

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE



FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN EN UN REACTOR DE LECHO EMPACADO A FLUJO PARA LA OBTENCIÓN DE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS MEDIANTE ENZIMAS INMOVILIZADAS

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AGROINDUSTRIAL

Autora

Martínez Leiton Katherine Victoria

Director

Ing. Jimmy Cuaran Mg.I.

Ibarra-Ecuador

2022



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

“EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN EN UN REACTOR DE LECHO EMPACADO A FLUJO PARA LA OBTENCIÓN DE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS MEDIANTE ENZIMAS INMOVILIZADAS”

Tesis revisada por los miembros del tribunal, por lo cual se autoriza su presentación como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERA AGROINDUSTRIAL

APROBADA

Ing. Jimmy Cuaran, Mg.I
DIRECTOR DE TESIS



FIRMA

Bioq. Valeria Olmedo MSc.
OPOSITOR



FIRMA

Ing. Jimmy Núñez, MSc.
OPOSITOR



FIRMA



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	100359159-9		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Martínez Leiton Katherine Victoria		
DIRECCIÓN:	La Victoria - Etapa III, Hugo Guzmán Lara y Luis Alfonso Martínez de la Vega No. 2-26		
EMAIL:	kvmartinezl@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	06215874	CELULAR:	0997055928

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Evaluación de parámetros de operación en un reactor de lecho empacado a flujo para la obtención de galactooligosacáridos mediante enzimas inmovilizadas.
AUTORA:	Martínez Leiton Katherine Victoria
FECHA:	18/10/2022
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO () POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera Agroindustrial
ASESOR/DIRECTOR:	Ing. Jimmy Cuaran, Mg.I

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los dieciocho días del mes de octubre del 2022

EL AUTOR:

Firma: 

Martínez Leiton Katherine Victoria

CI: 1003591599

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la señorita Katherine Victoria Martínez Leiton, bajo mi supervisión.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Jimmy Cuaran', written over a horizontal line.

Ing. Jimmy Cuaran, Mg.I

DIRECTOR DE TESIS

DEDICATORIA

A mi hija Arleth por ser la fuerza que me impulsa día a día a seguir adelante, por ser quien alegra mis días y los llena de un amor incondicional siendo la mejor hija del mundo, mi mundo. A mi abuelita Rosa que me enseñó que en la vida madre no es aquella que trae a sus hijos al mundo sino la que los cría con cariño y dedicación, siendo quien me levantó con un abrazo cuando más lo necesitaba, enseñándome a valorar las cosas pequeñas de la vida. A mis ángeles, mi abuelito Enrique y mi mejor amigo Jonathan que ya no están conmigo pero que siempre permanecerán en mi corazón, y al compañero y amigo incondicional con el cual compartí toda mi vida universitaria, Andrés.

Victoria M.

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo a Dios, porque él siempre está presente en cada paso que doy en la vida, permitiéndome llegar con éxito a cada uno de mis objetivos planteados, cuidándome y resguardándome de todo lo malo que se pueda presentar.

Quiero agradecer a mi hija Arleth y a mi abuelita Rosa, por ser quienes creen en mí siempre, impulsándome a mejorar cada día con sus palabras de apoyo y sus gestos de amor.

De igual manera quiero extender mi agradecimiento a quienes hicieron posible que esta meta se convirtiera en realidad por medio de su tiempo, paciencia, dedicación y conocimientos, al Ing. Jimmy Cuaran en calidad de Director de la presente investigación, y Bioq. Valeria Olmedo e Ing. Jimmy Núñez como mis Asesores.

Y para culminar, agradezco a mis amigos, por formar parte de mi mundo, logrando que este transcurso de mi vida universitaria sea lleno de bonitas anécdotas y experiencias inolvidables que marcaron mi crecimiento personal.

Victoria M.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE ECUACIONES	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1. PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS	3
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	3
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1.4. HIPÓTESIS	3
1.4.1. HIPÓTESIS NULA	3
1.4.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA	3
CAPÍTULO II	4
MARCO TEÓRICO	4
2.1. LACTOSUERO Y SU IMPORTANCIA COMPOSICIONAL	4
2.1.1. CLASIFICACIÓN DEL LACTOSUERO	5
2.1.2. APLICACIONES DEL LACTOSUERO EN LA INDUSTRIA	6
2.1.3. TECNOLOGÍAS PARA EL APROVECHAMIENTO DE LACTOSA PROVENIENTE DE LACTOSUERO	8
2.2. LACTOSA Y SU APROVECHAMIENTO DENTRO DE LA INDUSTRIA	13
2.3. GALACTOOLIGOSACÁRIDOS (GOS) Y SUS PROPIEDADES	15
2.3.1. FORMACIÓN DE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS	16
2.3.2. PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE GOS	18
2.3.3. ENZIMAS β -GALACTOSIDASAS EMPLEADAS PARA LA OBTENCIÓN DE GOS	19

2.4. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA PARA MEJORAR PROCESOS PRODUCTIVOS	20
2.4.1. MÉTODO DE ATRAPAMIENTO	22
CAPÍTULO III	24
MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO	24
3.2. MATERIALES Y EQUIPOS	24
3.2.1. MATERIA PRIMA E INSUMOS	24
3.2.2. REACTIVOS DE LABORATORIO	24
3.2.3. EQUIPOS	25
3.2.4. MATERIALES	25
3.2.5. UTENSILIOS	25
3.3. MÉTODOS	26
3.3.1. OBTENCIÓN DE LACTOSUERO CONCENTRADO Y DESPROTEINIZADO	26
3.3.1.1. FLUJOGRAMA DEL PROCESO	26
3.3.1.2. OPERACIONES UNITARIAS DEL PROCESO	28
3.3.2. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA PRODUCCIÓN DE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS CON ENZIMAS INMOVILIZADAS	28
3.4. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO	32
3.4.1. DIAGRAMAS DE FLUJO DEL EXPERIMENTO	32
3.4.2. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO	33
CAPÍTULO IV	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1. OBTENCIÓN DE LACTOSUERO CONCENTRADO Y DESPROTEINIZADO	45
4.1.1. CARACTERIZACIÓN DEL LACTOSUERO	45
4.1.2. PARÁMETROS PARA EL PROCESO DE CONCENTRACIÓN	46
4.2. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA PRODUCCIÓN DE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS CON ENZIMAS INMOVILIZADAS	50
4.2.1. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA OPTIMIZACIÓN	52

4.2.2. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ÓPTIMO PARA EL EXPERIMENTO CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	53
4.2.3. ANÁLISIS DE HPLC AL MEJOR TRATAMIENTO	55
CAPÍTULO V	58
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
5.1. CONCLUSIONES	58
5.2. RECOMENDACIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes principales del lactosuero	4
Tabla 2. Composición del lactosuero dulce y ácido	6
Tabla 3. Aplicaciones o aprovechamiento del lactosuero	6
Tabla 4. Principales Operaciones Unitarias llevadas a cabo para obtener lactosa concentrada	8
Tabla 5. Ventajas y Desventajas de la Tecnología de Membranas	10
Tabla 6. Clasificación de las Tecnologías de Membranas.....	11
Tabla 7. Propiedades Generales de los GOS	16
Tabla 8. Principales productores industriales de galactooligosacáridos.....	18
Tabla 9. Algunas de las preparaciones enzimáticas de β -galactosidasas disponibles comercialmente.....	19
Tabla 10. Ubicación del área de estudio	24
Tabla 11. Análisis físico - químicos del lactosuero al inicio del proceso.....	27
Tabla 12. Operaciones realizadas para la obtención del lactosuero concentrado y desproteinizado.....	28
Tabla 13. Niveles de los factores de Temperatura y Concentración de Lactosa	29
Tabla 14. Combinación de tratamientos de acuerdo con las variables independientes	30
Tabla 15. Variable de respuesta a evaluar	30
Tabla 16. Características técnicas de la celda CF042SS	35
Tabla 17. Parámetros de trabajo en la unidad de Microfiltración.....	36
Tabla 18. Características técnicas del evaporador de película ascendente.....	39
Tabla 19. Características físico – químicas del suero de leche	45
Tabla 20. Resultados de las operaciones unitarias.....	46
Tabla 21. Pesos de entrada y salida del prefiltrado y el porcentaje que representa.....	48

Tabla 22. Volumen de alimentación, de permeado y de retenido de la microfiltración.....	49
Tabla 23. Volumen de alimentación, permeado, retenido de la ultrafiltración	50
Tabla 24. Resultados de porcentaje de (%) de Azúcares Reductores para cada uno de los tratamientos	51
Tabla 25. Análisis de varianza para la variable concentración de azúcares reductores	52
Tabla 26. Punto óptimo para el experimento de concentración de azúcares reductores	55
Tabla 27. Resultados de la optimización de la Concentración de Azúcares Reductores ...	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principio básico de operación de una membrana.....	9
Figura 2. Estructura de la molécula de lactosa en configuraciones α y β	13
Figura 3. Estructura química de oligosacáridos derivados de la lactosa	14
Figura 4. Mecanismo de reacción en la síntesis de GOS mediante β -galactosidasas	17
Figura 5. Reactores enzimáticos que emplean enzimas inmovilizadas	21
Figura 6. Métodos para inmovilizar enzimas	22
Figura 7. Método de atrapamiento de enzimas.....	23
Figura 8. Esquema del reactor de lecho empacado a flujo	31
Figura 9. Recepción y almacenamiento de lactosuero	34
Figura 10. Filtración previa del lactosuero	34
Figura 11. Centrifugación del lactosuero	35
Figura 12. Unidad de filtración de flujo cruzado	35
Figura 13. Colocación de la membrana plana de microfiltración	36
Figura 14. Carga de lactosuero en el tanque de alimentación	37
Figura 15. Apertura de las válvulas del sistema al finalizar el trabajo en el equipo.	37
Figura 16. Membranas de microfiltración empleadas durante la operación	37
Figura 17. Recuperación del permeado de lactosa a través del equipo de filtración tangencial	38
Figura 18. Evaporador de película ascendente	39
Figura 19. Pesaje de alginato de sodio	40
Figura 20. Licuado de alginato de sodio	40
Figura 21. Reposo de la solución de alginato de sodio	41
Figura 22. Encapsulación de la enzima β -galactosidasa	41
Figura 23. Gelificación de las perlas de alginato de sodio	42

Figura 24. Filtrado y lavado de las perlas de alginato.....	42
Figura 25. Colocación de las perlas de alginato en el reactor de lecho empacado a flujo previo a la reacción enzimática	43
Figura 26. Choque térmico de la muestra tomada del reactor	43
Figura 27. Cuantificación de azúcares reductores por espectrofotometría.....	44
Figura 28. Curva de concentración de azúcares reductores en función del tiempo	51
Figura 29. Superficie de respuesta estimada (a) y gráfico de contorno (b).....	54
Figura 30. Porcentajes de azúcares del análisis de HPLC.....	56

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación (1) Factor de retención volumétrica.....	48
Ecuación (2) Concentración de GOS.....	57

RESUMEN

En Ecuador el aprovechamiento productivo del lactosuero no se considera como mayoritario debido a la falta de elaboración de productos a través del fraccionamiento de los principales constituyentes de este subproducto del sector lácteo, tal es el caso de la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales. En busca de nuevas alternativas que permitan reutilizar el suero de leche y generar más utilidades, se decidió obtener un producto de alta gama como son los galactooligosacáridos (GOS) obtenidos a partir de lactosa, éstos son considerados prebióticos, que pueden servir como materia prima para la fabricación de una variedad de productos, siendo utilizados principalmente como ingredientes alimentarios que contribuyen al fortalecimiento del sistema inmune y bienestar del organismo, y que son producidos industrialmente en forma de jarabe transparente o polvo blanco.

Con la presente propuesta se desarrolló una tecnología a escala de laboratorio para la producción de GOS mediante inmovilización enzimática de la β -galactosidasa (Lactozym Pure 6500 L), evaluando parámetros en un reactor de lecho empacado a flujo por un tiempo de 30 h, posterior a esto a través del empleo del Programa Estadístico Design Expert, al mejor tratamiento se hizo un análisis de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) para cuantificar la cantidad de galactooligosacáridos obtenidos.

La concentración de lactosa y temperatura óptimos para la producción se observaron a 45% y 40 °C respectivamente, alcanzando 38.89% de concentración de GOS.

ABSTRACT

In Ecuador, the productive use of whey is not considered the majority due to the lack of elaboration of products through the fractionation of the main constituents of this by-product of the dairy sector, such is the case of lactose, soluble proteins, lipids and mineral salts. . In search of new alternatives that allow the reuse of whey and generate more profits, it was decided to obtain a high-end product such as galactooligosaccharides (GOS) obtained from lactose, these are considered prebiotics, which can serve as raw material for the manufacture of a variety of products, being used mainly as food ingredients that contribute to strengthening the immune system and well-being of the organism, and that are industrially produced in the form of transparent syrup or white powder.

With this proposal, a laboratory-scale technology was developed for the production of GOS by enzymatic immobilization of β -galactosidase (Lactozym Pure 6500 L), evaluating parameters in a flow-packed bed reactor for a period of 30 h. To this, through the use of the Design Expert Statistical Program, the best treatment was analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to quantify the amount of galactooligosaccharides obtained.

Optimum lactose concentration and temperature for production were observed at 45% and 40 °C, respectively, reaching 38.89% GOS concentration.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. PROBLEMA

La industria láctea en el Ecuador es una de las más importantes, y se concentra principalmente en la Sierra, región eminentemente ganadera, en donde se producen grandes volúmenes de leche.

Según el Centro de Industrias Lácteas (CIL), el Ecuador destina 1,2 millones de litros de leche por día a la producción quesera, generando 900 mil litros de suero, de los cuales únicamente el 10% se está utilizando para ser procesado y formar parte de otros productos, esto se debe a que en la mayoría de los casos las industrias lácteas y muchas queserías artesanales prefieren hacer uso del suero para la alimentación animal, como fertilizante, o es eliminado en los desagües durante la elaboración de los quesos. El suero al ser un subproducto importante también constituye un contaminante para el medio ambiente, alcanzando valores de DQO entre 60–80 kg/m³ y DBO de 30–50 kg/m³, ante lo cual debe ser tratado en plantas de tratamientos residuales según lo estipulado por la ley, aumentando de esta manera costos de producción dentro de la industria (Mendoza & González , 2018) (Pais et al., 2017).

El aprovechamiento productivo del lactosuero no se considera como mayoritario en el Ecuador debido a lo mencionado anteriormente, por la falta de elaboración de productos a través del fraccionamiento de los principales constituyentes del suero de leche (lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales), tal es el caso de los galactooligosacáridos (GOS) obtenidos a partir de lactosa, la misma que puede servir como materia prima para la fabricación de una variedad de productos. Las escasas investigaciones de este oligosacárido y la falta de técnicas para su obtención, no han permitido dar una apertura adecuada para la producción a gran escala de este prebiótico dentro del mercado ecuatoriano, en el cual su adquisición es difícil y limitada, debido a que es un producto que no se elabora en el país, sin embargo principalmente en Japón y en menor medida en Europa los GOS están siendo utilizados como ingredientes alimentarios que contribuyen al fortalecimiento del sistema inmune y bienestar del organismo, y son producidos industrialmente en forma de jarabe transparente o polvo blanco (Cardelle, 2009).

1.2. JUSTIFICACIÓN

La industria láctea es uno de los sectores más importantes de las economías de los países industrializados y en vías de desarrollo, así como del Ecuador. Aproximadamente el 85-95% de la leche total utilizada para hacer queso se elimina como suero, el cual retiene alrededor del 55% de los nutrientes totales de la leche, como lactosa, proteínas solubles, grasas y sales minerales (Parra, 2009).

El significativo valor nutricional que posee el suero ha llevado a la búsqueda constante de nuevos productos y tecnologías que faciliten los procesos, reduciendo costos de producción y proporcionando valor agregado a este subproducto con potencial comercial que con frecuencia suele ser un problema para la industria láctea. El fraccionamiento del suero para la obtención de lactosa es un claro ejemplo de estas tecnologías, que permiten el desarrollo de productos con características especiales, tal es el caso de prebióticos como los galactooligosacáridos (GOS), que se producen a partir de lactosa por reacción enzimática con la β -galactosidasa. En el Ecuador la producción de galactooligosacáridos es un sector que no se abierto campo industrialmente, mientras que en otros países como: Japón, Holanda y Corea del Sur, existe un potencial comercial en cuanto a la producción de GOS, los cuales están siendo utilizados como ingredientes en la elaboración de yogures, barras de cereales, productos horneados, sopas, salsas, alimentos para bebés, dulces, bebidas tales como zumos de frutas y bebidas para deportistas, son empleados también en la industria cosmética y farmacéutica (estimulación de bacterias saludables de la piel) y como componente de piensos funcionales para la alimentación animal (Carrera , 2010) (Rodríguez Colinas , 2013) (Illanes , Vera , & Wilson ,2016).

