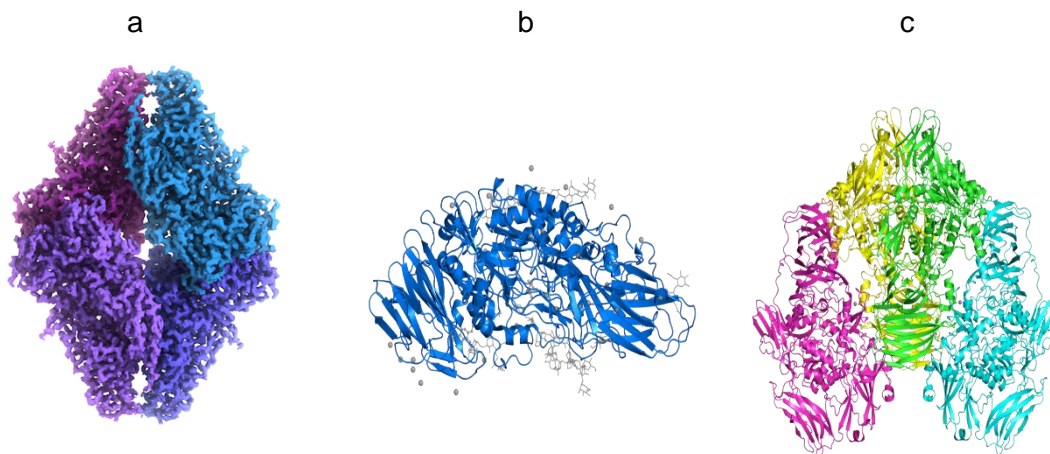


Figura 1-2. β -galactosidasa de diferentes orígenes.

a) *Escherichia coli* k-12, b) *Aspergillus oryzae* y c) *Kluyveromyces lactis*

Fuente: Protein data Bank en Europa (2017)

1.4.2 Síntesis de GOS

Los GOS pueden ser producidos por síntesis química a partir de azúcares simples [85], aunque el método más empleado es la catálisis enzimática. El proceso convencional para producción de GOS a partir de LaS involucra cuatro operaciones:

- Adecuación de la materia prima (pH, sólidos totales, iones, entre otros),
- Calentamiento hasta la temperatura de reacción de la enzima,
- Desarrollo de la reacción, (transgalactosilación) y,
- Purificación de los GOS.

El mecanismo de producción de GOS usando la β -galactosidasa es generalmente explicado a través de un proceso de tres pasos (Figura 1-3). El primero consiste en la unión del sustrato a la enzima; en el segundo paso ocurre la ruptura de la molécula de lactosa; el paso final depende del tipo de aceptor, si es agua, la galactosa es liberada. Sin embargo, si es un azúcar (galactosa), ocurre la oligomerización de las unidades de galactosa unidas a una glucosa terminal [14], [90] para formar GOS [102], [103] en condiciones específicas de alta concentración de sustrato [90].

Según Torres *et al.* [13] la reacción de transgalactosilación es una reacción cinéticamente controlada, lo que significa que existe una competencia entre la hidrólisis y la transgalactosilación, en la cual la hidrólisis está termodinámicamente favorecida. Sin

embargo, bajo condiciones de alta concentración de lactosa el equilibrio se desplaza hacia la transgalactosilación, produciendo oligómeros a partir de la D-glucosa y la D-galactosa, o simplemente realizando una transferencia interna de la galactosa de la posición 4 a la posición 6 de la glucosa, formando la alolactosa, en este caso no se produce la liberación de la glucosa [10]. Para la producción de GOS, se busca que la enzima empleada posea una alta capacidad de transgalactosilación, es decir, una alta velocidad de polimerización de las moléculas de galactosa [104]; esta actividad viene dada por diferentes factores, entre ellos se pueden mencionar el pH, la temperatura o la presencia de iones en el medio de reacción. En este mismo sentido, al encontrarse ampliamente distribuida en la naturaleza, su actividad y condiciones de proceso varían de una especie de microorganismo a otra. Incluso dentro de la misma especie existe una variación en su actividad.

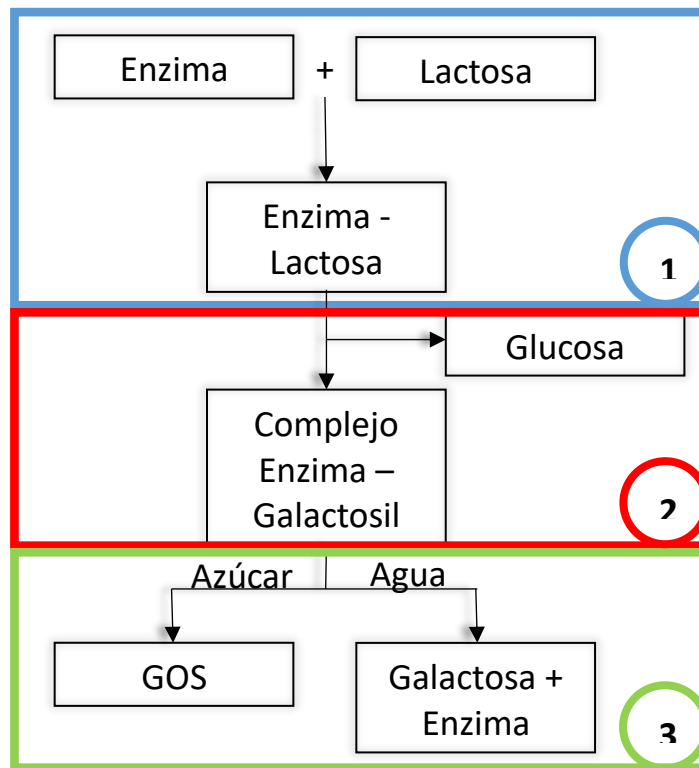


Figura 1-3. Mecanismo de acción sugerido para la β-galactosidasa.

Fuente: Byfield *et al.* [15], Lamsal y Buddhi [90].

1.4.3 Factores que afectan los rendimientos en la producción de GOS

Para que la β -galactosidasa sintetice GOS, es necesario ajustar sus condiciones de trabajo, es decir, suministrar a la enzima un ambiente que favorezca la reacción de transgalactosilación. Son varios los aspectos que se deben controlar para que la enzima reaccione adecuadamente y lograr los rendimientos deseados.

1.4.3.1 Contenido de agua del medio

Las reacciones enzimáticas ocurren naturalmente en medios con alto contenido de agua; sin embargo, la presencia de agua en el medio con lactosa no favorece el rendimiento de la reacción de transgalactosilación [105]. Debido a lo anterior, cuando el proceso de transgalactosilación ocurre en sistemas acuosos, esta reacción debe competir con la hidrólisis de la lactosa, encontrándose en el medio final altas concentraciones de galactosa y glucosa [101]. Para reducir el contenido de agua del medio reactante se han propuesto como alternativas aumentar la concentración de lactosa del medio, uso de fluidos presurizados (CO_2 , propano, n-butano) o desarrollar la reacción en solventes orgánicos, buscando cambiar su equilibrio.

Manera *et al.* [106] utilizaron CO_2 supercrítico, propano y n-butano presurizados como medio para obtener GOS a partir de lactosa (300 g/L) y células inmovilizadas de *K. marxianus* como fuente de β -galactosidasa, obteniendo rendimientos que oscilaron entre 21 y 28 %.

Por otro lado, Srisimarath y Pongsawasdi [107] encontraron que la reacción de lactosa (5.13 g/L) disuelta en solventes orgánicos como el 1,4 butanodiol, 1,5 pentanodiol, MEA (Metil-etil amina), TEP (Tri-etil fosfato) y acetonitrilo junto con un liofilizado de β -galactosidasa y β -ciclodextrina, presentaba un rendimiento del 47%, ofreciendo un importante potencial para su aplicación en la obtención de GOS en sustratos con bajo contenido de agua.

1.4.3.2 Presencia de iones en la reacción

Diversos estudios han mostrado cómo la presencia de algunos iones es capaz de afectar la actividad de la β -gal durante la producción de GOS. Dependiendo del origen de la enzima, la presencia de estos iones puede activar la reacción, o por el contrario puede ralentizarla o incluso detenerla [85]. Según reporta Aehle [108], la presencia de iones de

potasio y magnesio funciona como activador de la reacción de hidrólisis cuando se utiliza β -gal obtenida de *K. lactis*, mientras que en presencia de iones de calcio, sodio, zinc o cobre, la enzima se ve inhibida, sin embargo, estos reportes son dados para bajas concentraciones de los iones y no se reporta información para las cantidades a las cuales se encuentran estos minerales en el lactosuero. Por otro lado, Nguyen *et al.* [109] indicaron que para la β -gal de *Lactobacillus reuteri* los iones de sodio, potasio y manganeso actúan como activadores, mientras que los iones de hierro, calcio, cobre y zinc actúan como inhibidores de la enzima. De igual manera, Batra *et al.* [110] reportan que para *Bacillus coagulans* el EDTA es un activador. Según lo dicho anteriormente, existen resultados contradictorios del efecto de los diferentes minerales presentes en el LaS sobre la actividad de la β -gal, además no está claro si este efecto inhibitorio se relaciona solamente con la actividad hidrolítica de la enzima, o también afecta su capacidad de transgalactosilación.

El LaS, una de las materias primas del proceso de obtención de GOS, tiene una elevada cantidad de iones (Tabla 1-1) en su composición por lo que es indispensable conocer su efecto sobre el proceso que se quiere desarrollar.

1.4.3.3 pH y temperatura de reacción

Como se mencionó anteriormente, la estructura de la β -galactosidasa depende de la fuente de la cual es obtenida; esto lleva a que cada enzima presente diferentes condiciones de pH y temperatura óptimas para la reacción de transgalactosilación. En el caso de la temperatura, su efecto sobre la producción de GOS es explicado a través de la ecuación de Arrhenius [99]. El intervalo óptimo de temperatura para la mayoría de las β -galactosidasas se encuentra entre 30 y 50 °C; temperaturas más altas conducen a la desnaturalización de la enzima [111], sin embargo, las enzimas provenientes de microorganismos termófilos pueden soportar temperaturas superiores a los 70 °C [15].

En cuanto al pH, la producción de GOS a partir de enzimas obtenidas de diferentes microorganismos se ha realizado con pH entre 5,0 (*B. circulans*, *B. bifidum*, *Bacillus* sp.) y 7,5 (*Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterobacter agglomerans*) para enzimas provenientes de bacterias que presentan mayor actividad en este intervalo de pH. También, cuando la enzima se obtiene de eucariotas como mohos y levaduras es posible encontrar actividad en un intervalo más amplio, que oscila entre 3.7 (*Sporobolomyces singularis*) y 7,0 (*K. lactis*).

Aunque el pH y la temperatura afectan la actividad enzimática, Boon *et al.* [99] afirmaron que para la β -galactosidasa estos dos factores no son tan importantes comparados con el efecto ejercido por la cantidad inicial del sustrato de la reacción. Sin embargo, Guío [112] encontró que el pH tiene un efecto considerable para la β -galactosidasa de *K. lactis*. En los resultados reportados se sugiere que existe un punto óptimo de pH a 6,0, ya que valores mayores y menores de pH conducen a una reducción de la actividad de la enzima.

1.4.3.4 Concentración de sustrato

Se han encontrado porcentajes de conversión variados: 17% m/v de GOS con una concentración inicial de 25% de lactosa a 40 °C ó 36% m/v de GOS a partir de 38% de lactosa a 40°C con enzimas de microorganismos mesófilos. Para el caso de enzimas de termófilos se tienen rendimientos de conversión de 45% (m/v) de GOS con 70% de lactosa a 95°C y enzima de *Pyrococcus furiosus* [85].

Se ha descrito inhibición de la actividad de la β -gal causada por la concentración de sustrato; Palai y Bhattacharya [113] evaluaron el rendimiento en la formación de GOS a partir de un medio con concentraciones a partir de 5% m/v de lactosa y β -galactosidasa de *B. circulans*. Según los autores, existe inhibición debida a la alta concentración de glucosa en el medio a medida que avanzaba la reacción. En cualquier caso, concluyeron que se trataba de una inhibición no competitiva, lo que permitiría deducir que la identificación y control del agente causante de dicha inhibición podría ayudar a mejorar los rendimientos de producción de GOS.

La temperatura de reacción de la mayoría de las enzimas comercialmente disponibles (por ejemplo *K. lactis* o *A. oryzae*) varía entre 30 y 50°C. En este intervalo de temperatura, la lactosa posee una solubilidad en agua muy baja (35 – 40 % m/v) comparada con azúcares como glucosa o sacarosa, limitando la cantidad de sustrato que entra en contacto con la enzima [13]. Atendiendo a esto, el uso de enzimas termoestables permitiría trabajar a temperaturas más altas y por lo tanto solubilizar mayor cantidad de lactosa disuelta en el medio.

1.4.3.5 Inhibición por producto

Las reacciones de transgalactosilación presentan una mayor eficiencia en medios concentrados en lactosa, por esta razón, lo ideal es suplementar el medio con el mayor

porcentaje posible de lactosa (hasta alcanzar el límite de solubilidad) como sustrato para aumentar la concentración de producto obtenido, lo que conduciría a obtener rendimientos de producción altos. Sin embargo, el aumento de los monosacáridos producidos por la reacción de transgalactosilación puede producir inhibición [114]–[116]. Este tipo de inhibición es un aspecto particularmente limitante para el adecuado desempeño de la enzima durante la reacción, por lo que al dar solución a este problema se incrementaría el rendimiento de la conversión de lactosa en GOS, aumentando a su vez la rentabilidad del proceso. En este sentido, se han publicado varios estudios, aunque los resultados mostrados son contradictorios.

Diferentes modelos cinéticos se han propuesto para explicar el comportamiento de la β -galactosidasa [114]; en ellos se plantea una inhibición por los productos intermedios de la reacción (glucosa y/o galactosa). De acuerdo con varios autores [114], [115], [117]–[119], durante el proceso de hidrólisis de la lactosa y la síntesis de GOS, la galactosa generada actúa como inhibidor competitivo de la enzima, disminuyendo las velocidades de la reacción. De acuerdo con Chockchaisawasdee *et al.* [120], durante el proceso de obtención de GOS a partir de lactosa usando β -galactosidasa de *K. lactis* se presentan dos tipos de inhibición, competitiva causada por la galactosa generada y otra no competitiva debida a la presencia de glucosa con el avance de la reacción.

De igual forma, Neri *et al.* [121] encontraron que los monosacáridos presentes en el medio inhiben la reacción de transgalactosilación lo que reduce los rendimientos en la producción de GOS, esto en medios con 50% m/v lactosa inicial y enzima de *A. oryzae*. En este mismo sentido, la presencia de glucosa en el medio inicial causa inhibición, afectando tanto la hidrólisis de la lactosa como la formación de GOS. Vera *et al.* [122] reportaron en su trabajo, que cuando existe una concentración inicial de galactosa, ésta produce un efecto inhibitorio, mientras que cuando se usa glucosa inicial en concentraciones inferiores a 200 mmol/kg se ejerce un efecto potenciador sobre la producción de GOS, aunque según afirman los autores, al aumentar su concentración su efecto es inhibitorio.

De otro lado, Goulas, *et al.* [100] evaluaron el efecto ejercido por la glucosa y la galactosa como subproductos en la síntesis de GOS a partir de lactosa y LaS (45 – 50% m/v de lactosa) encontrando que para β -galactosidasa de *B. bifidum*, los dos

monosacáridos estudiados no ejercen un efecto inhibitorio, por el contrario incrementaron la producción de GOS de más de tres unidades de polimerización.

1.4.4 Operaciones de separación de GOS

Una de las razones por las cuales se requiere GOS de alta pureza es que aproximadamente el 70% de la población mundial es intolerante a la lactosa [10], aunque en Colombia esta cifra alcanza el 50% [123], por lo que presentar al consumidor una mezcla de GOS que contenga monosacáridos y lactosa residual de la reacción puede comprometer el éxito comercial y la eficacia del producto ante los consumidores. Con respecto a las operaciones de separación de los GOS se han empleado diversas técnicas que buscan reducir sus impurezas, entre ellas se encuentran la nanofiltración con las que es posible retirar 90% de los monosacáridos y hasta 52% de la lactosa [18], separación con solventes como etanol que logran una recuperación del 97,5% de GOS [17], cromatografía de intercambio iónico [13], uso de fluidos supercríticos como el dióxido de carbono [106], o fermentación selectiva con levaduras que son capaces de obtener GOS con una pureza del 95% [124]. Sin embargo, la mayoría de estas operaciones son costosas.

De lo dicho anteriormente, es claro que la presencia de lactosa residual y los monosacáridos dificultan las operaciones de separación subsecuentes a la transgalactosilación; por tanto, se requiere de la utilización de un proceso que permita generar valor agregado a los productos no deseados de la transgalactosilación. Por otra parte, esto podría reducir la inhibición por producto en la producción de GOS, facilitar las operaciones de purificación posteriores, así como reducir los costos de operación. En este sentido, una de las alternativas es la intensificación de procesos.

1.5 Intensificación de procesos

La producción de materias primas y productos para industrias alimentaria, farmacéutica y química a través de procesos más limpios y tecnologías amigables con el medio ambiente ha sido una de las preocupaciones de los científicos en los últimos años. A este tipo de tecnologías que requieren de un menor uso de energía, rutas flexibles, no contaminantes y de menor consumo de materiales y mano de obra que los procesos tradicionales se les denomina procesos intensificados [125], [126].

Aunque no existe un consenso acerca de su definición exacta, los procesos intensificados se consideran como un “desarrollo revolucionario de nuevos productos y/o procesos que aseguran el consumo reducido de materiales y energía, así como la reducción del impacto ambiental a la par que ofrecen gran flexibilidad en su escala de operación” [127]–[129]. Esta intensificación de procesos puede darse por dos factores: equipos y métodos. En el primer factor se incluyen tanto procesos reactivos como no reactivos, mientras que el segundo incluye sistemas multifuncionales, separadores híbridos, así como nuevas fuentes de energía [129]. Particularmente, en la producción de diferentes compuestos a través de bioprocesos se emplean operaciones costosas que usan sustancias químicas altamente contaminantes durante las fases de separación, en donde la intensificación es una alternativa para el diseño de procesos más eficientes [130].

En intensificación de bioprocesos se han empleado varias técnicas. En la literatura científica es posible encontrar procesos de reacción-separación como reactores de membranas de micro y nanofiltración acoplados a la fermentación con microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*) para la obtención de productos como etanol [131] y ácido láctico (*Lactobacillus delbrueckii*) [125]. Otro proceso que aplica la intensificación de bioprocesos es la producción de ácido glutámico con bacterias como *Corinebacterium glutamicum* y su posterior separación con membranas o electrodiálisis [127]. Otro ejemplo es la producción convencional de L-lisina por lotes donde se reportan modificaciones en un sistema continuo, logrando una disminución de 10 horas en el desarrollo del proceso, a través del acoplamiento de un sistema de separación por intercambio iónico, seguido de un proceso de secado por aspersion [132].

En el caso de la producción de GOS se podría realizar una intensificación en lo referido a la eliminación de la glucosa residual. En el Anexo A se muestra una comparación de las diferentes alternativas para el aprovechamiento de la glucosa residual obtenida tras la síntesis enzimática de GOS. La transgalactosilación de la lactosa para la producción de GOS podría ser compatible con la oxidación de glucosa por la glucosa oxidasa teniendo en cuenta diferentes variables, tal y como se indica a continuación.

1.5.1 Producción de ácido glucónico

Como ácido glucónico se conoce al ácido carboxílico formado por la oxidación del primer carbono de la glucosa [133] Este ácido es obtenido a partir de la glucosa por medio

de la oxidación ya sea con catalizadores químicos [134], microorganismos [135] o por síntesis enzimática [136], siendo ésta última la que más se emplea debido a la alta especificidad del producto obtenido. El ácido glucónico y sus sales son ampliamente usados en diferentes industrias [137], [138]. Los principales exportadores de ácido glucónico a nivel mundial son China, Francia e India, con exportaciones por valor de 180, 98 y 24 millones de dólares en 2016 y un comercio global de 207.000 toneladas. Colombia es consumidor de esta materia prima, de la que en 2016 importó 2.159 toneladas, equivalente al 1,04% del total de exportaciones mundiales [4].

Las condiciones de operación para la producción de ácido glucónico por vía enzimática presentan una alta compatibilidad con la producción de GOS cuando se produce en un sistema de tanque agitado por los motivos siguientes:

- Es posible obtener el ácido glucónico por síntesis enzimática.
- El pH y temperatura de las enzimas (glucosa oxidasa y catalasa) están en el intervalo de aquellos requeridos por la β -galactosidasa.
- La glucosa oxidasa es una enzima que presenta una alta estereoespecificidad al requerir como sustrato únicamente a la β -D-glucosa, dejando los demás azúcares sin reaccionar.
- La obtención enzimática de ácido glucónico evita procesos de separación de biomasa y metabolitos formados durante la fermentación que pueden interferir la reacción.

1.5.1.1 Propiedades y usos del ácido glucónico

El ácido glucónico es de especial interés por sus propiedades fisicoquímicas entre las que es posible mencionar su baja corrosividad, poca o nula volatilidad, inocuidad y ligero poder acidificante [20]. Adicionalmente, algunas características como la capacidad de formar complejos di- o tri-valentes con moléculas de alta masa molecular o su habilidad como quelante, permite su uso en varias industrias químicas [19]. En la industria de alimentos es particularmente utilizado debido a su capacidad de prevenir la formación de piedras durante el procesado de la leche, capacidad leudante, así como su habilidad de conferir un sabor ligeramente ácido y refrescante en bebidas.

El ácido glucónico y sus sales pueden ser usados en diferentes industrias, entre ellas es posible mencionar la farmacéutica, alimentaria, textil, detergente, curtiembre y fotografía, entre otras [138].

En la industria textil, de fibras, pinturas y cosméticos, el ácido glucónico es usado debido a que éste incrementa la hidrofobicidad y biodegradabilidad del polidimetilsilaxano, un tipo de silicona usado como surfactante [139]. También, en procesos de bio-remediación ambiental, el ácido glucónico ha sido empleado debido a su habilidad como secuestrante de metales pesados (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) [140].

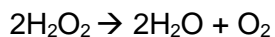
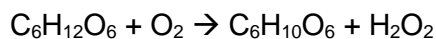
Sin embargo, es en la industria farmacéutica y de alimentos, donde el ácido glucónico presenta un uso más amplio. La FDA ha reconocido al ácido glucónico como una sustancia GRAS, además, el parlamento europeo lo permite como aditivo (E574) [19]. Este ácido es utilizado ampliamente en productos de horneados, derivados lácteos y la industria de bebidas refrescantes [19], [20].

1.5.1.2 Obtención de ácido glucónico

El método de obtención más común es la fermentación con *Aspergillus niger*. Este proceso es bien conocido y conlleva la utilización de medios con glucosa y/o residuos industriales ricos en este monosacárido [135], [138]. También se ha intentado la producción de este ácido como metabolito de diferentes microorganismos como *Gluconobacter diazotrophycus* [141]; sin embargo, el uso de microorganismos resulta en tiempos de fermentación largos (50 -70 h). Asimismo, se ha intentado su producción usando catalizadores químicos, entre ellos platino, bismuto-paladio o bismuto-paladio-platino; aunque el uso de éstos genera reacciones alternas indeseables como isomerización de carbohidratos o inactivación del catalizador que conduce a la reducción de la productividad, disminuyendo su utilidad comercial [142].

Por otro lado, es posible usar directamente la enzima que induce la reacción, reduciendo los requerimientos de energía y la producción de contaminantes en comparación con la síntesis química; además se facilita la separación del producto a diferencia de lo que ocurre en el caso de la utilización de microorganismos que requiere retirar la biomasa y los otros metabolitos generados haciendo ineficiente el proceso [137], [138], [143].

La enzima empleada en la oxidación de la glucosa a ácido glucónico es la glucosa oxidasa (E.C. 1.1.3.4); mientras la catalasa (E.C. 1.11.1.6) descompone el H₂O₂ que inactivaría a la glucosa oxidasa. Ambas son mostradas en la figura 1-4, la primera está formada por dos glicoproteínas unidas por puentes disulfuro, cada unidad contiene un ion ferroso y un grupo prostético FAD. Esta enzima tiene como función transformar la glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno [138]. La segunda, una hemoproteína que contiene cuatro grupos hemo, es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno [144]. La reacción general para la producción del ácido glucónico es la que se muestra a continuación:



De acuerdo con Ramachandran *et al.* [20], bajo las condiciones apropiadas, es posible convertir casi el 100% de la glucosa en ácido glucónico por vía enzimática, con la ventaja de no requerir procesos adicionales de purificación si se inmoviliza la enzima o se trabaja en un reactor de membrana. Según Sheu *et al.* [145] las condiciones ideales de operación se encuentran a una temperatura de 37 °C, suficiente aireación (5 L/min) y agitación y pH mínimo de 5.5.

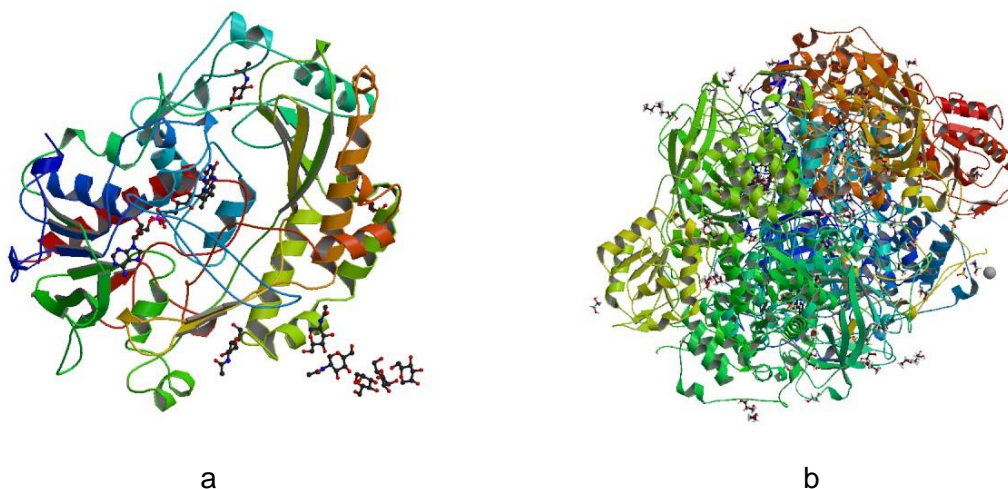


Figura 1-4. Estructura de (a) la glucosa oxidasa recombinante de *A. niger* y de (b) la catalasa de *E. coli*.
Fuente: *Protein data Bank* en Europa (2017).

Al proponer como alternativa el aprovechamiento de la glucosa residual del proceso de transgalactosilación para la producción del ácido glucónico, es posible que exista

interacción entre las enzimas o que los productos de las reacciones inhiban a la β -galactosidasa. En este caso, se ha encontrado que al pH de reacción de la β -galactosidasa, es posible precipitar el ácido glucónico, por ejemplo, como gluconato de calcio; además, se ha reportado que algunas enzimas presentan susceptibilidad a agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, aunque la β -galactosidasa producida por algunas especies de *Kluyveromyces* poseen mayor resistencia a estos agentes, a diferencia de la enzima obtenida de microorganismos del género *Thermus sp.* que presenta susceptibilidad a concentraciones de peróxido de hidrógeno superiores a 0,6% [146]. Por tanto, se deben controlar parámetros como el pH de reacción o concentración de peróxido generado para que estos no afecten la actividad de la β -galactosidasa en un sistema mixto de enzimas.

1.5.2 Aplicación de US en reacciones enzimáticas

Además de lo ya mencionado anteriormente, existen tecnologías no tradicionales como los ultrasonidos de potencia (US) que están siendo estudiadas desde hace algún tiempo en procesos biotecnológicos. A continuación, se hace una breve reseña de esta tecnología emergente.

El uso de US fue reportado desde 1927 para acelerar la velocidad de reacción para la producción de gran variedad de compuestos químicos, a través de una subdisciplina denominada sonocatálisis [147]. Más recientemente, en las últimas dos décadas, se ha estudiado el efecto de los US en las reacciones enzimáticas [148], [149] encontrando resultados variables, favorables y desfavorables, durante la síntesis de diferentes compuestos.

Los US se definen como ondas sonoras con frecuencias por encima de aquellas percibidas por el oído humano [150], generalmente entre 20 kHz y 5 MHz [151]. Los US podrían ser ampliamente usados en diversas áreas de la industria, tanto en procesos químicos como bioquímicos. En éste último, particularmente en reacciones enzimáticas, numerosos estudios han mostrado que los US pueden incrementar o disminuir la actividad de la enzima [152]. Además, esta tecnología tiene la particularidad de ser ambientalmente amigable, así como de promover cierto tipo de reacciones, acortando el tiempo de procesamiento [153].

1.5.3 Aplicaciones de los US

Los procesos convencionales de síntesis química de compuestos generalmente precisan altas temperaturas, conducen a largos tiempos de reacción, bajos rendimientos, altas cantidades de agentes que pueden ser tóxicos o muy caros, resultando procesos demasiado costosos [151]. Hay estudios en que los US se han usado en fermentaciones lácticas, donde son capaces de estimular el crecimiento de bacterias, reduciendo sus tiempos de fermentación [150], [154]. En la industria láctea, los US de baja frecuencia (20 – 100 kHz) y alta intensidad han sido ampliamente usados en procesos de emulsificación. En la industria de frutas y hortalizas los US han sido evaluados para incrementar la calidad de fresas y zanahorias antes y durante procesos de deshidratación, mostrando adicionalmente compatibilidad con otras operaciones usadas en este proceso [155], [156]. En la extracción de compuestos con actividad biológica como son los antioxidantes, la aplicación de US ha sido de especial interés y brinda nuevas perspectivas para incrementar los rendimientos en estos procesos. Este es el caso de la extracción de antocianinas de la mora azul [157] y compuestos fenólicos en borra de café [158].

La aplicabilidad de los US ha crecido en los últimos años, a pesar de ser una tecnología con casi un siglo de existencia [150], siendo la catálisis enzimática una de las aplicaciones más estudiadas.

1.5.4 Efecto de US sobre las enzimas

Algunos sistemas reactivos, incluyendo aquellos que involucran enzimas, presentan inconvenientes en términos de resistencia a la transferencia de masa, requiriendo largos tiempos de reacción y obteniéndose bajos rendimientos. Además, cuando se trata de suspensiones de sólidos en un medio líquido, se presentan problemas de aglomeración de partículas, así como de reducción de área superficial que afectan significativamente el progreso de la reacción [151].

Como es conocido, parte de la actividad de las enzimas depende de la naturaleza del medio de reacción y puede mejorarse en presencia de US, aunque no se conocen con certeza los mecanismos implicados [159]. Cabe anotar que el efecto sobre la enzima depende en gran medida de los parámetros generales de sonicación, como la intensidad de la radiación ultrasónica, y de la enzima con la cual se está trabajando [160]. Se sabe que cuando los US de potencia se propagan en un líquido se generan burbujas debidas a

los cambios de presión en el medio, es decir, cavitación (formación, crecimiento e implosión de pequeñas burbujas durante la propagación de las ondas de ultrasonido) que se produce en el medio [161]. Varios efectos de los US son atribuidos a los fenómenos de cavitación en medios acuosos. El colapso de las burbujas ocurre tan violentamente que resulta en un incremento puntual de presión y temperatura [162]. Además de la cavitación, existen otros efectos físicos en el medio, entre ellos se puede mencionar el incremento en la turbulencia asociada a la circulación del líquido que incrementa la transferencia de masa [151]. Específicamente en los sistemas enzimáticos, se ha encontrado que los US empleados en condiciones de bajas frecuencias y bajas intensidades son capaces de incrementar la velocidad de reacción, así como minimizar el efecto inhibitor y permitir usar soluciones muy concentradas de sustrato, este es el caso de soluciones concentradas de algunos azúcares [160].

2.Planteamiento del problema

El LaS es un subproducto de la industria láctea que se genera en grandes cantidades. La pequeña y mediana empresa colombiana lo utilizan en alimentación animal, compostaje y en menor proporción para deshidratación y aprovechamiento en algunos productos donde su uso es permitido. Sin embargo, la mayor parte del LaS es vertido a ríos y quebradas generando problemas de contaminación ambiental. Es posible reducir este problema al aprovechar el LaS para obtener derivados que generen valor agregado, este es el caso de los GOS, oligosacáridos con actividad prebiótica de gran interés por sus propiedades para la salud.

Los rendimientos reportados para la síntesis de GOS son bajos (el rendimiento típico está estimado entre 30% y 40%) [14] si se comparan con los obtenidos en la producción de oligosacáridos como los FOS (con valores cercanos a 70%) [15], debido a la inhibición ejercida por la glucosa y la galactosa generadas durante la reacción.

A medida que la β -galactosidasa actúa sobre el medio rico en lactosa, la enzima está sintetizando GOS e hidrolizando lactosa simultáneamente [14], en consecuencia, el medio resultante de la reacción de transgalactosilación es un caldo rico en GOS, lactosa que no reaccionó y monosacáridos (glucosa y galactosa). Estos últimos pueden causar inhibición de la reacción, por lo que es necesario determinar su efecto sobre la actividad enzimática de la β -galactosidasa empleada y en general sobre la producción de GOS para aumentar los rendimientos observados [121].

El contenido de azúcares residuales en el medio resultante del proceso de producción de GOS es elevado, lo que crea la necesidad de un proceso de separación que permita remover la mayor cantidad de estos productos y obtener GOS con mayor pureza. Esta pureza es necesaria para los mercados a los cuales van dirigidos estos prebióticos (productos para tratamientos de control de la diabetes, alimentos para personas con

intolerancia a la lactosa o alimentos para dietas bajas en calorías), elevando el costo del producto final.

En trabajos como los realizados por Sheu *et al.* [145], Kehong *et al.* [136] y Zhao *et al.* [163] se han empleado sistemas mixtos de enzimas para la mejorar la eficiencia de los procesos y facilitar la separación de diferentes productos de interés industrial encontrando resultados favorables por ejemplo para la producción de ácido glucónico a partir de almidón o fructooligosacáridos a partir de sacarosa. Un sistema mixto de enzimas que permita aprovechar los subproductos de la transgalactosilación es una alternativa para aumentar el rendimiento de GOS facilitando a su vez la separación en busca de reducir tiempos y costos de proceso.

2.1 Problema de investigación

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, el aprovechamiento del LaS para la producción de GOS es una tecnología que requiere mejorar sus condiciones de proceso para hacerla más atractiva en comparación con la producción de otros oligosacáridos. Por tanto, en esta propuesta de investigación se plantea resolver el siguiente problema de investigación:

“Evaluar un sistema mixto de enzimas para producir GOS y ácido glucónico e incrementar los rendimientos en la reacción de transgalactosilación a partir del lactosuero como fuente de lactosa”

2.2 Hipótesis

La hipótesis general que surge como respuesta al problema planteado es: ***“el uso de la glucosa residual para la obtención de ácido glucónico a través de un sistema mixto de enzimas es una alternativa para reducir la inhibición de la reacción de transgalactosilación e incrementar los rendimientos de GOS a partir del lactosuero, creando valor agregado en la industria láctea colombiana”***.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Evaluar un sistema mixto de enzimas para la producción de galactooligosacáridos y ácido glucónico que permita incrementar los rendimientos en la reacción de transgalactosilación a partir del lactosuero como fuente de lactosa.

2.3.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto inhibitorio de los monosacáridos generados durante la transgalactosilación de la lactosa sobre la actividad enzimática de la β -galactosidasa.
- Evaluar el efecto ejercido por la presencia de proteínas e iones del lactosuero sobre la actividad enzimática de la β -galactosidasa y la glucosa oxidasa.
- Determinar la cinética de la β -galactosidasa y la glucosa oxidasa durante el proceso producción de galactooligosacáridos y ácido glucónico a partir de lactosa y lactosuero.
- Determinar rendimientos de producción de GOS y ácido glucónico en un sistema mixto de enzimas a partir de lactosuero.

3. Materiales y métodos

3.1 Muestras y reactivos

Las enzimas utilizadas para llevar a cabo el proyecto fueron HA-Lactase® 5200, una β -galactosidasa obtenida de la levadura *K. lactis* y proporcionada por la empresa Chr Hansen (Dinamarca) de fácil acceso en el país. Esta enzima es de uso comercial y comúnmente empleada en la hidrólisis de la lactosa para la obtención de leche deslactosada. En la presente investigación, sin embargo, esta enzima fue empleada para la obtención de GOS.

Además, se empleó la enzima Gluzyme® 10000, una glucosa oxidasa obtenida del hongo *A. oryzae*, obtenida de la empresa Novozyme®, de origen danés. Esta enzima es usada comercialmente en la industria de panadería como coadyuvante en el leudado de masas; sin embargo, en este proyecto su finalidad fue evaluar su uso en la producción de ácido glucónico a partir de la glucosa generada durante la producción de GOS.

Los ensayos iniciales, en los que se pretendió evaluar el efecto de los diferentes componentes del LaS sobre la actividad de la β -galactosidasa y la producción de GOS se realizaron con lactosa grado analítico (>99.6%) provista por Merck®.

Para la evaluación de la producción de GOS a partir de LaS, este fue adquirido en la empresa CIMPA SAS. El LaS es de origen colombiano, obtenido del desuerado del queso fresco, y posteriormente deshidratado, con un contenido de lactosa no menor del 65% del total de sólidos (Anexo B).

La glucosa, galactosa, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y cloruro de magnesio fueron provistos por Merck®.

La proteína aislada de LaS (>92%) empleada para evaluar el efecto ejercido sobre la β -galactosidasa fue generosamente donada por la empresa COLANTA S.A.

El ácido sulfúrico (>96%), ácido fosfórico (85%), carbonato de sodio, albúmina sérica bovina fueron suministrados por Merck®. Los reactivos: azul de Coomassie G250 y etanol absoluto (>99%) fueron suministrados por Panreac®. El o-NP (orto-nitrofenol), el o-NPG (orto-nitrofenil galactopiranosido) fueron suministrados por Sigma-Aldrich®.

3.2 Caracterización del lactosuero

Los análisis realizados fueron: determinación de humedad, proteína, contenido de azúcares, contenido de materia grasa, cenizas y minerales (sodio, potasio, calcio y magnesio). La selección de los minerales a evaluar se basó en la alta abundancia de estos iones en el LaS [34].

3.2.1 Contenido de humedad

La determinación del contenido de humedad se realizó según el procedimiento AOAC 990.19 [164] para productos de origen lácteo. Se pesaron 2 ± 0.1 g de muestra en una cápsula de porcelana previamente tarada y se puso a secar en horno precalentado a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 4 horas. Posteriormente, la muestra se sometió a enfriamiento en desecador y se procedió a calcular su humedad por diferencia de peso según la ecuación 3-1.

$$\%humedad = \frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso húmedo}} * 100 \quad \text{Ecuación 3-1}$$

3.2.2 Contenido de proteína

Esta determinación se realizó de acuerdo al método descrito por Bradford [165] que se basa en la formación de color azul por la unión del reactivo de Bradford (azul de Coomassie) con las proteínas. Se realizó una dilución de la muestra de forma que estuviera, aproximadamente, en medio del intervalo de cuantificación de la curva patrón. A 0.1 mL de muestra se le adicionó 1 mL de solución de Bradford, mezclando vigorosamente y dejando en reposo durante 5 minutos para permitir la generación de color. Posteriormente se leyó la absorbancia de la muestra y se calculó la concentración con base en la curva patrón preparada entre 0 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina sérica bovina, usada como proteína patrón.