Con la presente propuesta se desarrolló una tecnología a escala de laboratorio para la producción de GOS mediante inmovilización enzimática de la β -galactosidasa, evaluando parámetros en un reactor de lecho empacado a flujo, en donde se utilizó como materia prima uno de los mayores subproductos de la industria láctea, como es el suero de leche.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar parámetros de operación en un reactor de lecho empacado a flujo para la obtención de galactooligosacáridos mediante enzimas inmovilizadas.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Obtener lactosuero concentrado y desproteinizado.
- ❖ Evaluar parámetros para la producción de galactooligosacáridos con enzimas inmovilizadas.

1.4. HIPÓTESIS

1.4.1. HIPÓTESIS NULA

La concentración de lactosa y la temperatura no influyen sobre la obtención de galactooligosacáridos por el método de inmovilización enzimática de la β -galactosidasa.

1.4.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA

La concentración de lactosa y la temperatura influyen sobre la obtención de galactooligosacáridos por el método de inmovilización enzimática de la β -galactosidasa.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. LACTOSUERO Y SU IMPORTANCIA COMPOSICIONAL

Jelen (2003) y Xia et al. (2005) mencionan que el lactosuero es un líquido verde translúcido que se obtiene por precipitación de la caseína en la elaboración de queso, aproximadamente por cada kilogramo de queso producido obtenemos 9 kg de lactosuero, que representa cerca del 85-90% del volumen de la leche y contiene el 55% de sus nutrientes. Entre los componentes más abundantes se destacan la lactosa y las proteínas solubles como sustancias de importante valor nutritivo, sin embargo, también se encuentran presentes otros componentes principales del lactosuero, los mismos que se encuentran detallados en la Tabla 1, junto a sus valores promedio:

Tabla 1. Componentes principales del lactosuero.

Componentes	Valores promedio
Lactosa	(45 – 50 g/ℓ)
Proteínas Solubles	(6 – 8 g/ℓ)
Lípidos	(4 – 5 g/ℓ)
Sales Minerales	(4 – 6 g/ℓ)
Agua	(93 – 95%)

Fuente: Tomado de (Muset & Castells, 2017), adaptado por el autor.

La proteína y lactosa, al ser los componentes principales y de mayor importancia nutricional del lactosuero son aprovechados en diferentes áreas dentro de la industria, tal es el caso de las proteínas cuyas propiedades químicas, físicas y funcionales son adecuadas para su uso en los campos alimentario, médico y farmacéutico, por ejemplo, como ingredientes funcionales en los alimentos, en la alimentación de infantes, tercera edad, productos para deportistas y en la fabricación de bebidas fermentadas y no fermentadas, barras de cereales, embutidos, sopas y salsas. Se pueden diferenciar varios tipos de proteínas, en donde la β -lactoglobulina es el componente principal con aproximadamente un 50% y la α -lactoalbúmina con un 20% de las proteínas solubles del suero, también están presentes inmunoglobulinas, seroalbúmina bovina y en menor cantidad la lactoferrina, lactoperoxidasa, y los glicomacropéptidos (Muset & Castells, 2017).

La lactosa es otro componente representativo del lactosuero, que juega un papel importante dentro de la presente investigación, debido a sus propiedades de hidrosolubilidad, reducida higroscopicidad, capacidad edulcorante y su aporte nutritivo, es muy utilizada como excipiente farmacéutico, en fórmulas infantiles para aumentar el contenido en lactosa; en la industria alimentaria, sirve como soporte de salsas, sopas y chocolates, mientras que en la industria química permite la producción de espumas de poliuretano. La valorización de la lactosa puede darse a través de varios medios, extracción, hidrólisis, y utilización de esta como sustrato para la fermentación microbiana, en estos casos es recomendable una desproteinización previa del suero (Ramírez J. , 2015).

De acuerdo a lo expuesto, el lactosuero es considerado una fuente de interés por sus nutrientes y también es el mayor subproducto de la industria quesera, ante lo cual existe una necesidad constante de búsqueda tecnológica y métodos eficientes, como el fraccionamiento, que permitan aprovechar cada uno de sus componentes.

2.1.1. CLASIFICACIÓN DEL LACTOSUERO

Según Parra (2009) la composición y tipo de lactosuero varía significativamente dependiendo del tipo de leche, tipo de queso fabricado y el proceso de tecnología empleado. Si se emplean enzimas en la coagulación de la leche el suero se denomina dulce, y si las enzimas se reemplazan con ácidos orgánicos se denomina ácido.

Existen dos tipos de lactosuero dependiendo principalmente de la eliminación de la caseína:

- ❖ El lactosuero dulce es aquel que tiene un pH entre 5.8 y 6.6 aproximadamente, se obtiene como subproducto de quesos frescos, semiduros y duros, en donde el insumo principal para su elaboración es el cuajo. Considerado un líquido sobrante de la precipitación de las proteínas de la κ -caseína por coagulación enzimática. Ejemplos: queso fresco de mesa, cuajadas, quesos tipo holandés (Ramírez J. , 2012) (Muset & Castells, 2017) (Garavito & Méndez, 2021).

- ❖ El lactosuero ácido presenta un promedio de pH de 4.5, proviene de quesos frescos de pasta hilada principalmente, como resultado del proceso de fermentación o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína o alcanzar el pH de hilado. Ejemplos de quesos: mozzarella, doble crema. ricotta, provolone, cottage, crema (Jelen, 2003) (Bon Rosas , 2005).

De acuerdo con Parra (2009), en la composición del lactosuero dulce se observa una ligera diferencia en cuanto al mayor contenido de lactosa y proteína que posee este con respecto al lactosuero ácido. A continuación, se presenta en la Tabla 2 el detalle de la composición nutricional del lactosuero dulce y ácido:

Tabla 2. Composición del lactosuero dulce y ácido.

Componentes	Lactosuero dulce (g/ℓ)	Lactosuero ácido (g/ℓ)
Sólidos Totales	63.0 – 70.0	63.0 – 70.0
Lactosa	46.0 – 52.0	44.0 – 46.0
Proteína	6.0 – 10.0	6.0 – 8.0
Calcio	0.4 – 0.6	1.2 – 1.6
Fosfatos	1.0 – 3.0	2.0 – 4.5
Lactato	2.0	6.4
Cloruros	1.1	1.1

Fuente: (Panesar et al., 2007)

Parzanese (2008) también menciona que entre estos dos tipos de suero, el suero dulce tiene una mejor capacidad de procesamiento y produce más subproductos de valor agregado debido a que este contiene aproximadamente 95% de lactosa, 25% de proteínas y 8% de grasa láctea, es por esta razón que desde hace mucho tiempo se lo emplea para diferentes fines a través de su reutilización y fraccionamiento.

2.1.2. APLICACIONES DEL LACTOSUERO EN LA INDUSTRIA

La búsqueda constante para aportar con nuevos productos que contribuyan al mercado y que provengan de subproductos de la industria alimentaria, como de la láctea, permite que surjan una gran variedad de alternativas para el uso del lactosuero, facilitando su aprovechamiento en varios campos. En la Tabla 3 podemos encontrar las principales aplicaciones y productos provenientes del lactosuero:

Tabla 3. Aplicaciones o aprovechamiento del lactosuero.

Aplicación	Beneficios
- Productos de panadería como croissants, tortas.	Incrementa el valor nutricional, actúa como emulsificante, reemplaza la adición del huevo dándole cuerpo a la masa.
- Productos lácteos como bebidas fermentadas y quesos.	Valor nutricional, emulsificante, gelificante, mejores propiedades organolépticas, mejor consistencia, cohesividad.
- Bebidas como jugos de frutas, refrescos, bebidas	Valor nutricional, solubilidad, viscosidad, estabilidad coloidal.

achocolatadas, bebidas a base de leche.	
- Postres como barras de yogurt, helados	Propiedades emulsificantes, dar cuerpo y textura a los productos.
- Confitería	Como emulsificante y facilitar el batido.
- Productos cárnicos	Pre-emulsificante, gelificante, mejor solubilidad.
- Alimentos nutricionales	Alimentos de mayor valor nutricional y bajo costo, alimentos para deportistas, fórmulas nutricionales especiales para mantener peso saludable, fórmulas infantiles.
- Concentrados de proteína	Productos alimenticios especiales, suplementos nutricionales, productos de panadería y confitería. Contiene aproximadamente 25-89% de proteína, 4-52% de lactosa y 1-9% de grasa.
- Obtener aislados de proteína	Para suplementos de proteína, bebidas y productos altos en proteínas. Contiene 90-95% de proteína, 0.5-1% de lactosa y 0.5-1% de grasa.
- Obtener hidrolizados de proteína	Para fórmulas infantiles, productos para deportistas, productos nutricionales especiales. Contiene aproximadamente 80-90% de proteína, 0.5-1% de lactosa y 0.5-0.8% grasa.
- Purificación de proteínas aisladas	α -lactoalbúminas, β -lactoglobulinas, inmunoglobulinas, glicoproteína como lactoferrina y lactoperoxidasa.
- Fuente de compuestos bioactivos	Péptidos y proteínas con potencial antihipertensivo, actividad antimicrobial, antioxidante.
- Fuente de lactosa	Compuesto transportador en productos farmacéuticos, componentes de fórmulas infantiles, materia prima para la producción de derivados de lactosa: lactulosa, GOS, latitol, glucosa. Para bioconversión de lactosa: alcohol, ácido láctico, biocombustible.
- Fuente para extraer minerales	Calcio, fosforo.

Fuente: De Wit (1998, citado en Poveda , 2013)

2.1.3. TECNOLOGÍAS PARA EL APROVECHAMIENTO DE LACTOSA PROVENIENTE DE LACTOSUERO

En los antecedentes se verifica el potencial del lactosuero para su uso, y en la actualidad existen diversas tecnologías y procesos que facilitan su aprovechamiento. En la Tabla 4 se muestra las principales operaciones unitarias que intervienen en el proceso de fragmentación y obtención de componentes de interés del lactosuero, como la lactosa:

Tabla 4. Principales Operaciones Unitarias llevadas a cabo para obtener lactosa concentrada.

Operaciones Unitarias	Compuesto Eliminado
Prefiltración	Impurezas
Centrifugación	Grasa
Microfiltración (MF)	Caseína y grasa residual
Ultrafiltración (UF)	Retenido proteico
Concentración	Agua

2.1.3.1. Prefiltración y Centrifugación como pretratamientos del lactosuero.

Los pretratamientos permiten obtener mejoras en cuanto a los flujos de permeado para el proceso posterior mediante la tecnología de membranas, debido a que facilitan la remoción de macropartículas, grasa, caseína y microorganismos presentes en el lactosuero, reduciendo de esta manera el colmataje en las membranas empleadas.

- ❖ **Prefiltración:** permite retener partículas de queso, restos de grasa en suspensión e impurezas, como pelusas o pelos que pudiesen estar presentes en el lactosuero, para lo cual se emplean telas finas como lino, lienzo, mallas, las mismas que poseen un diámetro de 0.1 mm de poro (Camacho, 2009).
- ❖ **Centrifugación:** Muñi et al. (2005) hacen referencia a que la centrifugación constituye un importante pretratamiento del lactosuero, en el cual se emplea una centrífuga de discos, en donde para mejorar la eficiencia del descremado, el lactosuero debe ingresar a una temperatura de 35 a 40 °C, logrando de esta manera la separación de las minúsculas gotas de grasa presentes en la materia prima, las cuales en su mayoría tienen diámetros aproximados de 2 a 10 μm .

2.1.3.2. Tecnología de Membranas para la recuperación de compuestos de interés del lactosuero.

El lactosuero contiene componentes valiosos de importancia comercial cuando se separa, ante lo cual su fraccionamiento es esencial para explotar todo su potencial. Aproximadamente el 90% del lactosuero en base al peso seco está representado por la lactosa y las proteínas, que pueden ser recuperadas a través del uso de membranas, la cual actualmente es una tecnología que permite la separación de los diferentes componentes del lactosuero (Pouliot, 2008) (Atra, Vatai, Bekassy - Molnar, & Balint, 2005).

En la Figura 1 se muestra el comportamiento de una membrana como barrera de separación selectiva, por medio de la cual atraviesan ciertos componentes (permeado), bajo la acción de la presión y el tamaño molecular menor al de las porosidades de la membrana, mientras que otros componentes no permeables no pasarán a través de esta (retenido) (Camacho, 2009).

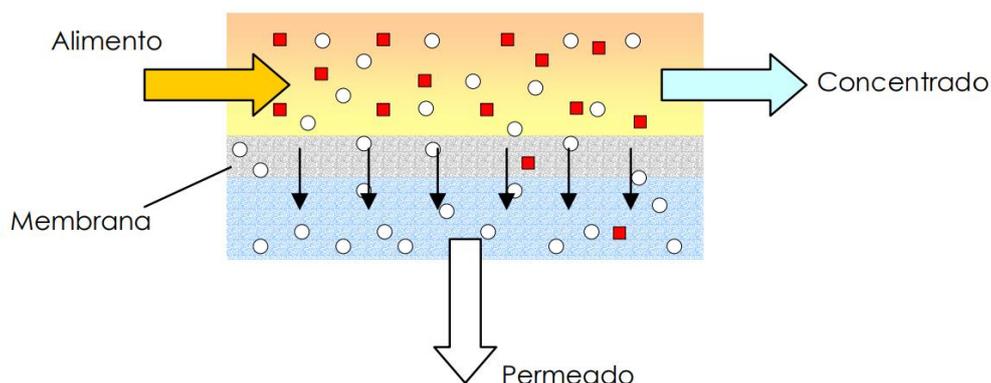


Figura 1. Principio básico de operación de una membrana.

Fuente: (Cuartas, 2005)

Diferentes estudios se han concentrado en el empleo de membranas para lograr separar componentes de interés, como son la lactosa y las proteínas, estableciendo parámetros de operación que mejoren la obtención de los mismos, en cuanto al desempeño de las membranas (UF y NF) se puede caracterizar en términos de flujo de permeado, retención de la membrana, y rendimiento, dichos parámetros serán determinados por el diámetro de poro de la membrana, temperatura, presión y el caudal de reciclado (Atra et al., 2005).

En algunos países la utilización de tecnología de membranas aplicada en los procesos de concentración y fraccionamiento del lactosuero, ha permitido obtener concentrados con un contenido proteico del 30% al 80%, los mismos que están siendo aprovechados para el

enriquecimiento de alimentos, tales como bebidas, pan y sopas, favoreciendo de esta manera a aliviar las carencias proteicas provocadas por el crecimiento poblacional desmedido. Al mismo tiempo, se ha logrado mejorar el uso de la lactosa como sustrato en procesos de fermentación, y en la concentración y cristalización de la misma para su uso en la industria farmacéutica (Faría , García , & García, 2003)

2.1.3.2.1. Ventajas y Desventajas de la Tecnología de Membranas

Dentro de la industria láctea el empleo de membranas es una tecnología muy difundida a nivel mundial, por lo tanto, es necesario conocer las ventajas y desventajas de la misma, que se presentan en la Tabla 5:

Tabla 5. Ventajas y Desventajas de la Tecnología de Membranas.

Ventajas	Desventajas
Se recuperan compuestos del suero con gran valor nutricional y funcional.	Problemas de mantenimiento como fugas o contaminaciones.
Se reduce la emisión de residuos que atentan contra el medio ambiente.	Ensuciamiento por la acumulación de sustancias en la superficie y dentro de los poros.
La separación se realiza de forma continua.	Disminución del flujo por taponamiento de poros.
Los procesos son fácilmente combinables con otros procesos de separación, el escalado de los procesos es sencillo.	En matrices complejas necesita de un pretratamiento.
No altera térmicamente los componentes del producto y no es preciso añadir aditivos.	Los reemplazos de membranas se realizan con personal especializado.
No hay modificación de la naturaleza de los productos tratados.	

Fuente: De Chacón (2006, citado en Hermosa , 2021)

En base a la anterior tabla se puede definir que la separación por membranas ofrece varias ventajas en términos de consumo de energía, operación a baja temperatura, sin requisitos de aditivos y fácil integración con operaciones posteriores. Una limitación importante en estos procesos es el manejo en cuanto a la concentración de sólidos, debido a que, trabajar a altas concentraciones es un inconveniente por la obstrucción o ensuciamiento de las membranas y el efecto de polarización de la concentración (Pinelo , Jonsson, & Meyer, 2009) (Vegas et al., 2008).

La mayoría de las operaciones con membranas presentan una disminución del flujo a lo largo del tiempo relacionado al ensuciamiento, inclusive una reducción de hasta un 80% del

rendimiento inicial puede tardar minutos o meses, por esto se considera importante la aplicación de pretratamientos y una limpieza adecuada de las membranas empleadas, tal es el caso que para la limpieza de membranas con residuos orgánicos y biológicos (proteínas, lípidos, biopolímeros, almidón), el agente más utilizado es el Na(OH) (sosa cáustica), el cual por lo general se prepara en solución acuosa al 0.1 N, y remueve fácilmente los residuos antes mencionados debido a que es compatible con la mayoría de los materiales de las membranas (Riquelme, 2010).

2.1.3.2.2. Clasificación de las Tecnologías de Membranas

Existen diferentes tecnologías de membranas descritas en la Tabla 6, las cuales permiten la separación de los componentes del suero para su aprovechamiento posterior, entre la más destacada se encuentra la Ultrafiltración (UF), ampliamente usada debido a su eficiencia y relativo bajo costo.

Tabla 6. Clasificación de las Tecnologías de Membranas.

Tecnología	Concentrado	Permeado
Microfiltración (MF)	Lípidos, bacterias, proteínas de peso molecular alto.	Agua, minerales, lactosa, proteínas pequeñas.
Ultrafiltración (UF)	Proteínas y lípidos.	Lactosa, sales minerales, agua.
Nanofiltración (NF)	Pequeñas moléculas, sales divalentes, ácidas disociadas, agua.	Agua, iones monovalentes.
Ósmosis Inversa (OI)	Todos los solutos	Agua

Fuente: Tomado de (Torres J. , 2001) (Parzanese, 2008), adaptado por el autor.

2.1.3.3. Fraccionamiento y Concentración del lactosuero

❖ Microfiltración

La Microfiltración (MF) es empleada en la separación de partículas que poseen un tamaño comprendido entre 0.05 y 10 μm , en la cual se trabaja con presiones de operación que van de 0.5 a 3 bar. Por lo general su uso se enfoca en la retención de sólidos en suspensión, siendo empleada en la etapa de limpieza, concentración o como pretratamiento. La MF en algunos casos facilita la eliminación completa de bacterias y esporas (tamaño: ~ 0.4 a $2 \mu\text{m}$) de la leche y los diferentes derivados lácteos, permitiendo extender su vida útil y convirtiéndose en una alternativa a la ultrapasteurización (Ibáñez, 2007) (Saboya & Maubois, 2000) (Griep, Cheng, & Moraru, 2016).

La MF contribuye a obtener productos de calidad al ser aplicada en la producción de derivados lácteos, debido a que permite la eliminación de bacterias, esporas y grasa en la obtención de WPC (Concentrado de proteína del suero), WPI (Aislado de proteína del suero) y también reduce partículas no requeridas en el permeado de lactosa, contribuyendo para la utilización de la misma en procesos posteriores (Lipnizki, 2010).

❖ Ultrafiltración

La Ultrafiltración (UF) es un proceso de separación por membranas comúnmente utilizado para retener macromoléculas de peso molecular entre 1 y 200 kDa. Su principal aplicación es como etapa de concentración o purificación en la industria láctea (leche, suero, producción de queso, obtención de concentrados proteicos). Las membranas empleadas en la UF tienen un tamaño de poro que oscila entre 0.001 y 0.1 μm las cuales facilitan la retención de proteínas y la permeación selectiva de lactosa, minerales, agua y compuestos de baja masa molar. Dentro de otros campos la UF también se usa en la industria metalúrgica, en la industria textil y en la potabilización de aguas, así como en el tratamiento de aguas residuales (Brans, 2006) (Ibáñez, 2007).

❖ Concentración

Illanes (2016) menciona que, la producción de lactosa a partir de suero permeado considera la concentración, como una operación unitaria que generalmente se realiza mediante evaporación de efectos múltiples; en algunos casos, el permeado está preconcentrado por ósmosis inversa, y la preconcentración junto con la desmineralización parcial se puede realizar mediante nanofiltración.

La evaporación se basa en la energía térmica, en la cual una solución se concentra debido a la separación de sus componentes entre los estados gas - líquido, en los alimentos líquidos como el lactosuero la fase volátil es principalmente el agua, la cual es removida en base a la diferencia entre las presiones de vapor de los componentes del fluido. Esta técnica es muy utilizada industrialmente, debido a que logra mejorar las concentraciones de los componentes de interés sin embargo, se requiere de mayor energía (Monceaux & Kuehner, 2009) (Hunter & Hayslet, 2002).

2.1.3.4. Diagrama del proceso productivo para la obtención de lactosa concentrada

En el Diagrama 1, se esquematiza el proceso de transformación del lactosuero dulce hasta la obtención de lactosa concentrada:

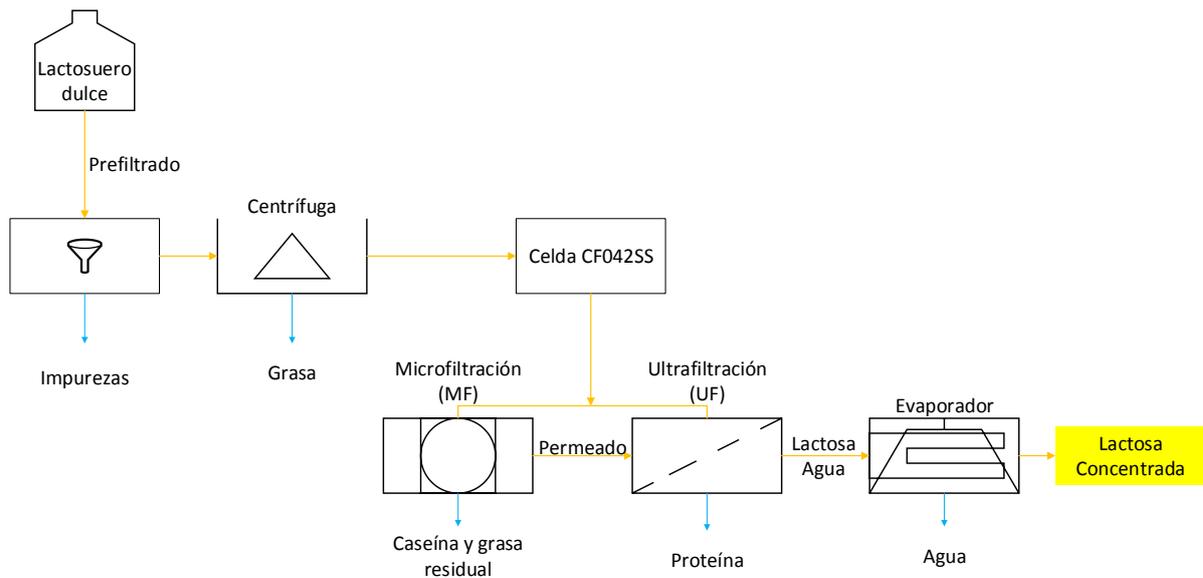


Diagrama 1. Proceso de obtención de lactosa concentrada.

2.2. LACTOSA Y SU APROVECHAMIENTO DENTRO DE LA INDUSTRIA

La lactosa (4-O-β-galactopiranosil-D-glucopiranososa, $C_{12}H_{22}O_{11}$) es un disacárido que comprende una molécula de glucosa ligada a una molécula de galactosa por un enlace β (1-4). La lactosa en soluciones acuosas está presente en las formas α y β (Figura 2) (Gänzle, Haase, & Jelen, 2008).

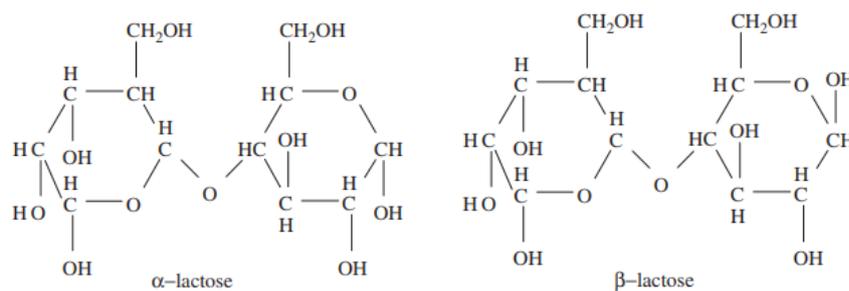


Figura 2. Estructura de la molécula de lactosa en configuraciones α y β.

Fuente: (Gänzle, Haase, & Jelen, 2008)

Es uno de los compuestos más representativos del lactosuero, con un contenido del 4.5%, es considerablemente menos dulce que la sacarosa o la glucosa debido a que tiene un poder edulcorante del 20% y 30% de la sacarosa respectivamente, por lo que su contribución a la dulzura es irrelevante. Adicionalmente cabe destacar que, en términos prácticos, la lactosa

es un azúcar que tiene baja solubilidad en el agua (alrededor de 180 g/l a temperatura ambiente) por lo que tenderá a precipitar a concentraciones más altas y a temperaturas bajas, de forma que afecta las propiedades organolépticas y funcionales de los productos que la contienen como, por ejemplo, en los helados. Ante lo mencionado, se proponen técnicas que permitan un mejor aprovechamiento de los componentes de este disacárido, explotando completamente su potencial para su uso posterior en nuevos productos, tal es el caso de los galactooligosacáridos (GOS) producidos a partir de lactosa (Livney, Donhowe, & Hartel, 1995) (Schaafsma, 2008).

En el comercio existen cuatro grados principales de lactosa (fermentativa, cruda, comestible y farmacológica) que son utilizados para diferentes actividades industriales. En particular, la lactosa se usa ampliamente como un relleno o aglutinante en la fabricación de tabletas y cápsulas farmacéuticas, desde otro punto de vista es un compuesto de interés cuando se transforma de su forma nativa a otros productos de valor agregado como se observa en la Figura 3, en donde se puede visualizar los siguientes compuestos: lactulosa, GOS, lactosucrosa, lactitol, ácido lactobiónico, tagatosa, epilactosa y fructosil-GOS (Gómez & Sánchez , 2018).

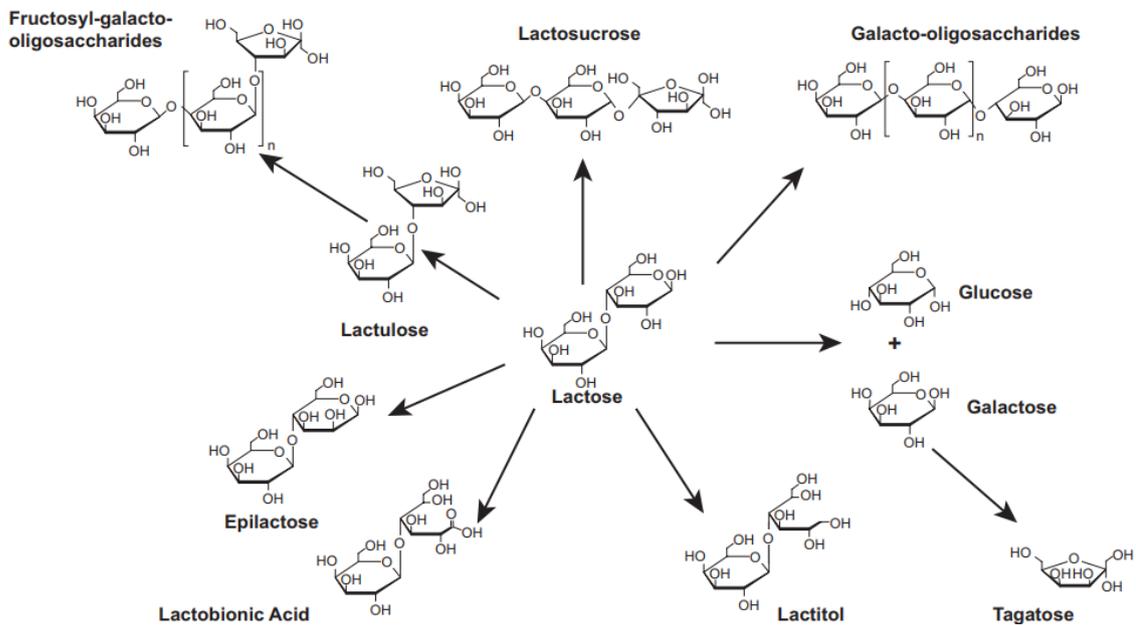


Figura 3. Estructura química de oligosacáridos derivados de la lactosa.

Fuente: (Gómez & Sánchez, 2018)

A nivel mundial las investigaciones sobre el aprovechamiento de la lactosa se orientan a estudiar y mejorar la hidrólisis de este compuesto para ser aplicado al procesamiento de

productos y subproductos lácteos. Por ejemplo, en los campos de los productos lácteos líquidos, a fin de mejorar la hidrólisis de la lactosa; en el control de la cristalización de la lactosa en productos lácteos concentrados; en la aplicación del lactosuero y su permeado en el campo alimentario y no alimentario ; en la producción de oligosacáridos y exopolisacáridos; en la mejora de la producción de cultivos celulares, y en el desarrollo de nuevos sabores y productos desde la hidrólisis de la lactosa (quesos, bebidas, jarabes, compuestos químicos, etc.) (Gómez & Sánchez , 2018) (Gänzle, Haase, & Jelen, 2008).

2.3. GALACTOOLIGOSACÁRIDOS (GOS) Y SUS PROPIEDADES

Los GOS son oligosacáridos no digeribles, los cuales alcanzan el colon y estimulan el crecimiento o la actividad de las bacterias benéficas del sistema digestivo, su indigestibilidad se debe a que estos compuestos tienen configuración β y las enzimas digestivas gastrointestinales humanas son mayoritariamente específicas de enlaces α -glicosídicos (Sako, Matsumoto, & Tanaka , 1999).

Entre los principales beneficios de los GOS resaltan su efecto prebiótico, siendo utilizados como aditivos en las leches infantiles por imitar a los oligosacáridos de la leche materna (HMOs) en la modulación de la microbiota intestinal, en la prevención de la adhesión de patógenos y en la estimulación del sistema inmune. No obstante, su diversidad y complejidad es menor en comparación con los HMOs (Chen & Gänzle, 2016; Vera & Illanes , 2016).

Su efecto prebiótico dependerá de la longitud de la cadena que presenten, observándose mejores efectos en tri- (GOS-3) y tetra-sacáridos (GOS-4), los cuales normalmente representan más del 90% de los oligosacáridos sintetizados (Illanes & Guerrero , 2016).

Adicional a esto los GOS presentan excelentes propiedades para su incorporación en diferentes matrices alimenticias ya que son: estables a temperatura ambiente y durante largos períodos de almacenamiento, solubles en agua, estables a pH ácido y frente al calor, etc. Estas y más propiedades generales de los galactooligosacáridos, se detallan en la Tabla 7. Tomando a consideración sus propiedades, los GOS son utilizados como ingredientes en una amplia variedad de productos alimenticios, especialmente yogures, barras de cereales, productos horneados, sopas, salsas, alimentos para bebés, dulces y bebidas tales como zumos de frutas y bebidas para deportistas (Rodríguez Colinas , 2013).

Dentro del campo de utilización de los GOS, también está presente, la elaboración de piensos funcionales para la alimentación animal, que de a poco se va expandiendo dentro del mercado, esta alimentación estaría dirigida tanto para animales de granja y mascotas como en acuicultura, sin embargo aún no se tiene claro si los GOS serán competitivos en todos los mercados de alimentación animal. Adicionalmente, cabe destacar que los GOS han sido propuestos en cosméticos y medicamentos como ingredientes, en base a la estimulación de las bacterias saludables de la piel (Illanes , Vera , & Wilson ,2016).

La importancia de los GOS dentro de otro ámbito, se ve enmarcado en la producción de beneficios económicos y ambientales, debido a que permite la utilización de uno de los mayores residuos contaminantes dentro de la industria láctea como es el lactosuero, el mismo que tiene un potencial amplio debido a la cantidad de nutrientes que presenta y que contribuyen en los diferentes campos industriales.

Tabla 7. Propiedades Generales de los GOS.