3.2.3 Contenido de azúcares

El contenido de glucosa, galactosa, lactosa y GOS, fue determinado por HPLC-IR con un cromatógrafo *UltiMate® 3000* (*ThermoScientific, USA*) acoplado a un detector de índice de refracción Shodex RI-101 (*Showa Denko K.K., Japan*). La columna usada fue *CarboSep CHO-411* que permite la separación de oligosacáridos hasta un DP de 10 (DP10). Las condiciones de operación del equipo fueron: agua desionizada como fase móvil, flujo de 0.4 mL/min, temperatura de 80°C. Para la cuantificación de los carbohidratos presentes se utilizaron patrones de cada uno de ellos.

3.2.4 Contenido de materia grasa

El contenido de lípidos presentes en los sustratos se realizó de acuerdo al procedimiento de la AOAC 920.39C [164] (extracción Soxhlet). Se tomaron 2 g de muestra previamente deshidratada y se colocaron en un dedal de celulosa dentro de un tubo de extracción Soxhlet. Posteriormente la muestra contenida en el dedal se sometió a recirculación de solvente a ebullición y luego a secado leve (70°C) durante dos horas, se enfrió en un desecador y se pesó. Luego se calculó el contenido de grasa por diferencia de peso con la muestra original según la ecuación 3-2.

$$\%grasa = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} * 100 \quad \text{Ecuación 3-2}$$

3.2.5 Contenido de cenizas

El contenido de cenizas se realizó según método AOAC 923.03 [164]. Se pesó 1 g de muestra y se sometió a carbonización a 140 °C. Posteriormente se sometió a calcinación en un horno a 550°C durante 18 horas. Después de retiradas las muestras del horno se pusieron en un desecador y una vez frías se pesaron las cenizas. El contenido de cenizas se calculó según la ecuación 3-3

$$\%cenizas = \frac{\text{Peso cenizas}}{\text{Peso muestra}} * 100 \quad \text{Ecuación 3-3}$$

3.2.6 Contenido de minerales

La concentración de los cationes presentes en la muestra (sodio, potasio, calcio y magnesio) fue cuantificada según el método AOAC 968.08 [164], por espectroscopía de

absorción atómica a partir de las cenizas obtenidas por calcinación de cada muestra analizada.

Los resultados de humedad, proteína, azúcares, grasa y cenizas se expresaron en porcentaje másico, mientras que el contenido de minerales se expresó en mg/kg de muestra.

3.3 Caracterización enzimática inicial

La actividad de la enzima β -galactosidasa se calculó de dos maneras: la primera fue la forma clásica, según el método del *o*-NPG [113] que evalúa la capacidad de hidrólisis en concentración mM, y la segunda según el método reportado por Vera *et al.* [122] en el que, además de evaluar la actividad de la enzima en función de la hidrólisis, lo hace también de acuerdo con la cantidad de GOS producidos a concentraciones altas de sustrato. Por otro lado, la actividad de la glucosa oxidasa fue calculada según el procedimiento de Sheu *et al.* [145]. A continuación, se describen los métodos usados.

3.3.1 Actividad hidrolítica de la β -gal

Esta se evaluó en buffer fosfato a pH entre 5.5 y 7.0 y una temperatura entre 30 y 45 °C. El método se basa en la generación de color producida por la liberación del *o*-NP por acción de la enzima sobre la molécula de *o*-NPG. Se tomaron 4.9 mL de solución de *o*-NPG 0.2 mM al pH de cada ensayo, a este volumen se le adicionó 0.1 mL de solución de enzima y se dejó reaccionar durante 5 minutos. Para detener la reacción se adicionó 1 mL de solución de carbonato de sodio 1 M. El blanco de reacción (*o*-NPG) se mezcló con carbonato de sodio. El contenido de *o*-NP generado en las muestras obtenidas fue cuantificado por espectrofotometría a una longitud de onda (λ) de 420 nm, comparando la absorbancia del color amarillo generado con el obtenido en una curva de calibración con patrón de *o*-NP. La actividad hidrolítica se definió para este método como el número de micromoles de *o*-NP producidas en el tiempo por gramo de enzima utilizada, según la siguiente ecuación:

$$U_{H1} = \frac{\mu\text{mol ONP}_{final} - \mu\text{mol O-NP}_{inicial}}{g_{Enzima}[\text{mL}] * t[\text{min}]} \quad \text{Ecuación 3-4}$$

3.3.2 Actividad hidrolítica y de transgalactosilación

Para calcular las condiciones óptimas de trabajo de la β -gal se preparó una solución de lactosa 1.17 mM (40%*m/v*) disuelta en buffer fosfato a pH 6.5. Diferentes relaciones enzima sustrato (E:S) fueron evaluadas para determinar la producción de GOS y conocer la relación entre las actividades hidrolítica y de transgalactosilación. Para la actividad de hidrólisis de la β -gal, una unidad internacional se definió como el número de micromoles de glucosa liberadas por unidad de tiempo por gramo de enzima.

$$IU_{H_2} = \frac{\mu\text{mol Glu}_{Final} - \mu\text{mol Glu}_{Inicial}}{g_{enzima} * t(\text{min})} \quad \text{Ecuación 3-5}$$

Por otro lado, la actividad de transgalactosilación se definió como el número de micromoles de GOS (DP 3 y 4) producidas por unidad de tiempo por gramo de enzima

$$IU_T = \frac{\mu\text{mol GOS}_{Final} - \mu\text{mol GOS}_{Inicial}}{g_{enzima} * t(\text{min})} \quad \text{Ecuación 3-6}$$

3.3.3 Actividad de la glucosa oxidasa

Esta técnica se basa en la evaluación de la cantidad de peróxido de hidrógeno producido en la reacción de oxidación de la glucosa. Para ello se realiza previamente una curva de calibración con peróxido de hidrógeno. En primer lugar, se preparó una solución de glucosa (50 mg/mL) en buffer fosfato de sodio al pH de trabajo (5.5-7.0) preincubándose a 40°C hasta el momento del ensayo. Aparte se prepara una dilución de la enzima. La actividad enzimática se midió en un espectrofotómetro UV-VIS (Specord 210Plus, Analytikjena, Alemania) con un sistema integrado de temperatura previamente atemperado a 40 °C y a una longitud de onda de 210 nm. Se tomaron valores de absorbancia cada 30 segundos durante 5 minutos. La actividad enzimática se reportó como los micromoles de peróxido de hidrógeno producidos por unidad de tiempo por g de enzima

$$IU = \frac{\mu\text{molH}_2\text{O}_2_f - \mu\text{molH}_2\text{O}_2_i}{g_{enz}(mL) * t_r(\text{min})} \quad \text{Ecuación 3-7}$$

En los tres casos anteriores, se tomó como enzima la cantidad de proteína presente en solución enzimática medidos con el método de Bradford. La cantidad de proteína presente en la solución enzimática fue asumida como la cantidad total de enzima.

3.4 Reacciones enzimáticas

Para encontrar la dosis adecuada de enzima que permitiera producir la mayor cantidad posible de GOS a partir de la lactosa se evaluaron diferentes relaciones de enzima:sustrato; Estas relaciones se calcularon según la ecuación 3-8.

$$E:S = \frac{g \text{ de } \beta\text{-galactosidasa}}{g \text{ de lactosa}} * 100 \quad \text{Ecuación 3-8}$$

Los ensayos se llevaron a cabo en sistemas de reacción bajo las condiciones que se presentan en la tabla 3-1.

Tabla 3-1. Condiciones generales de reacción para la obtención de GOS

Volumen de reacción	20 mL de medio de reacción
Enzimas	β -galactosidasa obtenida de <i>Kluyveromyces lactis</i> Glucosa oxidasa obtenida de <i>Aspergillus oryzae</i>
Temperatura de reacción	40 \pm 1°C
Tiempo de reacción	300 minutos
Agitación	150 rpm con agitador de tipo recíprocante
Buffer	Buffer fosfato pH entre 6.0 y 7.0
Concentración de sustrato	Lactosa en concentraciones de 35, 40 y 45 %m/v
Concentración de enzima	Relación E:S 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%

Adicionalmente, en la tabla 3-2 se presenta un resumen de las diferentes reacciones enzimáticas realizadas en el presente trabajo. Estas serán luego descritas en mayor detalle.

Tabla 3-2. Resumen reacciones enzimáticas planteadas en el proyecto

Objetivo	Ensayo	Variables evaluadas	Número de ensayos*
1	β -gal + Monosacáridos	Glucosa	15
		Galactosa	
2	β -gal + Minerales	Azúcares totales	36
		Sodio, Potasio, Calcio, Magnesio	
	β -gal + Proteína	Azúcares totales	9
		Proteína de lactosuero,	
3 – 4	Gox + Minerales	Sodio, Potasio, Calcio, Magnesio	4
	β -gal	Fuente de lactosa	9
		Ultrasonidos	
3 – 4	β -gal + Gox	Sistema secuencial	4
		Sistema simultáneo	
3 – 4	β -gal + Gox	Fuente de lactosa	12
		Ultrasonidos	
		Tiempo	

*El número de ensayos no tiene en cuenta repeticiones realizadas.

3.4.1 Efecto de la presencia de monosacáridos sobre la reacción de transgalactosilación

Con el desarrollo de las actividades que se describen a continuación se pretende dar respuesta al objetivo 1, que busca establecer (si existe) un efecto (activador o inhibidor) de los monosacáridos constituyentes de la lactosa y que además de estar naturalmente en el lactosuero, son productos de la reacción de transgalactosilación.

Con la finalidad de determinar el efecto causado por la presencia de glucosa y galactosa sobre la transgalactosilación de lactosa por la β -galactosidasa, se siguió la metodología de Neri *et al* [121] con algunas modificaciones. Se elaboraron medios con una concentración total de azúcares iniciales de 350, 400 y 450 mg/mL y diferentes relaciones de lactosa:glucosa (1:0.0, 1,0.3 y 1:0.6), lactosa:galactosa (1:0.0, 1,0.15 y 1:0,3), así como sus combinaciones. Se realizó la reacción de transgalactosilación a la temperatura y pH de reacción óptimos de la enzima. Posteriormente se realizó la reacción con cada una de las mezclas (Tabla 3-2) y se determinó el efecto ejercido por cada uno de los monosacáridos a través de la medición de la producción de GOS. Adicionalmente el desempeño de la reacción fue evaluado en función de la productividad (miligramos de GOS

por litro de solución por minuto - $\text{mg}_{\text{GOS}}/\text{mL}\cdot\text{min}$), rendimiento (miligramos de GOS producidos por miligramo de lactosa alimentada $\text{mg}_{\text{GOS}}/\text{mg}_{\text{Lac-i}}$) y conversión (miligramos de lactosa que reaccionó por miligramos de lactosa alimentada al inicio - $\text{mg}_{\text{Lac-t}}/\text{mg}_{\text{Lac-i}}$).

Las relaciones de lactosa:glucosa y lactosa:galactosa en el medio elaborado a partir de lactosa fueron seleccionadas de acuerdo a la máxima cantidad de glucosa y galactosa presentes en el punto más alto de producción de GOS reportados por Guio [112] para la β -galactosidasa de *K. lactis*.

Tabla 3-3. Diseño experimental para determinación del efecto de monosacáridos en el proceso de transgalactosilación de la lactosa

Factor	Niveles de variación	Factor	Niveles de variación	Factor	Niveles de variación
Lactosa (g/L)	350 400 450	Lactosa (g/L)	350 400 450	Lactosa (g/L)	350 400 450
Relación lac:glu	1:0 1:0,3 1:0,6	Relación lac:gal	1:0 1:0,15 1:0,3	Relación lac:glu:gal	1:0:0 1:0,3:0,15 1:0,6:0,3

Lac = lactosa; Glu = glucosa; Gal = galactosa

A partir de los resultados obtenidos se determinó el efecto ejercido por los monosacáridos durante la reacción. El diseño experimental empleado fue un modelo de superficie de respuesta Box-Behnken con tres factores (relación lactosa:glucosa, relación lactosa:galactosa y concentración de sólidos solubles), con tres niveles de variación para cada uno. La optimización de la superficie de respuesta se realizó usando una función de deseabilidad para los tres factores usados, que permitiera encontrar el óptimo más probable. El comportamiento del modelo experimental se explicó a través del modelo cuadrático

$$Y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_{ij} X_i^2 + \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Ecuación 3-9}$$

Donde Y es la respuesta predicha, β_0 es el intercepto; β_{ij} son los coeficientes lineales, cuadráticos y de las interacciones. Fueron necesarios un total de 17 experimentos para estudiar los 10 coeficientes del modelo. Cada experimento se realizó por duplicado. Los datos estadísticos se trataron con el software *Minitab*® versión 17.

3.4.2 Efecto de los componentes del lactosuero sobre la reacción de transgalactosilación

A través del desarrollo de las actividades descritas a continuación se buscó dar respuesta al objetivo 2, que pretendía esclarecer el efecto ejercido por la presencia de proteínas y minerales presentes en el lactosuero sobre la producción de GOS.

Guío [112] determinó que existe una mayor producción de GOS en un medio que contiene solo lactosa en comparación con un medio con lactosuero e igual concentración de lactosa. Por este motivo se planteó estudiar el efecto causado por la presencia de proteínas e iones presentes en el lactosuero sobre la actividad de transgalactosilación de la β -galactosidasa. El efecto ejercido por la proteína y los minerales fue evaluado usando soluciones de lactosa y proteína aislada de lactosuero en diferentes concentraciones, sin exceder la cantidad máxima en que se encuentra la proteína en el lactosuero. De igual forma, se evaluaron diferentes concentraciones de lactosa y cloruro de sodio, cloruro de calcio, coluro de potasio y cloruro de magnesio, en todos los casos sin exceder la cantidad máxima de cada ion presente en el lactosuero. Los valores de adición de proteína y minerales se establecieron según los análisis preliminares realizados al lactosuero. La reacción de transgalactosilación se realizó a temperatura y pH óptimos de la enzima. Las combinaciones evaluadas se muestran en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4. Diseño experimental para determinación del efecto de proteína y minerales en el proceso de transgalactosilación de lactosa

Factor	Niveles de variación	Factor	Niveles de variación
	350		350
Lactosa (g/L)	400	Lactosa (g/L)	400
	450		450
	100%		100%
% proteína total	66%	% total de cloruro*	66%
	33%		33%

*El porcentaje total de cloruros corresponde a cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio según el experimento a realizar

El tratamiento estadístico de los datos se realizó a través de un diseño factorial 3^2 en donde los factores a evaluar fueron la concentración de lactosa inicial y la concentración

del agente a evaluar (proteína, sodio, potasio, calcio o magnesio) con tres niveles de variación: 100%, 66% y 33% del total de cada compuesto presente en el lactosuero.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon \quad \text{Ecuación 3-10}$$

Cada experimento fue realizado por duplicado y a cada duplicado se le realizó una réplica. Diferencias estadísticas entre tratamientos fueron determinadas con la prueba de Tukey. Los datos estadísticos fueron tratados usando el software *Minitab*® versión 17.

3.4.3 Efecto de minerales y proteína sobre la glucosa oxidasa

Una vez determinada la concentración óptima de lactosa inicial a la cual se produce mayor contenido de GOS en el medio, se procedió a calcular la cantidad de glucosa producida al cabo de 60 minutos de reacción. Con este valor y el de la actividad enzimática se calculó la cantidad de enzima Glucosa oxidasa (Gox) a emplear en el medio de reacción. A esta misma concentración de glucosa se procedió a evaluar el efecto de los minerales (sodio y potasio) y la proteína del lactosuero sobre la producción de ácido glucónico con Gox.

Las reacciones se llevaron a cabo en erlenmeyer de 125 mL con un volumen inicial de 50 mL de solución de glucosa en buffer fosfato; se adicionó una cantidad de enzima de 3.2 U/mL. La temperatura de reacción fue de 40 °C y el pH fue de 7,0. La reacción se llevó a cabo durante 300 minutos. Las concentraciones de minerales y proteína fueron iguales a las empleadas para la determinación del efecto sobre la β -galactosidasa. Debido a que la Gox requiere un agente oxidante para llevar a cabo la reacción, se suministró oxígeno en exceso a un flujo de 10 mL/min durante toda la reacción.

Para el tratamiento de los datos se realizó un ANOVA a partir de un diseño experimental completamente al azar. Cada tratamiento correspondió a un nivel de variación de cada mineral o la proteína de lactosuero. Los datos fueron evaluados por duplicado.

Una vez finalizado el desarrollo de estas actividades, se conoció el efecto ejercido por cada uno de los constituyentes del lactosuero sobre la β -galactosidasa y la producción de GOS. Además, permitió seleccionar las mejores condiciones para desarrollar el sistema multienzimático para obtención de GOS y ácido glucónico, actividades que se describen a continuación.

3.4.4 Producción de GOS en diferentes fuentes de lactosa

Para esta etapa del proyecto, las actividades fueron realizadas con apoyo del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), adscrito al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y a la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) en España.

Se deseaba conocer el efecto de diferentes fuentes de lactosa sobre la producción enzimática de GOS, para ello, se evaluó lactosa (99.9% pureza), permeado de lactosuero (88% lactosa, 9% minerales, 3% proteína) y lactosuero en polvo (68% lactosa, 12% proteína, 7.5% minerales). Se prepararon soluciones con 40% equivalentes de lactosa inicial, y a las condiciones ya establecidas de adicionaron las enzimas.

Junto con el efecto matriz, ejercido por la fuente de lactosa, se evaluó el efecto de diferentes intensidades de US sobre la actividad enzimática de la β -galactosidasa y la producción de GOS. La potencia acústica estimada fue de 30 ± 1.6 W y la intensidad acústica expresada por unidad de área de emisión superficial fue de 23.1 W/cm².

El tratamiento estadístico de los datos se realizó usando un diseño factorial 3² siendo los factores a evaluar la fuente de lactosa y la intensidad de US, cada uno con tres niveles de variación

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon \quad \text{Ecuación 3-11}$$

Cada experimento fue realizado por duplicado y a cada duplicado se le realizó una réplica. Diferencias estadísticas entre tratamientos fueron determinadas con la prueba de Tukey. Los datos estadísticos fueron tratados usando el software *Minitab*® versión 17.

3.4.5 Efecto de un sistema multienzimático sobre la producción de GOS

Una vez estudiados los efectos de cada uno de los componentes del lactosuero sobre las enzimas β -gal y la Gox, se procedió a evaluar el mejor método de adición de las enzimas para la producción de GOS y ácido glucónico en el sistema mixto de enzimas en medio de lactosa. Teniendo en cuenta el momento de adición de la Gox al medio de reacción, se decidió probar dos posibles combinaciones:

- Sistema simultáneo: en este sistema se planteó la adición de las enzimas β -gal y Gox desde el comienzo de la reacción, es decir al tiempo 0 min. La finalidad de este sistema fue conocer si las dos enzimas eran capaces de trabajar en sinergia o si por el contrario, existe algún tipo de inhibición por los productos formados. Adicionalmente, conocer si la enzima glucosa oxidasa (Gox) era capaz de transformar la glucosa que se iba generando a medida que β -gal producía GOS.
- Sistema secuencial: en este caso se planteó la adición de β -gal al inicio de la reacción y luego de 60 minutos adicionada la enzima Gox. Aquí se buscó conocer si en el momento de máxima producción de GOS, donde ya había suficiente glucosa disuelta en el medio, la Gox era capaz de actuar sobre su sustrato y oxidarlo a ácido glucónico.

Se evaluaron los resultados obtenidos a partir de un análisis de medias, teniendo en cuenta que se seleccionaría aquel sistema que fuera capaz de producir la mayor cantidad de GOS y de ácido glucónico en un medio con 40% de lactosa inicial. Como variables de respuesta para estas actividades se tuvieron en cuenta el rendimiento de la producción de GOS y ácido glucónico en la reacción, tanto a 60 minutos de iniciada, como al final de la misma. Otros parámetros considerados fueron el consumo de lactosa y glucosa residual en el medio.

Tras conocer la mejor alternativa de producción de GOS y ácido glucónico a través del sistema mixto de enzimas, se procedió a evaluar diferentes fuentes de lactosa como materias primas para la reacción. Estas fueron lactosa (99.9% lactosa), permeado de lactosuero (88% lactosa, 12% minerales), lactosa adicionada con proteína concentrada de lactosuero (>92% pureza – la mezcla se realizó a la relación presente en el LaS) y LaS en polvo (68% lactosa, 12% proteína, 7.5% minerales). Se prepararon soluciones con 40% equivalentes de lactosa inicial, y a las condiciones ya establecidas se adicionaron las enzimas. Junto con el efecto de la fuente de lactosa, también se evaluó el efecto de los US sobre la producción de GOS y ácido glucónico en un sistema mixto de enzimas.

Se sabe que la presencia de ultrasonidos en una reacción enzimática puede ejercer efectos favorables en la reacción [159]; por esta razón se planteó el uso de una sonda de US con diferentes intensidades. Para esto se propuso realizar la reacción con tres fuentes de lactosa. Se analizó la producción de GOS como variable respuesta.

Los ensayos se realizaron en 15 mL de medio de reacción en tubos falcon de 50 mL. Se empleó un sonicador (450 Digital Sonifier - Branson Ultrasonics Corp., Danbury,

CT) equipado con un sensor de temperatura (error estándar $\pm 0.1^\circ\text{C}$) y conectado a una sonda de 3 mm de diámetro (20 kHz, 400 W de potencia), inmersa hasta 2 cm por debajo de la superficie del fluido. Para evaluar el efecto de las variables, fuente de lactosa e intensidad de US se planteó un diseño factorial 3^3 . En la tabla 3-4 se observan los niveles del diseño experimental planteado.

Tabla 3-5. Diseño experimental efecto de fuente de lactosa e intensidad de US sobre la producción de GOS.

Fuente de lactosa	Intensidad de US*
Lactosa	
Permeado	0%, 15%, 30%
Lactosuero	

*Corresponde al porcentaje de la máxima amplitud que maneja el equipo de ultrasonidos

La fluorescencia intrínseca de las enzimas fue determinada con el fin de establecer si el tratamiento con US afecta la estructura secundaria de la enzima. Para esto se empleó el método descrito por Prajapat *et al* [166], realizando algunas modificaciones. El equipo empleado fue un espectrómetro de fluorescencia (Spectrofluorometer infinite M200 Tecan, Switzerland), con el cual se midió la fluorescencia intrínseca a una velocidad de escaneo de 1200 nm/s a una longitud de onda de excitación que estaba en un rango entre 300 y 480 nm (con paso de 5 nm). Las muestras analizadas correspondieron a β -gal y Gox incubadas a las mismas condiciones de reacción indicadas anteriormente (40°C ; pH 7.0) con 0% y 30% de intensidad de US. Los tiempos de muestreo seleccionados fueron 0, 60 y 300 minutos.

Adicionalmente, se estudiaron los controles de ultrasonidos (para β -gal y Gox) para evaluar el efecto de la intensidad de los US sobre la producción de GOS y ácido glucónico. Para esto, la dosis adecuada de enzima (relación enzima:sustrato 0.25) fue adicionada en una solución de buffer fosfato pH 6.5 e incubada a 40°C durante 300 minutos en presencia de ultrasonidos con amplitud de 30%. Se evaluó la actividad enzimática sobre los sustratos de referencia (lactosa y glucosa) a 0, 60 y 300 minutos. La potencia acústica estimada fue de $30 \pm 1.6 \text{ W}$ y la intensidad acústica expresada por unidad de área de emisión superficial fue de 23.1 W/cm^2 .

3.4.6 Cuantificación de carbohidratos

Las mezclas de carbohidratos fueron analizadas a través de un equipo de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) marca Agilent 7890A (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). Antes del análisis cromatográfico, las muestras fueron derivatizadas para formar sus respectivas trimetil-silil oximas. La formación de las oximas después de la sililación limita los posibles tautómeros de azúcares reducidos a dos posibles formas: E (*syn*) y A (*Anti*). Previamente, 15 μL de cada muestra se mezclaron con 400 μL de β -fenil-D-glucósido (0.5 mg/mL) usado como estándar interno y se evaporaron en condiciones de vacío (14 torr). La formación de oximas, de acuerdo a la metodología reportada por Ruiz-Matute *et al* [167], se realizó con 250 μL de cloruro de hidroxilamina (2.5% m/v) en piridina, calentado a 70°C durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras fueron persililadas con 250 μL de hexametildisilazano (HDMS) y 25 μL de ácido trifluoroacético (TFA) durante 30 minutos. Pasado este tiempo, cada muestra fue centrifugada a 10,000 rpm durante 2 minutos. Los análisis se realizaron usando una columna capilar DB- $\%HT$ (15 m x 0.32 mm x 0.10 μm) (J&W Scientific, Folsom, California, USA). Las temperaturas de inyección y detección fueron 280 y 350°C, respectivamente; el programa de temperatura del horno se incrementaba desde 150°C hasta 350°C a una velocidad de calentamiento de 3°C/min. La fase móvil utilizada fue nitrógeno a flujo de 1 mL/min. Cada inyección se realizó en modo *split* 1:20. Cada pico obtenido en los cromatogramas fue cuantificado teniendo en cuenta los factores de respuesta de cada compuesto (ácido glucónico, glucosa, galactosa, lactosa, rafinosa-DP3).

3.4.7 Tratamiento estadístico de datos

Debido a que en esta etapa se quería conocer no solamente el efecto de la fuente de lactosa y los US, sino que además se deseaba averiguar cómo afectaba el tiempo al perfil de los carbohidratos producidos, en particular los GOS y el ácido glucónico, el tratamiento estadístico de los datos se realizó por medio del diseño factorial de parcelas subdivididas, donde las subdivisiones (o niveles del factor tiempo) correspondieron a cada tiempo de muestreo durante la reacción [168]. Cada experimento fue realizado por duplicado. Se establecieron las diferencias estadísticas entre tratamientos mediante la prueba de Tukey.

Por otra parte, el análisis global de los datos fue realizado mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA), una técnica que busca reducir la dimensionalidad de los datos, manteniendo la mayor cantidad de información posible, determinada por la varianza obtenida. Como resultado, la información obtenida mediante esta herramienta estadística se estudia mediante el análisis de tres gráficos, en los cuales puede establecerse la relación que hay entre muestras, entre variables, las muestras con respecto a las variables y el porcentaje de explicación de la varianza [169]. Las variables empleadas para la realización del PCA fueron: contenido de glucosa, galactosa, lactosa, GOS y ácido glucónico. Los datos obtenidos se trataron usando el software *Minitab*® versión 17.

4. Resultados y discusión

4.1 Caracterización de las materias primas

En la tabla 4-1 se presenta la composición proximal del LaS con el cual se desarrolló este trabajo.

Tabla 4-1. Composición proximal del LaS

Componente	Muestra de LaS	Reporte ficha técnica*
Proteínas (%)	12.56 ± 2.27	11.4 – 14.9
Lípidos (%)	1.29 ± 0.21	< 1.5
Carbohidratos (%)	68.69 ± 1.23	>72
<i>Lactosa (%)</i>	68.58 ± 1.32	-
<i>Glucosa (%)</i>	<1	-
<i>Galactosa (%)</i>	<1	-
Cenizas (%)	7.54 ± 0.02	<10.1
<i>Sodio (mg/100 g)</i>	818.30	-
<i>Potasio (mg/100 g)</i>	748.45	-
<i>Calcio (mg/100 g)</i>	1311.60	-
<i>Magnesio (mg/100 g)</i>	62.65	-
Humedad (%)	7.20 ± 0.17	< 5

*Suministrada por CIMPA SAS, proveedor de la materia prima.

Como puede observarse, el contenido de carbohidratos presente en el LaS es ligeramente menor al declarado en la etiqueta. Cabe resaltar que el principal componente de éste es lactosa y hay una muy baja concentración de monosacáridos. De igual manera, su humedad es mayor a la declarada, debido probablemente a problemas de almacenamiento. El suero (declarado como parcialmente desmineralizado) presenta un

contenido de minerales menor al valor establecido, se observa un contenido particularmente alto de calcio, que según la base de datos de alimentos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) debería ser del orden de 800 mg/100 g [34]. Sin embargo, es importante resaltar que la composición de los productos de origen animal como la leche y sus derivados depende de factores geográficos, climáticos y nutricionales, entre otros; por lo que no son extraños los valores obtenidos durante la cuantificación.

4.2 Actividad enzimática

4.2.1 Actividad hidrolítica

En la figura 4-1 se puede observar la actividad hidrolítica de la enzima β -gal empleada en función del pH y de la temperatura.

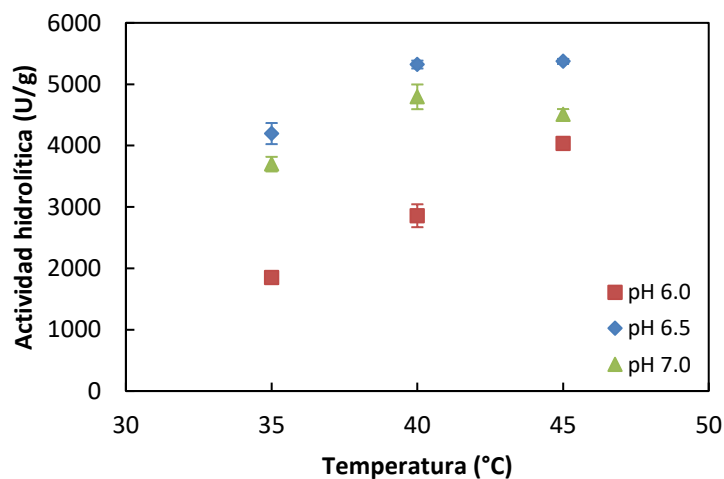


Figura 4-1. Actividad hidrolítica de la β -galactosidasa como función de la temperatura y del pH en presencia de o-NPG.

A través del análisis estadístico se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las actividades hidrolíticas a las temperaturas estudiadas. A las temperaturas (Figura 4-1) más altas (40 y 45 °C) no se detectaron diferencias entre ellas, siendo estas actividades más elevadas en comparación con las encontradas a temperatura más baja (35 °C). Respecto al pH se observó que el óptimo para la β -gal de *K. lactis* es 6.5, a pH

menores la actividad se reduce drásticamente y a pH mayores la actividad se reduce lentamente. Diversos trabajos en los que se emplea la enzima β -gal de *K. lactis* establecen como condiciones de trabajo 40 °C y pH 6.0 [104], [170]–[172]. Sin embargo, según los datos experimentales obtenidos en nuestro trabajo, se establecieron 40 °C y pH 6.5 como las condiciones más adecuadas para todos los ensayos realizados.

4.2.2 Actividad galactosil transferasa

Una vez identificadas las condiciones de pH y temperatura óptimas para la hidrólisis, se procedió a determinar la actividad galactosil transferasa usando como sustrato lactosa. En la literatura se reporta la actividad de la β -gal en función de la hidrólisis de bajas concentraciones de *o*-NPG; y se considera, por lo tanto, 1 unidad enzimática (U) como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de *o*-NPG, por mL por minuto. Sin embargo, en este proyecto se encontró que la dosis de enzima necesaria para hidrolizar la lactosa difiere significativamente de aquella necesaria para obtener buenos rendimientos en la transgalactosilación. Lo que sugiere una aproximación errónea al cálculo de la actividad y posterior dosificación de la β -gal [122].

En la figura 4-2 se puede observar que la actividad galactosil transferasa es más baja que la actividad hidrolítica de la β -gal, en el punto óptimo fue casi el doble de la actividad de transgalactosilación. Es también claro que altas relaciones enzima-sustrato conducen a bajas actividades de transgalactosilación, aun con actividades hidrolíticas mayores que 30 kU/g.

La máxima actividad galactosil transferasa (24.4 kU/g) se logró cuando la relación enzima-sustrato fue 0.25%. A esta misma relación, la actividad hidrolítica casi duplicó (47.5 kU/g) la actividad de transgalactosilación de la β -gal. Debido a la imposibilidad de separar la lactosa de otros disacáridos usando las técnicas analíticas disponibles la actividad de la β -gal podría, incluso, ser más alta.

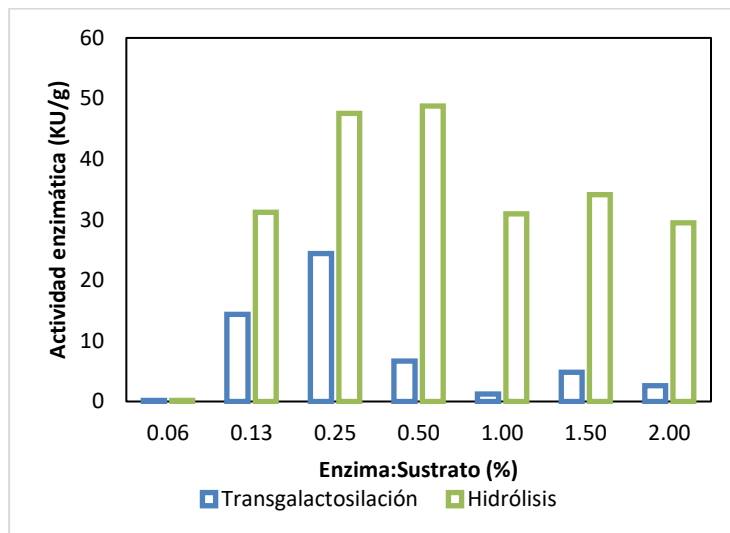


Figura 4-2. Actividades de hidrólisis y galactosil transferasa de la β -gal de *K. lactis* a diferentes concentraciones de enzima.

Esta misma técnica fue empleada por Vera *et al.* [122], quienes reportaron mayores actividades hidrolíticas y galactosil transferasa (196 KU y 55 KU respectivamente) y por Guerrero *et al.* [124] quienes hallaron altos valores para actividad hidrolítica en su trabajo. Cabe resaltar que estas actividades son particularmente más altas que las reportadas en el presente trabajo debido a que el origen de la enzima fue *Aspergillus oryzae* que, de acuerdo a la bibliografía, posee mayor actividad enzimática [104].

Según los resultados obtenidos es posible afirmar que relaciones enzima-sustrato entre 0.13% y 0.25% muestran las mayores actividades tanto hidrolítica como galactosil transferasa, esto indica que a estas relaciones se obtendrán mejores rendimientos de producción y menores tiempos de reacción. Por esta razón, la relación enzima-sustrato seleccionada para desarrollar los ensayos posteriores fue 0.25%.

4.3 Cinética característica de producción de GOS

El perfil cromatográfico de los productos obtenidos en la reacción de la lactosa (40% m/m) en presencia de la β -gal (HA-Lactase 5200), relación enzima:sustrato 0,25% a 40°C y pH 6.5 después de 40 minutos de reacción se presenta en el anexo C1. Allí se muestra que como resultado de la actividad de la β -gal, se obtienen monosacáridos (glucosa y galactosa), lactosa residual, GOS2 (no separables de la lactosa), GOS3 y GOS4, siendo

estos dos últimos los productos de mayor interés. Este perfil es similar al obtenido por Fischer y Kleinschmidt [173], quien reportó que el principal producto obtenido también fue la glucosa. Se sabe que la β -gal de *K. lactis* es capaz de producir di-, tri- y pequeñas cantidades de tetra-sacáridos (GOS2, GOS3 y GOS4) [117], [173]; sin embargo, debido a que la metodología analítica empleada en el presente trabajo no permitió la separación de los GOS2 de la lactosa, estos últimos no pudieron ser cuantificados por separado.

La cinética de la reacción de lactosa y β -gal para producir GOS se muestra en la figura 4-3. Se observa un descenso pronunciado en el contenido de lactosa en los primeros 60 minutos de reacción; de igual manera, se observa una producción de glucosa muy rápida hasta ese mismo tiempo, estabilizándose a partir de entonces hasta las 5 horas de reacción cuando alcanza 41 mg glucosa/100 mg de carbohidratos. En cuanto a la producción de GOS se muestra una rápida producción durante la primera hora de reacción (26.4 mg glucosa/100 mg de carbohidratos), sin embargo, a partir de este momento se inicia una fase de hidrólisis de GOS que coincide con el incremento constante de galactosa que llega a 26,7 mg galactosa/100 mg de carbohidratos. Este comportamiento coincide con el mostrado en trabajos previos como el de Boon *et al.* [99].

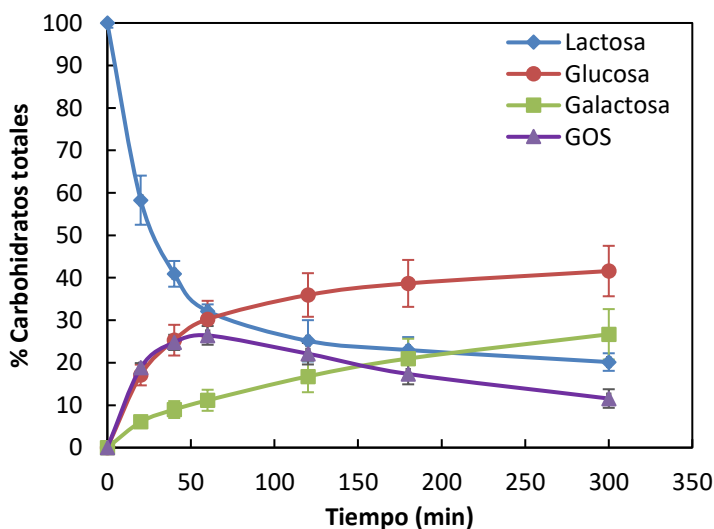


Figura 4-3. Cinética de la producción enzimática de GOS a partir de lactosa y β -gal (HA-lactase 5200). Condiciones de reacción: 40% m/m lactosa, 40 °C y pH de 6,5. Dosis de enzima 1,7 U/mL.

4.4 Efecto de los constituyentes del LaS sobre la β -gal

4.4.1 Proteínas y sales

En el análisis proximal realizado al LaS se encontró que este posee un contenido alto de proteína y minerales (Tabla 4-1). En la literatura existente se han realizado diversos estudios para evaluar el efecto que estos componentes tienen sobre la actividad hidrolítica de la β -gal de diferentes orígenes, incluyendo la obtenida de *K. lactis*. Sin embargo, estos estudios no han sido realizados teniendo en cuenta las concentraciones en que normalmente se encuentran en el LaS reconstituido al 40%. Por esta razón, se estudió el efecto de los minerales a las relaciones encontradas en el LaS a una cantidad de lactosa equivalente a 40% en el medio de reacción sobre la capacidad de la β -gal para formar GOS.

4.4.1.1 Efecto de las proteínas del lactosuero

El contenido medio de proteína del lactosuero empleado es 12.5%. Por este motivo, se realizaron las mezclas de lactosa y proteína de lactosuero en cantidades que no superaran este valor.