Propiedades físico – químicas	
Solubilidad en agua	80% (p/p)
Dulzor	30 – 60% sacarosa
Apariencia	Translúcidos
Viscosidad	Similar al jarabe de maíz con alto contenido en fructosa
Estabilidad	Estable a 160 °C / 10 min / pH 7; estable a 100 °C / 10 min / pH 2; estable a 37 °C / meses / pH 2
Punto de congelación	Se ve reducido en alimentos
Propiedad humectante	Aumenta capacidad de retención de humedad para prevenir excesiva sequedad
Actividad de agua	Baja actividad de agua reduciendo contaminación microbiana
Cariogeneidad	Bajo potencial para su desarrollo
Propiedades fisiológicas	
Digestibilidad	No digestibles, pero fermentables, estimándose el valor calórico entre 1 – 2 kcal/g
Propiedades prebióticas	Actividad metabólica y proliferación de bacterias bifidogénicas

Fuente: (Rodríguez Colinas , 2013)

2.3.1. FORMACIÓN DE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS

Los GOS son compuestos obtenidos industrialmente a partir de lactosa mediante transgalactosilación catalizada por β -galactosidasas; aunque, también se encuentran

presentes de forma natural en la leche y en alimentos comunes como frutas, vegetales y miel (Rastall, 2010).

Rodríguez (2015) menciona que, la β -galactosidasa cataliza la transferencia de una unidad de galactosa presente en un β -galactósido como la lactosa, a un aceptor que contiene un grupo hidroxilo. Esto se da a través de un mecanismo general de reacción (Figura 4) propuesto en tres pasos: En el primer paso se forma el complejo enzima-galactosa y la liberación simultánea de la glucosa. Posteriormente, el complejo enzima-galactosa sufre un ataque nucleofílico transfiriéndose a otro aceptor con un grupo hidróxilo. Cuando la transferencia se realiza al agua produce galactosa y si la transferencia es a otro carbohidrato como la lactosa, se producen di- tri- y/o GOS de mayor grado de oligomerización.

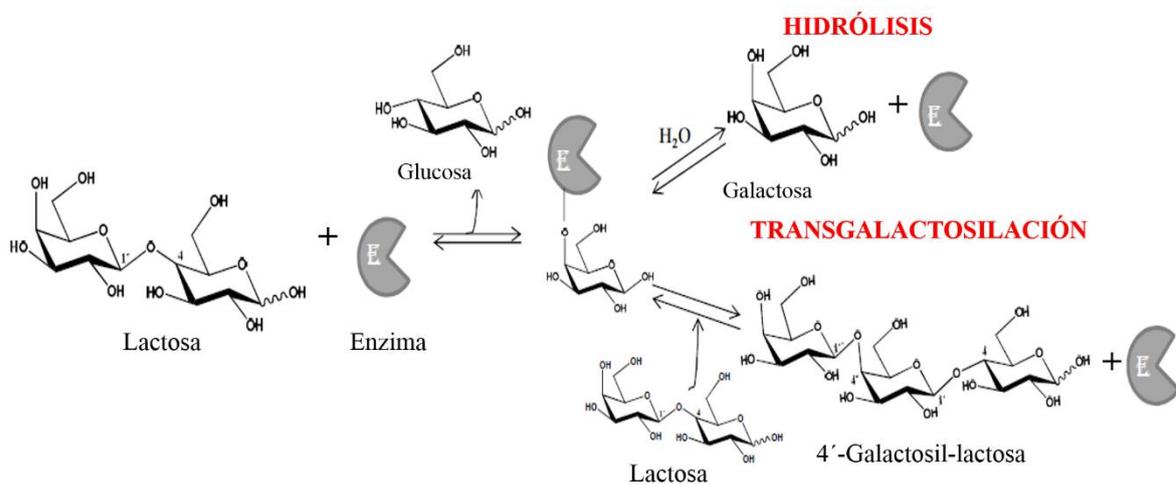


Figura 4. Mecanismo de reacción en la síntesis de GOS mediante β -galactosidasas.

Fuente: (Rodríguez Colinas , 2013)

Adicionalmente Rodríguez (2015) manifiesta que la formación de GOS viene determinada por un balance entre ambas reacciones: hidrólisis y transgalactosilación. En el caso de soluciones con baja concentración de lactosa se favorecerá la hidrólisis con la consecuente formación de galactosa, y a concentraciones elevadas de sustrato, la molécula de lactosa actúa de nuevo como aceptor formándose así una serie de GOS con diferente grado de polimerización.

La composición de la mezcla de GOS resultante dependerá de la fuente de la enzima empleada, concentración y naturaleza del sustrato y de las condiciones de reacción (pH, temperatura y tiempo), mientras que sus propiedades dependerán de su estructura,

composición química y del grado de polimerización (Corzo, Montilla , Cardelle, & Olano, 2009).

2.3.2. PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE GOS

La síntesis de GOS a una escala productiva industrial se lleva a cabo utilizando lactosa refinada o permeado de suero concentrado como sustrato y enzimas libres en disolución como catalizador. El uso mayoritario de enzimas libres se debe principalmente a que las β -galactosidasas presentan un costo menos significativo que otros aspectos del proceso. La producción de GOS con enzimas solubles presenta, sin embargo, importantes desventajas. Por un lado, en la mayoría de los casos se opera de forma discontinua, por lotes (*batch-mode*), lo que implica una eficiencia muy baja en el uso del catalizador, puesto que la enzima se utiliza solo una vez durante un corto período de tiempo y después es desechada. Por otro lado, la operación que supone la inactivación y extracción del catalizador utilizado del medio de reacción presenta serias dificultades cuando ha de realizarse a gran escala, y más aún si el medio presenta alta viscosidad (González , 2017).

González (2017) también menciona que los biocatalizadores más citados para la producción de GOS son las β -galactosidasas de *A. oryzae*, *K. lactis* y *B. circulans*, presentando todas ellas condición de GRAS.

Las principales empresas productoras de GOS, se observan en la Tabla 8, en donde se identifica la marca del producto que comercializan. Cabe destacar que, dentro del mercado, las preparaciones de GOS se presentan en forma de jarabes concentrados (70–75 °Bx) y en forma de polvo.

Tabla 8. Principales productores industriales de galactooligosacáridos.

Marca	Empresa productora	Organismo productor de la β -galactosidasa
Oligomate	Yakult Pharm Ind Co. (Japón)	<i>Sporobolomyces singularis</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
Vivinal GOS	Friesland foods Domo (Holanda)	<i>Bacillus circulans</i>
Cup-Oligo	Nissin Sugar Mfg. Co. (Japón)	<i>Cryptococcus laurentii</i>
BiMuno	Clasado Ltd. (Malta)	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
Bioligo GL 5700 IMF	Ingredion Incorporated (Corea del Sur)	<i>B. circulans</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>

Fuente: (Illanes , Vera , & Wilson, 2016)

2.3.3. ENZIMAS B-GALACTOSIDASAS EMPLEADAS PARA LA OBTENCIÓN DE GOS

El origen de la enzima β -galactosidasa (lactasa) puede ser muy variado utilizándose microorganismos, plantas y animales, presentando diferentes propiedades. La utilización de microorganismos presenta ventajas en cuanto a manipulación, bajo costo, altos rendimientos en la síntesis, etc. La β -galactosidasa más estudiada ha sido la de *Escherichia coli*; sin embargo, considerando que las aplicaciones van destinadas a alimentos, es lógico utilizar enzimas GRAS (generally recognized as safe) tales como las que proceden de *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Kluyveromyces lactis* y *K. fragilis* existiendo diferentes preparados de β -galactosidasas comerciales (Corzo, Montilla, Cardelle, & Olano, 2009).

Al trabajar con diferentes tipos de suero hay que considerar las enzimas a ser empleadas, tal es el caso de que, para el tratamiento de suero ácido se utilizan enzimas obtenidas de hongos, mientras que las cepas de *Kluyveromyces* son más convenientes para trabajar con suero neutro (Mahoney & Adamchuk, 1980).

Bohórquez (2016) también manifiesta que, el origen de la enzima β -galactosidasa permitirá que ella produzca diferentes tamaños o tipos de GOS; la enzima de *B. circulans* producirá GOS-2 y GOS-3 y en menor cantidad GOS-4 y GOS-5; la *Kluyveromyces spp.* Mayor GOS-2 y algunos GOS-3, mientras que la enzima *A. oryzae* mayor cantidad de GOS-3 y una pequeña cantidad de GOS-4, siendo esta última muy utilizada en alimentos y de bajo costo.

A nivel mundial, la producción de GOS va creciendo día a día, ante lo cual existen diferentes proveedores de este oligosacárido, el cual puede obtenerse a través de bacterias, levaduras y hongos, como se muestra en la Tabla 9:

Tabla 9. Algunas de las preparaciones enzimáticas de β -galactosidasas disponibles comercialmente.

Origen	Nombre Comercial	Proveedor
Bacterias		
<i>Bacillus sp.</i>	Novozym 231	Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark
<i>Escherichia coli.</i>	β -galactosidase	Sigma-Aldrich,UK
Levaduras		
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactase β -galactosidase	DSM Food Specialities, Delft, The Netherlands
<i>Saccharomyces fragilis</i>	β -galactosidase	SNAM Progetti, Italy

<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lactozyme	Sigma-Aldrich,UK
<i>Kluyveromyces sp.</i>	Lactase NL	Sigma-Aldrich,UK
<i>Candida pseudotropicalis</i>	Neutral Maxilact	Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark
	Lactase	Enzyme Development Corporation, NY, USA
		Pfizer, Milwaukee, USA
Hongos	Sumylact	Sumitomo Chemical, Japan
<i>Aspergillus niger</i>	Lactase	Valio Laboratory, Finland
<i>Aspergillus oryzae</i>	Fungal lactase	Enzyme Development corporation, NY, USA
	Biolactase	Biocon (US) Inc., Lexington, USA
	Lactase 2214C	Rohm, Darmstadt, Germany
	β –galactosidase	Sigma-Aldrich, UK

Fuente: (Panesar , Panesar , Singh, Kennedy, & Kumar , 2006)

Cabe destacar que, para la utilización de la enzima, cualquiera que sea su origen, siempre es necesario el conocimiento previo en cuanto a la estabilidad en el medio de trabajo y su actividad, debido a que estos parámetros pueden modificarse en cuanto a la temperatura, pH, y agregado de ciertos cationes en determinadas concentraciones.

2.4. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA PARA MEJORAR PROCESOS PRODUCTIVOS

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente (Arroyo , 1998).

Arroyo (1998), manifiesta que entre las ventajas y desventajas de las enzimas inmovilizadas se encuentran las siguientes:

❖ **Ventajas**

1. El aumento de la estabilidad de la enzima.
2. La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costes del proceso.
3. La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada.

❖ **Desventajas:**

1. La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
2. La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.

3. Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la movilización.
4. El biocatalizador es más caro que la enzima nativa.

El uso de equipos idóneos que permitan la facilidad de obtención del producto de interés es muy importante, ante lo cual en la Figura 5, podemos encontrar una clasificación de reactores enzimáticos que emplean enzimas inmovilizadas.

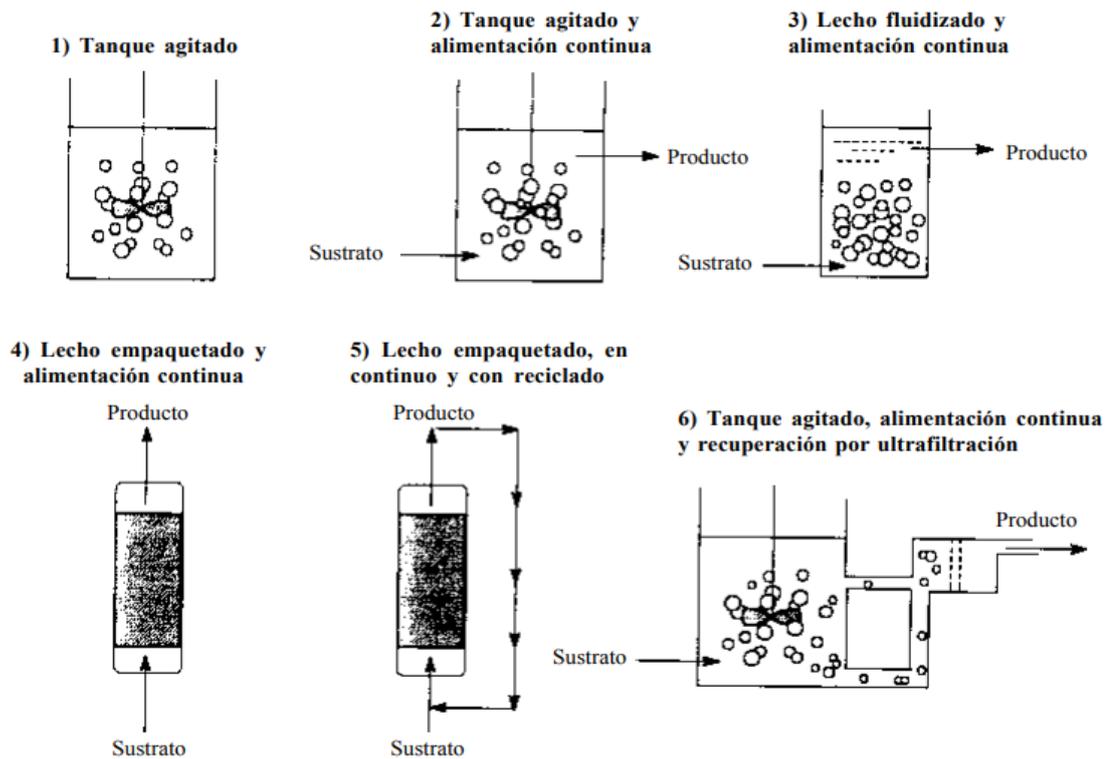


Figura 5. Reactores enzimáticos que emplean enzimas inmovilizadas.

Fuente: (Arroyo , 1998)

Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza, cabe destacar que la formación de productos en modo de flujo continuo es significativamente útil para una alta eficiencia de producción en comparación con el proceso de modo por lotes (Arroyo , 1998).

La mayoría de los estudios utilizan β -galactosidasa en estado libre para la conversión enzimática de lactosa en GOS. Sin embargo, el uso de enzimas en un estado libre tiene varias limitaciones; por ejemplo, altos gastos, baja estabilidad operacional y desafíos en la recuperación y reutilización. La inmovilización de enzimas en soportes adecuados puede superar algunos de los inconvenientes relacionados con el uso de enzimas de estado libre en reactores convencionales por lotes. La inmovilización de enzimas proporciona varias

ventajas, que incluyen una mayor estabilidad de la enzima y la formación del producto en modo de flujo continuo, costos de procesamiento reducidos, calidad y pureza del producto mejoradas y la eliminación de la separación de la enzima de la mezcla de reacción (Eskandarloo & Abbaspourrad, 2018).

A continuación, en la Figura 6 se presentan los diferentes métodos para inmovilizar enzimas:

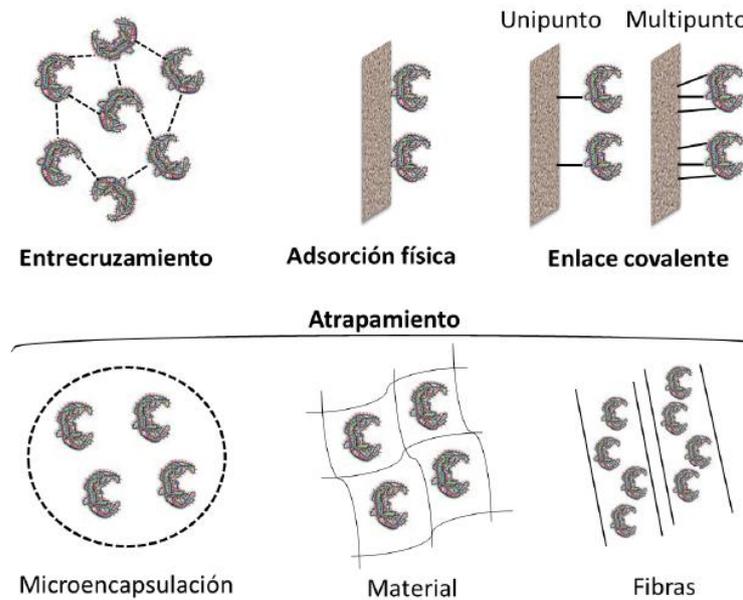


Figura 6. Métodos para inmovilizar enzimas.

Fuente: (González , 2017)

2.4.1. MÉTODO DE ATRAPAMIENTO

El atrapamiento es un método irreversible de inmovilización enzimática donde las enzimas son atrapadas en un soporte o en el interior de fibras, ya sea en el entramado de un material o en membranas poliméricas (incluyendo la microencapsulación), lo que permite la entrada y salida de los sustratos y productos, pero retiene las enzimas (Figura 7). Las matrices utilizadas normalmente son de materiales poliméricos como agar, alginato de calcio, poliacrilamida, k-carragenina y colágeno. En cuanto a las membranas, son de Nylon, celulosa, polisulfona y poliacrilamida (González , 2017).