En la figura 4-4 se muestra el perfil cinético de la reacción de producción de GOS durante la transgalactosilación de la lactosa (40% m/m) en presencia de diferentes concentraciones de proteína de LaS; otras reacciones pueden observarse en los anexos D1 a D4. Es posible notar que la β -gal consume la lactosa (Figura 4-3a) a la misma velocidad, a cualquier concentración de proteína. Según el ANOVA realizado, no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las diferentes muestras para el consumo de lactosa. La misma situación ocurre con la producción de glucosa y la galactosa (figuras 4-4b y c).

En la figura 4-4d se observa que durante los primeros 60 minutos de reacción se presenta un incremento en la concentración de GOS en el medio; sin embargo, a partir de este momento inicia la fase característica de hidrólisis de estos compuestos que, junto con los productos de la hidrólisis de la lactosa, contribuyen con el incremento de galactosa hasta el final de la reacción. El análisis estadístico para la formación de GOS también mostró que no existen diferencias en función del contenido en proteína y que las diferencias mostradas en la figura 4-4 se deben al contenido en lactosa. Lo anterior es

corroborado por la prueba de Tukey para determinación de diferencias entre medias de los tratamientos. Para este mismo tiempo de producción se encontró que la lactosa en concentraciones superiores al 40% reduce significativamente ($p < 0.05$) la producción de GOS en el medio de reacción.

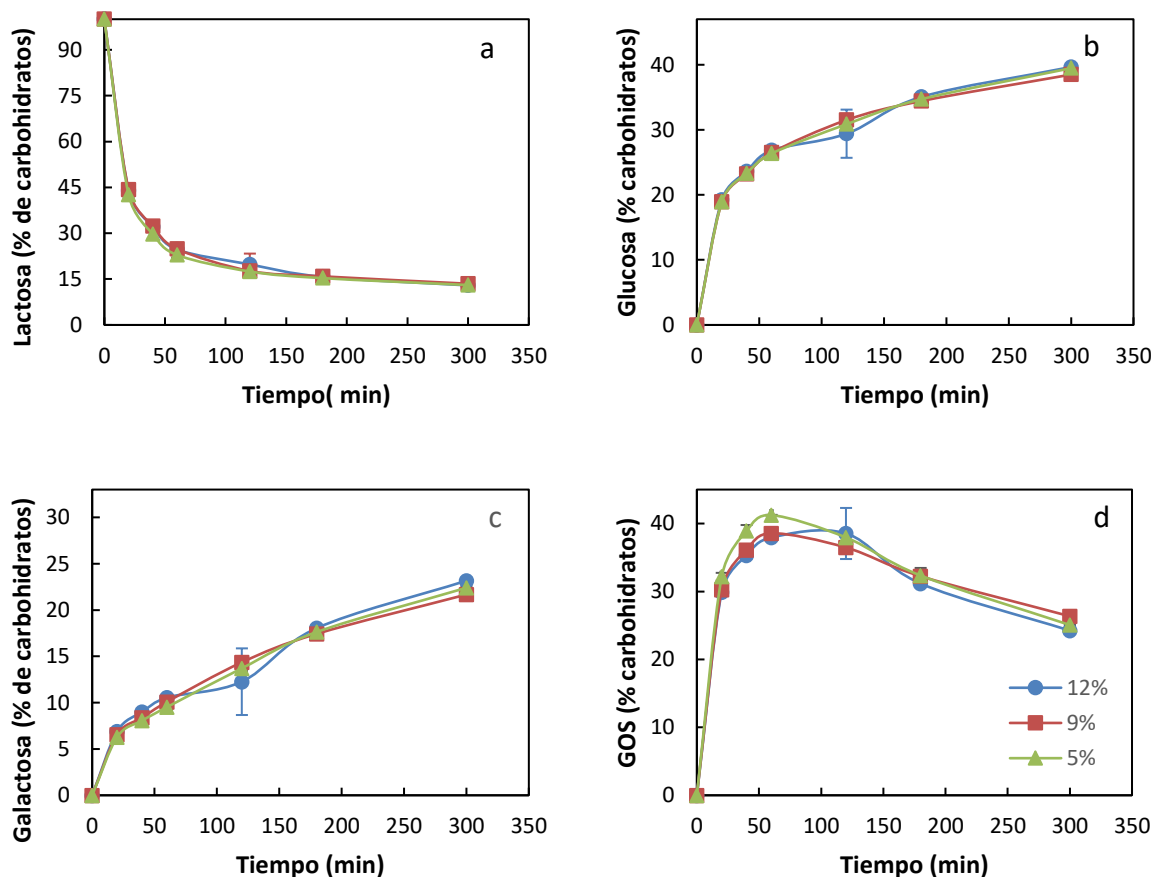


Figura 4-4. Producción de GOS en presencia de proteína de LaS. Reacción a 40% m/m de lactosa, relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH con diferentes concentraciones de proteína a) lactosa, b) glucosa, c) galactosa y d) GOS.

El análisis estadístico realizado para la concentración de GOS presente a los 60 minutos de reacción no mostró un efecto significativo ($p > 0.05$) por parte de la proteína en las concentraciones empleadas por lo que la presencia o ausencia de este compuesto característico del lactosuero no afecta la producción de GOS (Figura 4-5). Lo anterior es corroborado por la prueba de Tukey para determinación de diferencias entre medias de los experimentos. La diferencia que se encuentra se debe a que la lactosa en concentraciones

superiores al 40% reduce significativamente ($p < 0.05$) la producción de GOS en el medio de reacción.

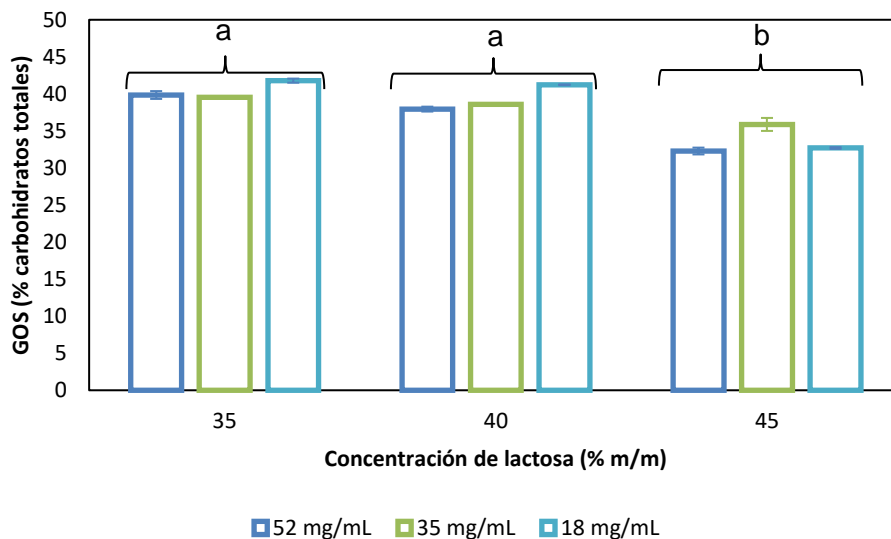


Figura 4-5. Producción de GOS a partir de lactosa en presencia de proteína de lactosuero a 60 minutos de reacción.

*Grupos con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En la bibliografía consultada no han encontrado estudios acerca del efecto ejercido por las proteínas del lactosuero sobre la producción de GOS; esto posiblemente debido a la relativa facilidad con que esta puede ser eliminada del lactosuero a través de procesos de separación por membrana; además, el alto valor comercial de estas proteínas justifica su eliminación previa a la reacción enzimática [97].

4.4.1.2 Efecto del sodio

Se evaluó el efecto del sodio sobre la producción de GOS a diferentes concentraciones de lactosa inicial. La figura 4-6 muestra las cinéticas de transgalactosilación de lactosa (40% m/m) en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de sodio; otras cinéticas pueden observarse en los anexos D5 a D8. En general, se encontró que a relaciones de cloruro de sodio iguales o menores que la presente en el lactosuero (818 mg/68 g de lactosa) la actividad hidrolítica de la β -gal se reduce en comparación con el control, pues al cabo de 60 minutos de reacción, la concentración de lactosa es mayor (37 mg/100 mg de carbohidratos) que en la reacción control (figura 4-3,

32 mg/100 mg de carbohidratos). Este resultado corresponde con el reportado por Flores *et al.* [174], quienes afirman que el sodio ejerce un efecto inhibitorio sobre la hidrólisis de la β -gal de *K. lactis*; siendo este directamente afectado por la concentración a la cual el catión se encuentra en el medio.

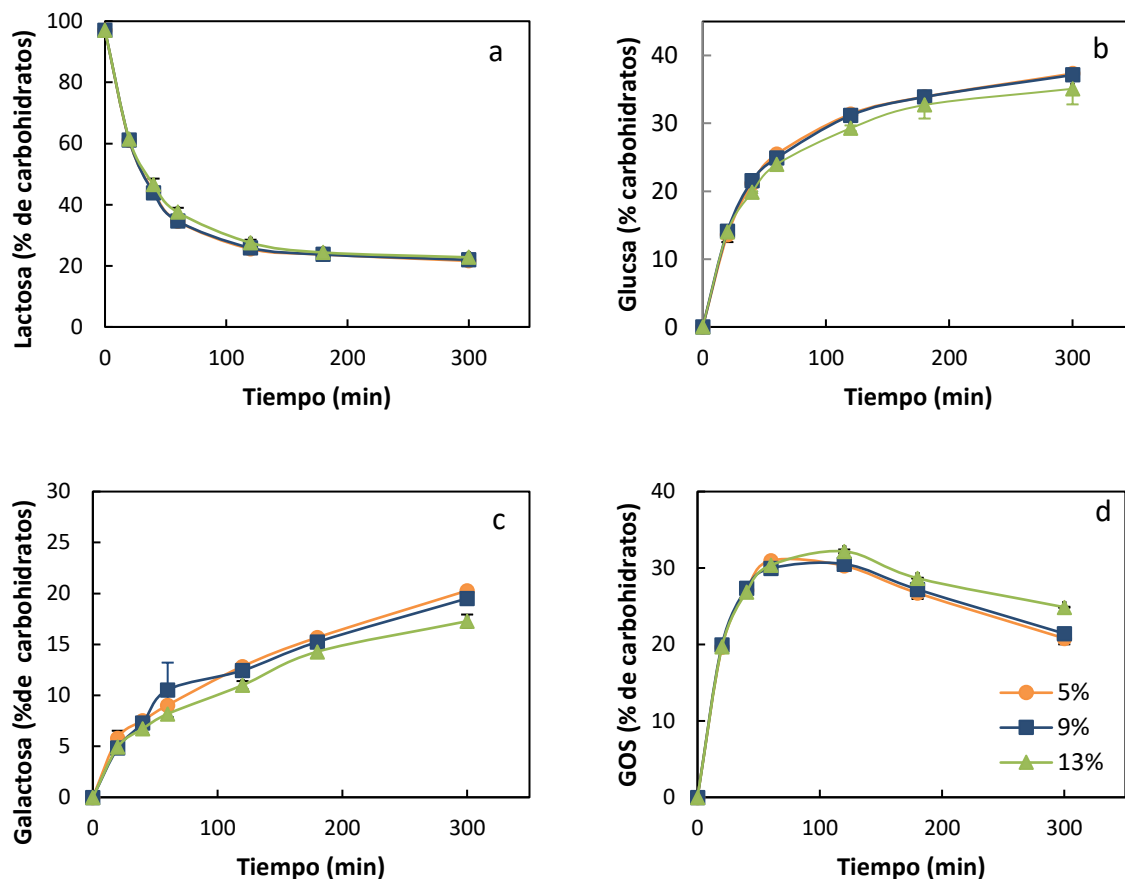


Figura 4-6. Producción de GOS en presencia de cloruro de sodio. Reacción a 40% m/m de lactosa, relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH con diferentes concentraciones de cloruro de sodio. a) lactosa, b) glucosa, c) galactosa y d) GOS.

Según los resultados del ANOVA realizada para el consumo de lactosa, de las tres concentraciones de lactosa inicial, aquella a 45% m/m, mostró un consumo significativamente mayor ($p < 0.05$). De otro lado, la liberación de glucosa (Figura 4-5b) en el medio de reacción no se ve afectada significativamente ($p < 0.05$) por altas concentraciones de cloruro de sodio (4,4 mg/mL). Sin embargo, se observó una producción más baja de galactosa (figura 4-6c) en comparación con la reacción control (Figura 4-3);

en consecuencia, al cabo de 60 minutos de reacción las concentraciones de GOS (Figura 4-7) obtenidas en presencia de cloruro de sodio fueron más altas que en la reacción sin adición del catión. A pesar de este resultado, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones de cloruro de sodio. Según el ANOVA, el promedio de las concentraciones de cloruro de sodio mayores a 8,7 mg/mL producen menos GOS que a 4,4 mg/mL. Esto se puede confirmar en la figura 4-8 que muestra que la actividad enzimática de transgalactosilación en presencia de cloruro de sodio disminuye a medida que se incrementa la concentración de cloruro de sodio en el medio de reacción.

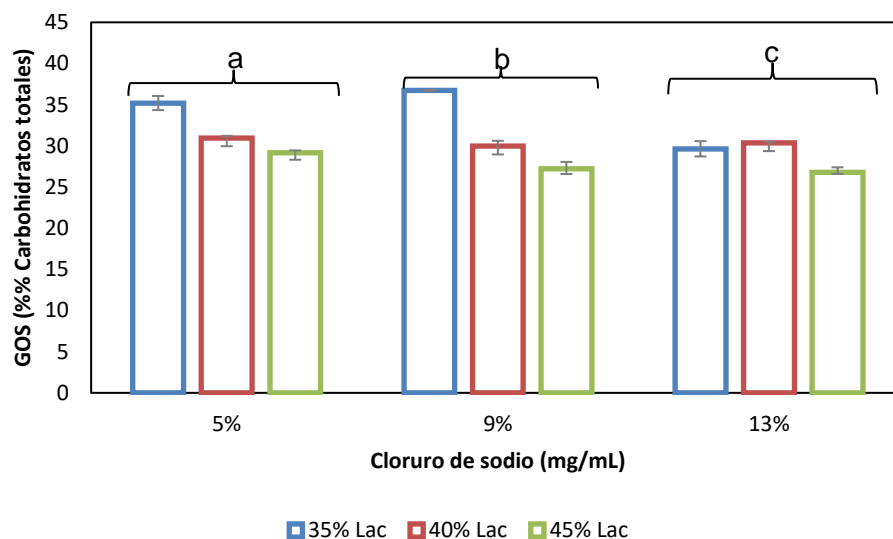


Figura 4-7. Producción de GOS a partir de lactosa en presencia de cloruro de sodio a 60 minutos
 *Grupos con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Fischer & Kleinschmidt [173] encontraron que el sodio actúa como potenciador de la hidrólisis a medida que se incrementa su concentración. De igual manera, Montilla *et al.* [175] reportaron un efecto activador del sodio sobre la actividad de hidrólisis, teniendo su máximo de producción a las 8 horas (16 mg/100 mg de carbohidratos). Otieno [85], de otro lado, reportó que el sodio actúa como un inhibidor de la actividad galactosil transferasa de la β -gal de *K. lactis*;

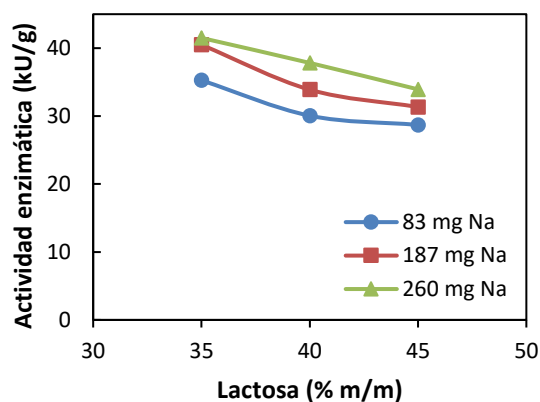


Figura 4-8. Efecto del cloruro de sodio sobre la actividad de transgalactosilación de la β -gal.

Queda entonces confirmado que la disminución en la actividad transferasa de β -gal se debe al aumento en la concentración de lactosa, además, la presencia de cloruro de sodio en el medio incrementa actividad de transgalactosilación (figura 4-8) en concentraciones hasta de 13 mg/mL, la misma presente en el LaS, por lo que se favorece la producción de GOS.

4.4.1.3 Efecto del potasio

Las reacciones que involucraron el cloruro de potasio mostraron la mayor cantidad de lactosa hidrolizada de los cuatro minerales evaluados; la concentración final fue menor al 10% del total de lactosa alimentada. El análisis estadístico se realizó a 40 minutos de reacción, debido a que la reacción logró su máximo a este tiempo. A partir de los resultados obtenidos se encontró que el potasio afecta de manera importante la transgalactosilación debido a que su presencia en la reacción genera menores concentraciones de GOS, las cuales son rápidamente hidrolizadas, favoreciendo por tanto la hidrólisis de estos.

Las cinéticas de este grupo de reacciones se muestran en la figura 4-9; otras cinéticas de reacción con cloruro de potasio se muestran en los anexos D9 a D12. Se encontró que el consumo de lactosa en el medio de reacción con menor concentración inicial de lactosa (35% m/m) fue significativamente ($p < 0.05$) mayor que con 40 y 45 %. Además, el consumo de lactosa fue significativamente mayor ($p < 0.05$) a medida que incrementaba la cantidad de cloruro de potasio en el medio de reacción. Estos resultados

concuerdan con los reportados por Montilla *et al.* [175], quienes sugieren que la actividad hidrolítica de la β -gal se incrementa con la presencia del catión K^+ en mayor proporción que con otros cationes estudiados. En concordancia con el resultado encontrado para la lactosa, en el ANOVA realizado para la glucosa producida, se encontró nuevamente que bajas concentraciones de lactosa y altas concentraciones de cloruro de potasio producen significativamente ($p < 0.05$) más glucosa en el medio de reacción bajo las condiciones evaluadas.

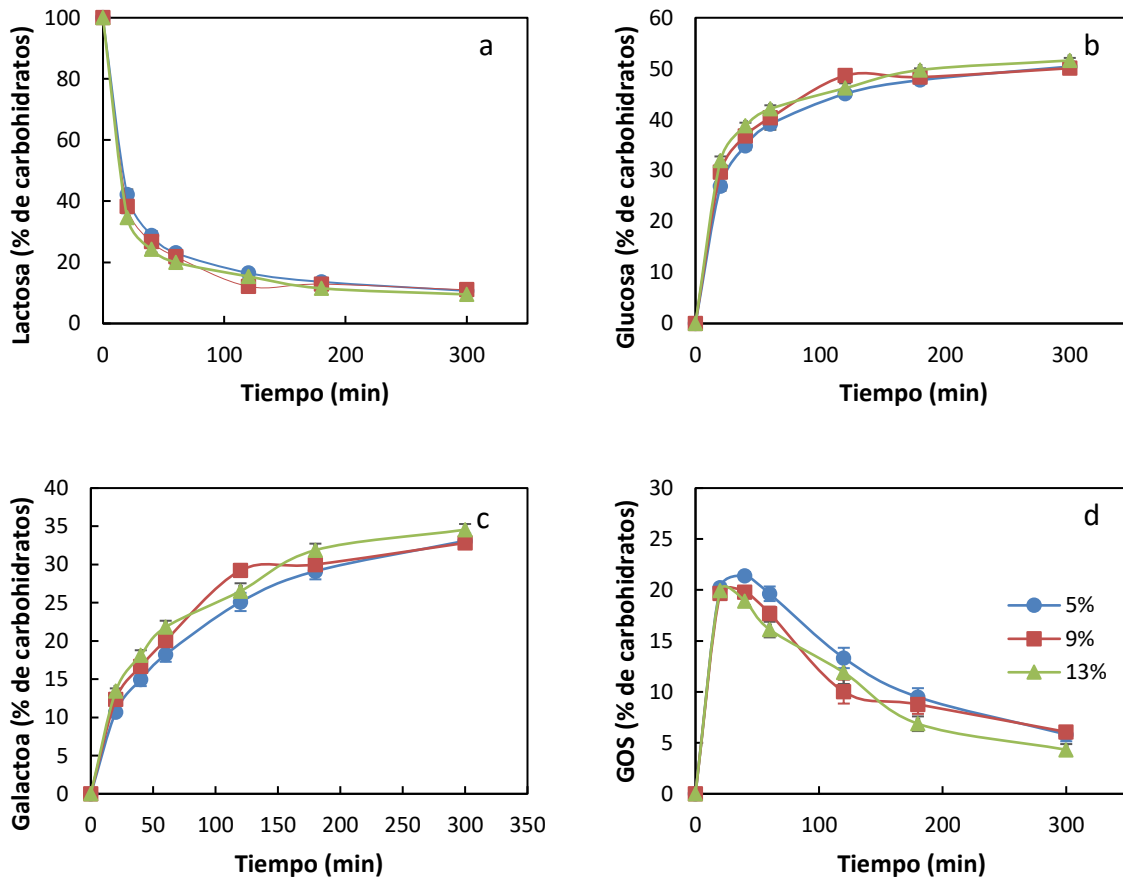


Figura 4-9. Producción de GOS en presencia de cloruro de potasio. Reacción a 40% m/m de lactosa, relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH con diferentes concentraciones de cloruro de potasio. a) lactosa, b) glucosa, c) galactosa y d) GOS.

Hubo también una rápida liberación de monosacáridos (Figura 4-8b y c) al medio. Para las reacciones que ocurrieron a 35 y 40% de lactosa inicial, la concentración de glucosa llegó casi a 50%, mientras que la galactosa supero el 30% del total de carbohidratos presentes en el medio, es decir que la hidrólisis se dio casi por completo.

La producción de GOS (figura 4-10) se vio afectada debido al favorecimiento de la hidrólisis por parte del cloruro de potasio. Los resultados sugieren que en presencia de cloruro de potasio la actividad de transgalactosilación de la β -gal se ve reducida ya que se producen menos GOS, y adicionalmente la degradación estos inicia antes de lo esperado. La mayor producción de GOS reportada (25.2 mg/100 mg de carbohidratos) se encontró con 35% de lactosa inicial y 5 mg/mL de cloruro de potasio a los 40 minutos de reacción. A partir de este momento, esta concentración disminuyó hasta 6% del total de carbohidratos. De acuerdo con Flores *et al.* [174], la hidrólisis de la lactosa por β -gal se ve favorecida en presencia del catión K^+ . En este mismo sentido, Montilla *et al.* [175] coinciden en que la producción de GOS en presencia del K^+ (sin importar el anión que la acompañe) es menor que la producción de GOS en la presencia de Na^+ .

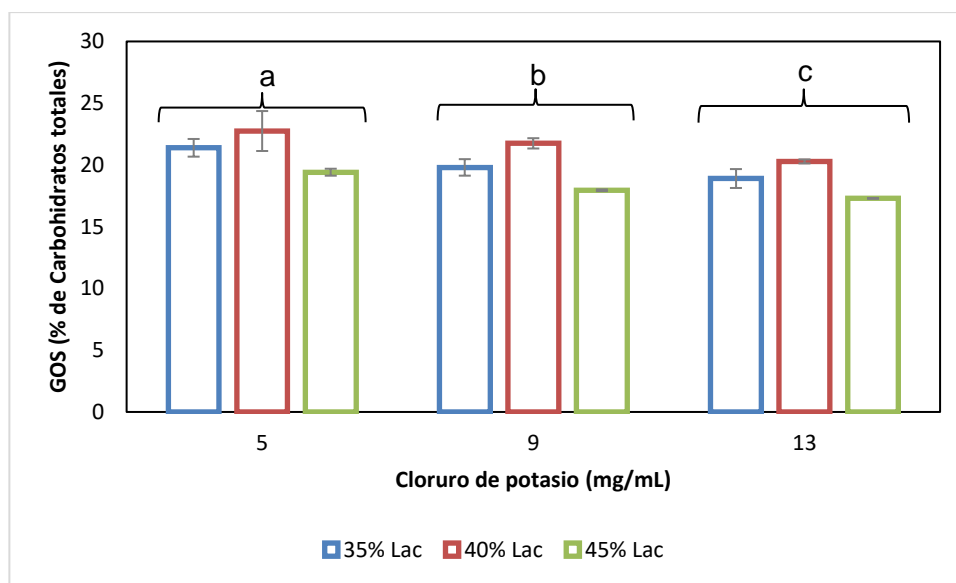


Figura 4-10. Producción de GOS a partir de lactosa en presencia de cloruro de potasio a 60 minutos.

*Grupos letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

El ANOVA realizado para la producción de GOS confirmó que la producción se ve significativamente ($p < 0.05$) disminuida tanto por el incremento de la concentración de

lactosa inicial como del cloruro de potasio. Esto está de acuerdo con lo que se pudo observar en la figura 4-11 donde la actividad transferasa de la β -gal tiene tendencia a disminuir con el aumento de la lactosa y del K.

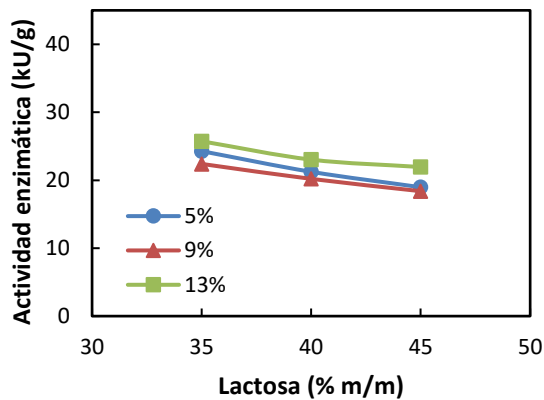


Figura 4-11. Actividad de transgalactosilación de la β -gal en presencia de cloruro de potasio.

4.4.1.4 Efecto del magnesio

La única diferencia encontrada entre las reacciones realizadas con y sin adición de cloruro de magnesio (Anexo D13) fue que en aquellos medios en los que no se agregó la sal, después de aproximadamente 30 minutos de iniciada la reacción, se podía ver un sobrenadante en el medio de reacción. Por el contrario, en aquellos medios en los que había presencia del cloruro de magnesio, el medio no hubo presencia del sobrenadante durante los 300 minutos de reacción. Es de resaltar que en ningún caso la enzima presentó pérdida de actividad, por lo que se puede decir que la enzima no se vio afectada en su sitio activo.

El cloruro de magnesio ha sido reportado en diferentes trabajos como cofactor de la enzima β -gal de *K. lactis* [173], [175], [176] a pesar de ello, se ha reportado que su presencia no es esencial para el funcionamiento de esta enzima. En el presente trabajo se encontró que el cloruro de magnesio no ejerce ningún efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la actividad de la β -gal, por lo que la enzima actúa de la misma manera, en presencia o ausencia de este mineral. La actividad galactosil transferasa reportada para las reacciones

que incluían cloruro de magnesio fue 26,5 kU/g, del mismo orden encontrado en la reacción control.

4.4.1.5 Efecto del calcio

Los experimentos realizados para comprobar el efecto ejercido por el cloruro de calcio durante la producción de GOS mostraron que la reacción se veía completamente inhibida por su presencia a las concentraciones del diseño experimental (15, 10 y 5 mg/mL). Estos resultados indican que este catión ejerce un efecto altamente inhibitorio sobre la β -gal. Por esta razón se exploraron diferentes concentraciones menores a 5 mg/mL para encontrar un valor al cual la β -gal presentara actividad. Las concentraciones de CaCl_2 evaluadas fueron 0.3, 0.6, 1.25 y 2.5 mg/mL. A las condiciones establecidas solo las concentraciones menores a 1.25 mg/mL de calcio presentaron producción de GOS.

En el medio con 0.6 mg/mL de CaCl_2 se evidenció un consumo bajo de lactosa (Figura 4-12a) al cabo de 60 minutos de reacción (solo un 27% de la lactosa inicial), mientras que al final de la reacción la lactosa residual fue de 32%. Además, hubo una baja producción de galactosa, cercana al 10%, al igual que de glucosa, que llegó a 31%. En ambos casos, la producción de GOS estuvo del orden de 28 %. En ambas figuras se puede observar que el máximo de producción de GOS se desplazó desde 40-60 minutos de reacción hasta 180 minutos (30% del total de carbohidratos), tiempo a partir del cual comienza una aparente reducción en su contenido. Por lo anterior, se puede afirmar que el cloruro de calcio es un fuerte inhibidor de la enzima β -gal, no solo en su actividad galactosil transferasa, sino que también afecta de manera significativa la actividad hidrolítica.

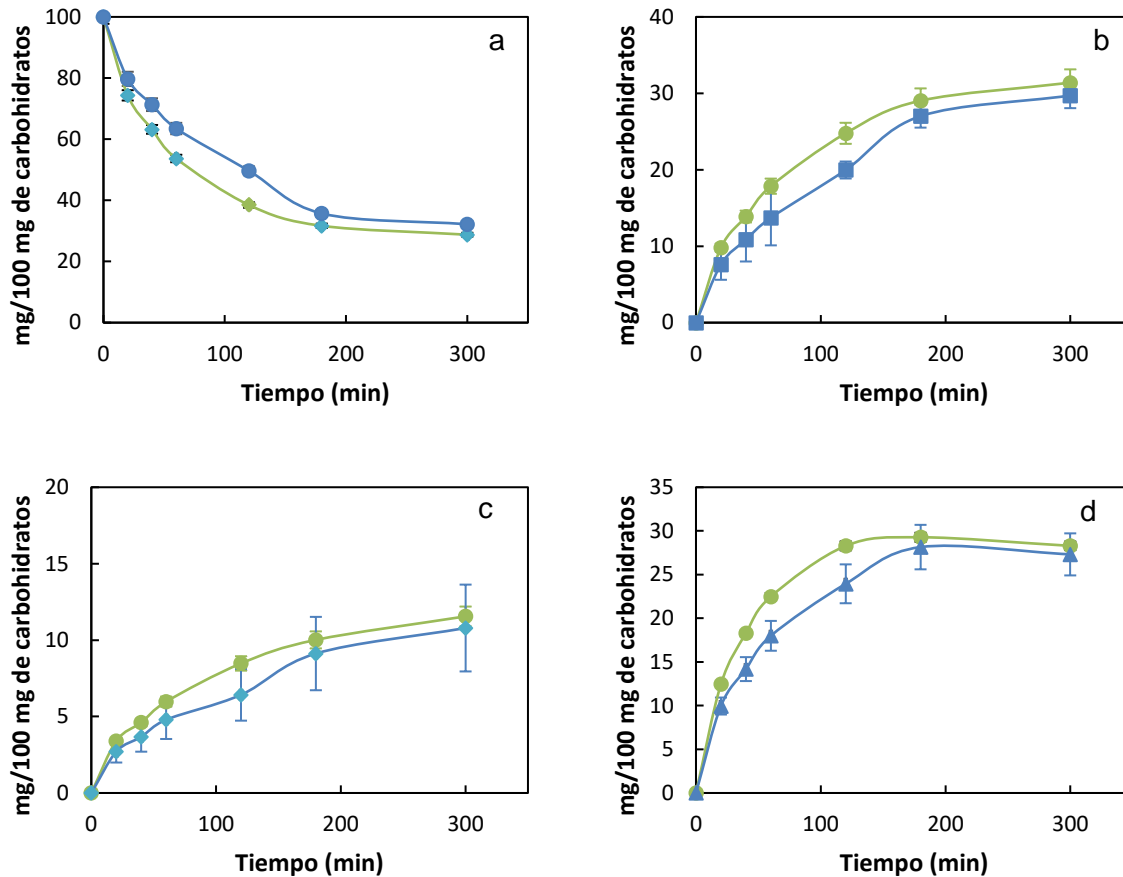


Figura 4-12. Cinética de producción de GOS a 40% de lactosa inicial en presencia de cloruro de calcio. (○) 0,3 mg/mL; (◇) 0,6 mg/mL de cloruro de calcio. a) lactosa, b) glucosa, c) galactosa y d) GOS.

En general se observó que el calcio en forma de cloruro es capaz de ralentizar la velocidad de reacción de la β -gal en el medio con lactosa. En la tabla 4-2 se puede observar como varía la actividad enzimática a diferentes concentraciones de lactosa y cloruro de calcio. A pesar que no especifica la forma en que el calcio afecta a la β -gal de *K. lactis*, Otieno [85] afirma que el catión Ca^{++} actúa como un agente inhibidor. Por otro lado, Fischer *et al.* [173] afirman que a pesar de existir un alto contenido de calcio en el lactosuero, este se encuentra mayoritariamente en forma de fosfato que ha sido previamente liberado durante la precipitación de la caseína en la elaboración del queso. Aunque es necesario considerar también que en el suero existe una elevada cantidad de sodio y potasio que pueden contrarrestar el efecto del calcio.

Tabla 4-2. Actividad galactosil transferasa (kU/g) de β -gal en presencia de cloruro de calcio.

Ca (mg/mL)	Lactosa inicial (%)		
	35%	40%	45%
0	28.5	26.5	26.9
0.3	17.3	18.9	20.0
0.6	13.8	15.7	16.9

4.4.2 Carbohidratos

4.4.2.1 Comportamiento de monosacáridos y lactosa

Según el diseño experimental propuesto (Tabla 3-3), se realizaron 15 reacciones en las que se combinaron diferentes cantidades de lactosa, glucosa y galactosa. De acuerdo con la figura 4-3 la máxima producción de GOS ocurrió a los 60 minutos de adicionada la β -gal; por esta razón, la reacción para evaluar el efecto de monosacáridos sobre la producción de GOS fue monitoreada hasta este tiempo de reacción. A continuación, se describen los tres ensayos más representativos, que contienen lactosa, lactosa:glucosa y lactosa:galactosa (Figura 4-13).

Como se puede observar en la Figura 4-13, la concentración de lactosa disminuyó en todos los medios de reacción, evidenciando la actividad hidrolítica de la β -gal. Sin embargo, en la reacción control (figura 4-3) se reportó una reducción mayor de la lactosa (82% de hidrólisis de lactosa). Para los medios con galactosa y glucosa inicial, el consumo de lactosa fue menor, de 65% y 53% respectivamente. En todos los casos, la concentración de lactosa al cabo de 60 minutos de reacción se redujo hasta aproximadamente 20%.

En general, la concentración de glucosa mostró un rápido incremento después de 20 minutos de inicio de la reacción, excepto para la reacción que tenía glucosa desde el inicio. Este incremento concuerda con los valores reportados por autores como Chockchaisawasdee *et al.* [120], Fischer y Kleinschmidt [173] y Boon *et al.* [99], quienes obtuvieron valores cercanos a 40% de glucosa al final de la reacción.

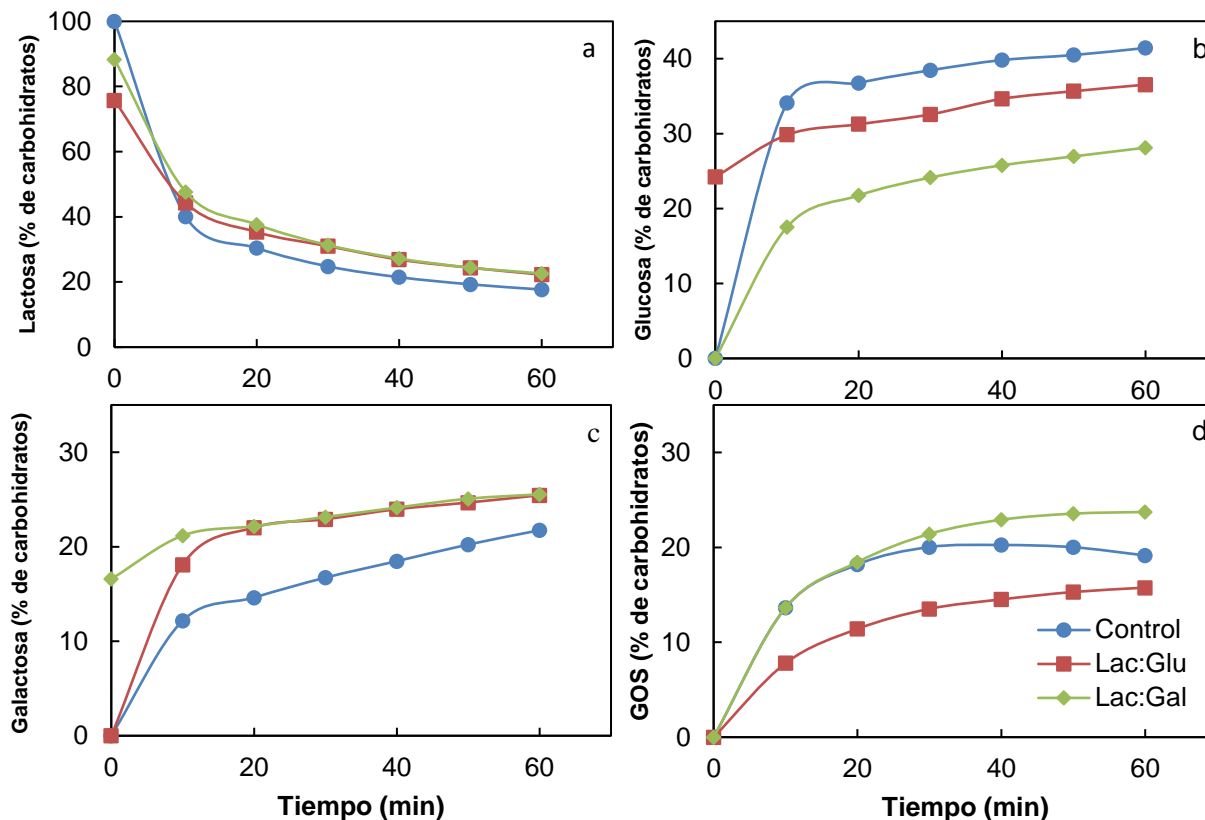


Figura 4-13. Evolución del contenido en carbohidratos durante la reacción de hidrólisis y transgalactosilación de lactosa en presencia y ausencia de galactosa y glucosa. Lactosa (○), Lactosa:glucosa 1:0.6 (□) y Lactosa:galactosa 1:0.3 (◇)

El incremento en la concentración de la glucosa puede considerarse como indicador de la alta actividad hidrolítica de la β -gal. Adicionalmente, como la β -gal empleada presenta una baja habilidad para usar la glucosa presente en la molécula de lactosa para la formación de GOS, el compuesto con mayor presencia en el medio después de 60 minutos de reacción fue la glucosa (Figura 4-13b). Warmerdam *et al.* [104] encontraron que la actividad de transgalactosilación de la β -gal de *K. lactis* es muy baja comparada con la de enzimas equivalentes de otras fuentes microbianas. Según los autores, tanto la cantidad de glucosa liberada en el medio como la baja velocidad de reacción indican que la β -gal de *K. lactis* no puede usar la glucosa como aceptor, lo que está relacionado directamente con la inhibición enzimática causada por este monosacárido.

Por otro lado, la concentración de galactosa residual (Figura 4-13c) llegó al 20% m/m del total de carbohidratos al cabo de 60 minutos, consecuencia de la actividad

hidrolítica de la enzima. En la reacción que contenía lactosa y galactosa al inicio de la reacción, el incremento en la concentración de galactosa no fue tan marcado como en las otras reacciones. Además, la mayor producción de GOS (Figura 4-4d) en esta muestra podría indicar habilidad de la β -gal para usar como aceptor parte de la galactosa libre, así como aquella liberada de la hidrólisis de la lactosa, lo cual explicaría el bajo incremento en la concentración de galactosa durante la reacción.

En cuanto a la reacción control, los GOS producidos tuvieron su máximo a los 40 minutos, sin embargo, los demás mostraron su máxima producción a los 60 minutos. La cantidad de GOS producida es similar a la reportada por González *et al.* [176] que mostró máximos superiores a 25% m/v.

4.4.2.2 Optimización de la producción de GOS

La región óptima para la producción de GOS a partir de lactosa y en presencia de monosacáridos (glucosa y galactosa) se evaluó a través de la metodología de superficie de respuesta (RSM) de Box-Behnken. A través de esta metodología se evaluó además el efecto del contenido total de sólidos en el medio de reacción; para esto se buscó la región del espacio en la que la producción de GOS se pudiera maximizar variando los tres parámetros anteriormente mencionados. Se encontró que las mejores condiciones fueron una relación lactosa:glucosa:galactosa de 1:0:0 en una concentración de 37% de azúcares totales iniciales.

Adicionalmente, se realizó la validación experimental del punto óptimo y el error fue menor que el 5%, por lo que los valores predichos tuvieron un buen ajuste con respecto a los datos experimentales. En la tabla 4-3 se muestra el ANOVA del modelo de superficie de respuesta para la producción de GOS. Los coeficientes de correlación (r^2), correlación ajustado ($\text{adj } r^2$) y correlación predicho ($\text{predicted } r^2$) son mayores al 97%, lo que indica que el modelo es capaz de explicar apropiadamente la variación de los datos experimentales.

Tabla 4-3. ANOVA para la superficie de respuesta de la producción de GOS

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	Valor F	p > F
Modelo	11632.2	9	1292.46	390.06	0.000
Modelo Lineal					
Glucosa (Glu)	9044.5	1	9044.48	2729.55	0.000
Galactosa (Gal)	1175.8	1	1175.81	354.85	0.000
Azúcares Totales (SST)	2.0	1	2.02	0.61	0.470
Modelo cuadrático					
Glu ²	872.1	1	872.08	263.19	0.000
Gal ²	30.2	1	30.18	9.11	0.029
SST ²	1.8	1	1.85	0.56	0.489
Interacciones					
Glu x Gal	438.5	1	438.51	132.34	0.000
Glu x SST	3.2	1	3.16	0.95	0.374
Gal x SST	84.4	1	84.36	25.46	0.004
Residual	16.6	5	3.31		
Falta de ajuste	14.6	3	4.88	5.09	0.169
Error	1.9	2	0.96		
Total	11648.7	14			

$r^2 = 99.86\%$, $r^2(\text{Ajustado}) = 99.60\%$ y $r^2(\text{Predicho}) = 97.95\%$

De acuerdo con el ANOVA, los términos lineales y cuadráticos del modelo ajustado que incluyen a glucosa y galactosa son estadísticamente significativos ($p < 0.05$) sobre la respuesta, así como algunas interacciones. También se puede observar que el contenido de azúcares totales no tiene un efecto significativo ($p > 0.05$) sobre la producción de GOS en los intervalos evaluados. La superficie de respuesta obtenida para la producción enzimática de GOS parece estar altamente influenciada por la glucosa presente en el medio, es decir, cuanto mayor sea la concentración de glucosa en el medio, menor será la cantidad de GOS producida después de 60 minutos de reacción.

En las figuras 4-14a y b se puede observar que la glucosa ejerce el efecto más importante sobre la producción de GOS. Altas concentraciones de glucosa inicial son capaces de inhibir de manera significativa la producción de GOS en el medio de reacción. La presencia de glucosa inicial en el medio conduce a una reducción de la actividad transferasa de la β -gal, evidenciado por la baja cantidad de GOS producida al cabo de 60 minutos de reacción.

Al contrario de nuestros resultados, Chockchaisawasdee *et al.* [120] afirmaron que la inhibición causada por la glucosa sobre la β -gal de *K. lactis* no es tan importante para la producción de GOS además para Kim *et al.* [117], la glucosa es mejor aceptor que la galactosa en la reacción de transgalactosilación durante la formación de disacáridos; sin embargo, estos disacáridos tienen mayor probabilidad de romperse que los de la galactosa, lo que podría explicar la alta producción de glucosa en presencia de β -gal de *K. lactis*.

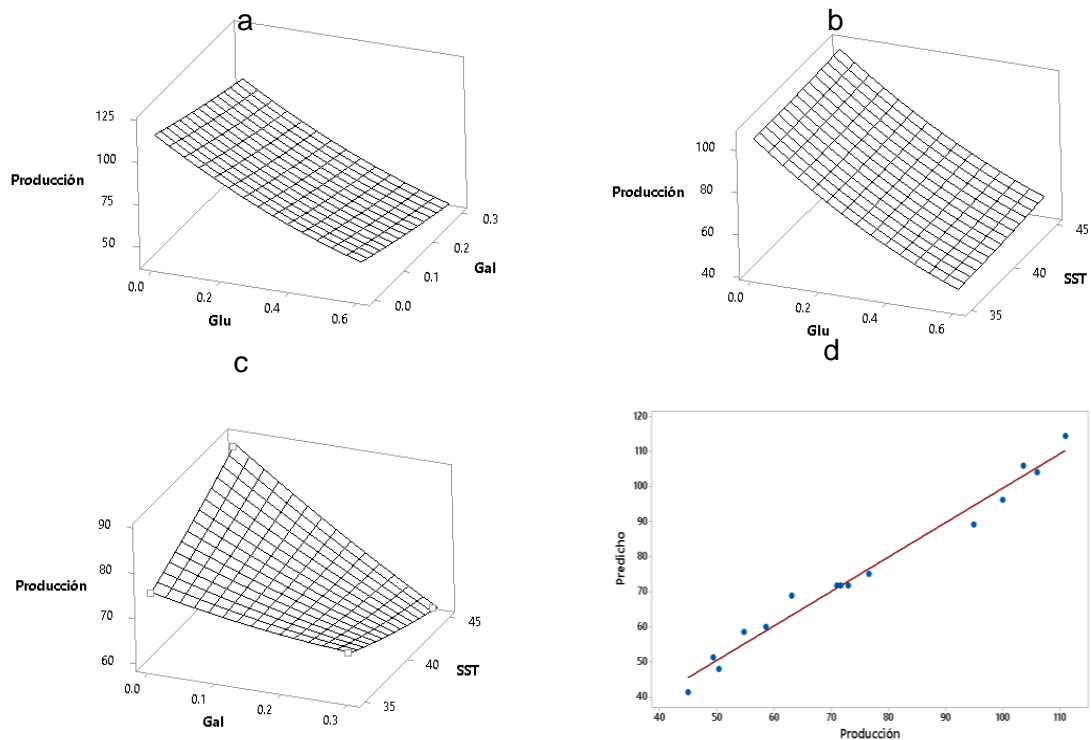


Figura 4-14. Gráficas de superficie de respuesta para la producción de GOS. (a - c) Representación de las superficies de respuesta de las interacciones de dos variables y la producción de GOS (g/l), (d) valores predichos vs experimentales de las interacciones de las variables evaluadas en la superficie de respuesta.

Se observó que tanto la ausencia de monosacáridos y el incremento en la concentración de sólidos solubles parecen tener un efecto positivo en la producción de GOS; sin embargo, las demás combinaciones condujeron a una reducción considerable del contenido de GOS en el medio al cabo de 60 minutos de reacción. En el presente trabajo se encontró que el efecto inhibitorio dado por la glucosa en las concentraciones evaluadas es mucho más importante que el ejercido por la galactosa, que mostró niveles

de inhibición más bajos. González-Delgado *et al.* [176] reportan en su trabajo que los mejores rendimientos para la síntesis de GOS a partir de β -gal de *K. lactis* se producen cuando existe una relación glucosa/galactosa igual o superior a 1.6; es decir, cuanto más glucosa contenga el medio, mayor será el rendimiento de GOS, lo que contradice los resultados aquí reportados. Sin embargo, estos resultados se obtuvieron a concentraciones de lactosa inicial más bajas que las trabajadas en este proyecto.

La concentración total de azúcares no mostró un efecto significativo en el intervalo evaluado para la producción de GOS, sin embargo, su interacción con la galactosa fue significativa ($p < 0.05$). Se sabe que altas concentraciones de lactosa inicial conducen a mejores producciones de GOS y por lo tanto a mejores rendimientos; aunque esta concentración está limitada por la solubilidad de la lactosa en agua (37% m/v a 40°C) [14]. González *et al.* [176] estudiaron el efecto de la lactosa inicial desde 50 hasta 250 g de lactosa /L de medio para la producción de GOS, encontrando que el rendimiento en la producción de GOS se incrementaba con el incremento en la cantidad de lactosa inicial, estabilizándose a altas concentraciones. Según los autores, la producción fue de 113 g/L de GOS al cabo de cinco horas de reacción y una dosis de enzima cinco veces menor que la empleada en el presente trabajo. Este es un valor similar al obtenido (108 g/L) aunque en un tiempo mucho más largo. Como ya se mencionó anteriormente, la relación enzima sustrato y, por tanto, la actividad de la β -gal varían considerablemente, esta pudo ser una razón de que los rendimientos de la enzima hayan sido similares a pesar de la concentración de sustrato.

Como respuestas adicionales a la producción de GOS, se evaluaron también el rendimiento de la reacción y la conversión de lactosa, parámetros importantes a tener en cuenta al momento de evaluar la conveniencia de un proceso.

Por ello, se realizó una optimización que tuvo en cuenta estos tres criterios como se muestra en la figura 4-15. Allí se muestran comportamientos muy similares para la variación del rendimiento y la productividad con respecto a las variables estudiadas, pero diferente para la conversión. Cuando el valor obtenido para la función de deseabilidad compuesta se acerca a 1 indica una alta cercanía de la respuesta a su valor ideal; para el caso de la reacción de producción de GOS se encontró que la deseabilidad alcanza su máximo valor cuando las relaciones lactosa:glucosa y lactosa:galactosa son 1:0:0 y el contenido de sólidos solubles es 37.3%, logrando una deseabilidad de 0.982.

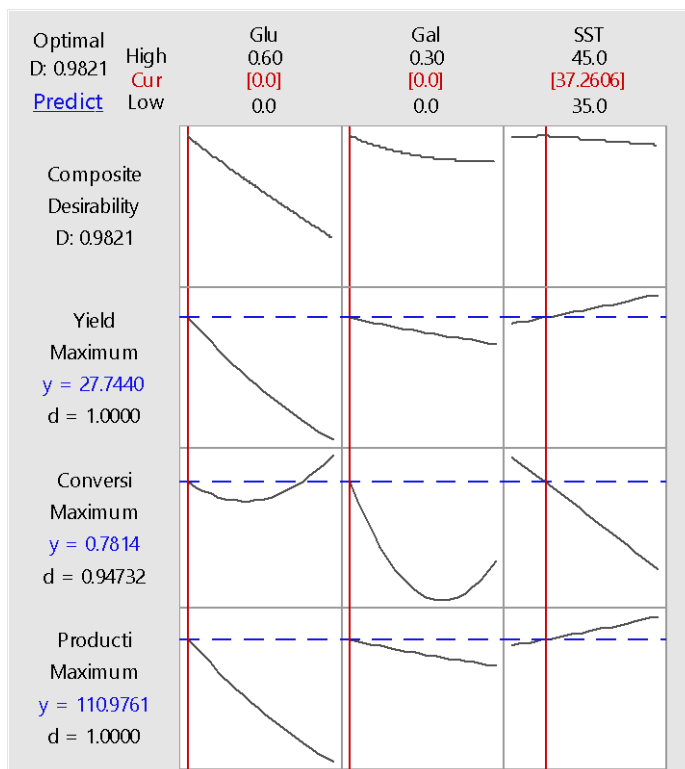


Figura 4-15. Optimización de la relación azúcares en la producción de GOS.
Lactosa:glucosa (Glu), lactosa: galactosa (Gal) y azúcares totales (SST) para rendimiento, conversión y producción de GOS.

Por conveniencia se decidió trabajar con una concentración de azúcares totales de 40% para los demás ensayos de este trabajo, con el riesgo de reducir ligeramente la conversión de lactosa, aunque aumentando el rendimiento y la producción de GOS. Según la optimización realizada, al fijar los sólidos en 40% se redujo la deseabilidad a 0.962, un valor que no afecta considerablemente la reacción.

Como se mencionó anteriormente, la presencia de los monosacáridos en el medio de reacción afecta negativamente la actividad de la β -gal de *K. lactis* en la producción de GOS. El efecto negativo de la glucosa sobre la producción de GOS es mayor que el ejercido por la galactosa, por esta razón la implementación de una estrategia para eliminar la glucosa del medio podría aliviar la inhibición debida a esta. Para ello, se propuso la producción enzimática de ácido glucónico a partir de la glucosa resultante de la hidrólisis por β -gal en la producción de GOS.

Un resumen de todo lo expuesto anteriormente, se muestra la Tabla 4-4. Como se ha mostrado hasta aquí, diferentes factores inciden en la producción enzimática de GOS usando β -gal de *K. lactis*. Se ha demostrado que la glucosa reduce considerablemente la producción de GOS, así como la galactosa, aunque esta última presenta un efecto mucho menos marcado. Además, la relación enzima:sustrato es importante para lograr buenos rendimientos de producción y evitar que los GOS se hidrolicen. De otro lado se establecieron los diferentes efectos que tienen los minerales y la proteína del lactosuero sobre la actividad hidrolítica y transferasa de la β -gal.

Tabla 4-4. Interacciones entre β -gal y los componentes del lactosuero.

Componente	Efecto sobre la β-gal
Relación E:S	0.25% Muestra los mejores rendimientos de producción de GOS
Glucosa	Reduce notablemente la producción de GOS.
Galactosa	Reduce de manera moderada la producción de GOS.
Azúcares totales	> 40% de solidos reducen rendimientos.
Proteína	No ejerce efecto aparente.
Cloruro de sodio	Presenta efecto activador de la transgalactosilación.
Cloruro de potasio	Efecto activador de la hidrólisis – Se alcanza el máximo en tiempo más corto y posteriormente se hidrolizan los GOS.
Cloruro de magnesio	No ejerce efecto aparente sobre la producción de GOS – Evita desnaturalización de la enzima.
Cloruro de calcio	Concentraciones >0.6 mg/mL inhiben completamente la reacción.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, algunos de los componentes del lactosuero podrían afectar negativamente a la actividad enzimática y, por tanto, a los rendimientos de producción de GOS, aunque otros pueden afectarlos positivamente. En este sentido, podría ser necesario realizar operaciones previas de purificación que permitan reducir los componentes que afectan negativamente a niveles en los cuales su efecto es el menor posible; por ejemplo, operaciones de separación, o de osmosis inversa o resinas de intercambio iónico para remoción de minerales. Ahora bien, hay que tener en cuenta la mezcla de cationes presentes por lo que es necesario estudiarlos en su conjunto, como se encuentran de forma natural en el suero y el permeado.

Otra de las estrategias sería intentar aplicar procedimientos en los que la actividad enzimática se viera incrementada. Así, dado que se ha visto que los ultrasonidos (US) pueden afectar la actividad de diferentes enzimas capaces de sintetizar oligosacáridos, como es el caso de Bera *et al.* [147] quienes afirman que el uso de US es bastante útil en la producción de este tipo de compuestos. Por esta razón, se propuso la evaluación adicional del efecto de los US sobre la producción de GOS.

4.4.3 Efecto de los US sobre la producción enzimática de GOS

Demirhan *et al* [177] reportaron un efecto positivo de los US sobre la hidrólisis de la lactosa en leche, donde el consumo de lactosa por β -gal de *K. fragilis* alcanzó 92% en presencia de US, comparado con 68% en condiciones normales. A continuación se relata el efecto de los US y de la fuente de lactosa: pura (>99.9% de lactosa), permeado de lactosuero (88% lactosa, 7% Minerales y 3% proteína) y lactosuero (lactosa 68,7%, minerales 7,5% proteína 12,5%) sobre la producción de GOS en un medio con 40% de lactosa.

Debido al contenido de sólidos diferentes a la lactosa presentes en el lactosuero, y a su dificultad para solubilizar la máxima concentración en medios diferentes a la lactosa, fue necesario ajustar el contenido de lactosa en este medio a 37% que, como ya se demostró, no existe diferencia significativa entre la producción de GOS a 35 y 40% de sólidos; lo que permitió tomar esta decisión. En la figura 4-16 se muestran las cinéticas de producción de GOS en las combinaciones de los diferentes tratamientos con US.

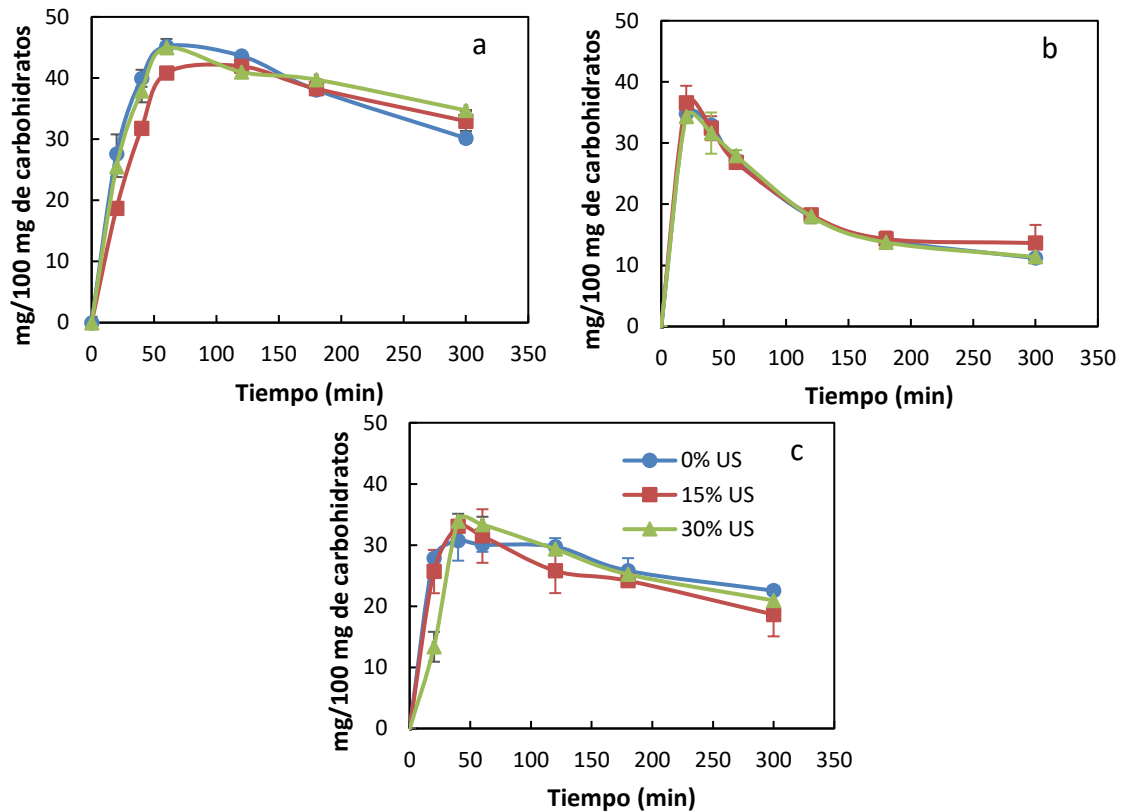


Figura 4-16. Producción de GOS en: (a) lactosa; (b) Per; (c) LaS con diferentes amplitudes de US

En los ensayos realizados se encontró que no existe un efecto significativo ($p > 0.05$) de los US sobre la producción de GOS; sin embargo, la fuente de lactosa es una limitante importante para la producción de GOS. El permeado mostró un efecto similar al mostrado por el cloruro de potasio en el medio de reacción, donde hubo un rápido incremento en la concentración de GOS durante los primeros 20 minutos y luego una rápida reducción debida a su hidrólisis. Esta disminución en la concentración de GOS fue muy rápida, comparada con los demás tratamientos evaluados (Lactosa y lactosuero). Según los resultados reportados anteriormente para el efecto de los minerales, el comportamiento aquí mostrado puede estar relacionado con la presencia de potasio permeado, lo que favorece la hidrólisis de la lactosa y de los GOS.

De otro lado, las cinéticas realizadas en el medio de lactosuero mostraron un comportamiento intermedio en el que la proteína de lactosuero parece moderar el efecto inhibitorio causado por las sales de potasio que se encuentran en una concentración

aproximada de 28 mg/g de permeado [178]. A pesar de presentar una producción de GOS más baja que con el medio de lactosa, la variación en la concentración de GOS en el medio con lactosuero sigue una tendencia similar en el tiempo de reacción. Aunque en un periodo de tiempo más largo debido al uso de una dosis menor de enzima, Lisboa *et al.* [179] obtuvieron cinéticas similares para una reacción a partir de lactosuero y enzima del mismo origen; la producción máxima reportada por estos autores al cabo de cuatro horas de reacción estuvo en el mismo intervalo que la encontrada en este trabajo a los 60 minutos de la reacción. Otros trabajos como el de Goulas *et al.* [100] obtuvieron rendimientos entre 36 - 43 mg/100 mg de carbohidratos; sin embargo, estos resultados fueron logrados en tiempos largos (30 horas de reacción – 10 horas hasta obtener el máximo de GOS) con una fuente diferente de la enzima (*A. oryzae*) y también dosis diferentes de enzima. Es importante resaltar que largos tiempos de reacción no son deseables debido a los costos en que se incurre durante el proceso.

4.5 Oxidación de la glucosa a ácido glucónico

Se comprobó que la glucosa, además de ser producida en cantidades cercanas al 40% del total de carbohidratos presentes en el medio, ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad galactosil transferasa de la β -gal de *K. lactis*, por lo que su remoción no solo puede facilitar los procesos de purificación, sino que también podría ayudar a aliviar la inhibición causada. Por esta razón se propuso eliminarla del medio a través de su oxidación a ácido glucónico usando un sistema bi-enzimático (β -gal – Gox), para lo cual fue preciso estudiar primeramente la oxidación de glucosa a glucónico y el efecto ejercido por algunos de los componentes del lactosuero sobre la actividad de la Gox.

Debido a que, como ya se reportó anteriormente, la mayor parte del calcio presente en el lactosuero no está libre, se decidió no evaluar su efecto. En general se encontró que ni la presencia de proteína de lactosuero, ni la presencia de sodio o potasio (Figura 4-17) en las concentraciones normalmente halladas en el lactosuero incidieron de manera significativa ($p > 0.05$) en la producción de ácido glucónico a partir de glucosa y Gox. Por lo anterior, es posible afirmar que estos compuestos no afectan a la reacción de oxidación y, por tanto, a la actividad de la Gox.

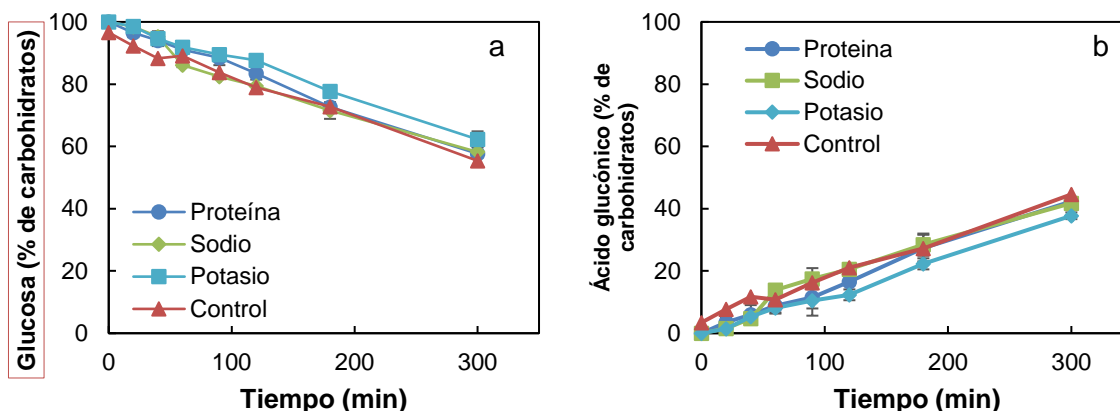


Figura 4-17. Cinéticas de consumo de glucosa (a) y producción de ácido glucónico (b) en presencia de proteínas de suero, sodio y potasio.

Como se observa en la figura 4-18, solo el 42% de la glucosa disponible se había oxidado a ácido glucónico al cabo de cinco horas de reacción, por esto, se propuso el uso de US como alternativa para acelerar la reacción [151]. En la figura 4-18a se muestra el comportamiento cinético de la oxidación de la glucosa en presencia de diferentes amplitudes de US. Se puede observar que la muestra control (0% US) tiene una tendencia lineal donde apenas ha consumido el 44% de la glucosa inicial, dejando una gran cantidad de sustrato por consumir al cabo de cinco horas de reacción. A medida que se incrementa la amplitud de los US se observa una disminución en la concentración de sustrato, de tal manera que con 30% de la amplitud y dos horas de reacción, se logró una conversión superior al 75%, momento a partir del cual el incremento en la concentración de ácido glucónico tendió a estabilizarse.

En cuanto al ácido glucónico se evidenció que un incremento en la amplitud de US también aumenta su velocidad de producción, lo que supone una mayor actividad enzimática de la Gox. Esta mayor actividad puede ser explicada con alguno de los efectos que los US causan sobre un fluido como la cavitación y el incremento en la turbulencia [159]. Estos pudieron haber incrementado la transferencia de masa de las moléculas reactivas (sustrato y aire) hacia la enzima [151], [159], lo que condujo a un mejor mezclado y a una mayor velocidad de reacción. Esto último es particularmente significativo, ya que el tiempo de reacción, que normalmente es de 15 horas [180], en presencia de US se redujo a 2 horas de reacción en el presente trabajo, usando la misma fuente de enzima. En trabajos realizados por Witonska *et al.* [134] y Önal *et al.* [181] se lograron tiempos de

reacción menores (1 y 2 horas) usando catalizadores químicos; sin embargo, estas reacciones requirieron de elevadas temperaturas (50 – 90°C), valores de pH alcalinos y aunque hubo conversiones de glucosa superiores a 70%, también se reportó la generación de productos no deseados como sorbitol, indicador de bajas selectividades.

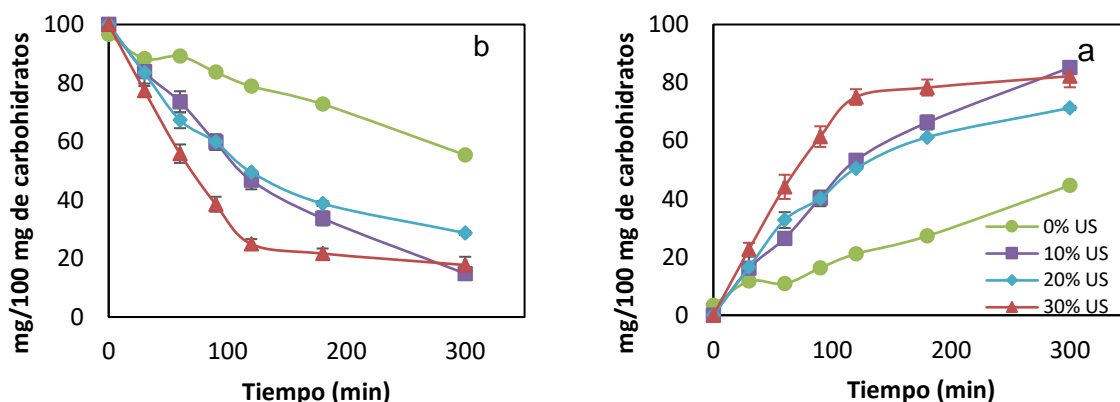


Figura 4-18. Cinéticas de producción de ácido glucónico (a) y consumo de glucosa (b) en presencia de US. (○) 0% US, (□) 10% US, (◇) 20% US, (Δ) 30% US.

En resumen, a partir de los ensayos realizados se observó que los componentes mayoritarios del lactosuero no afectan la actividad enzimática de la Gox. Además, se encontró que el uso de US es una herramienta útil para acelerar la reacción de oxidación enzimática de la glucosa a ácido glucónico en medio acuoso a pH 6,0 y 40 °C, condiciones a las cuales también es posible producir GOS por vía enzimática.

Cómo es posible la producción de GOS y la de ácido glucónico bajo las mismas condiciones de reacción (40°C y pH 6,7 – 7,0 en buffer fosfato) en la siguiente etapa se evaluó su trabajo conjunto (sistema enzimático mixto).

4.6 Producción de GOS y de ácido glucónico en un sistema enzimático mixto

En el presente apartado se describirán los resultados obtenidos para el uso de enzimas β -gal y Gox en serie (adición secuencial) y en paralelo (adición simultánea). Para la identificación y cuantificación de los compuestos generados, la técnica cromatográfica empleada permitió la separación de los disacáridos (GOS2) y de la lactosa; se encontró

que la β -gal de *K. lactis* produjo gran cantidad de GOS2 y GOS3, y pequeñas fracciones (< 3%) de GOS4. Dentro de los disacáridos producidos se encontraron galactobiosa (β 1-3) y alolactosa (gal- β -(1-6) glu), identificados previamente en trabajos realizados por Hernández *et al.* [182], además de algunos compuestos minoritarios no identificados. Dentro de los trisacáridos reportados por los mismos autores se encontró también la 6-galactosil-lactosa. Los perfiles cromatográficos obtenidos, en general, son similares a los reportados en la literatura por otros autores [170], [183], [184]. Debido a las bajas concentraciones en que se encontraban, los tetrasacáridos no son visibles en el Anexo C2.

Para la síntesis enzimática de GOS en un sistema mixto de enzimas en el que se transforme la glucosa generada en la reacción de transgalactosilación a un subproducto de valor agregado, se propusieron dos sistemas enzimáticos. En el primero se adicionaron las dos enzimas (β -gal y Gox) al mismo tiempo (simultáneo), mientras que en el segundo se adicionó primero la β -gal y pasados 60 minutos (tiempo al cual se encontró mayor producción de GOS y una alta concentración de glucosa) se adicionó la Gox (secuencial). El pH se controló con solución solución 5 %m/m de hidróxido de sodio.

La cinética de los sistemas mixtos mencionados anteriormente se muestra en la figura 4-19. Se puede observar que la lactosa (Figura 4-19c) se consumió más rápidamente en el sistema secuencial que en el sistema simultaneo, sin embargo, al final de la reacción, el contenido de lactosa fue similar. Después de 5 horas de reacción el consumo de lactosa fue superior al 90% en ambas reacciones con un remanente de lactosa de 8,7 y 7,1% m/m para la reacción simultánea y secuencial, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Fischer y Kleinschmidt [173] y por Martínez-Villaluenga *et al.* [183], quienes también reportaron consumos de lactosa superiores al 90% al final de la reacción.

En cuanto al contenido de galactosa (figura 4-19c) se puede decir que su producción fue más baja que en la reacción control. En los sistemas bi-enzimáticos la cantidad de galactosa producida fue la mitad de la producida en la reacción convencional al cabo de 5 horas de reacción. Además, el sistema mixto que menos galactosa produjo fue el secuencial, aunque esta diferencia fue de solo 2%.

En la Figura 4-19b, se puede observar que en el sistema secuencial se produjo mayor cantidad de glucosa en la primera hora de reacción, sin embargo, después de este tiempo su contenido se redujo en un 11% debido a la actividad de la Gox, llegando a

valores de 26%, casi un 60% menor que la reacción control. Por otro lado, el sistema simultáneo mostró una velocidad de producción de glucosa más baja, hasta los 120 minutos de reacción, después de este tiempo se presentó un consumo, aunque más bajo que en el control. La cantidad de glucosa residual (38%) presente en el medio usando esta estrategia de reacción no difiere significativamente de la reacción solo con β -gal (41%) por lo que se puede afirmar que el uso de un sistema simultáneo no es particularmente efectivo para oxidar la glucosa.

La reducción en el contenido de glucosa y del pH en el sistema secuencial indicaron oxidación de la glucosa y producción de ácido glucónico por parte de la Gox. La concentración de ácido glucónico (figura 4-19d) en el sistema secuencial llegó a 11%*m/m*, mientras que la generada en el sistema simultáneo alcanzó apenas 2%. A partir de los resultados obtenidos se puede afirmar que adicionar la Gox cuando el medio presenta alto contenido de glucosa puede favorecer la producción de ácido glucónico. Onishi *et al.* [185] reportaron el consumo casi total de glucosa en un sistema secuencial, donde se adicionó la Gox después de 24 h de adición de la β -gal; en este sistema tampoco hubo efectos antagónicos de las enzimas. Mafra *et al.* [137] trabajó en la producción de ácido glucónico a partir del hidrolizado de sacarosa en un sistema mixto (invertasa, Gox y catalasa), reportando una oxidación total de la glucosa. En este caso, la Gox era de la misma fuente y dosis similar (2.6 U) a la reportada en el presente trabajo, adicionalmente, el mismo autor reportó un tiempo de reacción de 5 horas. En los dos trabajos anteriores, los autores encontraron una alta oxidación de la glucosa a ácido glucónico; sin embargo, los largos tiempos de reacción (> 24h) son un inconveniente desde el punto de vista de los costos del proceso.

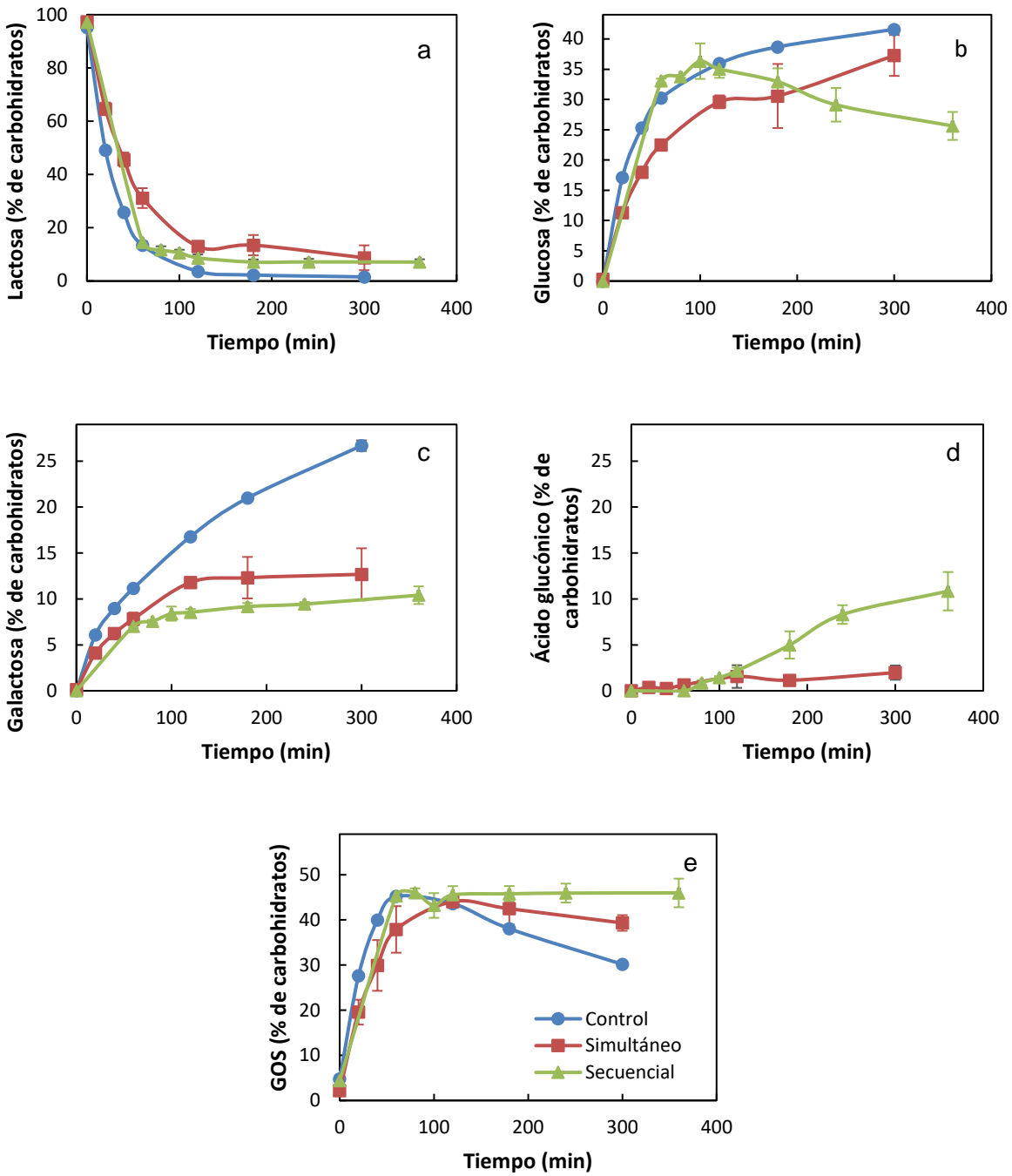


Figura 4-19. Cinética de los sistemas multienzimáticos a 40 °C, pH de 7,0; dosis de β -gal 1,7 U/mL y Gox 3,2 U/mL.

Control (○), Sistema simultáneo (□) y secuencial (Δ) para (a) lactosa, (b) glucosa, (c) galactosa, (d) ácido glucónico y (e) GOS.

En la figura 4-19e se muestra la producción de GOS durante la reacción. El sistema secuencial mostró una concentración de GOS (>45% m/m) al cabo de 1 hora de reacción, similar a la producción de GOS en el sistema control, sin embargo, el sistema secuencial tuvo la particularidad de que después de 60 minutos de reacción el contenido de GOS se mantuvo constante en el medio, mientras que el sistema simultáneo produjo una concentración máxima de 44% a los 120 minutos y posteriormente se redujo hasta 39%, un comportamiento similar al control. Cabe resaltar que esta reducción fue menor que la presentada por la reacción convencional que llegó hasta 34% al final de la reacción. Cheng *et al.* [170] evaluaron el efecto de un sistema simultáneo de producción de GOS y ácido glucónico con lactosa como sustrato, encontrando que no existía ningún efecto potenciador o inhibitorio del sistema bi-enzimático sobre la producción de GOS o la actividad de la β -gal.

Las concentraciones de GOS obtenidas (44 y 45% m/m) en este proyecto fueron más altas que las reportadas por Martínez-Villaluenga *et al.* [183] y Chockchaisawasdee *et al.* [120] en sistemas enzimáticos simples, quienes obtuvieron concentraciones de GOS cercanas al 30% del total de carbohidratos presentes en el medio. A pesar de haber usado la misma fuente de enzima (*K. lactis*), esta variación puede deberse a la dosis o el proveedor (Novozyme® o CHR Hansen ®) de la enzima empleada, o incluso a factores como el buffer empleado, puesto que como ya se demostró, el catión potasio usado en los trabajos reportados, favorece la hidrólisis de la lactosa sobre su transgalactosilación [186].

Los resultados obtenidos en los ensayos hasta aquí realizados muestran que la actividad galactosil transferasa de la β -gal de *K. lactis* no se ve afectada negativamente por el sistema mixto de enzimas. Sin embargo, se observó que la Gox de *A. oryzae* era capaz de producir una concentración de ácido glucónico 5 veces mayor en un sistema secuencial, que cuando se empleó el sistema simultáneo de enzimas. Por esta razón se decidió utilizar este sistema en los ensayos siguientes.