Además de la simplicidad metodológica de esta forma de inmovilización de enzimas, otra gran ventaja es la protección de la enzima del contacto directo con el ambiente minimizando así aquellos factores que afectan la actividad enzimática como las burbujas de aire y el contacto con solventes hidrofóbicos. La principal limitante de la utilización de esta metodología es que el enrejado polimérico formado puede en ocasiones provocar problemas

de transferencia de masa; es decir, el enrejado, siendo una barrera, puede llegar a disminuir la interacción adecuada entre la enzima y el sustrato, teniendo así una implicación directa en la cinética de reacción (Salazar et al., 2014).

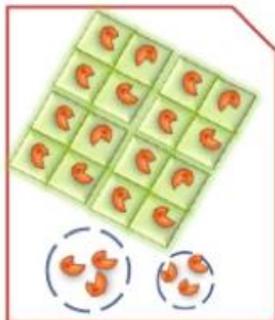


Figura 7. Método de atrapamiento de enzimas.

Fuente: (Rodríguez & Castillo , 2014)

2.4.1.1. Atrapamiento en alginato de calcio

La inmovilización de las enzimas β -galactosidasa es una alternativa para aumentar la eficiencia del proceso de hidrólisis y transgalactosilación de la lactosa. A nivel mundial, diferentes autores han inmovilizado la lactasa en diversos soportes con el objetivo de conservar y aumentar su actividad, así como generar mayor resistencia de la enzima al sustrato en diversas condiciones (Gómez & Sánchez, 2018).

Prashanth & Mulimani (2004) inmovilizaron enzimas en perlas de alginato de calcio según el método de Ates y Mehmetoglu. Se mezcla 4 ml de solución de alginato de sodio (3.75%) con una solución de enzima de 1 ml hasta una concentración de alginato final homogénea de 3%. La mezcla es extruida gota a gota utilizando una aguja de jeringa hipodérmica estéril en una solución de CaCl_2 0.2 M mantenida a 4 °C para formar perlas. Las perlas se dejan endurecer en la solución de CaCl_2 durante 2 h. Las perlas esféricas resultantes se lavan con agua destilada estéril. Las perlas se almacenan en tampón acetato 0.2 M (pH 4.8) a 4 °C. Se utiliza glutaraldehído como agente de reticulación según el método de Ates y Mehmetoglu. Las perlas de alginato de calcio se tratan durante 3 minutos en 5 ml de glutaraldehído al 1%. Las perlas se separan por filtración, se lavan con agua estéril y se almacenan a 4 °C hasta su uso.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Bioprocesos localizado en las Unidades Eduproductivas de la Universidad Técnica del Norte. Los análisis físico – químicos del suero de leche, lactosa desproteinizada y concentrada se realizaron en dos laboratorios particulares localizados en la ciudad de Quito, los cuales son: Laboratorio de Análisis y Aseguramiento de Calidad (Multianálityca S.A.) y Laboratorio de Análisis de Alimentos, Aguas y Afines (LABOLAB).

Tabla 10. Ubicación del área de estudio.

Características	Detalle
- Provincia	Imbabura
- Cantón	Ibarra
- Altitud	2 225 m.s.n.m.
- Temperatura media anual	Temperatura promedio de 18 °C
- Humedad relativa promedio	73%
- Precipitación	623 mm/año

Fuente: (GAD Municipal San Miguel de Ibarra , 2018)

3.2. MATERIALES Y EQUIPOS

En la presente investigación se utilizó la siguiente materia prima, reactivos de laboratorio, equipos, materiales y utensilios:

3.2.1. MATERIA PRIMA E INSUMOS

- Suero de leche
- Enzima β -galactosidasa (Lactozym Pure 6500 L)
- Membranas de UF y MF

3.2.2. REACTIVOS DE LABORATORIO

- Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N
- Alginato de Sodio ($C_6H_7O_6Na$)
- Cloruro de Calcio ($CaCl_2$)
- Ácido Cítrico ($C_6H_8O_7$) 0.1 M

- Fosfato Disódico (Na_2HPO_4) 0.2 M
- Reactivo DNS
- Agua destilada

3.2.3. EQUIPOS

- Reactor empacado a flujo
- Centrífuga (Modelo LWA 205 – 19 discos)
- Celda CF042SS
- Evaporador
- Potenciómetro
- Espectrofotómetro
- Refractómetro ABBE
- Balanza analítica
- Mesa de acero inoxidable
- Cuarto frío

3.2.4. MATERIALES

- Vasos de precipitación 250 ml
- Termómetro de mercurio
- Probeta 100 ml
- Tubos de ensayo
- Gradillas plásticas
- Cubetas de espectrofotómetro
- Balón 50 ml
- Viales plásticos 3 ml

3.2.5. UTENSILIOS

- Bidón (Capacidad 20 ℓ)
- Baldes plásticos (Capacidad 20 ℓ)
- Cuchara de madera
- Cucharas plásticas
- Cocina de inducción
- Olla de inducción (Capacidad 5 ℓ)

- Tela lienzo (0.1 mm diámetro de poro)
- Jarras de plástico (Capacidad de 2 ℓ)
- Licuadora
- Cernidor metálico

3.3. MÉTODOS

3.3.1. OBTENCIÓN DE LACTOSUERO CONCENTRADO Y DESPROTEINIZADO

Para llevar a cabo la fase experimental fue necesario la adquisición de la materia prima, el lactosuero, que fue adquirido en la industria láctea Floralp S.A. ubicada en Caranqui perteneciente al cantón Ibarra. Se transportaron galones de 20 ℓ hasta el laboratorio de Bioprocesos localizado en las Unidades Eduproductivas de la UTN, en donde se procedió a su almacenamiento en el cuarto frío ($T = 7\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.3.1.1.FLUJOGRAMA DEL PROCESO

Para la obtención de lactosuero concentrado y desproteínizado, se estableció un proceso productivo, el cual fue adaptado a los equipos con los cuales cuenta el laboratorio de Bioprocesos, en donde el lactosuero fue sometido a una serie de pretratamientos con el fin de disminuir los componentes que causan obstrucción y disminución del flujo en las membranas, antes de ingresar al tratamiento por ultrafiltración y posterior concentración. Entre estos pretratamientos se encuentran, la filtración previa o prefiltración, centrifugación y microfiltración (MF), a través de los cuales se realiza la reducción selectiva de componentes no requeridos al final del proceso. Cada una de las operaciones de pretratamiento y tratamiento para la obtención del lactosuero concentrado y desproteínizado se encuentran esquematizadas en el Diagrama 2.

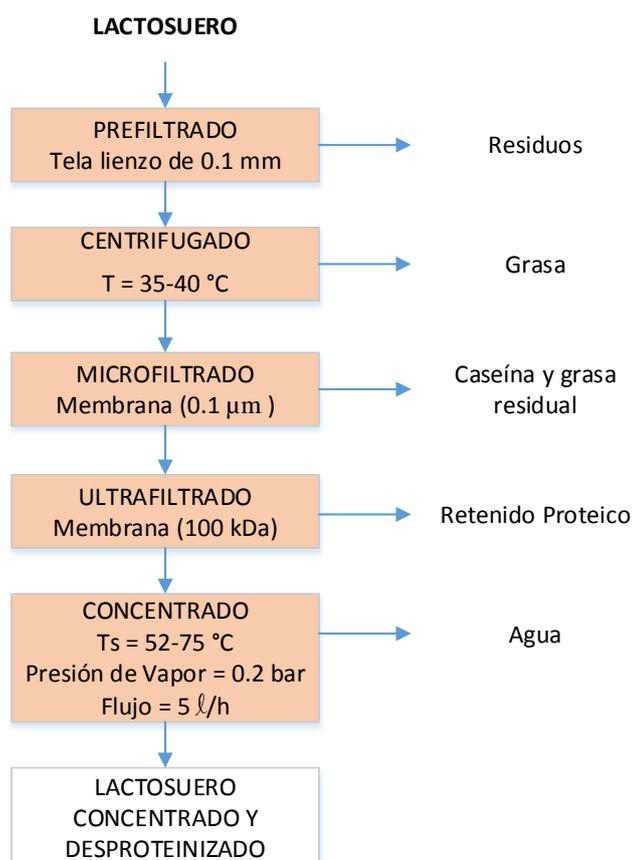


Diagrama 2. Proceso de obtención del lactosuero concentrado y desproteínizado.

Como paso previo se realizó la toma de muestras para la caracterización del suero dulce en su composición físico – química, esto con el fin de determinar variables de interés al inicio y el final del proceso.

Las muestras tomadas del lactosuero dulce proveniente de la elaboración de queso fresco fueron sometidas a un análisis proximal conforme se representa en la Tabla 11.

Tabla 11. Análisis físico - químicos del lactosuero al inicio del proceso.

Análisis	Método	Norma
Lactosa % (m/m)	Cromatografía	AOAC 977.20
Proteína láctea % (m/m)	Kjeldahl	INEN ISO 8968
Grasa láctea % (m/m)	Gravimétrico	AOAC 2003.06
pH	Potenciometría	AOAC 973.41

3.3.1.2. OPERACIONES UNITARIAS DEL PROCESO

Las operaciones tomadas a consideración para la obtención de lactosuero concentrado y desproteínizado, conjuntamente con el equipo empleado y sus especificaciones se detallan en la Tabla 12.

Tabla 12. Operaciones realizadas para la obtención del lactosuero concentrado y desproteínizado.

Operación	Equipos	Especificaciones
Prefiltración	Tela lienzo	Diámetro de poro 0.1 mm
Centrifugación	Descremadora tipo centrífuga, modelo LWA 205	Número de discos 19
Microfiltración	Celda CF042SS	Membrana con Diámetro de poro de 0.1 μm
Ultrafiltración	Celda CF042SS	Membrana con Diámetro de poro de 100 kDa
Concentración	Evaporador de película ascendente	Capacidad máxima del tanque de alimentación 30 ℓ

Las operaciones de Microfiltración (MF) y Ultrafiltración (UF) se llevaron a cabo en una unidad de filtración de flujo cruzado o tangencial a escala de laboratorio, la misma que está constituida por el equipo modular que es la celda CF042SS, diseñada para evaluar procesos de filtrado con membranas planas, y el equipo periférico el cual tiene como partes fundamentales la bomba de alimentación y el tanque de almacenamiento.

Posterior a las operaciones de membrana el permeado de lactosuero, fue concentrado en un evaporador de película ascendente, con el fin de eliminar el agua existente y obtener lactosa concentrada, la cual fue caracterizada mediante un análisis cromatográfico.

3.3.2. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA PRODUCCIÓN DE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS CON ENZIMAS INMOVILIZADAS

Para llevar a cabo el presente objetivo, se tomó a consideración la utilización del paquete estadístico Design Expert en su versión 13 para desarrollar el diseño del experimento, permitiendo determinar las condiciones más favorables de temperatura y concentración de lactosa que permitan la producción de galactooligosacáridos.

3.3.2.1. Método del Experimento

En la presente investigación se empleó el Método de Superficie de Respuesta (MRS) con optimización mediante un Diseño Central Compuesto (DCC) para la evaluación de dos

factores en estudio A (Temperatura) y B (Concentración de lactosa), estableciendo un rango de mínimos y máximos determinados para cada factor.

El Método de Superficie de Respuesta empleado, permitió la optimización de los resultados en cuanto a la producción de galactooligosacáridos (GOS) con la enzima β -galactosidasa (Lactozym Pure 6500 L), para lo cual se realizaron 13 tratamientos, en los cuales se evaluaron como variable de respuesta la concentración de azúcares reductores como medida indirecta de la producción de GOS.

Posterior a esto se determinó el mejor tratamiento, al cual se aplicó un análisis de HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia) para determinar la cantidad de GOS obtenida en dicho tratamiento.

3.3.2.2. Factores en Estudio

Los factores en estudio planteados en la presente investigación son Temperatura (Factor A) y Concentración de lactosa (Factor B). En la Tabla 13 se describen los valores de los niveles mínimos, máximos y puntos centrales para cada variable independiente:

Tabla 13. Niveles de los factores de Temperatura y Concentración de Lactosa.

FACTOR A		
Temperatura (°C)		
Nivel mínimo	Punto central	Nivel máximo
40	50	60
-1	0	1
FACTOR B		
Concentración de Lactosa (%)		
Nivel mínimo	Punto central	Nivel máximo
25	35	45
-1	0	1

3.3.2.3. Tratamientos

Para esta investigación en el diseño experimental se obtuvieron 13 tratamientos, con cinco repeticiones al punto central y puntos aleatorios para los lados axiales. En la Tabla 14 se pueden visualizar los valores obtenidos para cada variable independiente:

Tabla 14. Combinación de tratamientos de acuerdo con las variables independientes.

Tratamiento	Variables Independientes	
	TEMPERATURA (°C)	CONCENTRACIÓN DE LACTOSA (%)
T1	60.0	45.0
T2	50.0	35.0
T3	40.0	45.0
T4	40.0	25.0
T5	50.0	35.0
T6	64.1	35.0
T7	50.0	49.1
T8	50.0	35.0
T9	50.0	35.0
T10	60.0	25.0
T11	35.9	35.0
T12	50.0	35.0
T13	50.0	20.9

3.3.2.4.Unidad Experimental

Cada unidad experimental estuvo conformada por 100 ml de lactosa (sustrato) y 13 ml de enzima encapsulada (alginato + enzima).

3.3.2.5.VARIABLES DE RESPUESTA A EVALUAR

Para todos los tratamientos propuestos se evaluó la concentración de azúcares reductores con el objetivo de encontrar el mejor tratamiento que permita determinar la producción de galactooligosacáridos (GOS). A continuación, en la Tabla 15 se muestran la variable de respuesta a evaluar del producto final:

Tabla 15. Variable de respuesta a evaluar.

Variable	Método	Unidades
Concentración de azúcares reductores	DNS	%

La concentración de azúcares reductores se determinó mediante el método DNS , para lo cual se construyó una curva de calibración con soluciones patrón de glucosa estándar a diferentes concentraciones, que mediante espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 540 nm hizo posible la cuantificación de azúcares reductores de las muestras resultantes

de la conversión enzimática, el mejor tratamiento fue analizado mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) con el fin de cuantificar la cantidad de GOS obtenidos.

La experimentación se realizó en un reactor de lecho empacado a flujo, equipo en el cual se evaluaron los parámetros de operación con el propósito de determinar las mejores interacciones entre las variables en estudio (temperatura y concentración de lactosa).

A continuación, se describe cada una de las partes del reactor y sus funciones.

3.3.2.6. Reactor de lecho empacado a flujo

En la Figura 8 se puede visualizar el esquema general del reactor de lecho empacado a flujo empleado en la obtención de GOS.

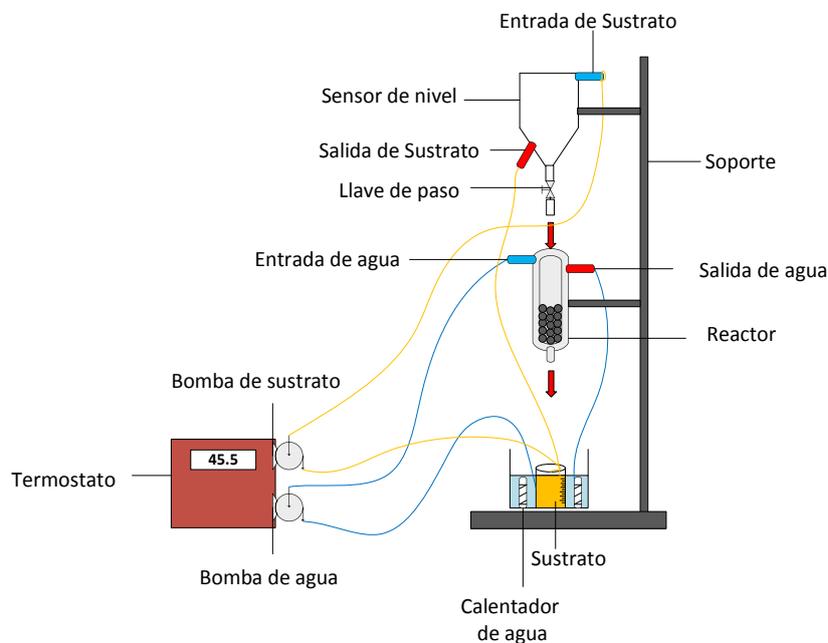


Figura 8. Esquema del reactor de lecho empacado a flujo.