4.7 Sistemas multienzimáticos con otras fuentes de lactosa

Una vez se realizaron los ensayos para definir la mejor alternativa de adición de enzimas al sistema multienzimático en un medio compuesto por lactosa (40%) en buffer

fosfato de sodio 0.05 M y la dosis apropiada de enzima, se procedió a comparar el sistema multienzimático en diferentes medios ricos en lactosa: lactosa pura (Lac), lactosa + proteína (La+P), permeado de lactosuero (Per) y lactosuero (LaS). También, se aplicaron diferentes amplitudes de US (0%, 15% y 30% de la potencia máxima). En trabajos realizados por Sheu *et al.* [145] se encontró que la Gox requiere un tiempo superior a 12 horas para lograr una conversión superior al 90% de la glucosa presente en el medio; sin embargo, como ya se demostró anteriormente, los US fueron capaces de reducir el tiempo de conversión de la glucosa en ácido glucónico a tiempos similares a los empleados por β -gal para producir GOS. A continuación se presentan los resultados obtenidos para el sistema multienzimático.

4.7.1 Efecto de los US sobre el sistema multienzimático

En las reacciones enzimáticas se encontró que β -gal utilizó más del 90% de la lactosa (Anexo D15) presente en los diferentes medios empleados; sin embargo, en ninguno de los casos evaluados existió efecto de los ultrasonidos sobre la β -gal en relación con su habilidad para consumir la lactosa; este resultado se esperaba debido al comportamiento obtenido para las reacciones modelo con lactosa pura. De acuerdo con los resultados obtenidos en el ANOVA para este grupo de ensayos, no existe efecto significativo ($p > 0.05$) de los US sobre la hidrólisis de lactosa. Este mismo comportamiento fue encontrado para la galactosa en todas las fuentes de lactosa evaluadas (Ver anexo D16). También, se encontró que el uso de US o su interacción con la fuente de lactosa no ejercen ningún efecto significativo ($p > 0.05$) sobre la concentración máxima producida de GOS en el medio. Así como sucedió cuando la β -gal trabajó sola, se puede confirmar que los fenómenos de cavitación o turbulencia, u otros asociados al uso de US, no afectan significativamente a la β -gal de *K. lactis* y las concentraciones de GOS producidas.

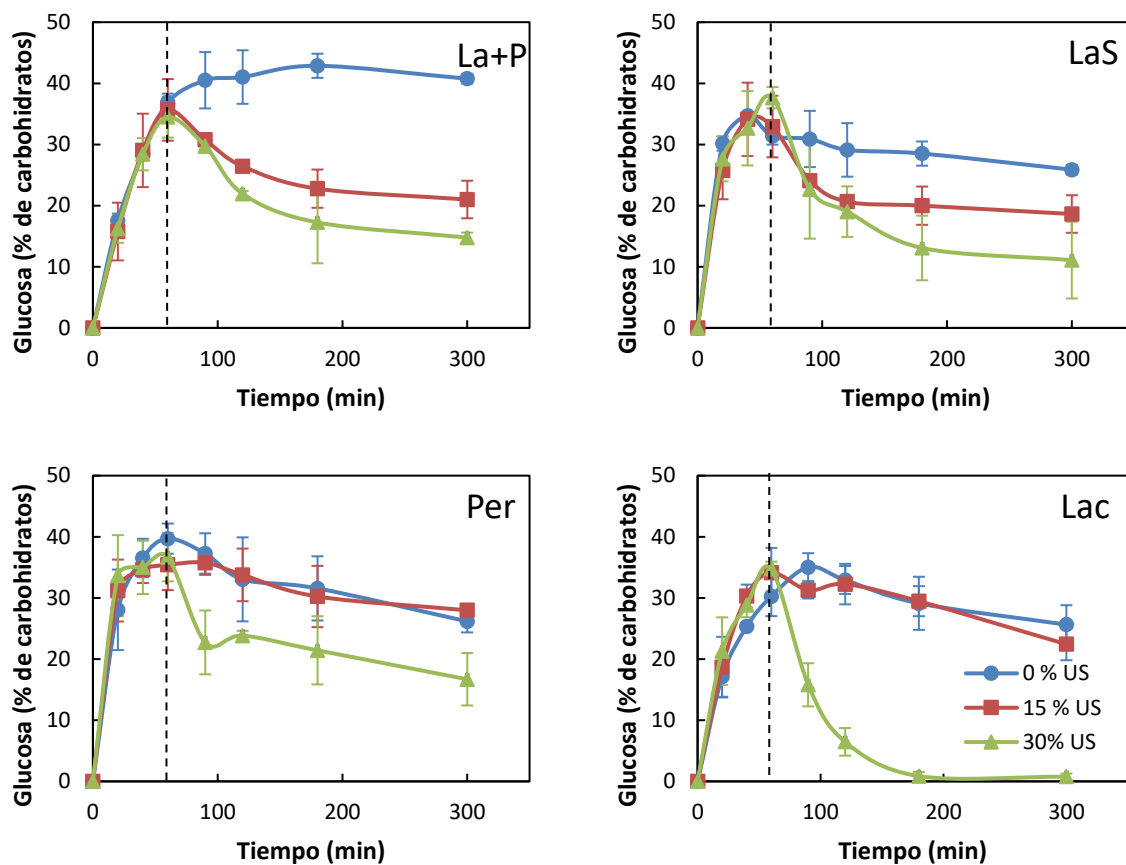


Figura 4-20. Producción de glucosa con un sistema multienzimáticos secuencial.

Lac = lactosa; La+P = Lactosa + proteína de lactosuero; Per = permeado de lactosuero; LaS = Lactosuero. (○) 0% US, (□) 15% US, (Δ) 30% US. Condiciones de reacción: 40% m/m equivalente de lactosa, relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH.

Por otro lado, se encontró un efecto significativo ($p < 0.05$) para el consumo de glucosa (Figura 4-20) a partir de 60 minutos de reacción, tiempo al cual fue adicionada la Gox y existía una concentración media de glucosa de 35% m/m, se encontró que las diferencias estadísticas ocurren debido a la presencia de los US, además se observó que el consumo de glucosa se incrementa a medida que aumenta la intensidad de los US, determinando que la amplitud de US que mayor efecto tiene sobre el consumo de glucosa es 30%.

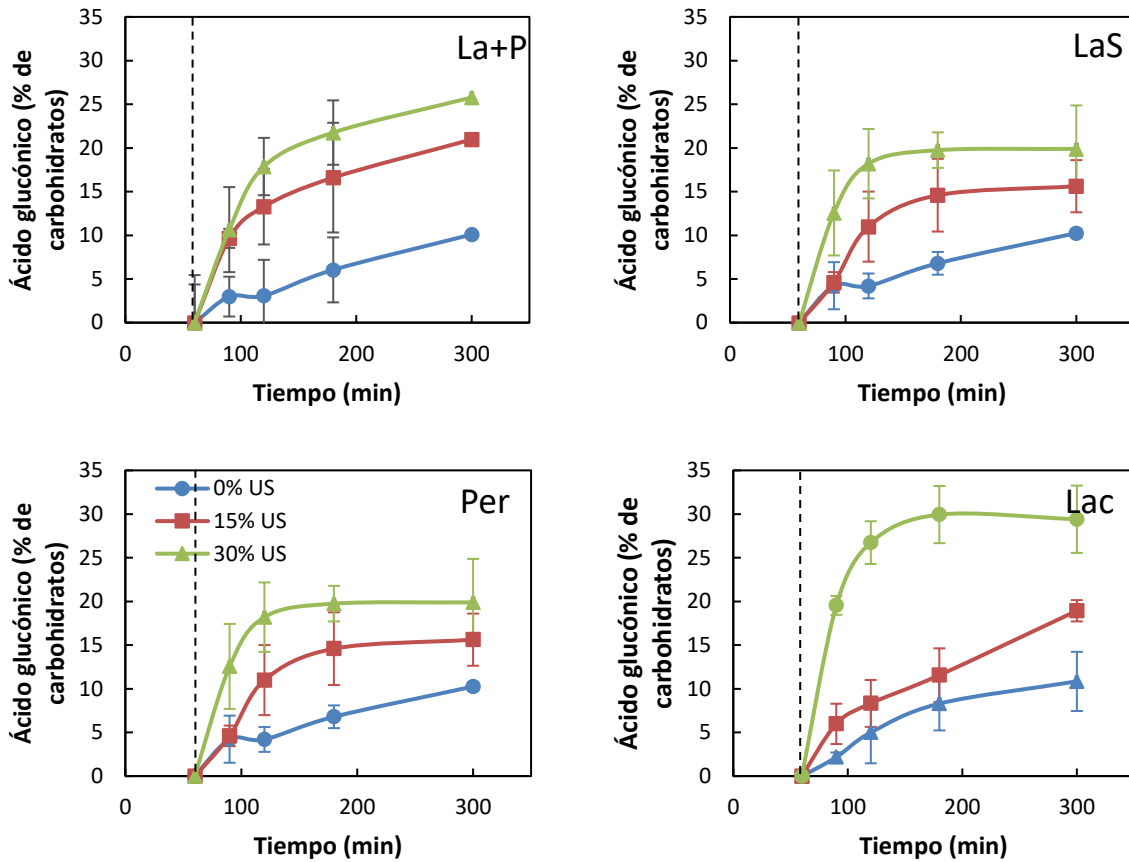


Figura 4-21. Producción de ácido glucónico en los sistemas multienzimáticos. Lac = lactosa; La+P = Lactosa + proteína de lactosuero; Per = permeado de lactosuero; LaS = Lactosuero. (Δ) 0% US, (□) 15% US, (○) 30% US.

La producción de ácido glucónico (Figura 4-21) con Gox inició pasados 60 minutos de adicionada la β -gal. En este momento la concentración GOS era la más alta y existía una concentración de glucosa suficientemente alta para iniciar la reacción de oxidación. Se evidenció un claro efecto potenciador de los US sobre la producción de ácido glucónico (Figura 4-21). Adicionalmente, se encontró que para el ácido glucónico la fuente de lactosa no es significativa ($p > 0.05$). El efecto más claro se presentó en el medio con lactosa y La+P. Diversos autores han reportado que la producción de ácido glucónico por vía enzimática encuentra su máximo valor después de 12 horas de reacción [180], [187]; en el caso del presente trabajo, se encontró un consumo casi total de glucosa al cabo de 120 minutos de reacción en el medio con lactosa.

4.7.2 Efecto de la fuente de lactosa

Contrario al efecto de los US, la fuente de lactosa afecta significativamente ($p < 0.05$) la hidrólisis de la lactosa por la β -gal, aunque como ya se dijo, se utilizó más del 90% de la lactosa (Anexo D14) en los medios Lac, LaS y La+P se consume mayor cantidad de glucosa que con Per.

En cuanto a la liberación de galactosa, el ANOVA mostró que en todas las fuentes de lactosa existe una tendencia diferente; la mayor cantidad de este monosacárido es liberada en Per (26.6% m/m), mientras que Lac parece utilizar mayor cantidad de galactosa en la transgalactosilación que las demás fuentes de lactosa. Esta mayor liberación de galactosa puede estar relacionada con la cantidad de minerales presentes en el permeado que, como ya se mencionó afecta las actividades hidrolítica y transferasa de la β -gal.

El contenido de glucosa liberada al medio al cabo de 60 minutos de reacción fue aproximadamente 35% m/m en todos los tratamientos, sin importar la fuente de lactosa que no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$), por lo tanto, la actividad de la Gox no se ve afectada por la composición de las diferentes fuentes de lactosa empleadas durante la reacción.

En relación con la producción de GOS (Figura 4-22), se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) debidas a la fuente de lactosa, Per produjo significativamente menos GOS que las demás fuentes de lactosa. Estas diferencias pueden deberse a la composición del medio empleado, pues Per tiene una relación lactosa:minerales mayor que aquella presente en las demás fuentes de lactosa, por otro lado, entre LaS y La+P no existió diferencia ($p > 0.05$) en la concentración de Gos presente en las reacciones quienes no tenían altos contenidos de minerales en sus composiciones. Sin embargo, la mayor cantidad de GOS fue producida por el medio con lactosa pura.

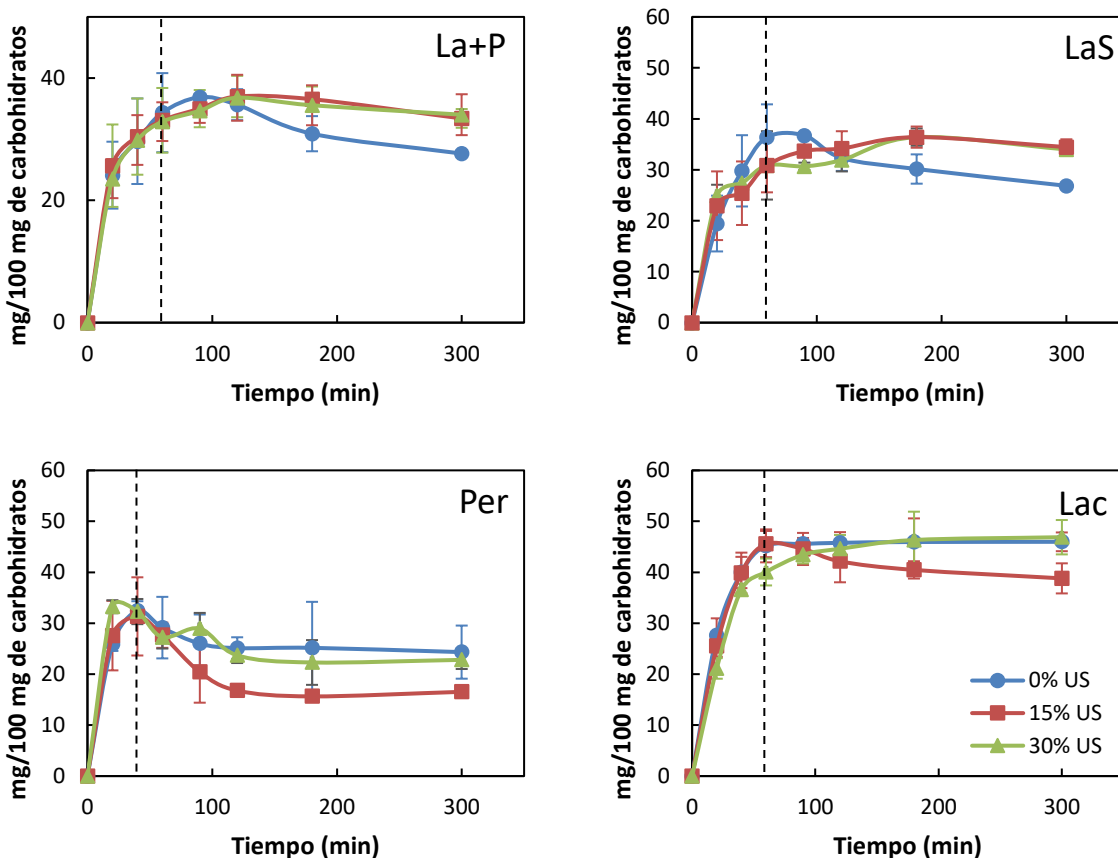


Figura 4-22. Producción de GOS en los sistemas multienzimáticos.

Lac = lactosa; La+P = Lactosa + proteína de lactosuero; Per = permeado de lactosuero; LaS = Lactosuero. (○) 0% US, (□) 15% US, (Δ) 30% US. Condiciones de reacción: 40% m/m equivalente de lactosa, relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH.

Los resultados obtenidos para la producción de GOS indican que la fuente de lactosa juega un papel importante en la transgalactosilación de la lactosa. En la tabla 4-5 se muestra el ANOVA realizado para la producción de GOS usando diferentes fuentes de lactosa y amplitudes de US. Se encontró que, como se esperaba, la fuente de lactosa ejerce un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la β -gal y su capacidad para producir GOS; siendo Lac el medio que produce mayores concentraciones de GOS, seguido de La+P y LaS, la menor cantidad de GOS es producida por Per. Sin embargo, en el medio de LaS se producen cantidades similares a La+P y mayores que en Per. Para La+P y LaS, la presencia de proteína parece amortiguar la hidrólisis de la lactosa y favorecer ligeramente su transgalactosilación por parte de la β -gal, aunque, como ya se mencionó, en estas muestras se encontró un desplazamiento del punto máximo de producción de GOS.

Tabla 4-5. ANOVA para producción de GOS con diferentes fuentes de lactosa y diferentes amplitudes de US.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Amplitud de US (IUS)	2	21.5	10.7	0.5	0.5890
Fuente de lactosa (Flac)	3	2161.2	720.4	39.0	0.0002
Error IUS*Flac	6	110.9	18.5		
Tiempo	7	11716.0	1673.7	362.6	0.0000
Flac*Tiempo	21	1435.0	68.3	10.7	0.0000
Error IUS*Flac*Tiempo	56	356.9	6.4		
Total	95	15801.5			

p<0.05 indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

En la literatura consultada no se encontraron trabajos que evaluaran la producción de GOS a partir del lactosuero, salvo el trabajo realizado en nuestro grupo de investigación por Guío [112], quien realizó reacciones de transgalactosilación con β -gal de *K. lactis* a diferentes concentraciones de lactosuero como fuente de lactosa inicial. A las mejores condiciones de trabajo (40°C, pH 6.9 y 40% de lactosa inicial) se encontró una baja producción de GOS, que llegó a valores cercanos a 16 mg/100 mg de carbohidratos al cabo de 40 minutos de reacción, aunque el autor solo reportó la presencia de tri y tetrasacáridos, dejando los disacáridos junto con la lactosa. En otro trabajo, Adamczak *et al.* [188] produjeron GOS a partir permeado y diferentes marcas comerciales de β -gal de *K. lactis*. Las mayores producciones de GOS reportadas por este autor corresponden a aquellas en las que se usó *HA-Lactase*, cercanas a 13 mg/100 mg de carbohidratos al cabo de 10 minutos de reacción. Sin embargo, la concentración de enzima usada por estos investigadores fue mayor a la usada en este trabajo. Como ya se ha mencionado anteriormente, el efecto los minerales presentes en el permeado y el lactosuero, particularmente el potasio reduce considerablemente los rendimientos de la reacción. De aquí queda claro entonces, que los medios ricos en lactosa con elevado contenido de minerales reducen considerablemente la actividad de transgalactosilación de la β -gal, debido particularmente al efecto del cloruro de potasio presente, que favorece la reacción de hidrólisis de la lactosa sobre la oligomerización de la misma. Además, en el trabajo realizado por Onishi *et al.* [185], quienes evaluaron la eliminación de glucosa por su oxidación a ácido glucónico, reportaron una producción de GOS menor a 40 %m/v del total de carbohidratos al cabo de 40 horas de reacción, mientras que Cheng *et al.* [170] reportó una producción aproximada de GOS de 30 %m/v del totales carbohidratos. En los dos

casos anteriores, el medio fue lactosa, las fuentes de enzima fueron *Szrobasidium magnum* y *Bacillus sp.*, respectivamente y el contenido de GOS fue menor al reportado en el presente trabajo.

La fuente de lactosa no mostró un efecto aparente sobre la producción de ácido glucónico (figura 4-21). En la tabla 4-6 se muestra el resultado del ANOVA para la producción de ácido glucónico en diferentes fuentes de lactosa y bajo diferentes amplitudes de US. Se encontró que para el ácido glucónico la fuente de lactosa no es significativa ($p > 0.05$).

Tabla 4-6. ANOVA para producción de ácido glucónico con diferentes fuentes de lactosa y diferentes amplitudes de US.

Fuente de variación	GI	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Amplitud de US (IUS)	2	752.3	376.2	21.6	0.0018
Fuente de lactosa (Flac)	3	94.2	31.4	1.82	0.2439
Error IUS*Flac	6	103.5	17.4		
Tiempo	7	5525.6	789.4	47.1	0.0000
Flac*Tiempo	21	106.6	5.1	0.3	0.9981
Error IUS*Flac*Tiempo	56	939.6	16.8		
Total	95	7521.9			

$p < 0.05$ indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Un problema reportado frecuentemente para la producción de ácido glucónico y otras reacciones que involucran líquidos y gases es la solubilidad de estos últimos en un medio acuoso [189]. En los medios empleados se presentaron dos grandes inconvenientes, el primero relacionado con la baja solubilidad del oxígeno en agua (6.41 mg/L); y el segundo, los US son usados para desgasificar agua, por lo tanto, el aire necesario para la reacción debió ser suministrado en exceso. De otro lado, es bien conocido que el efecto de los US sobre las enzimas se relaciona con los fenómenos de cavitación [160]. Como el aire fue continuamente alimentado, los US estaban permanentemente disipando las burbujas generadas. En el sistema propuesto, es probable que los US redujeran suficientemente el tamaño de las burbujas de aire para facilitar su interacción con el otro reactivo (glucosa) e incrementar su contacto con el sitio activo de la Gox lo que incrementaría el consumo de glucosa en la reacción. En este orden de ideas, a través del uso de los US en el sistema multienzimático la actividad enzimática de la Gox fue lo suficientemente alta para consumir la glucosa producida por la β -gal en menos de

120 minutos de reacción en un medio con lactosa pura; sin embargo, en los demás medios empleados hubo una concentración de glucosa que no se consumió, esto pudo deberse a que la enzima sufrió algún tipo de inactivación o a que el contacto entre la Gox y la glucosa no ocurría suficientemente rápido debido a la variedad de compuestos presentes en las muestras.

En el sistema multi-enzimático se empleó el análisis de componentes principales (PCA) para encontrar diferencias entre los tratamientos evaluados (Fuente de lactosa y amplitud de US), con esta herramienta se confirmó gráficamente la existencia de un patrón de comportamiento de las muestras durante las reacciones de transgalactosilación y oxidación y los factores que podrían estar influenciando la reacción.

A partir de los resultados de PCA que se explican a partir de la figura 4-23, se puede observar una clara relación entre la variación de la composición durante la producción de GOS y ácido glucónico a partir de diferentes fuentes de lactosa y tres niveles de US a medida que transcurre el tiempo de reacción. Del total de la varianza, el 83% es explicada a partir de los dos primeros componentes, y el 99% con los 3 primeros componentes. La figura 4.23a muestra la influencia del tiempo durante los primeros 60 minutos de reacción (Flecha azul), en donde los primeros tiempo se asocian con un alto contenido de lactosa (Figura 4-23b) y su consecuente hidrólisis. Cuyos productos se desplazan hacia la derecha a medida que la concentración de lactosa disminuye en el medio, donde poco a poco predominan los productos de la reacción (principalmente GOS y galactosa). Adicionalmente, a través del segundo componente se puede explicar la el efecto de los US sobre las concentraciones de glucosa y ácido glucónico producido, que varían en el tiempo con una relación inversa después de 60 minutos de reacción (Figura 4-23b). La alta dispersión existente para las muestras a 120, 180 y 300 minutos en el medio es indicio del efecto de la intensidad de los US sobre el medio de reacción, donde los puntos más cercanos al origen indican bajas potencias de US y bajas concentraciones de ácido glucónico presentes en el medio, mientras que las muestras que se encuentran hacia el extremo superior son aquellas que contienen altas concentraciones de ácido glucónico, indicando también un efecto más fuerte de los US sobre la Gox. En general, la figura 4-30a muestra cómo avanza la reacción en el tiempo a través del desplazamiento de los puntos (que representan cada muestra tomada) de izquierda a derecha, indicando el

consumo de lactosa y producción de GOS; y luego de abajo hacia arriba indicando el consumo de glucosa y producción de ácido glucónico.

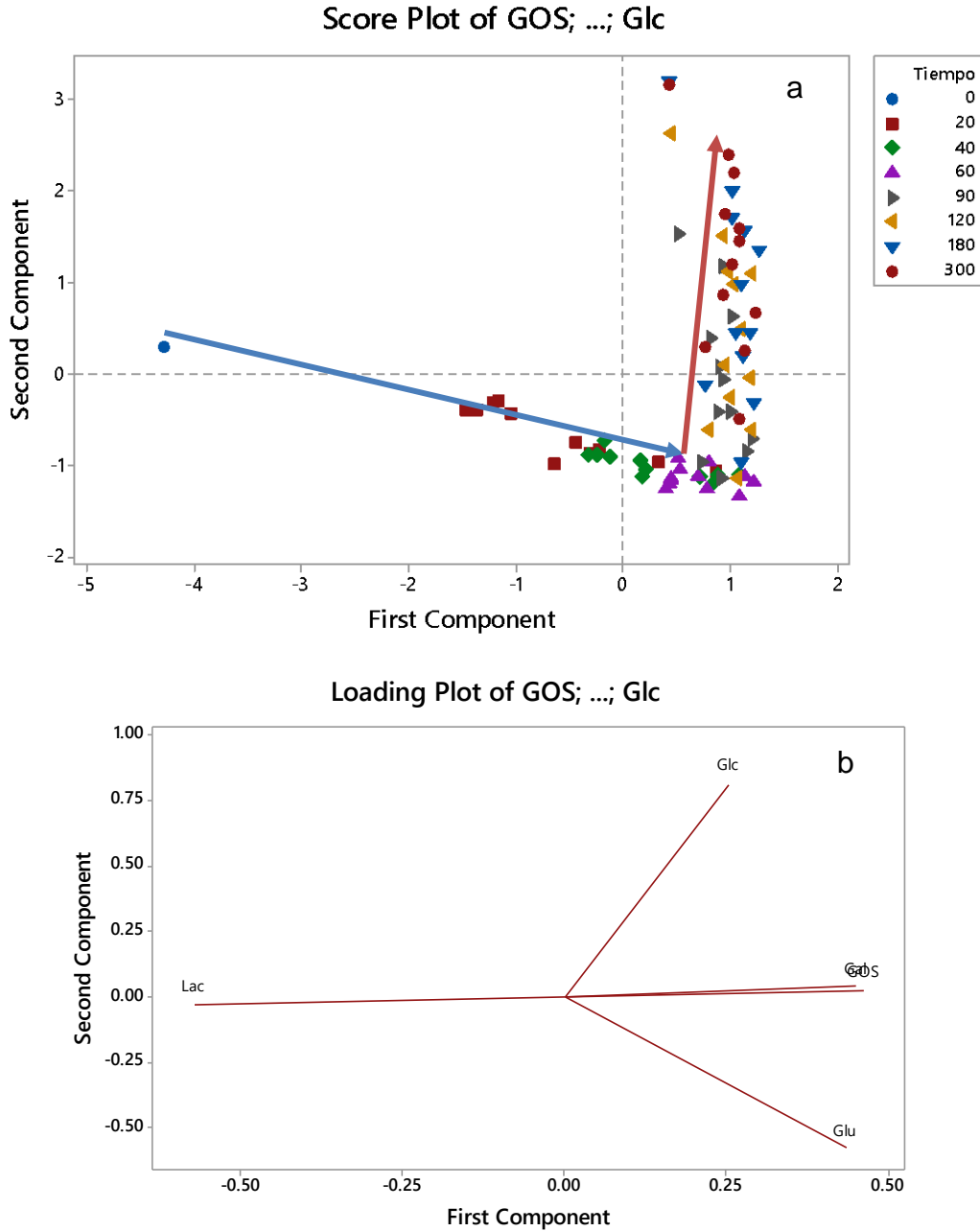


Figura 4-23. Score plot (a) y loading plot (b) obtenido mediante PCA de las reacciones de transgalactosilación. 1= Lactosa; 2= Permeado, 3= Lactosuero y 4 = Lactosa + Proteína.

4.7.3 Efecto de los US sobre las enzimas.

La actividad catalítica de las enzimas tiene una fuerte dependencia con la configuración del sitio activo. Se sabe que la acción de los US puede inducir cambios en la estructura secundaria de la molécula, lo que puede exponer mejor el sitio activo de la enzima [190]. Con el fin de evaluar si los tratamientos llevados a cabo con los US produjeron cambios conformacionales en la β -gal y la Gox durante sus respectivas reacciones de transgalactosilación y oxidación, se estudiaron las modificaciones mediante fluorescencia intrínseca, dado que durante este tipo de cambios se pueden exponer residuos de triptófano de la proteína.

4.7.3.1 Cambios conformacionales en la β -galactosidasa

Las muestras de β -gal (Figura 4-24a) mostraron un comportamiento de distribución bimodal en el tratamiento sin US durante todo el tiempo de reacción, este indica que no se presentaron cambios conformacionales en la superficie de la enzima. Aunque la enzima sigue tiene un comportamiento similar bajo efecto de los US, se observó un leve incremento en la intensidad de fluorescencia de las muestras después de 60 y 300 minutos de tratamiento con US; esto indica que la enzima pudo sufrir algunas alteraciones estructurales bajo la influencia de los US. Las emisiones máximas de la enzima a condiciones normales fueron hasta de 400.000 unidades de absorbancia (a.u) a 345 nm, mientras que en presencia de US las emisiones estuvieron cerca de 500.000 a.u. a la misma longitud de onda. Según mencionan Abidi *et al* [191], el incremento en la amplitud de fluorescencia indica cambios en la orientación de los residuos de triptófano en la superficie de la molécula de β -gal, conduciendo a un desdoblamiento de la molécula. Además, se reduce la exposición de regiones hidrofílicas a entornos polares [166]. A pesar de ello, apenas se vio efecto de los US en la transgalactosilación.

4.7.3.2 Cambios conformacionales en la glucosa oxidasa

. En contraste, la Gox fue mucho más sensible a variaciones con respecto al tiempo y al tratamiento con US. En condiciones convencionales sin US, la Gox mostró un incremento en sus emisiones de fluorescencia después de 60 minutos de reacción. El nivel de emisión más alto alcanzado fue de 554.000 a.u. a 345 nm de longitud de onda (Figura 4-24b). De la misma forma que se describió para la β -gal, el incremento de la fluorescencia

indica un aumento de los residuos de triptófano expuestos en la superficie de la molécula de la enzima.

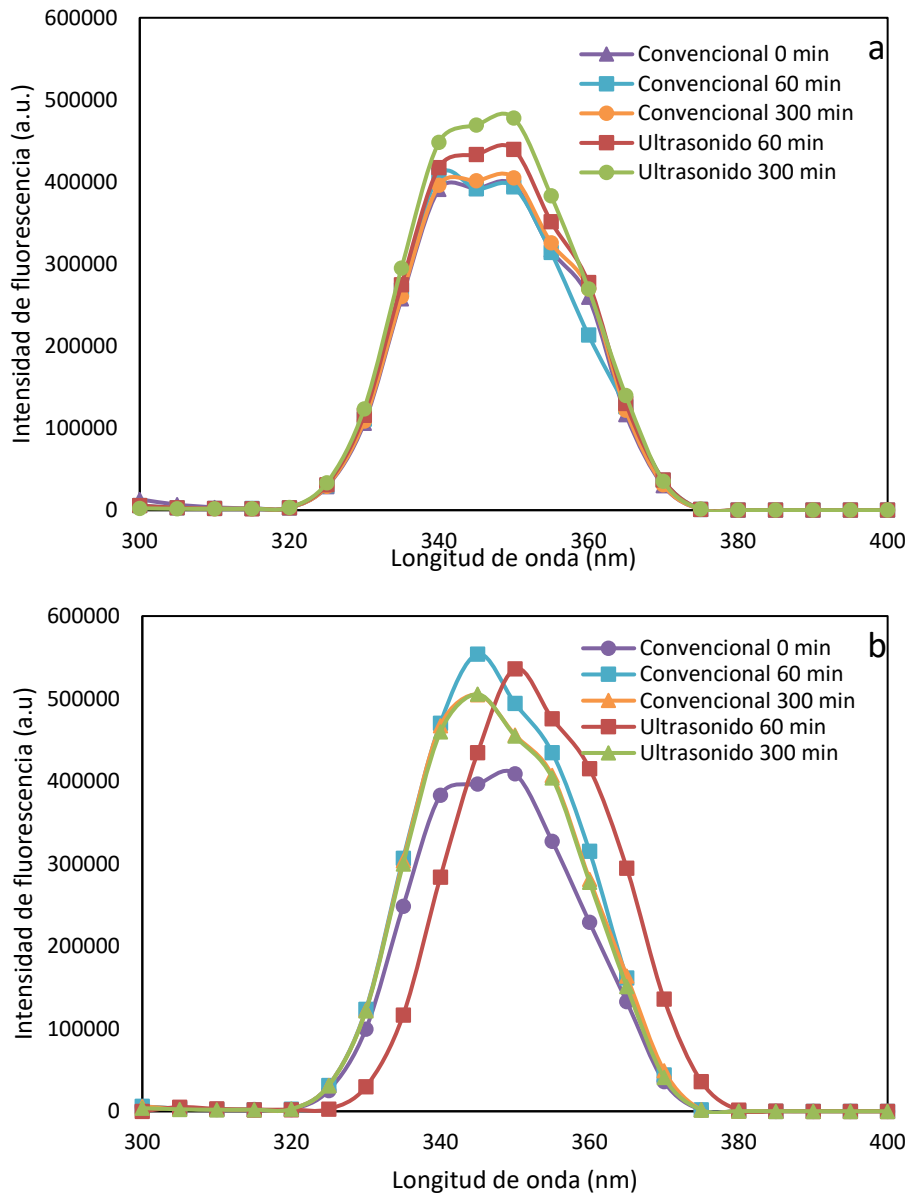


Figura 4-24. Espectro de fluorescencia para a) β -gal (HA-Lactase) and b) Gox (Gluzyme BG10000) correspondientes a producción convencional y con US de GOS y ácido glucónico.

Al cabo de 300 minutos de exposición a los US, la Gox mostró una pequeña reducción en sus emisiones. Esta reducción se relaciona con una reducción de los residuos

de triptófano expuestos en la superficie de la enzima. Sin embargo, no se notaron desplazamientos a otras zonas del espectro y este desdoblamiento ejerció efecto significativo sobre la actividad de la enzima. En el caso de la Gox bajo el efecto de los US a 300 minutos, se encontró una variación similar en la amplitud de emisión de la fluorescencia a aquella mostrada por el tratamiento sin US; no obstante, se presentó un desplazamiento hacia los rojos (*Red shift*) durante los tratamientos de 60 minutos. Este desplazamiento observado en el máximo de longitud de onda de emisión y su incremento en la amplitud de fluorescencia son indicadores de que la molécula de Gox tuvo un desdoblamiento, modificando su estructura [192]. Los cambios aquí mostrados podrían generar una mayor exposición del sitio activo de la enzima y un incremento en la velocidad de consumo de la glucosa durante los primeros 60 minutos de reacción, según se observa en la figura 4-24.

4.7.3.3 Actividad enzimática

En la figura 4-25 se muestran los cambios porcentuales de la actividad enzimática después de 60 y 300 minutos de tratamiento con US, tanto para β -gal como para Gox. Se puede observar que hubo un pequeño incremento en la actividad de la β -gal en ambos tiempos de ensayo. Sin embargo, de acuerdo con los resultados de la composición de carbohidratos previamente mostrados, no se encontraron variaciones en la producción de GOS al usar diferentes intensidades de US; por tanto, ese efecto de los US sobre la conformación del enzima, no se reflejó en un incremento importante de la actividad de transgalactosilación de la lactosa por efecto del US.

En cuanto a Gox, los US mostraron un efecto muy positivo sobre su actividad. La actividad residual en la muestra tratada con US fue 8 y 9 veces más alta que en la muestra control (0 min) después de 60 y 300 minutos de tratamiento. Estos resultados sugieren que la molécula de Gox tuvo una sobreexcitación en presencia las ondas de US, lo que condujo a un incremento de la cantidad de la glucosa oxidada en un corto periodo de tiempo. Estos resultados difieren de aquellos reportados por Giuseppe-Elie *et al.* [193] quienes no encontraron efecto de los US (23 kHz, 4 °C, 10-60 min) sobre la estabilidad, conformación, y actividad catalítica de Gox. Esto puede atribuirse a las diferencias en la temperatura de tratamiento (40°C vs 4°C). Los autores indicaron que los US a bajas temperaturas de proceso no afectan de manera apreciable a la bioactividad de la enzima. Sin embargo, Davulcu *et al.* [194] empleó un equipo de US (20 kHz, 200 W de potencia) durante 30

minutos para blanqueamiento de tela de algodón con Gox y encontró un incremento de 8 veces en la formación de peróxido de hidrógeno, siendo esto un claro indicador de una mayor actividad enzimática.

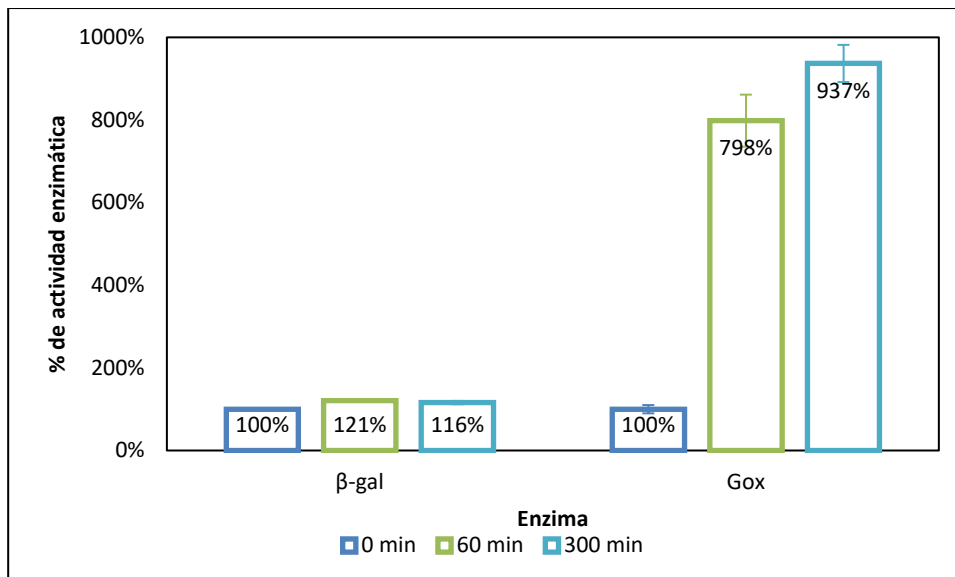


Figura 4-25. Variación (%) de la actividad enzimática para β-gal y Gox después de 60 y 300 minutos de tratamiento con US

4.8 Rendimientos de producción de GOS

En la tabla 4-7 se puede observar que los mayores rendimientos de producción se produjeron para las reacciones realizadas en medio lactosa, en sistema convencional o multienzimático. Estos tratamientos fueron estadísticamente más altos ($p > 0.05$) que aquellos rendimientos obtenidos con otras fuentes de lactosa. Esto anterior indica que fuentes de lactosa con baja pureza reducen considerablemente los rendimientos en las reacciones de transgalactosilación, por lo que a mayor pureza de la lactosa, mayor será el rendimiento obtenido. De otro lado, para el sistema multienzimático, los rendimientos de producción de ácido glucónico fueron estadísticamente mayores ($p < 0.05$) en aquellos tratamientos donde actuaron los ultrasonidos (15% y 30%), comprobando una vez más, que la presencia de ultrasonidos favorece la actividad de la Gox durante la oxidación de la glucosa a ácido glucónico.

Tabla 4-7. Rendimientos de producción de GOS y ácido glucónico

Fuente	Sistema	0% US	15% US	30% US	0% US	15% US	30% US
Lac (60 min)	Conven- cional	52.2 ± 1.82 ^a	47.3 ± 2.61 ^a	51.2 ± 3.12 ^a			
Per (40 min)		34.4 ± 4.02 ^b	33.9 ± 3.25 ^b	33.0 ± 4.81 ^b			
LaS (120 min)		34.3 ± 3.75 ^b	39.6 ± 2.08 ^b	39.3 ± 2.79 ^b			
Lac (60 min)	Multienzi- mático	52.2 ± 3.51 ^a	50.4 ± 1.97 ^a	46.8 ± 3.48 ^a	11.7 ± 2.48 ^b	19.5 ± 2.14 ^a	33.1 ± 1.51 ^a
Per (40 min)		35.8 ± 2.65 ^b	34.6 ± 3.32 ^b	34.1 ± 2.41 ^b	10.7 ± 2.90 ^b	15.9 ± 1.85 ^a	20.2 ± 2.93 ^a
LaS (90 min)		40.1 ± 3.45 ^b	36.7 ± 2.47 ^b	34.5 ± 2.48 ^b	18.0 ± 0.43 ^b	23.9 ± 1.67 ^a	27.0 ± 1.01 ^a
La+P (90 min)		39.2 ± 3.32 ^b	37.1 ± 4.12 ^b	36.8 ± 3.87 ^b	10.4 ± 1.21 ^b	21.3 ± 1.73 ^a	26.4 ± 2.76 ^a

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- Los minerales presentes en el LaS influyen sobre la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (HA-lactase®) durante la transgalactosilación de la lactosa. El cloruro de sodio inhibe la hidrólisis (de lactosa y gos) e incrementa la producción de GOS a bajas concentraciones, pero a mayores concentraciones la disminuye. El potasio incrementa la actividad hidrolítica de la enzima, reduciendo considerablemente los rendimientos de producción de GOS. Por otro lado, el cloruro de calcio en las concentraciones evaluadas inhibe completamente cualquier actividad de la enzima y finalmente, el cloruro de magnesio evita la desnaturalización de la β -galactosidasa, aunque no tiene efecto sobre la actividad de la misma.
- Ni las proteínas del LaS ni los US ejercen un efecto importante sobre el proceso de producción de GOS.
- Los minerales (cloruro de sodio y cloruro de potasio) y la proteína del lactosuero no afectan la producción de ácido glucónico a partir de la glucosa con glucosa oxidasa de *Aspergillus oryzae*.
- El uso de US durante la oxidación enzimática de glucosa para producir ácido glucónico reduce el tiempo de reacción e incrementa su rendimiento alcanzando valores superiores al 70% lo que facilita el uso conjunto de la β -galactosidasa de *K. lactis* para la producción de GOS en un sistema multienzimático.
- El uso de un sistema multienzimático secuencial asistido por US para la producción de GOS y ácido glucónico puede ser usado como una estrategia para obtener GOS

bajos en glucosa, y enriquecidos en ácido glucónico, un compuesto bioactivo de interés para la industria farmacéutica y de alimentos, utilizando tanto soluciones de lactosa como medios complejos (Per y LaS).

Conclusión general

- Un sistema multienzimático secuencial asistido por US para la producción de GOS y ácido glucónico puede ser usado como una estrategia para obtener GOS bajos en glucosa, y enriquecidos en ácido glucónico, un compuesto bioactivo de interés para la industria farmacéutica y de alimentos, utilizando tanto soluciones de lactosa como medios complejos (permeado y lactosuero).

5.2 Recomendaciones

- Con base en los resultados obtenidos, es necesario evaluar el efecto que los US tienen sobre la β -galactosidasa proveniente de otras fuentes.
- Se debería evaluar el sistema mixto de enzimas usando β -galactosidasa de diferentes fuentes estudiando su compatibilidad con la glucosa oxidasa, particularmente aquellas enzimas termoestables.
- Se recomienda realizar el escalado del sistema multienzimático a volúmenes más grandes con el fin de evaluar si los rendimientos y tiempos de producción se mantienen.
- Sería de especial interés realizar la modelación matemática de los diferentes procesos aquí desarrollados con el fin de ahondar más en el conocimiento de los sistemas de reacción y de las enzimas que intervienen en el proceso.
- Es conveniente estudiar en mayor profundidad el efecto conjunto de las sales sobre la actividad de la Gox, ya que, aunque no hay un efecto significativo de la proteína, el

sodio y el potasio por separado, en el Per, LaS y lactosa con proteínas la actividad de esta enzima es mucho menor.


Anexo A: Otras alternativas para el aprovechamiento del lactosuero

Los compuestos que se muestran en la Tabla 5 tienen gran potencial en la industria; en el caso del ácido láctico y el etanol por ser *commodities*, es decir, por tener una producción masificada y aplicación en una amplia variedad de industrias; otros, por ser compuestos con interesantes perspectivas para la salud, la conservación de alimentos, el sector farmacéutico, entre otros. Entre estos últimos, el ácido glucónico es una alternativa viable debido a que se obtiene mediante un proceso con mayor compatibilidad con el de producción de GOS

Anexo A1. Alternativas de aprovechamiento de la glucosa en la obtención de GOS		
Producto	Ventajas	Desventajas
Biomasa bacteriana (ácido-lácticas)	Rápido crecimiento Fácil separación	Requerimientos nutricionales complejos Costo elevado de nutrientes
Biomasa fúngica (levaduras)	Rápido crecimiento Fácil separación	Requiere una suplementación con micronutrientes. Costo elevado de nutrientes
Ácido láctico	Subproducto de la biomasa bacteriana Altos rendimientos de conversión	Procesos complejos de separación posterior Varios géneros de ácido lácticas son probióticas y podrían consumir el producto
Bacteriocinas	Subproducto de biomasa bacteriana Alto valor comercial	Proceso de separación posterior complejo Requiere de 2 cepas bacterianas para mejorar producción de bacteriocinas por competencia Varios géneros de ácido lácticas son probióticas y podrían consumir el producto Producción en cantidades muy bajas
<i>Continuación...</i>		
Etanol	Subproducto de la biomasa de <i>Saccharomyces</i> sp. y otros géneros de levaduras	Costos asociados al proceso de destilación; Relación costo-beneficio baja

Pululano	Polisacárido extracelular, alto valor comercial	La fermentación tiene altas demandas de OD; Periodos largos de fermentación (>5 días)
Ácido glucónico	Alto valor comercial, obtenido por síntesis enzimática, Separación por precipitación con presencia de iones como Na ⁺ o Ca ⁺⁺ Enzimas empleadas son económicas y disponibles en el mercado.	Requiere de un alto suministro de oxígeno en la reacción El peróxido de hidrógeno producido inhibe la enzima.
β-glucano	Alto valor comercial; microorganismos económicos y de fácil acceso	Si es un polisacárido intracelular se requieren operaciones posteriores de purificación

Anexo B: Ficha técnica del lactosuero

 Insumos y tecnología para la Industria alimentaria	FICHA TECNICA SUERO DE LECHE EN POLVO	CI - 260 / 011
		Versión 001
		Página 1 de 4
		Fecha de Emisión: 05-06-13

Descripción

Suero es el producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración del queso, la caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche y/o los productos derivados de la leche. La coagulación se obtiene mediante la acción de, principalmente, enzimas del tipo del cuajo.

Los sueros en polvo son productos lácteos obtenidos por medio del secado del suero.

El suero dulce en polvo debe ser de color blanco-amarillento homogéneo, debe presentar olor y sabor característico del producto, estar exento de sabores y olores extraños a la naturaleza del mismo. Debe ser un polvo homogéneo, exento de grumos, libre de partículas quemadas visibles o materias extrañas. No debe contener preservantes, neutralizantes, ni sustancias tóxicas.

Áreas de aplicación

Producto de uso industrial. Puede ser utilizado como materia prima para fabricación de alimentos destinados al consumo humano: productos de confitería, panadería, lácteos, cármicos y helados, o como reemplazo total/parcial de sólidos de leche, para mejorar el color, sabor y la textura.

Beneficios

Sustituto de proteína.

Dosis


Según el producto a elaborar y su formulación.

Composición

Suero lácteo.

Especificaciones físico-químicas

Aspecto	Polvo homogéneo, libre de grumos, terrones y partículas oscuras.
Color	Blanco, cremoso, suave.
Sabor y olor	Dulce, agradable y característico. Puede presentar un ligero aroma de cocido. Debe estar libre de aromas desagradables, en especial del característico de la rancidez oxidativa o lipolítica.

 <p>Insumos y tecnología para la Industria alimentaria</p>	FICHA TECNICA SUERO DE LECHE EN POLVO	CI - 260 / 012
		Versión 001
		Página 2 de 4
		Fecha de Emisión: 05-06-13

	Min	máx.
Proteína (%m/m)	11,0	14,0
Grasa (%m/m)	1,0	1,5
Lactosa (%m/m)	65,0	75,0
Humedad (%m/m)	1,0	4,0
Cenizas (%m/m)	7,0	8,5
Acidez expresada como ácido Láctico (%m/m, en solución al 10%)	---	0,15
pH (solución al 10%)	6,0	6,5
Cloruro (%p/v)	0,07	0,11
Partículas quemadas y sedimentos (Disco-mg/L)	---	Disco B-15
Indicadores	Negativo	

Especificaciones microbiológicas

Requisito	n	m	M	c
Recuento total de microorganismos mesófilos UFC/g	3	1000	1000	1
NMP Coliformes totales / g	3	< 3	7	1
NMP Coliformes fecales / g	3	< 3	---	0
Recuento de mohos y levaduras UFC/g	3	50	500	1
Recuento Estafilococo coagulasa (+) UFC / g	3	< 100	100	1
Bacillus cereus UFC/g	3	100	1000	1
Salmonella / 25 g	3	0	---	0
Esporas de clostridium sulfito reductor UFC / g	3	100	1000	1
Listeria monocytogenes / 25 g	Negativo			

Donde,

n: número de muestras a examinar

m: índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M: índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.


c: numero de muestras permisibles con resultados entre m y M.

Especificaciones de metales pesados

Plomo (Pb) 2,0

Datos nutricionales

No aplica para productos de uso industrial.

 Insumos y tecnología para la Industria alimentaria	FICHA TECNICA SUERO DE LECHE EN POLVO	CI - 260 / 012
		Versión 001
		Página 3 de 4
		Fecha de Emisión: 05-06-13

Almacenamiento

El suero en polvo es higroscópico, puede absorber olores y humedad por lo cual, debe almacenarse en un lugar fresco, limpio, seco, a temperaturas inferiores a 25C y humedad relativa inferior al 65%. El empaque no debe estar en contacto directo con paredes o pisos y debe estar protegido de la luz solar. Si el producto está abierto y nuevamente vuelto a cerrar por efectos de muestreo, se debe consumir internamente máximo en 1 mes a partir de la fecha en la que fue destapado. El producto debe salir de la planta mínimo con el 70% de su vida útil.

Embalaje

Bolsa interior de polietileno de baja densidad cerrada herméticamente, con capacidad de 25 kg, dentro de bolsa de papel kraft multipliegos. Sacos de 10 kg, 20 kg y 25 kg.

Pureza y legislación

Las normas de calidad para este producto, corresponden a especificaciones internas, las cuales cumplen con las reglamentaciones emitidas por el Ministerio de la protección Social, Republica de Colombia y con normas internacionales definidas para el suero en polvo:


- Resolución 2997 de 2007, Ministerio de la protección Social, Colombia. Reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir los lacto sueros en polvo, como materia prima de alimentos para consumo humano y se dictan otras disposiciones.
- Decreto 616 de 2006, Ministerio de la Protección Social, Colombia. Reglamento técnico sobre requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano.
- Resolución 5109 de 2005, Ministerio de la Protección Social, Colombia. Reglamento técnico sobre requisitos que deben cumplir los alimentos envasados y materias primas de alimentos para consumo humano.
- CODEX STAN 289-1995 (Enmienda 2006) NORMA DEL CODEX PARA SUEROS EN POLVO.
- ICONTEC. Norma Técnica Colombiana NTC 5098. PRODUCTOS LÁCTEOS. SUEROS EN POLVO.

Seguridad y manipulación

La hoja de seguridad del material está disponible según se requiera.

País de origen

Colombia

 Insumos y tecnología para la Industria alimentaria	FICHA TECNICA SUERO DE LECHE EN POLVO	CI - 260 / 012
		Versión 001
		Página 4 de 4
		Fecha de Emisión: 05-06-13

Certificación Kosher

Disponible según requerimiento.

GMO

Disponible según requerimiento.

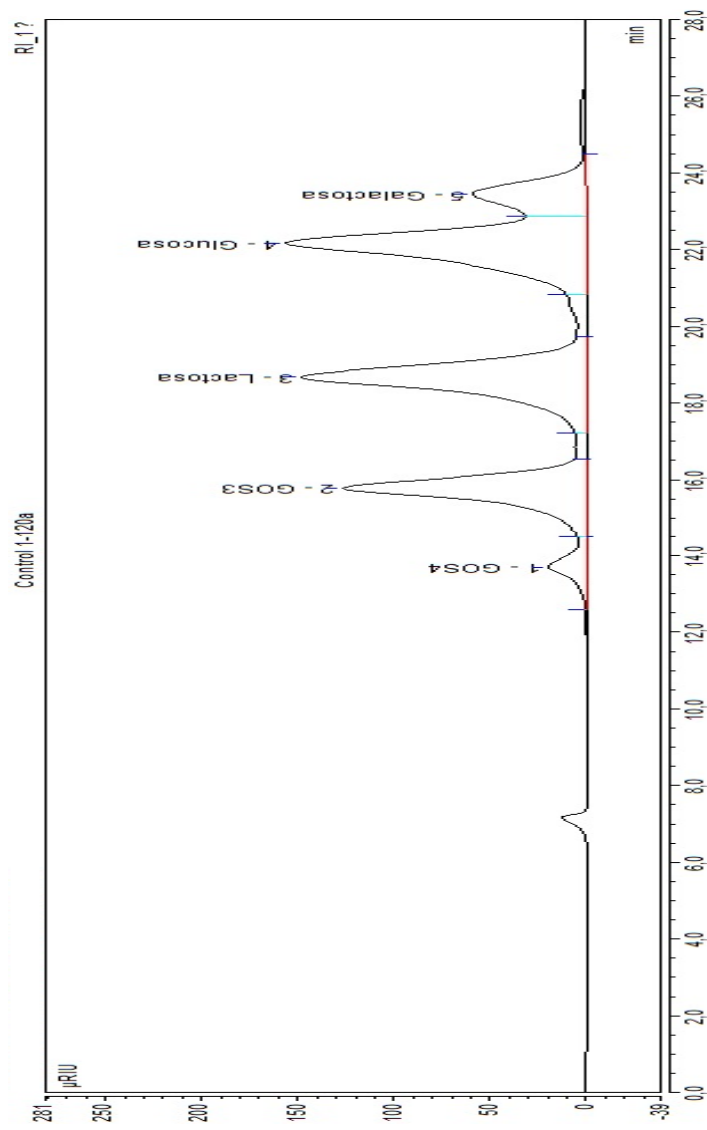
Alérgenos

Disponible según requerimiento.



CIMPA S.A.S. declara que los resultados reportados en el presente certificado, son tomados de la información suministrada por nuestro Proveedor, por lo tanto se fundamenta en sus técnicas de análisis autorizados. Dicha información se exige a Nuestros Clientes de realizar sus propios análisis.

Anexo C: Perfil cromatográfico de la reacción de producción de GOS – Tecnicas de cuantificación



Anexo C1. Perfil cromatográfico HPLC_RID de una reacción enzimática de producción de GOS.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS COLUMNA CHO-411 *Transgenomic*®

a. Reactivos

Agua desionizada desgasificada grado HPLC

Patrones de azúcares.

b. Patrones

- Para la elaboración de las curvas patrón de cada uno de los azúcares y oligosacáridos, debe prepararse soluciones patrón a 100 g/L.
- A partir de cada una de las soluciones se deben preparar diluciones seriadas (entre 5 y 8 puntos) que varíen entre 10 y 100 g/L.
- Alícuotas de 1,5 ml deben ser pipeteadas en los viales HPLC para los análisis posteriores.
- Marcar cada vial con el azúcar y la dilución correspondiente.

NOTA: Se debe verificar que tanto patrones como diluciones estén bien mezclados para evitar error.

c. Preparación de muestras

- Una vez inactivada la enzima, las muestras deben permanecer selladas y refrigeradas (o congeladas) para evitar la degradación por microorganismos o enzima activa remanente.
- De la muestra obtenida se debe tomar una alícuota de 2 – 3 ml y pasarla por un filtro de celulosa hasta lograr un volumen de aproximadamente 1,5 ml.
- Colocar el filtrado en los viales HPLC debidamente marcados.

NOTA: si no es posible leer la muestra en el rango de la curva, es necesario realizar la dilución correspondiente para ubicar el punto en la curva.

d. Condiciones de operación

- Las condiciones de operación del equipo fueron
 - Fase móvil: Agua desionizada desgasificada
 - Flujo: 0,4 mL/min
 - Temperatura: 80°C
 - Tiempo de análisis: 27 minutos

PREPARACIÓN DE MUESTRAS COLUMNA AMINOLIGADA Kromasil®

a. Reactivos

Agua desionizada desgasificada grado HPLC

Acetonitrilo grado HPLC

Patrones de azúcares.

b. Patrones

- Para la elaboración de las curvas patrón de cada uno de los azúcares y oligosacáridos, debe prepararse soluciones patrón a 2,5 mg/mL.
- A partir de cada una de las soluciones se deben preparar diluciones seriadas (entre 5 y 8 puntos) que varíen entre 1 y 25 mg/mL en acetonitrilo:agua 70:30.
- Alícuotas de 1,5 ml deben ser pipeteadas en los viales HPLC para los análisis posteriores.
- Marcar cada vial con el azúcar y la dilución correspondiente.

NOTA: Se debe verificar que tanto patrones como diluciones estén bien mezclados para evitar error.

c. Preparación de muestras

- Una vez inactivada la enzima, las muestras deben permanecer selladas y refrigeradas (o congeladas) para evitar la degradación por microorganismos o enzima activa remanente.
- De la muestra obtenida se debe tomar una alícuota de 2 – 3 ml y pasarla por un filtro de celulosa, tomar un volumen de 100 µL y diluirlo en 900 µL de acetonitrilo:agua 70:30.
- Colocar en los viales HPLC debidamente marcados.

NOTA: si no es posible leer la muestra en el rango de la curva, es necesario realizar la dilución correspondiente para ubicar el punto en la curva.

d. Condiciones de operación

- Las condiciones de operación del equipo fueron
 - Fase móvil: Acetonitrilo:Agua (70:30)
 - Flujo: 0,7 mL/min
 - Temperatura: 30°C
 - Tiempo de análisis: 30 minutos

PREPARACIÓN DE MUESTRAS COLUMNA SHODEX KS-801

a. Reactivos

Agua desionizada desgasificada grado HPLC

Ácido sulfúrico >98% v/v

Patrones de azúcares y ácido glucónico.

b. Patrones

- Para la elaboración de las curvas patrón de cada uno de los azúcares y oligosacáridos, debe prepararse soluciones patrón a 5 mg/mL.
- A partir de cada una de las soluciones se deben preparar diluciones seriadas (entre 5 y 8 puntos) que varíen entre 1 y 50 mg/mL en ácido sulfúrico 25 m.
- Alícuotas de 1,5 ml deben ser pipeteadas en los viales HPLC para los análisis posteriores.
- Marcar cada vial con el azúcar y la dilución correspondiente.

NOTA: Se debe verificar que tanto patrones como diluciones estén bien mezclados para evitar error.

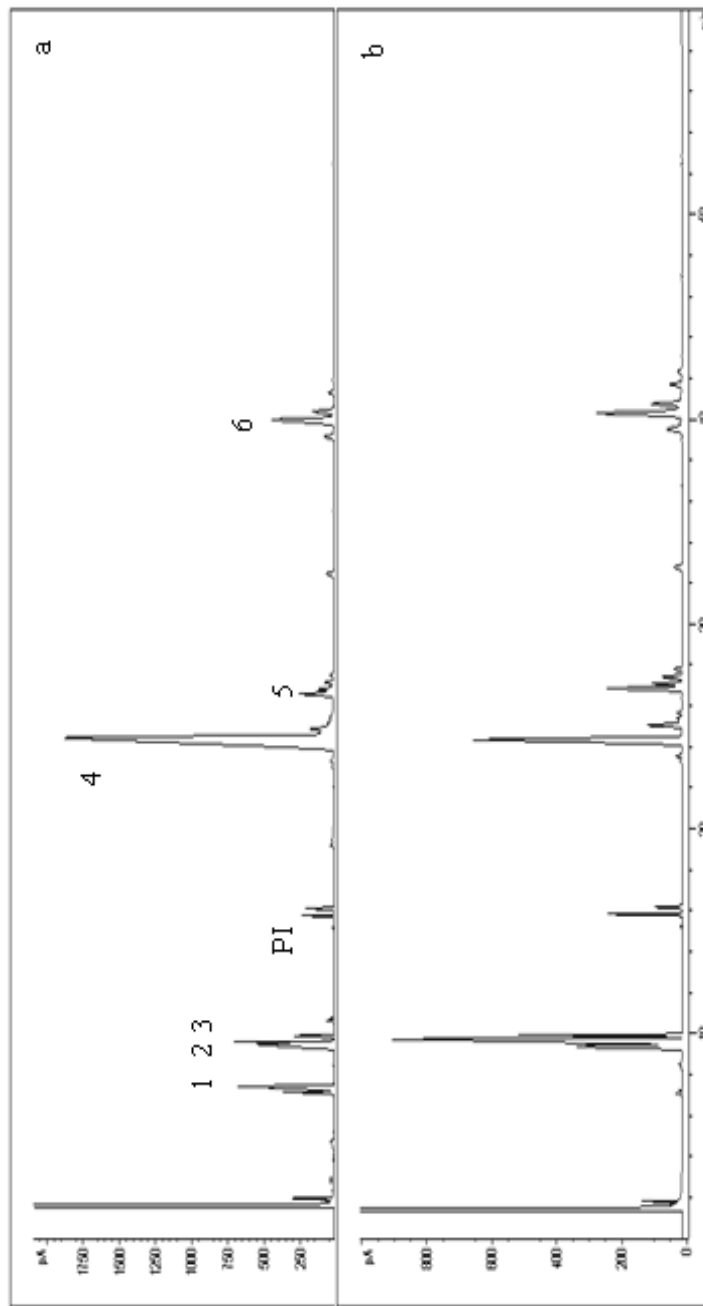
c. Preparación de muestras

- Una vez inactivada la enzima, las muestras deben permanecer selladas y refrigeradas (o congeladas) para evitar la degradación por microorganismos o enzima activa remanente.
- De la muestra obtenida se debe tomar una alícuota de 2 – 3 ml y pasarla por un filtro de celulosa, tomar un volumen de 100 μ L y diluirlo en 900 μ L de ácido sulfúrico 25 mM.
- Colocar en los viales HPLC debidamente marcados.

NOTA: si no es posible leer la muestra en el rango de la curva, es necesario realizar la dilución correspondiente para ubicar el punto en la curva.

d. Condiciones de operación

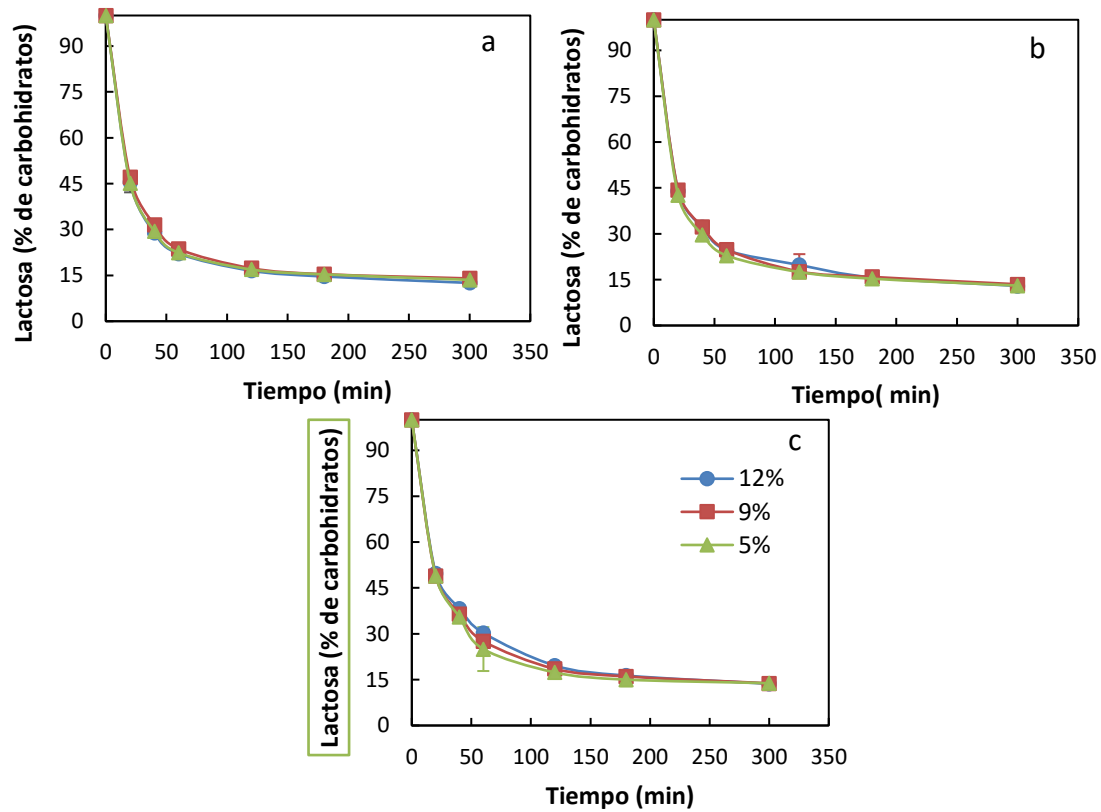
- Las condiciones de operación del equipo fueron
 - Fase móvil: Ácido sulfúrico 25 Mm en agua desionizada
 - Flujo: 0,9 mL/min
 - Temperatura: 50°C
 - Tiempo de análisis: 15 minutos



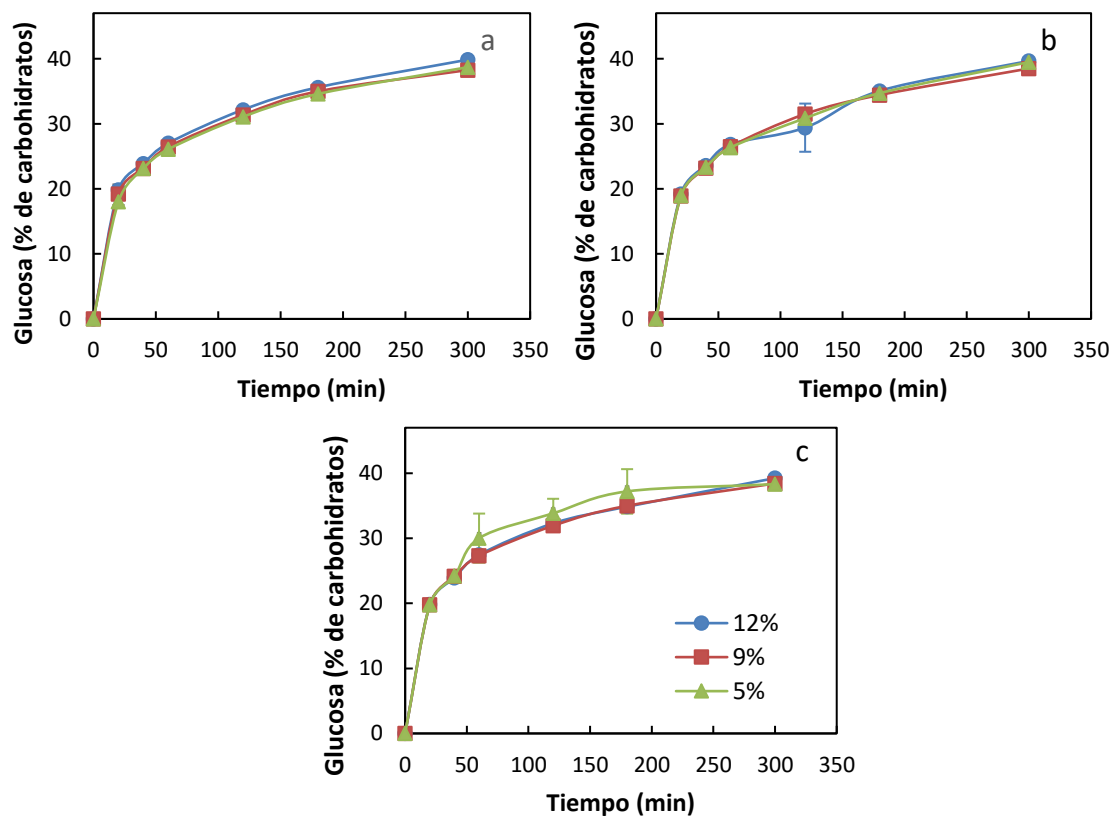
Anexo C2. Perfil GC-FID de las oximas trimetilsililadas de los carbohidratos obtenidos por síntesis enzimática.

a) β -gal + Gox y b) β -gal. Picos 1: Ácido Glucónico; 2: Galactosa; 3: Glucosa; 4: Lactosa; 5: Disacáridos; 6: Trisacáridos; PI: patrón interno.

Anexo D. Cinéticas de producción de GOS en las diferentes etapas del proyecto



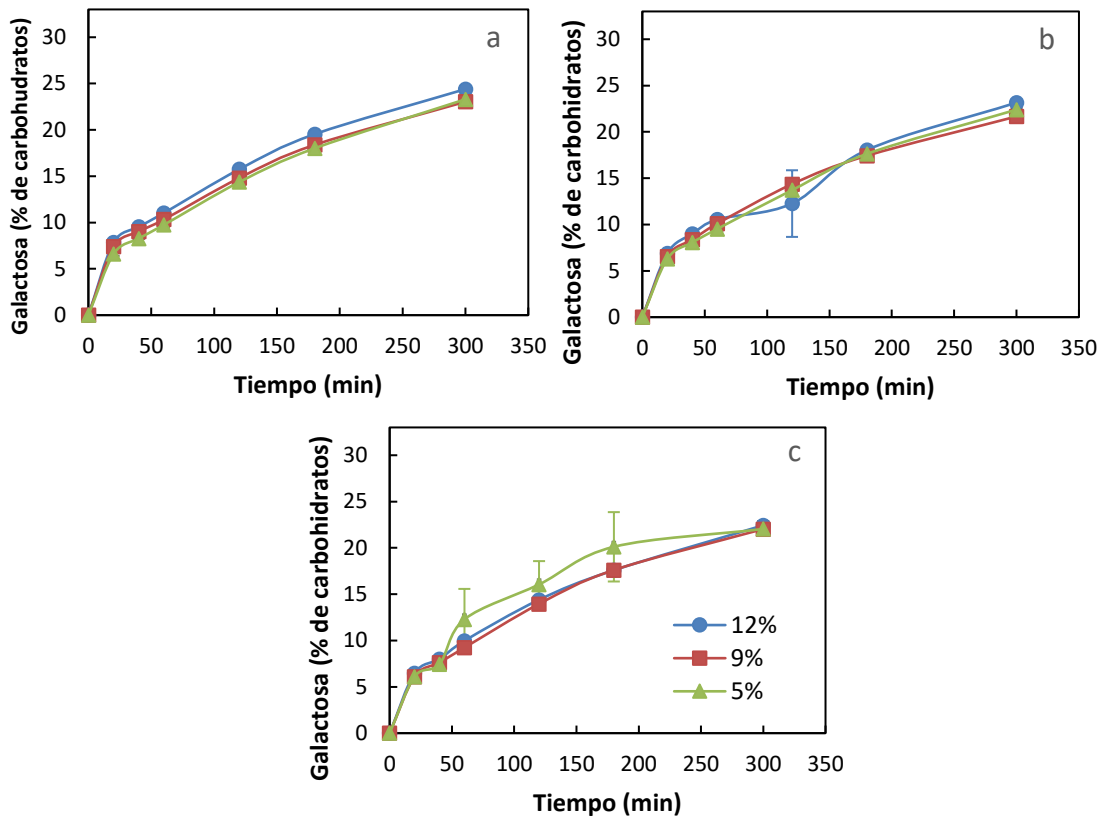
Anexo D1. Consumo de lactosa en la producción de GOS en presencia de lactosuero. A 35% (a); 40% (b) y 45% (c) de lactosa inicial durante la reacción de producción de GOS con diferentes concentraciones de proteína.



Anexo D2. Producción de glucosa durante la transgalactosilación en presencia de proteína de lactosuero

A 35% (a); 40% (b) y 45% (c) de lactosa inicial durante la producción de GOS con diferentes concentraciones de proteína.

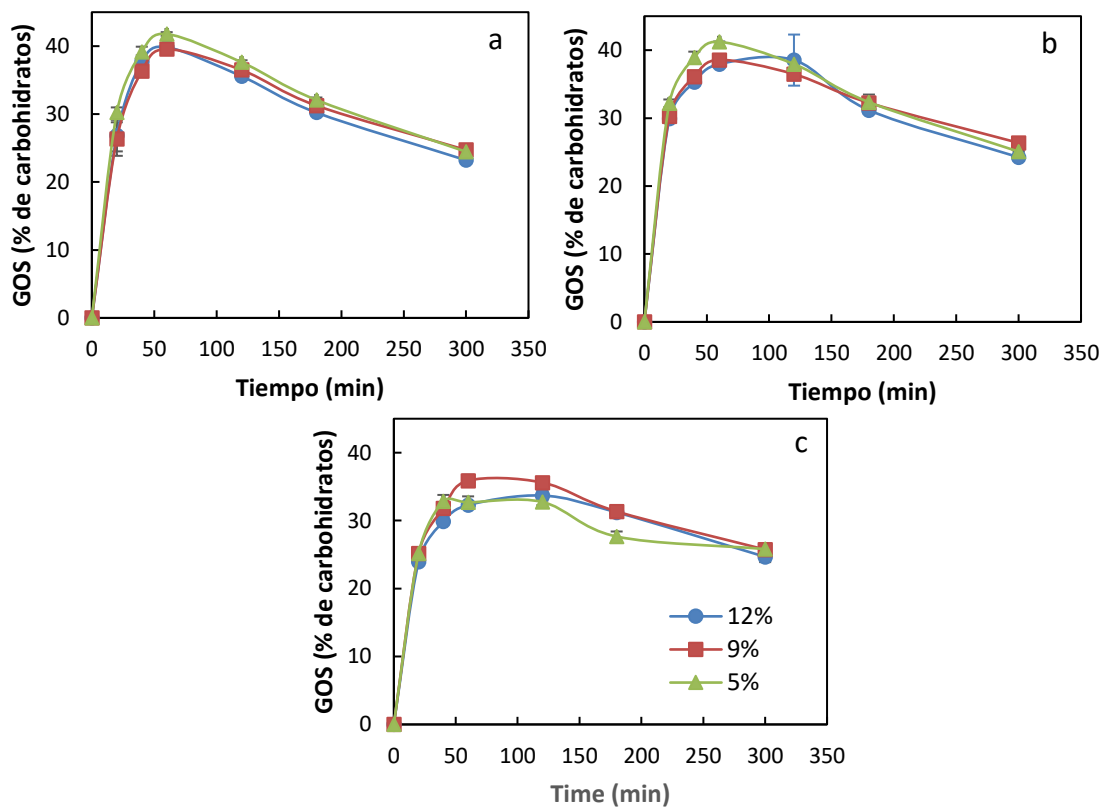
Condiciones de reacción: relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH



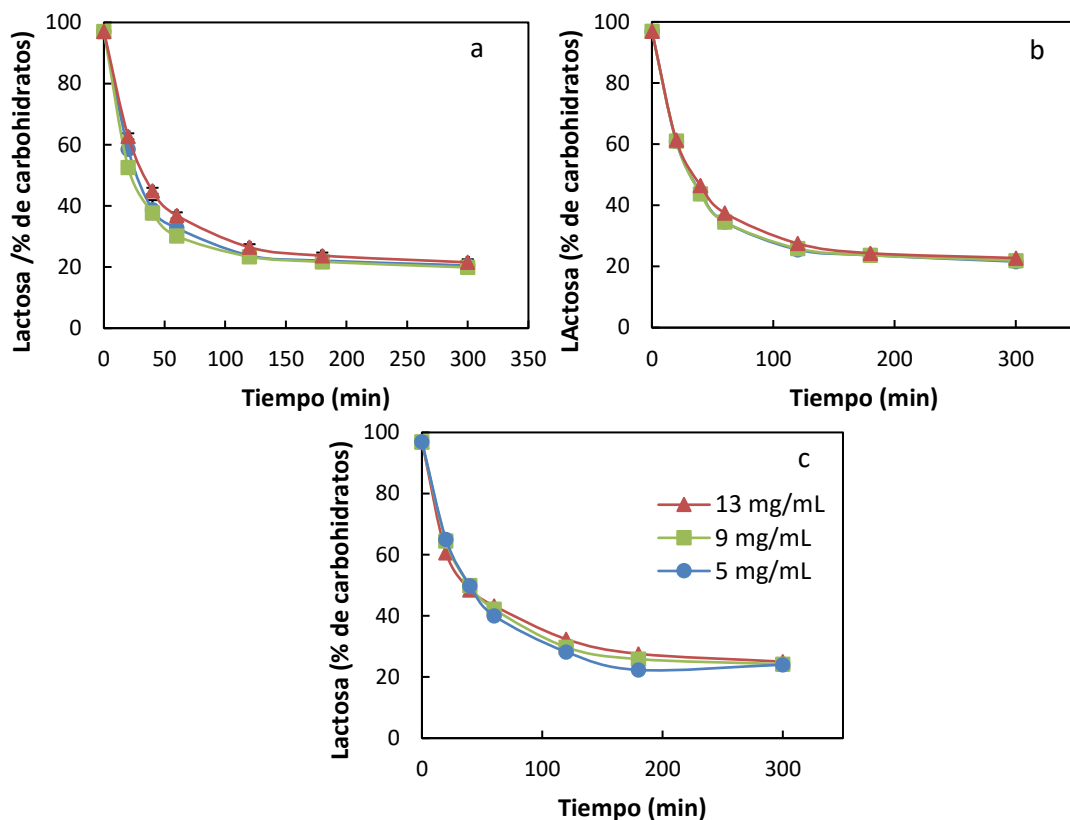
Anexo D3. Producción de galactosa durante la transgalactosilación en presencia de proteína de lactosuero.

A 35% (a), 40% (b) y 45% (c) de lactosa inicial durante la producción de GOS con diferentes concentraciones de proteína.