- ❖ **Reactor:** Equipo el cual está rodeado por una chaqueta que permite la circulación constante de agua caliente (relacionada con la temperatura de trabajo) y tiene en su interior las perlas de alginato con β -galactosidasa encapsulada.
- ❖ **Termostato:** Permite el control adecuado de temperatura de trabajo para cada uno de los tratamientos.
- ❖ **Sensor de nivel:** Facilita el llenado y descarga del sustrato.
- ❖ **Llave de paso:** Regula la descarga del sustrato antes de entrar en contacto con la enzima encapsulada.

- ❖ **Calentador de agua:** Calienta el agua que ingresa a la chaqueta del reactor hasta la temperatura requerida en cada tratamiento.
- ❖ **Bomba de agua:** Succiona el agua que ingresa en la chaqueta del reactor.
- ❖ **Bomba del sustrato:** Succiona el sustrato que ingresa al sensor de nivel.
- ❖ **Soporte:** Brinda estabilidad a cada una de las partes del equipo y está constituido de material metálico.

3.4. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

3.4.1. DIAGRAMAS DE FLUJO DEL EXPERIMENTO

El desarrollo experimental de la investigación planteada que permitió la obtención de galactooligosacáridos con enzimas inmovilizadas se dividió en dos fases principales: la primera corresponde a la obtención de lactosa concentrada (Diagrama 3) y la segunda fase es la reacción enzimática en el reactor de lecho empacado a flujo (Diagrama 4). A partir de estas dos fases se realizó la medición indirecta de GOS a través de la prueba de DNS a cada uno de los tratamientos y al mejor de ellos se procedió a aplicar un análisis de HPLC para cuantificar la cantidad de GOS obtenidos.

FASE 1: Obtención de lactosa concentrada

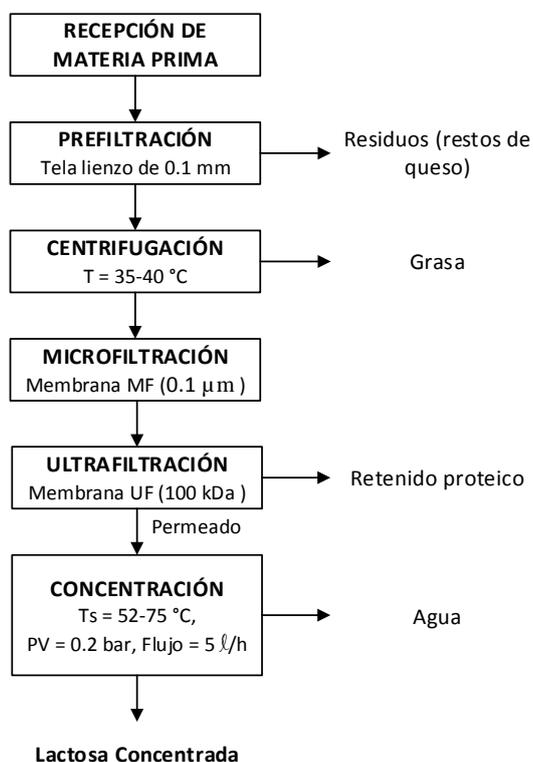


Diagrama 3. Proceso de obtención del lactosuero concentrado y desproteínizado.

FASE 2: Reacción enzimática en el reactor de lecho empacado a flujo

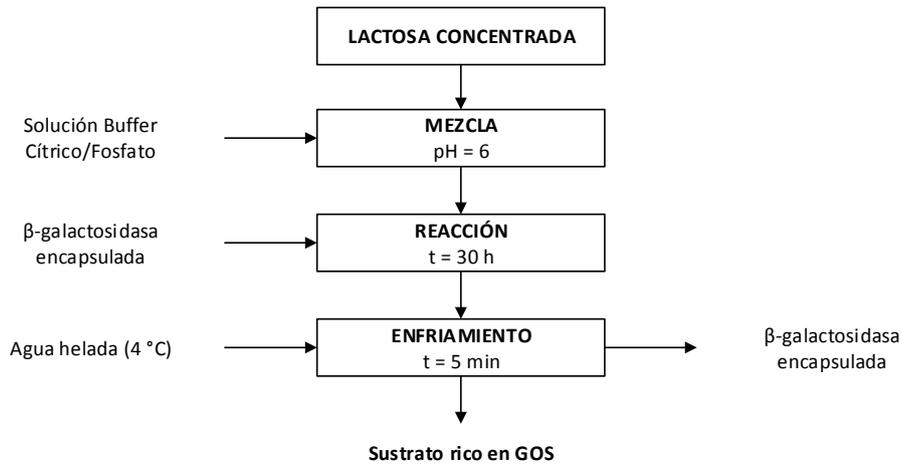


Diagrama 4. Proceso de transgalactosilación de la lactosa.

3.4.2. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

En esta sección se describe la concentración de lactosa y la reacción enzimática llevada a cabo en el reactor de lecho empacado a flujo:

3.4.2.1. FASE 1: Obtención de lactosa concentrada

3.4.2.1.1. Adquisición de materia prima

Se empleó materia prima procedente de la industria láctea Floralp, en donde se adquirieron 20 ℓ de lactosuero de queso fresco, con los cuales se llevó a cabo el presente trabajo de investigación.

3.4.2.1.2. Envasado y transporte del lactosuero

Posterior a la compra, la materia prima fue envasada en galones de 25 ℓ cerrados herméticamente. A continuación, se transportó el lactosuero desde la industria láctea hasta las Unidades Eduproductivas de la Universidad Técnica del Norte.

3.4.2.1.3. Recepción de materia prima

La recepción de materia prima fue llevada a cabo en las Unidades Eduproductivas, en donde se procedió a almacenar el lactosuero en un cuarto frío ($T = 7\text{ °C}$) dentro de la unidad de Lácteos, con el fin de que éste no comience con su proceso de deterioro y acidificación (Figura 9).



Figura 9. Recepción y almacenamiento de lactosuero.

3.4.2.1.4. Prefiltración

El lactosuero fue sometido a un proceso de filtración previa para retirar las macropartículas producto de la elaboración de queso fresco, aquí se hizo uso de una tela fina o lienzo de 0.1 mm de diámetro de poro (Figura 10).



Figura 10. Filtración previa del lactosuero.

3.4.2.1.5. Centrifugación

Se procedió a extraer la grasa del lactosuero por medio de la utilización de una descremadora tipo centrífuga (modelo LWA 205 de 19 discos), para lo cual se calentó el suero a una temperatura de 35-40 °C con el fin de facilitar la separación de la materia lipídica (Figura 11).



Figura 11. Centrifugación del lactosuero.

3.4.2.1.6. Microfiltración

Mediante el equipo modular que es la celda CF042SS localizado en el laboratorio de Bioprocesos, se realizó la operación de microfiltración tomando a consideración el ajuste de la presión, lo cual permite regular el flujo del caudal de alimentación proporcionando un mayor rendimiento en el proceso (Figura 12).



Figura 12. Unidad de filtración de flujo cruzado.

Las características del equipo modular empleado se pueden visualizar en la Tabla 16.

Tabla 16. Características técnicas de la celda CF042SS.

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN
Área activa de la membrana	42 cm ²
Presión máxima	69 bar – 1 000 psig
Temperatura máxima	80 °C
O-rings	Viton
Rango de pH	Según la membrana
Velocidad de flujo cruzado	Variable
Material de la celda	Acero inoxidable
Dimensiones	
- Profundidad de ranura	2.28 mm
- Ancho de ranura	39 mm

Fuente: (Sterlitech Corporation, 2018)

Proceso:

Se hizo uso de membranas de microfiltración con un diámetro de poro de 0.1 μm , procedentes de la Corporación Sterlitech, cuyas dimensiones son las siguientes, 11.3 mm (largo) por 5.7 mm (ancho) y corresponden a las medidas de la celda CF042SS, equipo utilizado para llevar a cabo las operaciones de membranas. Ante lo cual como primer paso se procedió a colocar la membrana de lámina plana en el módulo de filtración (Figura 13).



Figura 13. Colocación de la membrana plana de microfiltración.

Después de la realización de varias pruebas, se establecieron los parámetros adecuados para la utilización del equipo y se dio inicio a la experimentación, los mencionados parámetros están especificados en la Tabla 17:

Tabla 17. Parámetros de trabajo en la unidad de Microfiltración.

Especificaciones	Parámetros
Frecuencia	15 Hz
Presión de Entrada (P in)	300 psi
Presión de Salida (P out)	300 psi
Caudal	1 ℓ/min

Para llevar a cabo cada una de las experimentaciones se cargó el tanque de alimentación con 10 ℓ de suero que se calentaron hasta una temperatura de 35 $^{\circ}\text{C}$ y se fue agregando 5 ℓ de a poco a medida que el tanque lo permitía, hasta terminar de procesar 20 ℓ de suero (Figura 14).



Figura 14. Carga de lactosuero en el tanque de alimentación.

Para la utilización de la unidad de filtración es necesario abrir todas las válvulas y luego encender la bomba de alimentación, la cual va a trabajar a una frecuencia de 15 Hz, posteriormente cerramos el bypass y configuramos la presión de alimentación cerrando gradualmente la válvula del concentrado. Una vez terminada la operación de microfiltración se procedió a apagar la bomba de alimentación y a la apertura de todas las válvulas para aliviar la acumulación de presión existente en el sistema. (Figura 15).



Figura 15. Apertura de las válvulas del sistema al finalizar el trabajo en el equipo.

El lactosuero microfiltrado fue almacenado para su posterior ultrafiltración, y la membrana utilizada se lavó con agua destilada con el fin de eliminar las partículas presentes, posteriormente se colocó la misma en un recipiente plástico para su limpieza con Na(OH) al 0.1 N. Las membranas empleadas se pueden visualizar en la Figura 16.



Figura 16. Membranas de microfiltración empleadas durante la operación.

3.4.2.1.7. Ultrafiltración

El lactosuero proveniente de la microfiltración, es utilizado para llevar a cabo la ultrafiltración, mediante la cual se tuvo como fin recuperar el permeado rico en lactosa y la eliminación selectiva de retenido proteico (Figura 17).



Figura 17. Recuperación del permeado de lactosa a través del equipo de filtración tangencial.

Condiciones de Operación

Parámetros Fijos:

- ❖ Se trabajó con 4.5 ℓ de lactosuero previamente tratado para llevar a cabo cada una de las experimentaciones. Antes de iniciar con la ultrafiltración se cargó el tanque de alimentación con 1 ℓ de lactosuero por 3 minutos a una presión de 100 psi, debido a que el equipo presenta volúmenes muertos en las tuberías de 0.5 ℓ del retenido.
- ❖ La membrana de ultrafiltración empleada fue de 100 kDa cuyas dimensiones son las siguientes: 11.3 mm (largo) por 5.7 mm (ancho).
- ❖ El lactosuero ingresó a una temperatura de 35 °C, pH de 6.5 y 7.6 °Bx.

Parámetros Variables:

- ❖ La ultrafiltración se dio inició con una presión de entrada de 300 psi y de salida de 290 psi, presiones que cambiaron durante la operación hasta alcanzar una presión de entrada de 400 psi y de salida de 350 psi.

3.4.2.1.8. Evaporación

Mediante la evaporación, se llevó a cabo la eliminación de agua, con el fin de concentrar el permeado de lactosuero.

El equipo empleado en esta operación, fue un evaporador de película ascendente (Figura 18).



Figura 18. Evaporador de película ascendente.

Las especificaciones de uso del evaporador de película ascendente se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18. Características técnicas del evaporador de película ascendente.

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN
Flujo de producto	1 – 16 l/h
Flujo de agua helada	1 – 10 l/h
Longitud del tubo evaporador	1.36 m
Área de transferencia de calor	0.06 m ²
Tasa máxima de evaporación	10 l/h
Consumo máximo de vapor	15 kg/h
Presión máxima de vapor (trabajo)	1.7 bar
Área del condensador	0.17 m ²
Capacidad máxima del tanque de alimentación	30 l
Capacidad del tanque de condensado	5.0 l
Capacidad del tanque de concentrado	5.0 l
Bomba CIP (capacidad)	8 l/m
Sistema de vacío	22 mmHg absolutos

Fuente: (Sterlitech Corporation, 2018)

Parámetros de Operación

Parámetros Fijos:

- ❖ Se trabajó con permeado de lactosa para cada experimentación. Antes de comenzar con la concentración se cargó la bandeja de producto con 6 l de lactosa.
- ❖ La concentración se llevó a cabo a una presión de vapor de 0.2 bar y un flujo de 5 l/h
- ❖ El permeado de lactosa ingresó a una temperatura de 7 °C, pH 6.00 y 7.8 °Bx.

Parámetros Variables:

- ❖ La operación se llevó a cabo a una temperatura de salida del producto de 52 °C, la misma que iba fluctuando hasta un máximo de 75 °C.
- ❖ La lactosa concentrada fue sometida a un análisis físico – químico para determinar su porcentaje de concentración.

3.4.2.2.FASE 2. Reacción enzimática en el reactor de lecho empacado a flujo

Para llevar a cabo la reacción enzimática fue necesario la utilización del reactor de lecho empacado a flujo, al igual que la lactosa concentrada y la enzima β -galactosidasa. Previo a la reacción, la enzima fue encapsulada en alginato de sodio, para lo cual se tomó a consideración los siguientes pasos:

- ❖ **Pesaje:** En primer lugar, se procedió al pesaje de 1.5 g de alginato de sodio en una balanza digital ($A_p = 0.01$ g) (Figura 19).



Figura 19. Pesaje de alginato de sodio.

- ❖ **Mezclado:** Se agregó 50 ml de agua destilada a una temperatura de 35 °C y 1.5 g de alginato pesados previamente en una licuadora manual, a través de la cual se logró la homogenización de la solución (Figura 20).



Figura 20. Licuado de alginato de sodio.

- ❖ **Reposo:** La solución que se formó se llevó a refrigeración ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), durante un periodo de tiempo de 30 minutos, sin embargo, para evitar la precipitación del alginato fue necesario licuar la solución cada 15 minutos (Figura 21).



Figura 21. Reposo de la solución de alginato de sodio.

- ❖ **Encapsulación:** En este paso se empleó la enzima β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* de la marca comercial Lactozym Pure 6500 L. Se inició con una solución de enzima y agua destilada relación 1:5, se utilizó 2.4 ml por cada 12.5 ml de la solución de alginato de sodio preparada anteriormente. Para obtener una correcta homogenización se agitó ligeramente la mezcla (enzima + solución de alginato) y posterior a esto se realizó la encapsulación enzimática mediante el goteo de la solución formada en cloruro de calcio CaCl_2 al 2% (Figura 22).



Figura 22. Encapsulación de la enzima β -galactosidasa.

- ❖ **Gelificación:** Las perlas de alginato formadas, se dejaron en reposo en cloruro de calcio durante un periodo de tiempo de 30 minutos, con el fin de que los iones

de sodio se intercambien con los iones de calcio y así lograr un gel insoluble en agua (Figura 23).



Figura 23. Gelificación de las perlas de alginato de sodio.

- ❖ **Filtrado y lavado:** Después de la gelificación, se eliminó el cloruro de calcio de las perlas de alginato, por medio de la utilización de un colador metálico, para lo cual se realizó también diferentes lavados con agua destilada, con el fin de eliminar cualquier residuo del cloruro de calcio (Figura 24).



Figura 24. Filtrado y lavado de las perlas de alginato.

3.4.2.2.1. Reacción Enzimática

Antes de iniciar con la reacción enzimática se preparó disoluciones de lactosa al 25%, 35% y 45%, ajustando el pH a 6 con el tampón cítrico/fosfato, para cada uno de los tratamientos se empleó 100 ml. Posteriormente se agregó las perlas de alginato de sodio con β -galactosidasa encapsulada en el interior del reactor de lecho empacado a flujo. El tiempo de reacción fue de 30 horas, durante las cuales, la temperatura del reactor fue controlada mediante un termostato y un flujo constante de agua caliente (Figura 25):



Figura 25. Colocación de las perlas de alginato en el reactor de lecho empacado a flujo previo a la reacción enzimática.

3.4.2.2.2. Choque Térmico

Al pasar las 30 horas de reacción enzimática, se procedió a tomar una muestra del reactor, para someterla a ebullición ($t = 10$ min) y posterior choque térmico ($t = 5$ min), empleando agua helada, todo esto con el fin de lograr una inactivación de la reacción enzimática (Figura 26):



Figura 26. Choque térmico de la muestra tomada del reactor.

3.4.2.2.3. Cuantificación

Finalmente, las lecturas se hicieron por espectrofotometría Uv-Vis a una longitud de onda de 540 nm utilizando el método DNS para conocer la concentración de azúcares reductores, como medida indirecta de la producción de GOS (Figura 27). Posterior a esto a través del empleo del Programa Estadístico Design Expert, al mejor tratamiento se hizo un análisis de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) para cuantificar la cantidad de galactooligosacáridos obtenidos.



Figura 27. Cuantificación de azúcares reductores por espectrofotometría.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OBTENCIÓN DE LACTOSUERO CONCENTRADO Y DESPROTEINIZADO

4.1.1. CARACTERIZACIÓN DEL LACTOSUERO

La materia prima empleada (lactosuero) fue caracterizada mediante análisis físico – químicos antes de ingresar al proceso de obtención de lactosuero concentrado y desproteínizado. En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos del suero de leche.

Tabla 19. Características físico – químicas del suero de leche.

Componentes del lactosuero				
Lactosa (%m/m)	Proteína (%m/m)	Grasa (%m/m)	pH	Referencias
4.68	0.53	0.22	6.5	Este estudio
5.0	0.8	0.3	6.8	(INEN, 2011)

El valor alcanzado en la caracterización del lactosuero en cuanto a pH fue de 6.5, similar a lo reportado por Muset & Castells (2017), quienes definen que los valores de pH entre 5.8 y 6.6 corresponden a un suero dulce, lo cual nos permite definir que el suero empleado en el proceso es dulce, y tuvo una composición de lactosa de 4.68%, proteína láctea de 0.53% y contenido graso de 0.22%. Además, se establece que los valores citados están dentro de los rangos aceptables de acuerdo a lo establecido en la Norma Técnica Ecuatoriana de suero de leche líquido NTE INEN 2594:2011.

En base a lo manifestado por Parzanese (2008), el lactosuero al ser dulce tendrá una mejor capacidad de procesamiento y producirá más subproductos de valor agregado, ante lo cual es la materia prima idónea para llevar a cabo investigaciones relacionadas con el fraccionamiento de productos de interés, como es el caso de la lactosa a través de la cual se puede obtener galactooligosacáridos, esta información concuerda con lo que plantea González (2017), en donde hace referencia que la síntesis de GOS a una escala productiva industrial se lleva a cabo utilizando como materia prima lactosa refinada o permeado de suero concentrado proveniente de lactosuero dulce.

Cabe destacar que existen algunos factores que afectan directamente la composición y las características físico – químicas de la leche y que están relacionados al lactosuero, ante lo

cual los valores obtenidos pueden variar en cuanto a otras investigaciones. Tal es el caso de Novoa (2019), en cuya investigación hizo uso de materia prima (lactosuero dulce) procedente de la industria láctea Floralp y obtuvo una composición de lactosa de 2.08%, proteína láctea de 0.46% y contenido graso de 0.35%. La variación en cuanto a los resultados, en comparación a esta investigación se debe a la procedencia de la leche empleada en la fabricación del queso, las diferencias en el proceso de obtención del lactosuero, como también a las condiciones ambientales (ordeño y época climática) (Montesdeoca & Piloso, 2020).

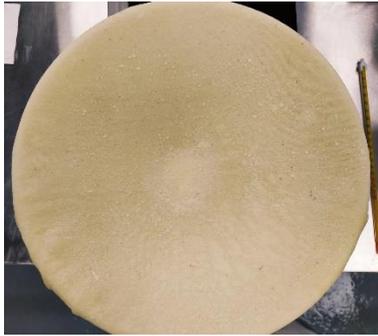
En cuanto al proceso, es importante contar con un suero el cual contenga porcentajes menores de proteína y mayor cantidad de lactosa, debido a que esto facilita la adquisición de un permeado rico en lactosa y la fácil eliminación del retenido proteico a través del uso de tecnologías de membranas. Adicionalmente, cuando la cantidad de grasa es menor, se disminuye el colmataje u obstrucción de los poros de las membranas empleadas en las operaciones de microfiltración y ultrafiltración del lactosuero, permitiendo obtener mejoras en cuanto a los flujos de permeado.

4.1.2. PARÁMETROS PARA EL PROCESO DE CONCENTRACIÓN

A partir de la caracterización de la materia prima se procedió a realizar la obtención de lactosuero concentrado y desproteinizado a través de diferentes operaciones unitarias, tales como: prefiltración, centrifugación, microfiltración, ultrafiltración y concentración. Aquí también se establecieron parámetros que se adaptaron a los equipos disponibles en el laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Técnica del Norte.

En la Tabla 20 se resumen las operaciones llevadas a cabo junto al resultado obtenido:

Tabla 20. Resultados de las operaciones unitarias.

Operación Unitaria	Resultado	Ilustraciones
1) Prefiltración	Suero libre de residuos.	

2) Centrifugación

Reducción de grasa (Inicial 0.22%
- Final 0.18%)



3) Microfiltración (MF)

80% de rendimiento del experimento.

FRV = 6.7



4) Ultrafiltración (UF)

Remoción del 68.9% del retenido proteico.



5) Concentración

Concentración de lactosa 48%.



1) Prefiltración: permitió la eliminación de residuos presentes en el lactosuero, entre los principales residuos se encontraron restos de queso. A continuación, se presenta la Tabla 21

en la cual se encuentran las cantidades de suero prefiltrado, los pesos obtenidos de la materia retenida en la tela lino y los porcentajes que estos representan.

Tabla 21. Pesos de entrada y salida del prefiltrado y el porcentaje que representa.

Experimentación	Suero	Residuo	Porcentaje
	kg	g	%
1	20.0	0.22	0.0011
2	25.0	0.35	0.0014

Como se puede visualizar en la Tabla 21, el porcentaje de residuos recogidos a través de la operación de prefiltración es menor a 0.01%, considerándose un valor despreciable a nivel de laboratorio. Sin embargo, a escalas industriales en donde se manejan grandes volúmenes de lactosuero los porcentajes serían significativos. Tal como lo indica Camacho (2009), en donde hace referencia a que el procesamiento de 16 000 ℓ de leche al día, representaría alrededor de 80 kg de desechos sólidos.

2) Centrifugación: Contribuyó a la disminución de grasa desde una concentración de 0.22% hasta 0.18% lo que involucra una separación del 0.04% de la grasa presente inicialmente en el suero. El resultado no fue el esperado y esto estuvo relacionado con el equipo empleado, debido a que la centrifugadora no contaba con los requerimientos adecuados para llevar a cabo el proceso de separación de grasa del suero de leche.

3) Microfiltración: La materia prima proveniente de la centrifugación fue sometida a una operación de microfiltración, en donde se tomó a consideración el Factor de Retención Volumétrica (FRV).

Según Zeman & Zydney (1996) el FRV es la relación entre el volumen de alimentación (V_a) y el volumen de retenido (V_r) y tiene a su vez relación con el proceso.

$$FRV = \frac{V_a}{V_r} \quad (1)$$

En la Tabla 22 se muestran los volúmenes obtenidos de retenido como de permeado, empleados en la microfiltración.

Tabla 22. Volumen de alimentación, de permeado y de retenido de la microfiltración.

Volúmenes	Cantidad
Volumen de alimentación (Va)	20 ℓ
Volumen de permeado (Vp)	16 ℓ
Volumen de retenido (Vr)	3 ℓ

Se conoce que mientras menos volumen de retenido se obtenga, mayor será el Factor de retención volumétrica, indicando una mayor eficiencia dentro de la operación.

$$FRV = \frac{Va}{Vr}$$

$$FRV = \frac{20}{3}$$

$$FRV = 6.7$$

Para el experimento se obtuvo un FRV de 6.7, mientras que el volumen de permeado recuperado representó un rendimiento del 80%. Los valores son similares a los reportados por Camacho (2009), en cuya investigación consiguió un FRV de 5 y un rendimiento del 75% en el volumen de permeado recuperado, sin embargo estos valores difieren con respecto a Jaramillo (2021) en donde alcanzó un rendimiento en la operación de microfiltración tangencial de 65%, y esto estuvo relacionado en cuanto al reemplazo de membranas de microfiltración por papel filtro industrial, ante lo cual es importante destacar que el uso adecuado de membranas especializadas en derivados lácteos contribuyen a aumentar el rendimiento de la operación de microfiltración.

En cuanto a las pérdidas de volumen, se define que están relacionadas a la presencia de volúmenes muertos y la retención de algunas partículas en las membranas, en nuestro caso se evidenció pérdidas debido a la presencia de lactosuero en las tuberías y bomba de la unidad de filtración, lo cual representó una pérdida en volumen del 5% que corresponde al volumen de retenido.

4) Ultrafiltración: En la operación de ultrafiltración se obtuvo permeado de lactosa y la eliminación selectiva del retenido proteico. En la Tabla 23 se muestran los volúmenes de retenido como de permeado, empleados en la ultrafiltración.

Tabla 23. Volumen de alimentación, permeado, retenido de la ultrafiltración.

Volúmenes	Cantidad
Volumen de alimentación (Va)	4.5 ℓ
Volumen de permeado (Vp)	0.9 ℓ
Volumen de retenido (Vr)	3.1 ℓ

En base a los datos antes descritos, se logró una remoción de 68.9% de retenido, siendo un valor similar al reportado por Muñi et al. (2005), los cuales consiguieron en su experimentación el mayor porcentaje de retención de proteína que fue de 71.60%. Por lo tanto, se define que los porcentajes de remoción de proteína son altos y contribuyen en la operación posterior a la ultrafiltración permitiendo concentrar el permeado de lactosa desproteinizada.

5) Concentración: La lactosa proveniente de la ultrafiltración fue sometida a una operación de concentración, mediante la cual se eliminó el agua presente en la misma. En esta operación se tomó a consideración una temperatura de evaporación que fluctuaba de 50 a 72 °C, y está dentro de los parámetros descritos por Vélez (2018) quien manifiesta que la evaporación de leche en las plantas industriales se lleva a cabo entre 40 y 75 °C.

4.2. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA PRODUCCIÓN DE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS CON ENZIMAS INMOVILIZADAS

Antes de iniciar con la reacción enzimática fue necesario determinar la duración del proceso, ante lo cual se estableció el tiempo de reacción:

- ❖ **Tiempo de reacción:** Para determinar este tiempo se tomaron en cuenta las referencias bibliográficas que indican las mejores condiciones para la producción de GOS. Una vez iniciada la reacción enzimática, se procedió a tomar muestras cada hora del sustrato (lactosa) para cuantificar mediante espectrofotometría Uv-Vis. Durante el proceso se registró un incremento de los azúcares reductores al alcanzar las 12 horas de reacción, momento en el cual la lactosa se hidroliza, durante las 13 horas siguientes se continuó con la hidrólisis, sin embargo, a partir de la hora 26 fue evidente la disminución de la concentración de azúcares reductores en la reacción, aquí empieza la producción de GOS, además, se

observó que a partir de la hora 28 el cambio en la concentración de azúcares reductores se estabiliza (Figura 28). Por lo tanto, se estableció un tiempo de reacción de 30 horas y se trabajó con el mismo criterio para todos los tratamientos.

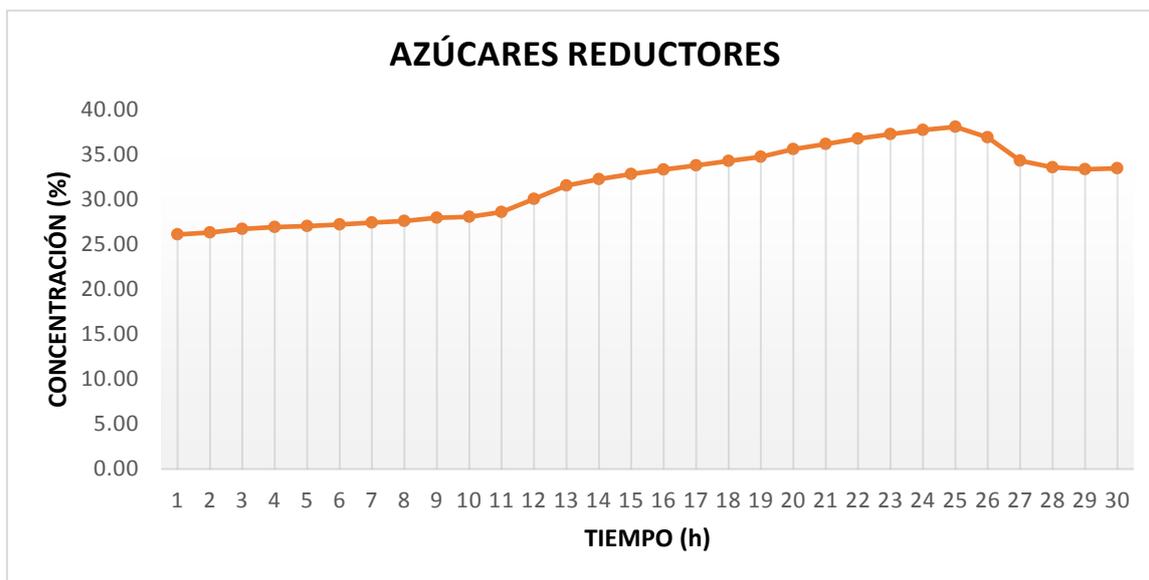


Figura 28. Curva de concentración de azúcares reductores en función del tiempo.

Una vez determinado el tiempo de reacción enzimática, se dio inicio a la fase experimental en donde se evaluaron los parámetros descritos en la metodología, como son la temperatura (T°) y la concentración de lactosa (%). A través del desarrollo de Diseños Compuestos Centrales y un análisis de Superficie de Respuesta se optimizó la concentración de azúcares reductores como medida indirecta de GOS y se estableció la mejor combinación entre los factores en estudio.

En la Tabla 24 se detallan las relaciones de los factores en estudio como Temperatura (Factor 1) y concentración de lactosa (Factor 2), conjuntamente con los rendimientos expresados en porcentaje (%) de azúcares reductores, obtenidos durante la reacción enzimática para la producción de GOS.

Tabla 24. Resultados de porcentaje de (%) de Azúcares Reductores para cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Factor 1	Factor 2	Respuesta
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Concentración de lactosa (%)	Azúcares reductores (%)
T1	60.0	45.0	31.67
T2	50.0	35.0	33.75

T3	40.0	45.0	20.34
T4	40.0	25.0	30.89
T5	50.0	35.0	33.08
T6	64.1	35.0	26.47
T7	50.0	49.1	29.19
T8	50.0	35.0	33.14
T9	50.0	35.0	32.10
T10	60.0	25.0	25.37
T11	35.9	35.0	24.48
T12	50.0	35.0	32.18
T13	50.0	20.9	33.74

En este experimento el tiempo de reacción (30 horas), volumen de sustrato (100 ml), concentración de enzima (2.4 ml) y flujo de alimentación (30 ml/h - $D = 2.4 \text{ h}^{-1}$), se mantuvieron constantes.

A continuación, se presenta el análisis de varianza de la variable de respuesta (% azúcares reductores) para analizar la significancia del modelo propuesto.

4.2.1. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA OPTIMIZACIÓN

El análisis de varianza de la variable de respuesta (% azúcares reductores) se muestra en la Tabla 25, este análisis permitió conocer si el modelo estadístico sugerido es útil para determinar el punto óptimo que nos permita obtener la mayor concentración de GOS en función de los azúcares reductores.

Tabla 25. Análisis de varianza para la variable concentración de azúcares reductores.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F - valor	p - valor	Significancia
Modelo	209.87	5	41.97	38.61	< 0.0001	Significativo
A-Temperatura	9.30	1	9.30	8.55	0.0222	
B-Con. Lactosa	14.27	1	14.27	13.13	0.0085	
AB	70.98	1	70.98	65.28	< 0.0001	
A ²	113.44	1	113.44	104.33	< 0.0001	
B ²	7.57	1	7.57	6.96	0.0335	
Residuo	7.61	7	1.09			
Falta de ajuste	5.65	3	1.88	3.85	0.1129	no significativo
Error Puro	1.96	4	0.4896			
Total	217.48	12				

R ²	0.9650
R ² Ajustado	0.9400
C.V. %	3.51

Mediante el análisis ANOVA se logró determinar que el valor obtenido de 38.61 para el F-modelo es significativo, y el resultado del coeficiente de determinación ajustado $R^2 = 0.9400$ permite saber que el modelo estadístico sugerido para este trabajo es útil en la búsqueda del punto óptimo para la producción de GOS ya que según Gutiérrez & Salazar (2016) si el modelo no presenta un coeficiente de determinación mínimo de 0.70, no es recomendable el uso del mismo para la predicción de variables resultado.