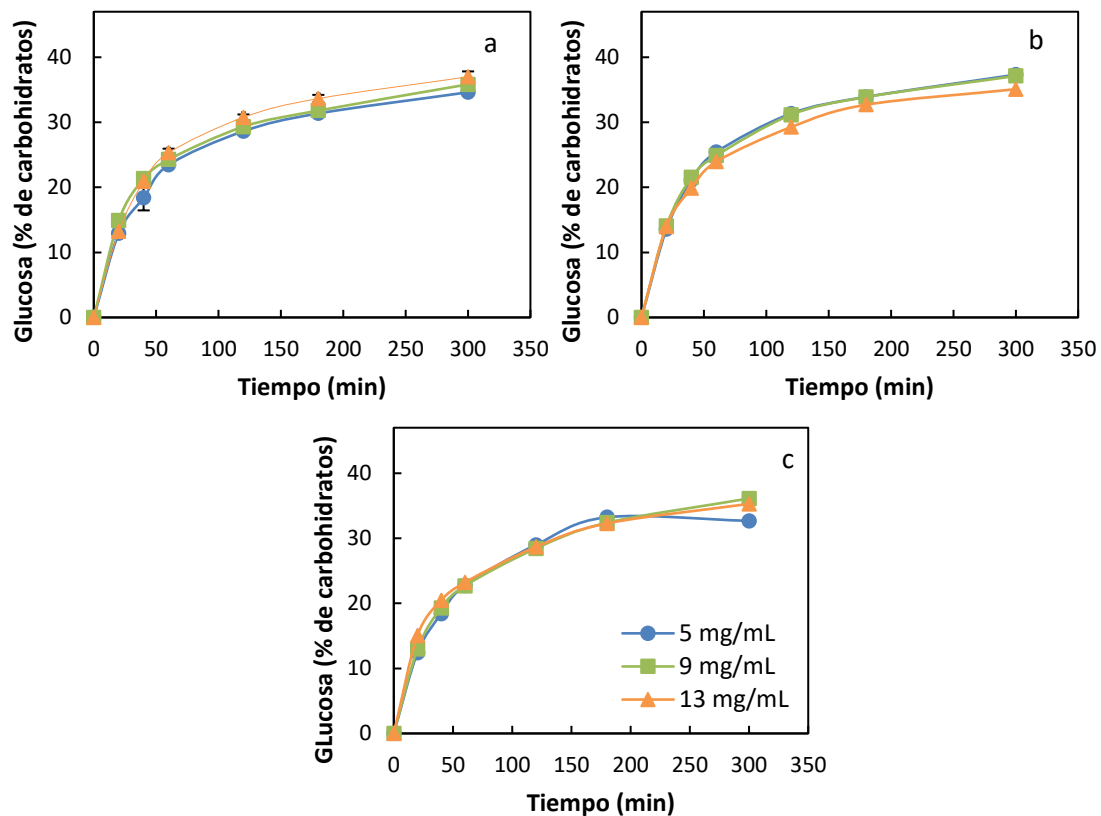
Condiciones de reacción: relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH



Anexo D4. Producción de GOS en presencia de proteína de lactosuero. A 35% (a), 40% (b) y 45% (c) de lactosa inicial con diferentes concentraciones de proteína. Condiciones de reacción: relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH



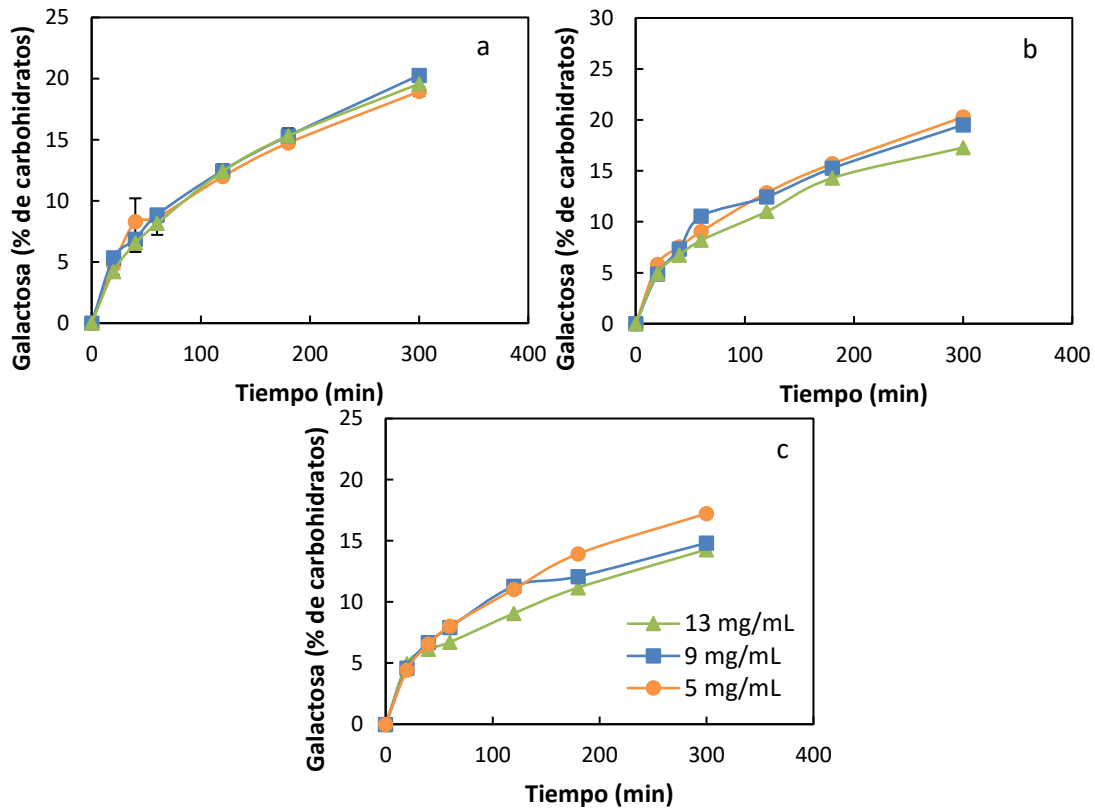
Anexo D5. Consumo de lactosa en presencia de cloruro de sodio. A 35% (a); 40% (b) y 45% (c) de lactosa inicial durante la producción de GOS con diferentes concentraciones (m/v) cloruro de sodio. Condiciones de reacción: relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH



Anexo D6. Producción de glucosa durante la transgalactosilación en presencia de cloruro de sodio.

A 35% (a); 40% (b) y 45% (c) de lactosa inicial durante la producción de GOS con diferentes concentraciones cloruro de sodio.

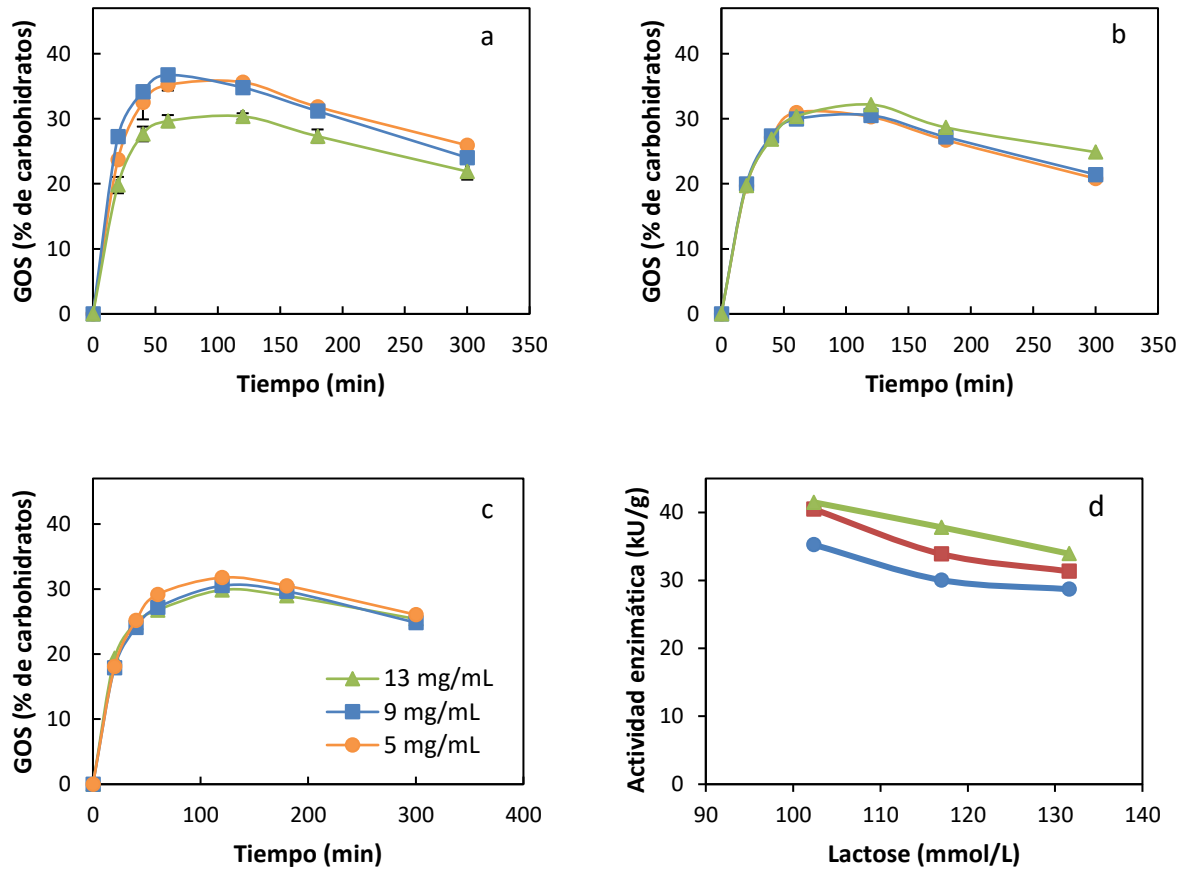
Condiciones de reacción: relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH



Anexo D7. Producción de galactosa durante la transgalactosilación en presencia de cloruro de sodio.

A 35% (a); 40% (b) y 45% (c) de lactosa inicial durante la producción de GOS con diferentes concentraciones cloruro de sodio

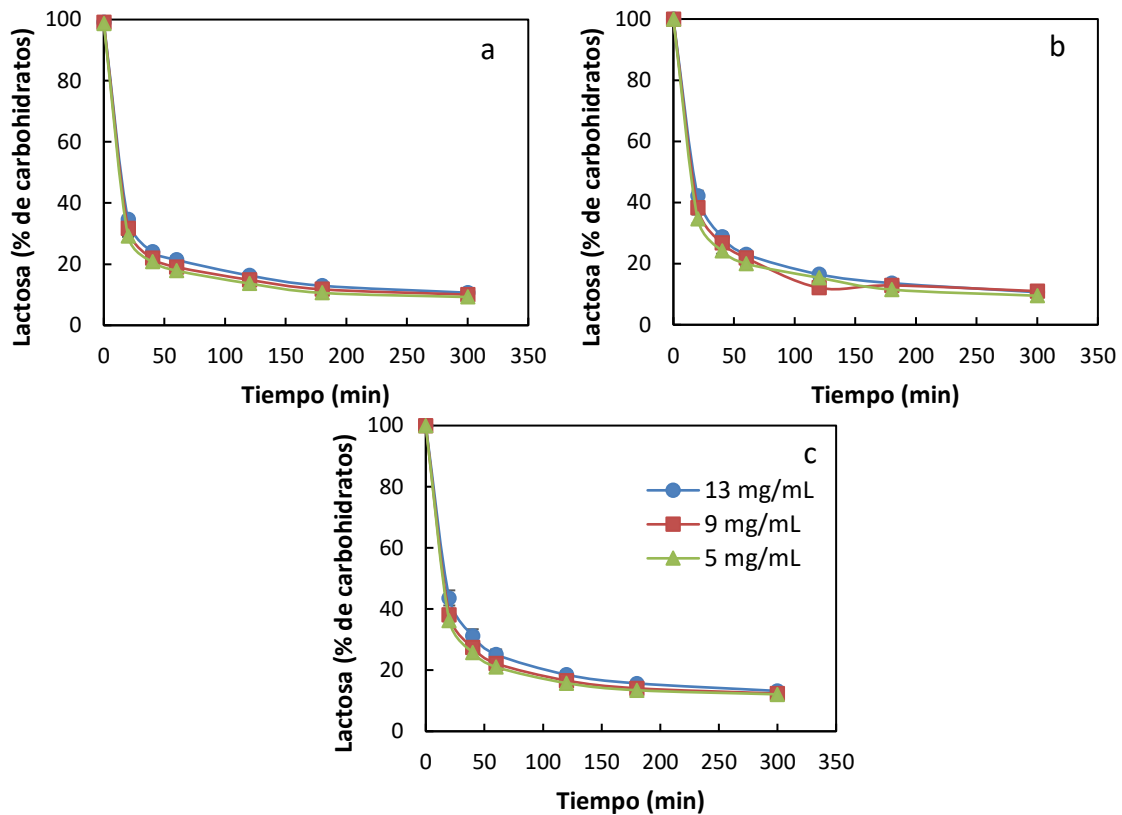
Condiciones de reacción: relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH



Anexo D8. Producción de GOS en presencia de cloruro de sodio.

A 35% (a); 40% (b) y 45% (c) de lactosa inicial con diferentes concentraciones cloruro de sodio y efecto de la concentración de lactosa sobre la velocidad de reacción (d).

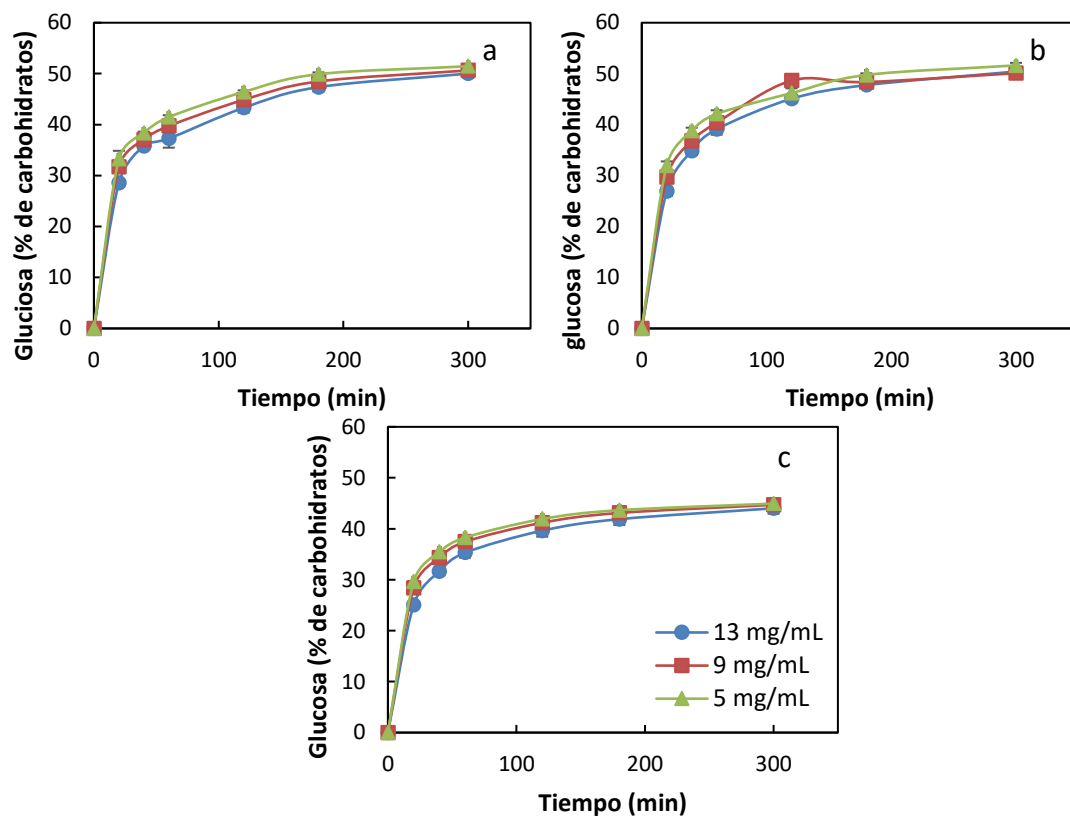
Condiciones de reacción: relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH



Anexo D9. Consumo de lactosa durante la transgalactosilación en presencia de cloruro de potasio

A 35% (a); 40% (b) y 45% (c) de lactosa inicial durante la producción de GOS con diferentes concentraciones cloruro de potasio.

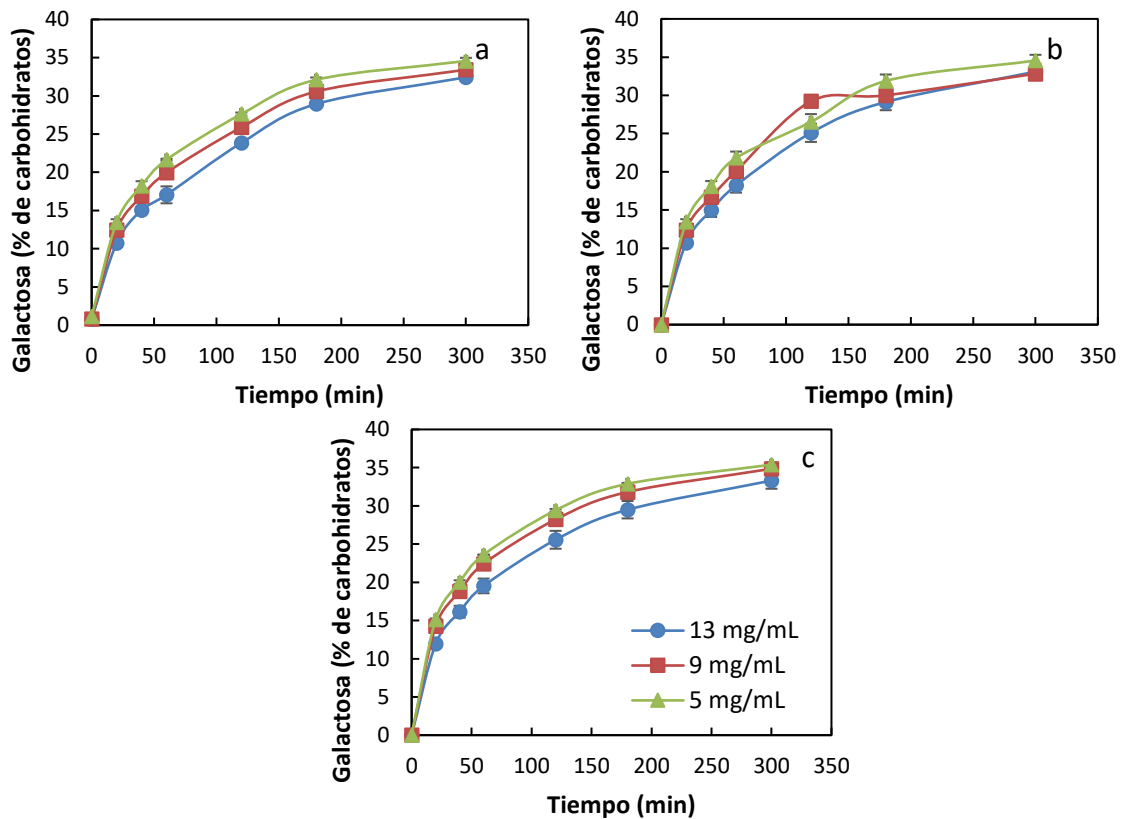
Condiciones de reacción: relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH



Anexo D10. Producción de glucosa durante la transgalactosilación en presencia de cloruro de potasio.

A 35% (a); 40% (b) y 45% (c) de lactosa inicial durante la producción de GOS con diferentes concentraciones cloruro de potasio.

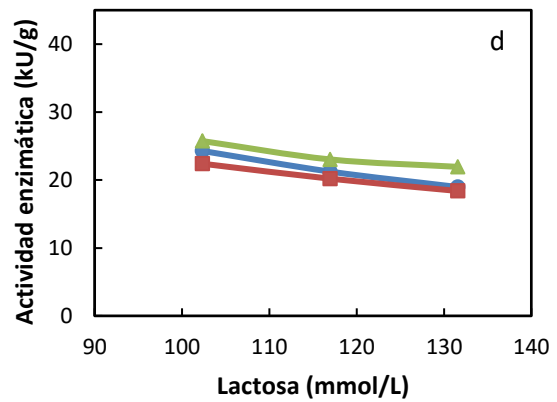
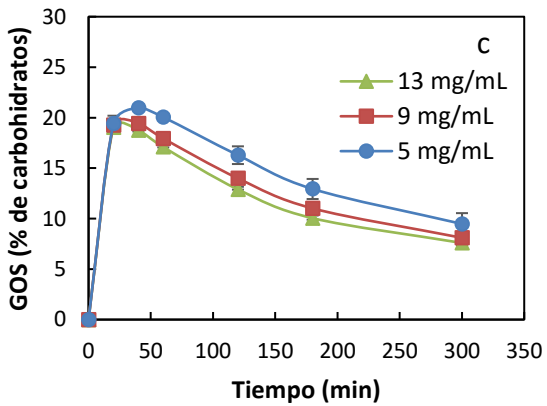
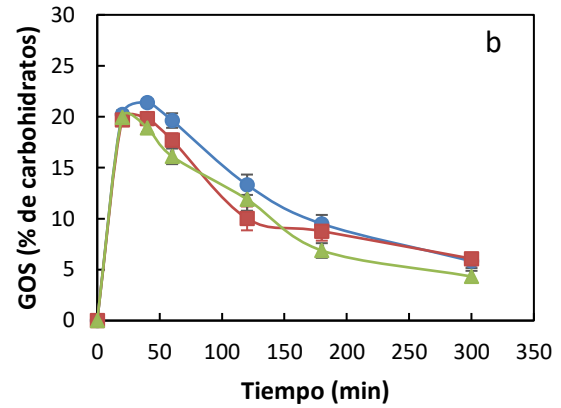
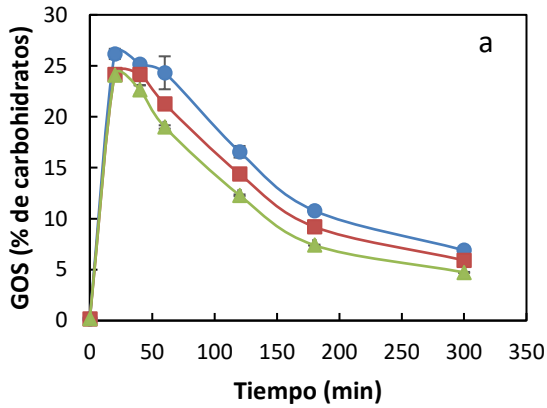
Condiciones de reacción: relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH



Anexo D11. Producción de galactosa durante la transgalactosilación en presencia de cloruro de potasio.

A 35% (a); 40% (b) y 45% (c) de lactosa inicial durante la producción de GOS con diferentes concentraciones cloruro de potasio (—○— Potasio 33%, —□— Potasio 66%, —△— Potasio 100%).

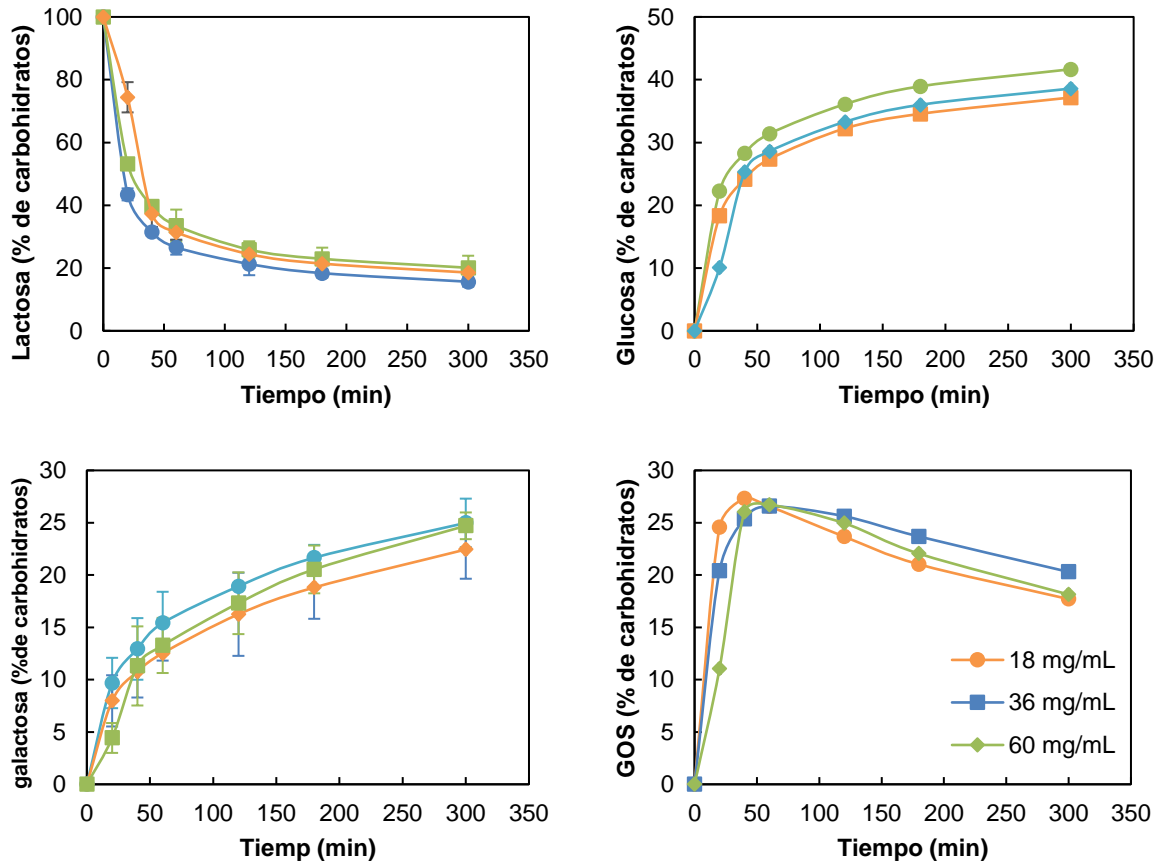
Condiciones de reacción: relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH



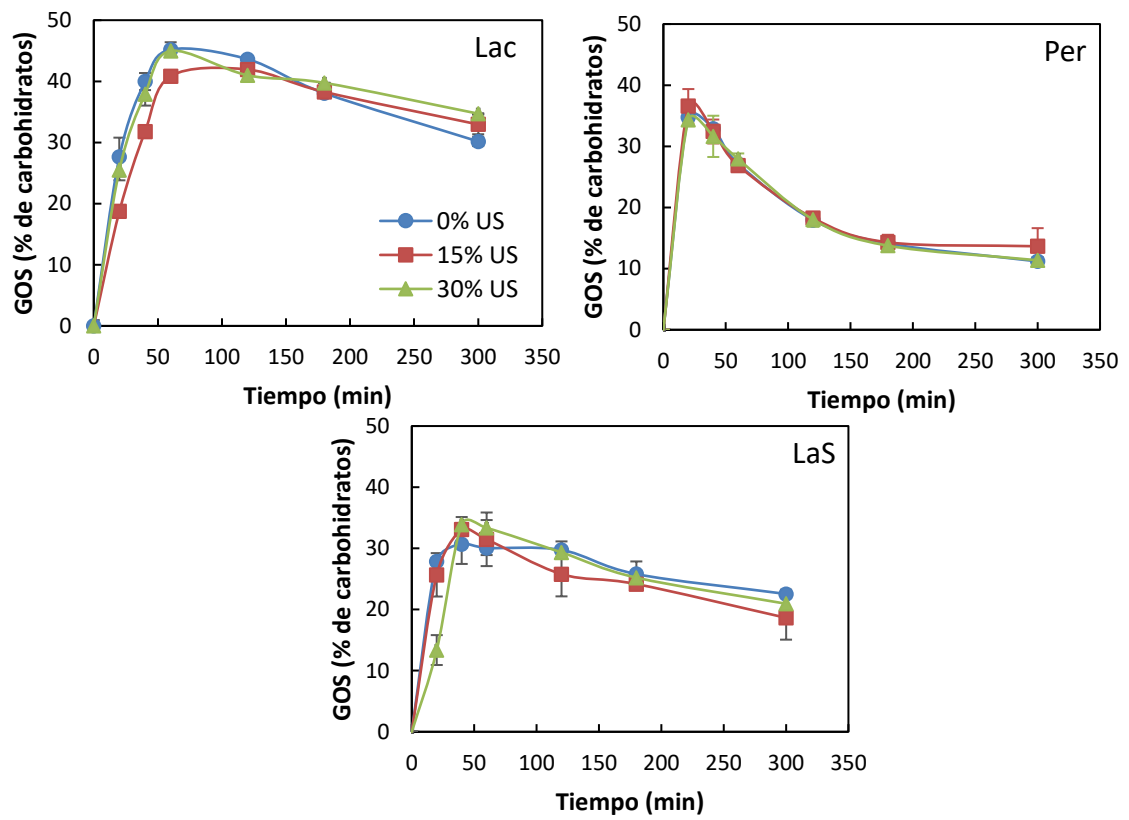
Anexo D12. Producción de GOS durante la transgalactosilación en presencia de cloruro de potasio.

A 35% (a); 40% (b) y 45% (c) de lactosa inicial con diferentes concentraciones cloruro de potasio y efecto de la concentración de lactosa sobre la velocidad de reacción (d).

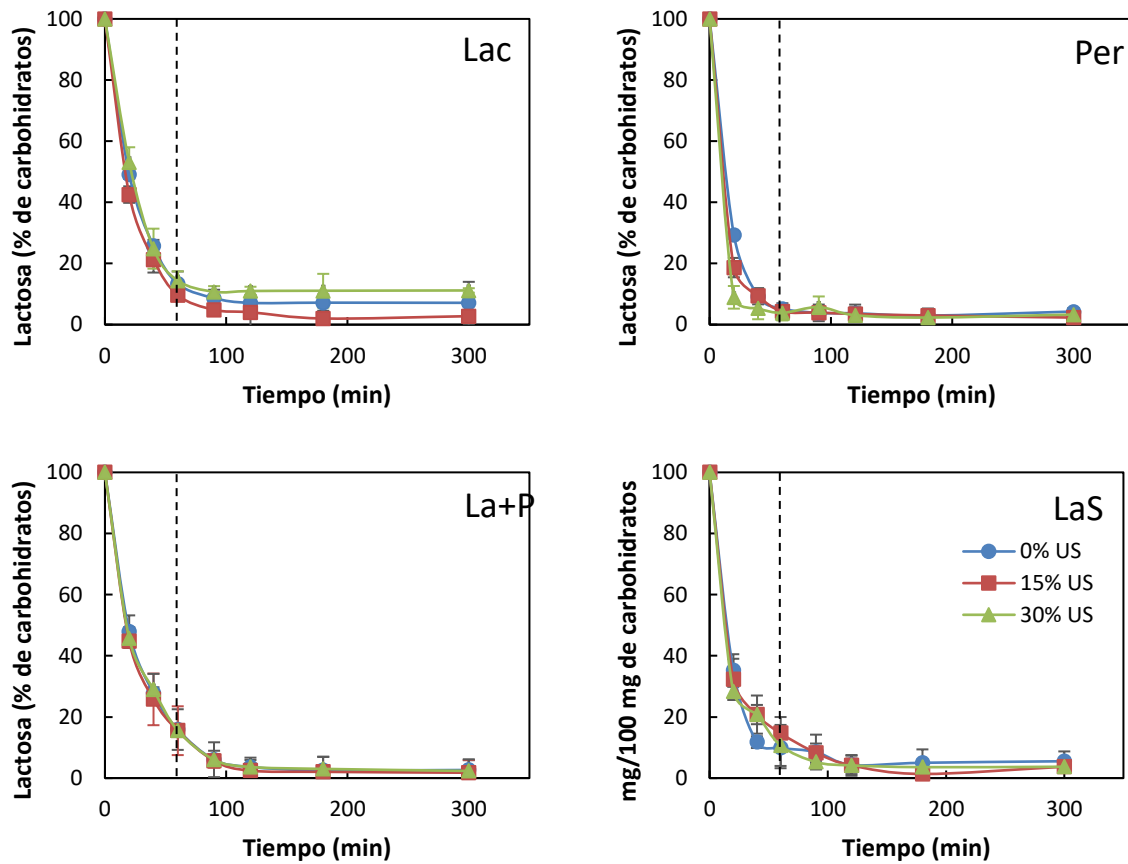
Condiciones de reacción: relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH



Anexo D13. Reacción de transgalactosilación en presencia de cloruro de magnesio. A 35% (a); 40% (b) y 45% (c) de lactosa inicial con diferentes concentraciones cloruro de potasio y efecto de la concentración de lactosa sobre la velocidad de reacción. Condiciones de reacción: relación enzima:sustrato 0.25, 40°C y 6.5 de pH

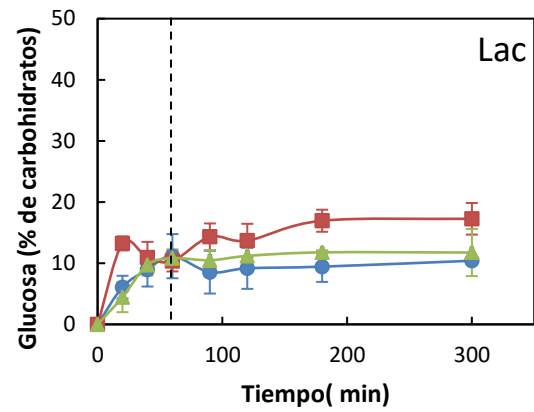
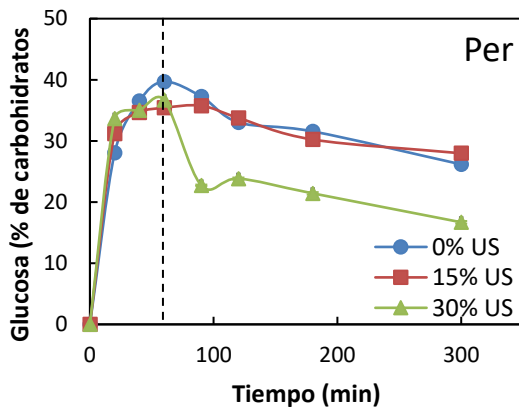
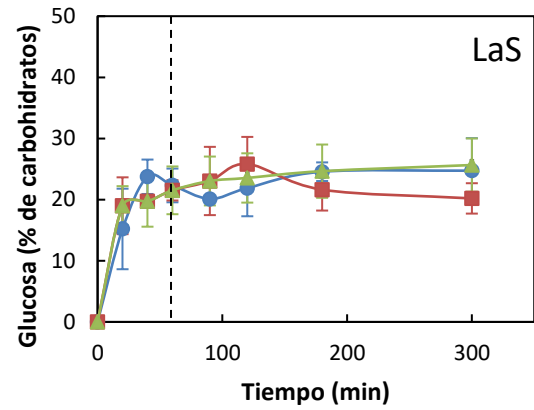
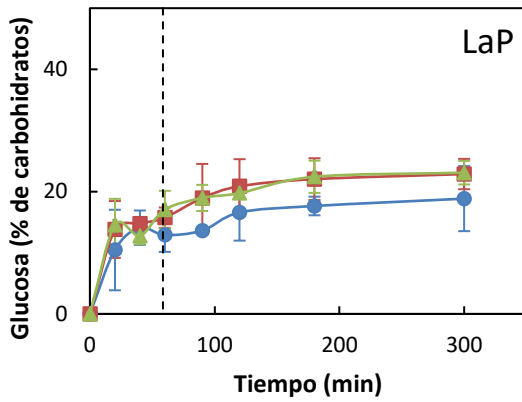


Anexo D14. Producción de GOS en: (a) lactosa; (b) Permeado; (c) lactosero y diferentes amplitudes de US



Anexo D15. Consumo de lactosa en los sistemas multienzimáticos.

Lac = lactosa; La+P = Lactosa + proteína de lactosuero; Per = permeado de lactosuero; LaS = Lactosuero.



Anexo D16. Producción de galactosa en los sistemas multi-enzimáticos.

Lac = lactosa; La+P = Lactosa + proteína de lactosuero; Per = permeado de lactosuero; LaS = Lactosuero.

Bibliografía

- [1] E. Van Leusen *et al.*, *Food Oligosaccharides*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014.
- [2] Ministerio de Agricultura y desarrollo rural, “Agronet,” 2017. [Online]. Available: <https://www.minagricultura.gov.co/Paginas/inicio.aspx>. [Accessed: 21-May-2018].
- [3] FAO, “Milk and Milk Products Price and Trade Update,” 2014. [Online]. Available: http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Dairy/Documents/Milk_and_Milk_Products.pdf. [Accessed: 05-May-2017].
- [4] International Trade Center, “Trade map,” 2017. [Online]. Available: <http://www.trademap.org/>. [Accessed: 05-May-2017].
- [5] G. W. Smithers, “Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold,’” *Int. Dairy J.*, vol. 18, no. 7, pp. 695–704, Jul. 2008.
- [6] A. Cardelle-Cobas, N. Corzo, A. Olano, C. Peláez, T. Requena, and M. Ávila, “Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on Lactobacillus, Streptococcus and Bifidobacterium growth,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 149, no. 1, pp. 81–87, 2011.
- [7] G. Tzortzis, A. K. Goulas, and G. R. Gibson, “Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, Bifidobacterium bifidum NCIMB 41171,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 68, no. 3, pp. 412–416, 2005.
- [8] Y. S. Song, H. Y. Shin, J. Y. Lee, C. Park, and S. W. Kim, “ β -Galactosidase-immobilised microreactor fabricated using a novel technique for enzyme immobilisation and its application for continuous synthesis of lactulose,” *Food Chem.*, vol. 133, no. 3, pp. 611–617, 2012.
- [9] A. Cilla, R. Lacomba, G. García-Llatas, and A. Alegría, “Prebióticos y nucleótidos en alimentación infantil; revisión de la evidencia. (Spanish),” *Nutr. Hosp.*, vol. 27, no. 4, pp. 1037–1048, 2012.
- [10] G. Tzortzis and J. Vulevic, “Galacto-Oligosaccharide Prebiotics,” in *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, D. Charalampopoulos and R. Rastall, Eds.

- Springer New York, 2009, pp. 207–244.
- [11] T. Mennini, “Probiotics and prebiotics,” *Nutrafoods*, vol. 12, no. 2, pp. 66–67, 2013.
- [12] U. Vyas and N. Ranganathan, “Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Gut and Beyond,” *Gastroenterol. Res. Pract.*, vol. 2012, pp. 1–16, 2012.
- [13] D. Torres, M. do P. Gonçalves, J. Teixeira, and L. R. Rodrigues, “Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 9, no. 5, pp. 438–454, 2010.
- [14] A. Gosling, G. W. Stevens, A. R. Barber, S. E. Kentish, and S. L. Gras, “Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose,” *Food Chem.*, vol. 121, no. 2, pp. 307–318, 2010.
- [15] J. Byfield, S. Cardenas, C. J. Alméciga-Díaz, and O. F. Sánchez, “ β -galactosidase and galactooligosaccharides production and applications,” *Recent Patents Chem. Eng.*, vol. 3, no. 1, pp. 17–29, 2010.
- [16] O. Hernández, A. I. Ruiz-Matute, A. Olano, F. J. Moreno, and M. L. Sanz, “Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides,” *Int. Dairy J.*, vol. 19, no. 9, pp. 531–536, Sep. 2009.
- [17] D. Sen *et al.*, “Galactosyl oligosaccharide purification by ethanol precipitation,” *Food Chem.*, vol. 128, no. 3, pp. 773–777, Oct. 2011.
- [18] Y. M. Feng, X. L. Chang, W. H. Wang, and R. Y. Ma, “Separation of galacto-oligosaccharides mixture by nanofiltration,” *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 40, no. 3, pp. 326–332, 2009.
- [19] P. Pal, R. Kumar, and S. Banerjee, “Manufacture of gluconic acid: A review towards process intensification for green production,” *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 104, pp. 160–171, 2016.
- [20] S. Ramachandran, P. Fontanille, A. Pandey, and C. Larroche, “Gluconic acid: Properties, applications and microbial production,” *Food Technology and Biotechnology*, vol. 44, no. 2, pp. 185–195, 2006.
- [21] V. Vaclavik and E. Christian, *Essentials of Food Science*, 3rd ed. New York: Springer New York, 2008.
- [22] H.-D. Belitz, W. Grosch, and P. Schieberle, *Food Chemistry*, 4th ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- [23] D. Barile and R. A. Rastall, “Human milk and related oligosaccharides as prebiotics,”

- Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 24, no. 2, pp. 214–219, 2013.
- [24] Proexport Colombia, *Sector lácteo en Colombia*. Bogotá DC., 2011.
- [25] R. L. Hernández Buevas, “Sector lácteo, un negocio de \$6 billones anuales,” *El Heraldo*, 2016. [Online]. Available: <https://www.elheraldo.co/economia/asoenergia-rechaza-posibles-nuevos-aumentos-en-precio-de-la-energia-252377>. [Accessed: 10-Jul-2017].
- [26] R. IAlimentos, “El problema de la leche en Colombia,” *ialimentos: la revista de la industria de alimentos*. p. 1, 2016.
- [27] A. H. Varnam and J. P. Sutherland, *Milk and milk products*, First edit. Wallington: Springer US, 1994.
- [28] Consejo Nacional Lácteo, “Inventario de productos lácteos,” 2014. [Online]. Available: http://www.cnl.org.co/index.php?option=com_remository&Itemid=108&func=startdown&id=968. [Accessed: 01-Nov-2014].
- [29] G. Del Re, G. Di Giacomo, L. Aloisio, and M. Terreri, “RO treatment of waste waters from dairy industry,” *Desalination*, vol. 119, no. 1–3, pp. 205–206, Sep. 1998.
- [30] L. A. H. M. Verheijen, D. Wiersema, and L. W. Hulshoff Pol, *Management of Waste from Animal Product Processing*. Wageningen, The Netherlands: Agriculture and Consumer Protection, 1996.
- [31] A. R. Prazeres, F. Carvalho, and J. Rivas, “Cheese whey management: a review.,” *J. Environ. Manage.*, vol. 110, pp. 48–68, Nov. 2012.
- [32] F. Carvalho, A. R. Prazeres, and J. Rivas, “Cheese whey wastewater: characterization and treatment.,” *Sci. Total Environ.*, vol. 445–446, pp. 385–96, Feb. 2013.
- [33] S. Yang and E. Silva, “Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose,” *J. Dairy Sci.*, vol. 78, no. 11, pp. 2541–2562, 1995.
- [34] United States Department of Agriculture, “National Nutrient Database,” *Agricultural Research Service*, 2017. [Online]. Available: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/>. [Accessed: 15-Jan-2015].
- [35] Ministerio de Salud, *Procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de los Derivados Lácteos*. Colombia: www.invima.gov.co, 1986, p. 39.

- [36] B. Sarkar, P. P. Chakrabarti, A. Vijaykumar, and V. Kale, "Wastewater treatment in dairy industries — possibility of reuse," *Desalination*, vol. 195, no. 1–3, pp. 141–152, Aug. 2006.
- [37] IDEAM, *Estudio nacional de agua 2014*. Bogotá D.C.: Panamericana Formas e Impresos S.A, 2015.
- [38] R. A. Parra Huertas, "WHEY: IMPORTANCE IN THE FOOD INDUSTRY," *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, vol. 62, no. 1, pp. 4967–4982, 2009.
- [39] G. L. Sánchez, M. Y. Gil, M. A. Gil, F. J. Giraldo, L. J. Millán, and M. E. Villada, "Aprovechamiento del suero lácteo de una empresa del norte antioqueño mediante microorganismos eficientes," *Prod. + Limpia*, vol. 4, no. 2, p. 9, 2009.
- [40] X. Colin, J.-L. Farinet, O. Rojas, and D. Alazard, "Anaerobic treatment of cassava starch extraction wastewater using a horizontal flow filter with bamboo as support.," *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 8, pp. 1602–7, May 2007.
- [41] E. G. Pavas and M. A. Gómez-García, "Multifactorial optimization of the decolorisation parameters of wastewaters resulting from dyeing flowers.," *Water Sci. Technol.*, vol. 59, no. 7, pp. 1361–9, Jan. 2009.
- [42] C. A. Madera, J. Silva, D. D. Mara, and P. Torres, "Wastewater use in agriculture: irrigation of sugar cane with effluents from the Cañaveralejo wastewater treatment plant in Cali, Colombia.," *Environ. Technol.*, vol. 30, no. 10, pp. 1011–5, Sep. 2009.
- [43] H. N. Gavala, H. Kopsinis, I. V. Skiadas, K. Stamatelatou, and G. Lyberatos, "Treatment of Dairy Wastewater Using an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor," *J. Agric. Eng. Res.*, vol. 73, no. 1, pp. 59–63, May 1999.
- [44] K. Yang, Y. Yu, and S. Hwang, "Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation.," *Water Res.*, vol. 37, no. 10, pp. 2467–77, May 2003.
- [45] H. H. Fang, "Treatment of wastewater from a whey processing plant using activated sludge and anaerobic processes.," *J. Dairy Sci.*, vol. 74, no. 6, pp. 2015–9, Jun. 1991.
- [46] J.-C. Frigon, J. Breton, T. Bruneau, R. Moletta, and S. R. Guiot, "The treatment of cheese whey wastewater by sequential anaerobic and aerobic steps in a single digester at pilot scale.," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 18, pp. 4156–63, Sep. 2009.

- [47] J. L. R. Gutiérrez, P. A. G. Encina, and F. Fdz-Polanco, "Anaerobic treatment of cheese-production wastewater using a UASB reactor," *Bioresour. Technol.*, vol. 37, no. 3, pp. 271–276, Jan. 1991.
- [48] J. Rivas, A. R. Prazeres, F. Carvalho, and F. Beltrán, "Treatment of cheese whey wastewater: combined coagulation-flocculation and aerobic biodegradation.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 13, pp. 7871–7, Jul. 2010.
- [49] R. C. Martins and R. M. Quinta-Ferreira, "Final remediation of post-biological treated milk whey wastewater by ozone," *Int. J. Chem. React. Eng.*, vol. 8, no. 1, p. A142, 2010.
- [50] A. M. Farnet, P. Prudent, F. Ziarelli, M. Domeizel, and R. Gros, "Solid-state ¹³C NMR to assess organic matter transformation in a subsurface wetland under cheese-dairy farm effluents.," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 20, pp. 4899–902, Oct. 2009.
- [51] M. I. G. Siso, "The biotechnological utilization of cheese whey: A review," *Bioresour. Technol.*, vol. 57, no. 1, pp. 1–11, Jul. 1996.
- [52] L. F. M. C. Aquino, A. C. O. Silva, M. Q. Freitas, T. L. Felicio, A. G. Cruz, and C. A. Conte-Junior, "Identifying cheese whey an adulterant in milk: Limited contribution of a sensometric approach," *Food Res. Int.*, vol. 62, pp. 233–237, Aug. 2014.
- [53] V. de L. M. Finete, M. M. Gouvêa, F. F. de C. Marques, and A. D. P. Netto, "Is it possible to screen for milk or whey protein adulteration with melamine, urea and ammonium sulphate, combining Kjeldahl and classical spectrophotometric methods?," *Food Chem.*, vol. 141, no. 4, pp. 3649–55, Dec. 2013.
- [54] A. Borin, M. F. Ferrão, C. Mello, D. A. Mareto, and R. J. Poppi, "Least-squares support vector machines and near infrared spectroscopy for quantification of common adulterants in powdered milk.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 579, no. 1, pp. 25–32, Oct. 2006.
- [55] J. L. Repetto, V. Echarri, M. Aguerre, and C. Cajarville, "Use of fresh cheese whey as an additive for Lucerne silages: Effects on chemical composition, conservation quality and ruminal degradation of cell walls," *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 170, no. 3–4, pp. 160–164, Dec. 2011.
- [56] C. Cajarville, A. Britos, D. Garciarena, and J. L. Repetto, "Temperate forages ensiled with molasses or fresh cheese whey: Effects on conservation quality, effluent losses and ruminal degradation," *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 171, no. 1, pp. 14–19, Jan.

- 2012.
- [57] Ministerio de Salud, *Procesamiento, composición, requisitos y comercialización de los alimentos infantiles, de los alimentos o bebidas enriquecidos y de los alimentos o bebidas de uso dietético*. Colombia: Instituto Colombiano de Bienestar Familiar - ICBF, 1984, p. 15.
- [58] B.-M. Exl, "A review of recent developments in the use of moderately hydrolyzed whey formulae in infant nutrition," *Nutr. Res.*, vol. 21, no. 1–2, pp. 355–379, Jan. 2001.
- [59] Instituto Colombiano de Normas Técnicas, *NTC1325 Industrias cárnicas. Productos cárnicos procesados no enlatados*. Colombia, 2008, p. 32.
- [60] K. M. Wójciak, M. Karwowska, and Z. J. Dolatowski, "Use of acid whey and mustard seed to replace nitrites during cooked sausage production.," *Meat Sci.*, vol. 96, no. 2 Pt A, pp. 750–6, Feb. 2014.
- [61] R. Adjonu, G. Doran, P. Torley, and S. Agboola, "Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities," *J. Food Eng.*, vol. 122, pp. 15–27, Feb. 2014.
- [62] S. Wichchukit, M. H. Oztop, M. J. McCarthy, and K. L. McCarthy, "Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component," *Food Hydrocoll.*, vol. 33, no. 1, pp. 66–73, Aug. 2013.
- [63] E. J. Aguirre-Ezkauriatza, J. M. Aguilar-Yáñez, A. Ramírez-Medrano, and M. M. Alvarez, "Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: comparison of batch, continuous and fed-batch cultures.," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 8, pp. 2837–44, Apr. 2010.
- [64] I. Espinosa-Gonzalez, A. Parashar, and D. C. Bressler, "Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production.," *Bioresour. Technol.*, vol. 155, pp. 170–6, Mar. 2014.
- [65] F. Khodaiyan, S. H. Razavi, and S. M. Mousavi, "Optimization of canthaxanthin production by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 from cheese whey using statistical experimental methods," *Biochem. Eng. J.*, vol. 40, no. 3, pp. 415–422, Jul. 2008.
- [66] J.-M. Girard *et al.*, "Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production," *Algal Res.*, 2014.
- [67] A. E. Ghaly and M. A. Kamal, "Submerged yeast fermentation of acid cheese whey

- for protein production and pollution potential reduction.," *Water Res.*, vol. 38, no. 3, pp. 631–44, Feb. 2004.
- [68] P. S. Panesar, J. F. Kennedy, C. J. Knill, and M. Kosseva, "Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey," *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, vol. 53, no. 1, pp. 219–226, 2010.
- [69] A. Willem Schepers, J. Thibault, and C. Lacroix, "Lactobacillus helveticus growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. multiple factor kinetic analysis," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 30, no. 2, pp. 176–186, Feb. 2002.
- [70] M. S. A. Tango and A. E. Ghaly, "Amelioration of lactic acid production from cheese whey using micro-aeration," *Biomass and Bioenergy*, vol. 17, no. 3, pp. 221–238, Sep. 1999.
- [71] M. I. González, S. Álvarez, F. Riera, and R. Álvarez, "Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey," *J. Food Eng.*, vol. 80, no. 2, pp. 553–561, May 2007.
- [72] C. Gao, C. Ma, and P. Xu, "Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass," *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 930–939, 2011.
- [73] K. Okano, T. Tanaka, C. Ogino, H. Fukuda, and A. Kondo, "Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: Recent achievements, perspectives, and limits," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 85, no. 3, pp. 413–423, 2010.
- [74] P. J. Ren, "Biodegradable Poly(Lactic Acid): Synthesis, Modification, Processing and Applications." Springer Berlin Heidelberg, 2010.
- [75] P. Panesar, J. Kennedy, D. Gandhy, and K. Bunko, "Bioutilisation of whey for lactic acid production," *Food Chem.*, vol. 105, no. 1, pp. 1–14, 2007.
- [76] M. Tango, "Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions," *Biomass-Bioenergy*, vol. 16, no. 1, pp. 61–78, Jan. 1999.
- [77] S. Gabardo, R. Rech, C. A. Rosa, and M. A. Z. Ayub, "Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors," *Renew. Energy*, vol. 69, pp. 89–96, Sep. 2014.

- [78] P. M. R. Guimarães, J. A. Teixeira, and L. Domingues, "Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 375–84, Jan. 2010.
- [79] M. Dębowski, E. Korzeniewska, Z. Filipkowska, M. Zieliński, and R. Kwiatkowski, "Possibility of hydrogen production during cheese whey fermentation process by different strains of psychrophilic bacteria," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 39, no. 5, pp. 1972–1978, Feb. 2014.
- [80] F. Kargi, N. S. Eren, and S. Ozmihci, "Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 37, no. 3, pp. 2260–2266, Feb. 2012.
- [81] P. R. Ferreira Rosa, S. C. Santos, and E. L. Silva, "Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 39, no. 3, pp. 1288–1296, Jan. 2014.
- [82] J. Woodward, M. Orr, K. Cordray, and E. Greenbaum, "Enzymatic production of biohydrogen.," *Nature*, vol. 405, no. 6790, pp. 1014–5, Jun. 2000.
- [83] P. R. F. Rosa, S. C. Santos, I. K. Sakamoto, M. B. A. Varesche, and E. L. Silva, "Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: effect of hydraulic retention time on the microbial community composition.," *Bioresour. Technol.*, vol. 161, pp. 10–9, Jun. 2014.
- [84] B. Rodriguez-Colinas, L. Fernandez-Arrojo, A. O. Ballesteros, and F. J. Plou, "Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk," *Food Chem.*, vol. 145, pp. 388–394, 2014.
- [85] D. O. Otieno, "Synthesis of β -Galactooligosaccharides from Lactose Using Microbial β -Galactosidases," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 9, no. 5, pp. 471–482, 2010.
- [86] R. Mohammadi and A. M. Mortazavian, "Review Article: Technological Aspects of Prebiotics in Probiotic Fermented Milks," *Food Rev. Int.*, vol. 27, no. 2, pp. 192–212, 2011.
- [87] S. I. Mussatto and I. M. Mancilha, "Non-digestible oligosaccharides: A review," *Carbohydr. Polym.*, vol. 68, no. 3, pp. 587–597, 2007.
- [88] K. N. Yukiko and S. L. Omaye, "Metabolic diseases and pro- and prebiotics:

- Mechanistic insights," *Nutr. Metab. (Lond)*, vol. 9, no. 1, pp. 60–68, 2012.
- [89] T. Paiboon *et al.*, "Prebiotics - A Review," *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, vol. 31, no. 4, pp. 401–408, 2009.
- [90] B. P. Lamsal, "Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 92, no. 10, pp. 2020–2028, 2012.
- [91] A. Osman, G. Tzortzis, R. A. Rastall, and D. Charalampopoulos, "A comprehensive investigation of the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides by whole cells of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171," *J. Biotechnol.*, vol. 150, no. 1, pp. 140–148, 2010.
- [92] F. A. A. Organization. and W. H. Organization, "Guidelines for the evaluation of probiotics in food." Ontario, 2002.
- [93] P. Hołownia, B. Jaworska-Łuczak, L. Wiśniewska, P. Biliński, and A. Wojtyła, "The benefits and potential health hazards posed by the prebiotic inulin - A review," *Polish J. Food Nutr. Sci.*, vol. 60, no. 3, pp. 201–211, 2010.
- [94] J. Novak and J. Katz, "Probiotics and prebiotics for gastrointestinal infections," *Curr. Infect. Dis. Rep.*, vol. 8, no. 2, pp. 103–109, 2006.
- [95] Beghin Meiji, "Prebiotics (MCP-6079) - Global Industry Analysts, Inc.," *Global industry analyst*, 2016. [Online]. Available: <http://www.strategyr.com/MCP-6079.asp#sthash.BFPcM9Jb.dpbs>. [Accessed: 07-Mar-2018].
- [96] W. Zhang *et al.*, "Enhanced β -galactosidase production of *Aspergillus oryzae* mutated by UV and LiCl," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 44, no. 3, pp. 310–320, 2013.
- [97] M. Corzo-Martínez, P. Copoví, A. Olano, F. J. Moreno, and A. Montilla, "Synthesis of prebiotic carbohydrates derived from cheese whey permeate by a combined process of isomerisation and transgalactosylation," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 93, no. 7, pp. 1591–1597, 2013.
- [98] S. G. Mohammed, A. A. Sahi, N. A. Ameer, and F. Chen, "Prebiotic and Synbiotic Effects of *Lactobacillus rhamnosus* Isolated from Iraq on Intestinal Tract Microflora in Mice," *Pakistan J. Nutr.*, vol. 10, no. 5, pp. 433–442, 2011.
- [99] M. . Boon, A. E. . Janssen, and K. van 't Riet, "Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 26, no. 2–4, pp. 271–281, Feb. 2000.

- [100] A. Goulas, G. Tzortzis, and G. R. Gibson, "Development of a process for the production and purification of α - and β -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171," *Int. Dairy J.*, vol. 17, no. 6, pp. 648–656, 2007.
- [101] D. F. M. Neri, V. M. Balcão, F. O. Q. Dourado, J. M. B. Oliveira, L. B. Carvalho Jr, and J. A. Teixeira, "Galactooligosaccharides production by β -galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane–polyaniline particles," *React. Funct. Polym.*, vol. 69, no. 4, pp. 246–251, 2009.
- [102] A.-R. Park and D.-K. Oh, "Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 85, no. 5, pp. 1279–1286, 2010.
- [103] V. Sangwan, S. K. Tomar, R. R. B. Singh, A. K. Singh, and B. Ali, "Galactooligosaccharides: Novel Components of Designer Foods," *J. Food Sci.*, vol. 76, no. 4, pp. R103–R111, 2011.
- [104] A. Warmerdam, F. K. Zisopoulos, R. M. Boom, and A. E. M. Janssen, "Kinetic characterization of galacto-oligosaccharide (GOS) synthesis by three commercially important β -galactosidases.," *Biotechnol. Prog.*, vol. 30, no. 1, pp. 38–47, Jan. 2014.
- [105] W. Bednarski and A. Kulikowska, "Influence of two-phase system composition on biocatalytic properties of β -galactosidase preparations," *Chem. Pap.*, vol. 61, no. 5, pp. 364–369, 2007.
- [106] A. P. Manera *et al.*, "Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides using pressurised fluids as reaction medium," *Food Chem.*, vol. 133, no. 4, pp. 1408–1413, Aug. 2012.
- [107] W. Srisimarath and P. Pongsawasdi, "Enhancement of the oligosaccharide synthetic activity of β -galactosidase in organic solvents by cyclodextrin," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 43, no. 6, pp. 436–441, Nov. 2008.
- [108] W. Aehle, "Industrial Enzymes: Overview of Industrial Enzyme Applications," in *Enzymes in Industry*, W. Aehle, Ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004, pp. 257–262.
- [109] T. Nguyen *et al.*, "Purification and Characterization of Two Novel β -Galactosidases from *Lactobacillus reuteri*," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 14, pp. 4989–4998, Jun. 2006.
- [110] N. Batra, J. Singh, A. Joshi, and R. C. Sobti, "Improved Properties of *Bacillus*

- coagulans β -Galactosidase through Immobilization,” *Eng. Life Sci.*, vol. 5, no. 6, pp. 581–584, 2005.
- [111] J. Marín-Navarro, D. Talens-Perales, A. Oude-Vrielink, F. Cañada, and J. Polaina, “Immobilization of thermostable β -galactosidase on epoxy support and its use for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides biosynthesis,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 30, no. 3, pp. 989–998, 2014.
- [112] F. Guío, “Evaluación de la producción de galactooligosacáridos a partir de materias primas lácteas con beta-galactosidasa inmovilizada,” Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá, 2015.
- [113] T. Palai and P. K. Bhattacharya, “Kinetics of lactose conversion to galactooligosaccharides by β -galactosidase immobilized on PVDF membrane.,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 115, no. 6, pp. 668–73, Jun. 2013.
- [114] E. Jurado, F. Camacho, G. Luzón, and J. . Vicaria, “A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 31, no. 3, pp. 300–309, Aug. 2002.
- [115] E. Jurado, F. Camacho, G. Luzón, and J. M. Vicaria, “Kinetic model for lactose hydrolysis in a recirculation hollow-fibre bioreactor,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 59, no. 2, pp. 397–405, Jan. 2004.
- [116] M. M. Alvarez, E. J. Aguirre-Ezkauriatza, A. Ramírez-Medrano, and A. Rodríguez-Sánchez, “Kinetic analysis and mathematical modeling of growth and lactic acid production of *Lactobacillus casei* var. *ramnosus* in milk whey.,” *J. Dairy Sci.*, vol. 93, no. 12, pp. 5552–60, Dec. 2010.
- [117] C. S. Kim, E.-S. Ji, and D.-K. Oh, “A new kinetic model of recombinant beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 316, no. 3, pp. 738–43, Apr. 2004.
- [118] E. Demirhan, D. K. Apar, and B. Özbek, “Product inhibition of whey lactose hydrolysis,” *Chem. Eng. Commun.*, vol. 195, no. 3, pp. 293–304, Dec. 2007.
- [119] X. Hu, S. Robin, S. O’Connell, G. Walsh, and J. G. Wall, “Engineering of a fungal beta-galactosidase to remove product inhibition by galactose.,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 87, no. 5, pp. 1773–82, Aug. 2010.
- [120] S. Chockchaisawasdee, V. I. Athanasopoulos, K. Niranjana, and R. A. Rastall,

- "Synthesis of Galacto-oligosaccharide From Lactose Using Beta-Galactosidase From *Kluyveromyces lactis*: Studies on Batch and Continuous UF Membrane-Fitted Bioreactors," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 89, no. 4, p. 9, 2004.
- [121] D. Neri *et al.*, "Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol," *Food Chem.*, vol. 115, no. 1, pp. 92–99, Jul. 2009.
- [122] C. Vera, C. Guerrero, and A. Illanes, "Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations.," *Carbohydr. Res.*, vol. 346, no. 6, pp. 745–52, May 2011.
- [123] L. A. Angel, E. Calvo, and Y. Muñoz, "Prevalencia de hipolactasia tipo adulto e intolerancia a la lactosa en adultos," *Rev. Colomb. Gastroenterol.*, vol. 20, pp. 35–47, 2005.
- [124] C. Guerrero, C. Vera, C. Novoa, J. Dumont, F. Acevedo, and A. Illanes, "Purification of highly concentrated galacto-oligosaccharide preparations by selective fermentation with yeasts," *Int. Dairy J.*, vol. 39, no. 1, pp. 78–88, Nov. 2014.
- [125] P. Pal and P. Dey, "Process intensification in lactic acid production by three stage membrane integrated hybrid reactor system," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 64, pp. 1–9, Feb. 2013.
- [126] J. P. M. Sanders *et al.*, "Process intensification in the future production of base chemicals from biomass," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 51, pp. 117–136, Jan. 2012.
- [127] R. Kumar, D. Vikramachakravarthi, and P. Pal, "Production and purification of glutamic acid: A critical review towards process intensification," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 81, pp. 59–71, Jul. 2014.
- [128] B. Salamatina, H. Mootabadi, I. Hashemizadeh, and A. Z. Abdullah, "Intensification of biodiesel production from vegetable oils using ultrasonic-assisted process: Optimization and kinetic," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 73, pp. 135–143, Nov. 2013.
- [129] J. M. Ponce-Ortega, M. M. Al-Thubaiti, and M. M. El-Halwagi, "Process intensification: New understanding and systematic approach," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 53, pp. 63–75, Mar. 2012.

- [130] P. Lutze, A. Román-Martinez, J. M. Woodley, and R. Gani, "A systematic synthesis and design methodology to achieve process intensification in (bio) chemical processes," *Comput. Chem. Eng.*, vol. 36, pp. 189–207, Jan. 2012.
- [131] P. J. Verbelen, V. A. Nedović, V. Manojlović, F. R. Delvaux, I. Laskošek-Čukalović, and R. W. Branko Bugarski, "Bioprocess Intensification of Beer Fermentation Using Immobilised Cells," in *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, N. J. Zuidam and V. Nedovic, Eds. New York: Springer New York, 2010, pp. 303–325.
- [132] W. Pfefferle, B. Möckel, B. Bathe, and A. Marx, "Biotechnological Manufacture of Lysine," in *Microbial Production of L-Amino Acids*, B. Bathe, V. G. Debabov, S. Huebner, M. Ikeda, E. Kimura, A. Marx, B. Möckel, U. Mueller, and W. Pfefferle, Eds. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2003, pp. 59–112.
- [133] Information National Center for Biotechnology, "PubChem Compound Database; CID=10690," 2005. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10690>. [Accessed: 12-Jul-2017].
- [134] I. Witońska, M. Frajtak, and S. Karski, "Selective oxidation of glucose to gluconic acid over Pd–Te supported catalysts," *Appl. Catal. A Gen.*, vol. 401, no. 1–2, pp. 73–82, 2011.
- [135] R. Mukhopadhyay, S. Chatterjee, B. P. Chatterjee, P. C. Banerjee, and A. K. Guha, "Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*," *Int. Dairy J.*, vol. 15, no. 3, pp. 299–303, Mar. 2005.
- [136] K. An, F. Hu, and J. Bao, "Simultaneous saccharification of inulin and starch using commercial glucoamylase and the subsequent bioconversion to high titer sorbitol and gluconic acid.," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 171, no. 8, pp. 2093–104, Dec. 2013.
- [137] A. C. O. Mafra, F. F. Furlan, A. C. Badino, and P. W. Tardioli, "Gluconic acid production from sucrose in an airlift reactor using a multi-enzyme system.," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 38, no. 4, pp. 671–80, Oct. 2014.
- [138] E. J. Tomotani and M. Vitolo, "Immobilized glucose oxidase as a catalyst to the conversion of glucose into gluconic acid using a membrane reactor," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 40, no. 5, pp. 1020–1025, Apr. 2007.
- [139] T. Mehtiö, M. Toivari, M. G. Wiebe, A. Harlin, M. Penttilä, and A. Koivula, "Production

- and applications of carbohydrate-derived sugar acids as generic biobased chemicals,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, pp. 1–13, Jul. 2015.
- [140] K. Fischer and H.-P. Bipp, “Removal of Heavy Metals from Soil Components and Soils by Natural Chelating Agents. Part II. Soil Extraction by Sugar Acids,” *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 138, no. 1/4, pp. 271–288, 2002.
- [141] C. G. Nieto-Peñalver, M. J. Savino, E. V Bertini, L. A. Sánchez, and L. I. C. de Figueroa, “Gluconic acid produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 possesses antimicrobial properties.” *Res. Microbiol.*, vol. 165, no. 7, pp. 549–58, Sep. 2014.
- [142] M. Comotti, C. Della Pina, and M. Rossi, “Mono- and bimetallic catalysts for glucose oxidation,” *J. Mol. Catal. A Chem.*, vol. 251, no. 1–2, pp. 89–92, 2006.
- [143] K. Nakao, A. Kiefner, K. Furumoto, and T. Harada, “Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 52, no. 21–22, pp. 4127–4133, Nov. 1997.
- [144] R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, and W. V Rodwell, *Harper’s Illustrated biochemistry*, 26th ed. MacGraw-Hill, 2003.
- [145] D. C. Sheu, P. J. Lio, S. T. Chen, C. T. Lin, and K. J. Duan, “Production of fructooligosaccharides in high yield using a mixed enzyme system of β -fructofuranosidase and glucose oxidase,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 23, no. 18, pp. 1499–1503, 2001.
- [146] M. Ladero, A. Santos, J. . García, A. . Carrascosa, B. C. . Pessela, and F. García-Ochoa, “Studies on the activity and the stability of β -galactosidases from *Thermus* sp strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 30, no. 3, pp. 392–405, Mar. 2002.
- [147] S. Bera, D. Mondal, J. T. Martin, and M. Singh, “Potential effect of ultrasound on carbohydrates,” *Carbohydr. Res.*, vol. 410, pp. 15–35, Jun. 2015.
- [148] C. P. O’Donnell, B. K. Tiwari, P. Bourke, and P. J. Cullen, “Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 21, no. 7, pp. 358–367, Jul. 2010.
- [149] J. Moreno, N. Corzo, A. Montilla, M. Villamiel, and A. Olano, “Current state and latest advances in the concept, production and functionality of prebiotic oligosaccharides,” *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 13, pp. 50–55, 2017.

- [150] K. S. Ojha, T. J. Mason, C. P. O'Donnell, J. P. Kerry, and B. K. Tiwari, "Ultrasound technology for food fermentation applications," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 34, pp. 410–417, 2017.
- [151] S. V. Sancheti and P. R. Gogate, "A review of engineering aspects of intensification of chemical synthesis using ultrasound," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 36, pp. 527–543, May 2017.
- [152] M. A. Ganaie and U. S. Gupta, "Recycling of cell culture and efficient release of intracellular fructosyltransferase by ultrasonication for the production of fructooligosaccharides," *Carbohydr. Polym.*, vol. 110, pp. 253–258, 2014.
- [153] M. Corzo-Martínez, A. Montilla, R. Megías-Pérez, A. Olano, F. J. Moreno, and M. Villamiel, "Impact of high-intensity ultrasound on the formation of lactulose and Maillard reaction glycoconjugates.," *Food Chem.*, vol. 157, no. Supplement C, pp. 186–92, Aug. 2014.
- [154] A. Ljubić, A. b Jurić, and K. L. . Jakopović, "Effect of high intensity ultrasound on the milk fermentation by bifidobacteria [Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na fermentaciju mlijeka bifidobakterijama]," *Mljekarstvo*, vol. 65, no. 2, pp. 71–80, 2015.
- [155] M. Villamiel, J. Gamboa, A. C. Soria, E. Riera, J. V. García-Pérez, and A. Montilla, "Impact of Power Ultrasound on the Quality of Fruits and Vegetables During Dehydration," *Phys. Procedia*, vol. 70, pp. 828–832, 2015.
- [156] J. Gamboa-Santos, A. C. Soria, M. Villamiel, and A. Montilla, "Quality parameters in convective dehydrated carrots blanched by ultrasound and conventional treatment," *Food Chem.*, vol. 141, no. 1, pp. 616–624, 2013.
- [157] B. He *et al.*, "Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace," *Food Chem.*, vol. 204, pp. 70–76, Aug. 2016.
- [158] N. A. Al-Dhabi, K. Ponmurugan, and P. Maran Jeganathan, "Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 34, pp. 206–213, 2017.
- [159] M. M. . b c Delgado-Povedano, M. D. . b c de Castro, and M. D. Luque de Castro, "A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship," *Anal. Chim. Acta*, vol. 889, pp. 1–21, 2015.
- [160] B. Kwiatkowska, J. Bennett, J. Akunna, G. M. Walker, and D. H. Bremner,

- “Stimulation of bioprocesses by ultrasound,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 768–780, Nov. 2011.
- [161] G. Huang *et al.*, “Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 37, pp. 144–149, Jul. 2017.
- [162] N. Shiferaw Terefe, R. Buckow, and C. Versteeg, “Quality-Related Enzymes in Plant-Based Products: Effects of Novel Food-Processing Technologies Part 3: Ultrasonic Processing,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 55, no. 2, pp. 147–158, Jan. 2015.
- [163] F. Zhao, H. Li, Y. Jiang, X. Wang, and X. Mu, “Co-immobilization of multi-enzyme on control-reduced graphene oxide by non-covalent bonds: an artificial biocatalytic system for the one-pot production of gluconic acid from starch,” *Green Chem.*, vol. 16, no. 5, p. 2558, 2014.
- [164] AOAC, *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed. 2002.
- [165] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, May 1976.
- [166] A. L. Prajapat, P. B. Subhedar, and P. R. Gogate, “Ultrasound assisted enzymatic depolymerization of aqueous guar gum solution,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 29, pp. 84–92, 2016.
- [167] A. I. Ruiz-Matute, M. Corzo-Martínez, A. Montilla, A. Olano, P. Copovi, and N. Corzo, “Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 28, no. 2, pp. 164–169, 2012.
- [168] D. C. Montgomery, *Design and analysis of experiments*. Wiley, 2009.
- [169] R. G. Brereton, *Applied Chemometrics for Scientists*. 2007.
- [170] C.-C. Cheng, M.-C. Yu, T.-C. Cheng, D.-C. Sheu, K.-J. Duan, and W.-L. Tai, “Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus* (Biotechnology Letters (2006) 28, (793-797) DOI: 10.1007/s10529-006-9002-1),” *Biotechnol. Lett.*, vol. 28, no. 22, 2006.
- [171] I. F. Gorlov *et al.*, “New approach for lactose transglycosylation into galactooligosaccharides,” *Pakistan J. Nutr.*, vol. 14, no. 11, 2015.
- [172] L. Santibáñez, L. Fernández-Arrojo, C. Guerrero, F. J. Plou, and A. Illanes, “Removal of lactose in crude galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 133, pp. 85–91, 2016.

- [173] C. Fischer and T. Kleinschmidt, "Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate," *Int. Dairy J.*, vol. 48, pp. 15–22, Jan. 2015.
- [174] M. V. Flores, R. J. J. Ertola, and C. E. Voget, "Effect of Monovalent Cations (K^+ and Na^+) on Lactose Hydrolysis by *Kluyveromyces lactis* β -Galactosidase A Kinetic Model," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 799, no. 1 Enzyme Engine, pp. 183–189, Oct. 1996.
- [175] A. Montilla, N. Corzo, and A. Olano, "Effects of monovalent cations (Na^+ and K^+) on galacto- oligosaccharides production during lactose hydrolysis by *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase," *Milchwissenschaft*, vol. 1, no. 67, pp. 14–18, 2012.
- [176] I. González-Delgado, M.-J. López-Muñoz, G. Morales, and Y. Segura, "Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*," *Int. Dairy J.*, vol. 61, pp. 211–219, 2016.
- [177] E. Demirhan and B. Özbek, "A modeling study on hydrolisys of lactose recovered from whey and β -galactosidase stability under sonic treatment," *Chem. Eng. Commun.*, vol. 196, no. 7, pp. 767–787, Mar. 2009.
- [178] O. M. Felli, ; Badino, ; Pilatti, and & Alesso, "Caracterización química del permeado de suero como abono. Variación estacional y por procedencia resumen," *Rev. FAVE -Ciencias Agrar.*, vol. 11, no. 1, 2012.
- [179] C. R. Lisboa, L. de Simoni Martinez, R. A. Trindade, F. A. de Almeida Costa, J. F. de Medeiros Burkert, and C. A. V. Burkert, "Response surface methodology applied to the enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides from cheese whey," *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 21, no. 6, pp. 1519–1524, 2012.
- [180] C. Cui, H. Chen, B. Chen, and T. Tan, "Genipin Cross-Linked Glucose Oxidase and Catalase Multi-enzyme for Gluconic Acid Synthesis," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 181, no. 2, pp. 526–535, Feb. 2017.
- [181] Y. Önal, S. Schimpf, and P. Claus, "Structure sensitivity and kinetics of d-glucose oxidation to d-gluconic acid over carbon-supported gold catalysts," *J. Catal.*, vol. 223, no. 1, pp. 122–133, 2004.
- [182] O. Hernández-Hernández, I. Calvillo, R. Lebrón-Aguilar, F. J. Moreno, and M. L. Sanz, "Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the characterization of prebiotic galactooligosaccharides.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1220, pp. 57–67, Jan. 2012.

- [183] C. Martínez-Villaluenga, A. Cardelle-Cobas, N. Corzo, A. Olano, and M. Villamiel, "Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G)," *Food Chem.*, vol. 107, no. 1, pp. 258–264, 2008.
- [184] Z. Li, M. Xiao, L. Lu, and Y. Li, "Production of non-monosaccharide and high-purity galactooligosaccharides by immobilized enzyme catalysis and fermentation with immobilized yeast cells," *Process Biochem.*, vol. 43, no. 8, pp. 896–899, 2008.
- [185] N. Onishi, I. Kira, and K. Yokozeki, "Galacto-oligosaccharide production from lactose by *Sirobasidium magnum* CBS6803," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 23, no. 4, pp. 253–256, 1996.
- [186] I. González-Delgado, Y. Segura, G. Morales, and M.-J. López-Muñoz, "Production of High Galacto-oligosaccharides by Pectinex Ultra SP-L: Optimization of Reaction Conditions and Immobilization on Glyoxyl-Functionalized Silica," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 8, pp. 1649–1658, 2017.
- [187] J. Mirón, M. P. González, J. A. Vázquez, L. Pastrana, and M. A. Murado, "A mathematical model for glucose oxidase kinetics, including inhibitory, deactivant and diffusional effects, and their interactions," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 34, no. 5, pp. 513–522, Apr. 2004.
- [188] M. Adamczak, D. Charubin, and W. Bednarski, "Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared from whey permeate," *Chemical Papers*, vol. 63, p. 111, 2009.
- [189] E. Kuna, R. Behling, S. Valange, G. Chatel, and J. C. Colmenares, "Sonocatalysis: A Potential Sustainable Pathway for the Valorization of Lignocellulosic Biomass and Derivatives," *Top. Curr. Chem.*, vol. 375, no. 2, p. 41, Apr. 2017.
- [190] P. B. Subhedar and P. R. Gogate, "Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 101, pp. 108–114, Mar. 2014.
- [191] M. Abidi, A. Iram, M. Furkan, and A. Naeem, "Secondary structural alterations in glucoamylase as an influence of protein aggregation," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 98, pp. 459–468, 2017.
- [192] L. Zhou, W. Liu, L. Zou, Z. Xiong, X. Hu, and J. Chen, "Aggregation and conformational change of mushroom (*Agaricus bisporus*) polyphenoloxidase

- subjected to thermal treatment," *Food Chem.*, vol. 214, pp. 423–431, 2017.
- [193] A. Guiseppi-Elie, S.-H. Choi, and K. E. Geckeler, "Ultrasonic processing of enzymes: Effect on enzymatic activity of glucose oxidase," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 58, no. 1–4, pp. 118–123, Jun. 2009.
- [194] A. Davulcu, H. A. Eren, O. Avinc, and B. Eriçsmiçs, "Ultrasound assisted biobleaching of cotton," *Cellulose*, vol. 21, no. 4, pp. 2973–2981, 2014.