El análisis p-value permitió conocer la significancia de la variable dependiente sobre el proceso productivo, por lo que se determinó que los factores A (Temperatura), B (Concentración de lactosa) y la interacción AB así como los cuadrados A^2 , B^2 resultan ser términos de modelo significativo que influyen en la producción de GOS, esto debido a que los valores resultantes son < 0.05 . Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa, la cual nos indica que la concentración de lactosa y la temperatura influyen sobre la obtención de galactooligosacáridos por el método de inmovilización enzimática de la β -galactosidasa.

Al mismo tiempo, un bajo valor del coeficiente de variación que se observa en la Tabla 25 (CV = 3.51%) indica una buena precisión y confiabilidad de los experimentos realizados.

4.2.2. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ÓPTIMO PARA EL EXPERIMENTO CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

En la Figura 29 se muestran los gráficos que reflejan el área explorada, donde la interacción entre los factores en estudio (temperatura, concentración de lactosa) definen el punto óptimo en función de la variable respuesta (concentración de azúcares reductores). Se establece que a medida que más se acerque a las áreas rojas del diseño, la concentración de azúcares reductores aumenta, por lo tanto, para la optimización el área explorada corresponde a las zonas celestes y azules.

Factor Coding: Actual

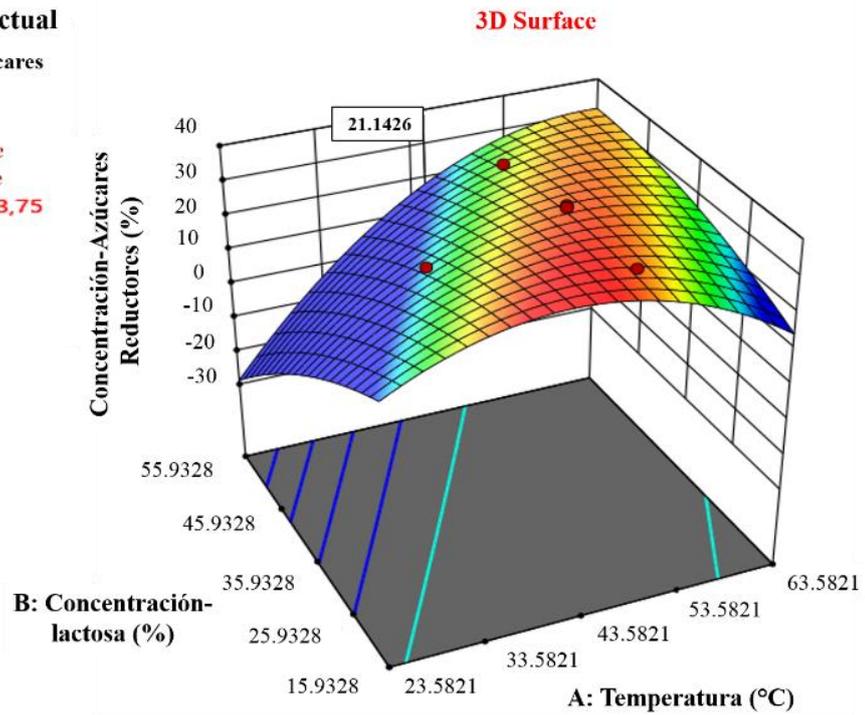
Concentración-Azúcares Reductores (%)

Design Points:

- Above Surface
 - Below Surface
- 20,34  33,75

X1 = A
X2 = B

a



b

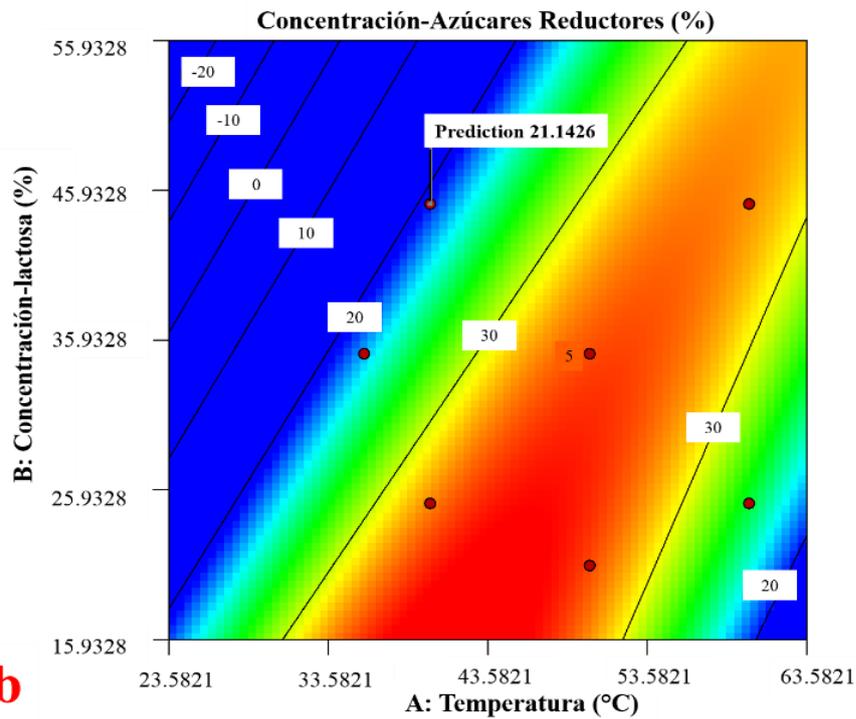


Figura 29. Superficie de respuesta estimada (a) y gráfico de contorno (b).

Mediante el análisis de los resultados con el uso del paquete estadístico Design Expert 13 se encontraron 5 soluciones de optimización correspondientes a la combinación de las variables temperatura (°C) y concentración de lactosa (%), sin embargo, sólo una fue seleccionada,

mostrándose las condiciones de optimización en cuanto a la concentración de azúcares reductores en la Tabla 26, para la validación del punto óptimo se realizaron tres réplicas del experimento a las condiciones sugeridas.

Tabla 26. Punto óptimo para el experimento de concentración de azúcares reductores.

N°	Temperatura (°C)	Lactosa (%)	Azúcares Reductores (%)	Atractivo	
1	40.00	45.00	21.14	0.940	Seleccionado

4.2.2.1. Validación de las condiciones establecidas para la optimización

Los resultados obtenidos para la validación del punto óptimo después de la experimentación se muestran en la Tabla 27, verificándose que el valor registrado (Media Real) se encontró dentro del rango de valores sugeridos por el programa, demostrándose la validación de la optimización de la variable respuesta.

Tabla 27. Resultados de la optimización de la Concentración de Azúcares Reductores.

Análisis	Media predicha	Desv. Est.	95% IP Bajo	Media Real	95% IP Alto
Concentración de Azúcares Reductores	21.14	1.04	17.99	20.12	24.29

4.2.3. ANÁLISIS DE HPLC AL MEJOR TRATAMIENTO

El mejor tratamiento corresponde a los siguientes parámetros: 40 °C (temperatura) y 45% (concentración de lactosa), estos resultados están en relación a las investigaciones bibliográficas consultadas.

En el caso de la temperatura es un factor que hay que tener en cuenta en la producción indirecta de GOS, tal como lo indica Bohórquez (2016), en cuya investigación define que las bajas temperaturas producen menos azúcares reductores y por ende más GOS, además coincide con el rango de temperatura de trabajo de la enzima β -galactosidasa Lactozym Pure 6500 L que es 40 a 50 °C , ante lo cual 40 °C es la temperatura adecuada para ser empleada, y está en concordancia con otros autores, tales como González (2017) y Guío (2014) quienes

emplearon la misma enzima comercial y temperatura, siendo esta un parámetro útil dentro de las investigaciones propuestas para la producción de GOS.

En cuanto a la concentración inicial de lactosa, es importante definir que esta afecta directamente la síntesis de GOS, debido a que los valores altos de la misma aseguran la presencia de menos moléculas de agua y favorecen la reacción de transgalactosilación, sin embargo, a menores concentraciones de lactosa se favorece la reacción de hidrólisis (Osman, 2016). En cuanto a lo citado se define que la mejor concentración de lactosa (45%) dentro de esta investigación, contribuye a la formación de GOS y está en relación a las investigaciones de Sanz (2009) y Olivenza (2015), quienes emplearon concentraciones altas de lactosa de 40% y 60% respectivamente, con las cuales alcanzaron mayores niveles de GOS, sin embargo, la aparición tardía de estos es evidente, ante lo cual es recomendable trabajar con concentraciones bajas para que la reacción se lleve a cabo de manera rápida.

Al mejor tratamiento obtenido y contrastado con la literatura se procedió a realizar un análisis de HPLC para identificar y cuantificar azúcares por separado (Figura 30) como son: lactosa, glucosa y galactosa, obteniendo 16.30%, 10.40% y 7.10% respectivamente. Los resultados obtenidos son superiores a los reportados en la investigación de Albayrak & Yang (2001), quienes obtuvieron 13% de glucosa y 3% de galactosa, sin embargo difieren en cuanto a la investigación de Sanz (2009) quien reportó 29.68% de glucosa y 12.14% de galactosa. Lucero (2022) menciona que el conocimiento en cuanto a las concentraciones de azúcares presentes en el sustrato (glucosa y galactosa) nos permite definir que la reacción de transgalactosilación se ha llevado a cabo, puesto que, si se hubiese realizado únicamente la reacción de hidrólisis, se asume que las cantidades hubiesen sido similares.

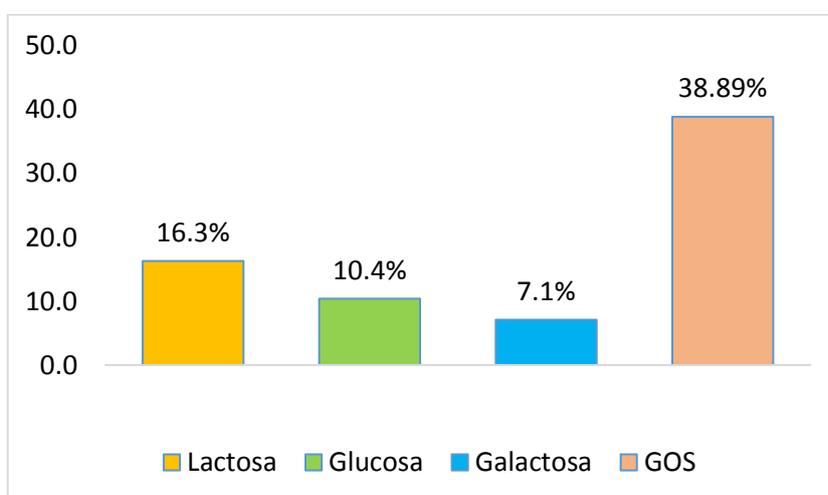


Figura 30. Porcentajes de azúcares del análisis de HPLC.

Para determinar la concentración de GOS, se tomó en cuenta la ecuación de (Zheng et al., 2006):

$$\text{Concentración GOS} = \frac{\text{Concentración glucosa} + \text{Concentración galactosa}}{\text{Concentración inicial de lactosa}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{Concentración GOS} = \frac{10.4 + 7.1}{45} \times 100\% = 38.89\%$$

El resultado en cuanto a la concentración de GOS de este estudio es de 38.89%, este valor es alto en comparación a los valores alcanzados por otros autores. Guío (2014) utilizando la misma fuente de enzima (Lactozym Pure 6500 L) obtuvo en su estudio 32.7%, mientras que Martínez & Cardelle (2008) alcanzaron un valor de 17% utilizando la β -galactosidasa *K. lactis* del preparado comercial Lactozym 3000 L HP G. Sin embargo el valor reportado en la teoría es bajo en cuanto al valor de Lucero (2022) quien alcanzó una concentración de 42.80% de GOS.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- ❖ El lactosuero dulce empleado fue idóneo para la obtención de lactosa concentrada debido a su bajo contenido de proteína (0.53%), lo que permitió una separación eficiente de los compuestos de interés evitando obstrucciones en los poros de las membranas utilizadas y por lo tanto un mejor flujo del permeado en cada una de las operaciones.
- ❖ La encapsulación de la enzima β -galactosidasa en soporte de alginato de sodio al 3%, permitió una mayor estabilidad de operación en el reactor y una fácil recuperación del sustrato, sin que exista la necesidad de separar la enzima a partir de la mezcla.
- ❖ Con un tiempo de trabajo de 30 horas se consiguió una conversión del 63.78% de lactosa en GOS, este tiempo se encuentra en el rango normal que emplean los reactores de lecho empacado a flujo, debido a la lenta reacción que existe entre la β -galactosidasa y la lactosa.
- ❖ Se acepta la hipótesis alternativa ya que los factores en estudio (temperatura y concentración de lactosa) sí influyen sobre la obtención de galactooligosacáridos mediante enzimas inmovilizadas.

5.2. RECOMENDACIONES

- ❖ Utilizar centrifugas específicas para lactosuero, que permitan la máxima separación de grasa y caseinatos, así se evitaría la obstrucción de los poros en las membranas de microfiltración.
- ❖ No someter al equipo de filtración tangencial (Celda CF042SS) a presiones mayores de 500 psi en la operación de ultrafiltración para evitar daños en las membranas.

- ❖ Estudiar otros métodos de inmovilización y enzimas comerciales que permitan una mayor producción de galactooligosacáridos.

BIBLIOGRAFÍA

- Livney, Y., Donhowe, D., & Hartel, R. (1995). Influence of temperature on crystallization of lactose in ice-cream. *International Journal of Food Science & Technology*, 30, 311-320.
- Albayrak, N., & Yang, S.-T. (2001). Production of Galacto-Oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnology and Bioengineering*, 77, 8-19.
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23-39.
- Atra, R., Vatai, G., Bekassy - Molnar, E., & Balint, A. (2005). Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering*, 67, 325-332.
- Baldasso, C., Barros, T. C., & Tessaro, I. C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, 278, 381-386.
- Bohórquez, D. (2016). *Evaluación de la producción de galacto-oligosacáridos (GOS) utilizando una β -galactosidasa a partir de la lactosa del lactosuero* (Trabajo de Fin de Maestría). Universidad de Sucre, Colombia.
- Bon Rosas, F. (2005). Desarrollo de un proceso de factores combinados para la conservación de suero de leche. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 13-15.
- Brans, G. (2006). *Design of membrane systems for fractionation of particles suspensions* (Doctoral Thesis). Wageningen University, Wageningen.
- Camacho, M. E. (Julio de 2009). *Obtención de un concentrado proteico del suero de la leche de vaca utilizando tecnología de membranas* (Trabajo de Fin de Grado). Escuela Politécnica Nacional, Ecuador.
- Cantón, E. (2016). *Estudio del diseño de una planta de procesado para el aprovechamiento de lactosuero de quesería* (Trabajo de Fin de Grado). Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona.

- Cardelle Cobas, A. (2009). *Síntesis, caracterización y estudio del carácter prebiótico de oligosacáridos derivados de la lactulosa* (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Carrera , W. (2010). *Elaboración de una bebida saborizada con base en suero de queso mozzarella* (Trabajo de Fin de Grado). Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
- Chacón , A. (2006). Tecnologías de membranas en la agroindustria láctea. *Agronomía Mesoamericana*, 17, 243-263.
- Chen , X., & Gänzle, M. (2016). Lactose and lactose-derived oligosaccharides: more than prebiotics?, *International Dairy Journal*, 67, 61-72.
- Cuartas, B. (2005). *Estudio del proceso de nanofiltración para la desmineralización de lactosuero dulce* (Tesis Doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Eskandarloo, H., & Abbaspourrad, A. (2018). Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using β -galactosidase immobilized on functionalized glass beads. *Food Chemistry*, 251, 115-124.
- Faría , J., García , A., & García, A. (2003). Eficiencia en la concentración de la proteína de lactosuero con una planta móvil de ultrafiltración y nanofiltración. *Revista Científica, FCV-LUZ, Vol. XIII(Nº 5)*, 347-351.
- GAD Municipal de San Miguel de Ibarra . (2018). *Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal San Miguel de Ibarra*. Obtenido de Ibarra, ciudad a la que siempre se vuelve: <https://www.ibarra.gob.ec/web/index.php/ibarra1234/informacion-general>
- Gänzle, M., Haase, G., & Jelen, P. (2008). Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal*, 18, 685 - 694.
- Garavito, L. M., & Méndez, T. (2021). *Propuesta para el aprovechamiento del lactosuero proveniente de la elaboración de queso ricotta por medio de separación por membranas*. Obtenido de <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/8667/1/6161807-2021-2-IQ.pdf>
- Gómez , A., & Sánchez , J. (2018). Producción de galactooligosacáridos: alternativa para el aprovechamiento del lactosuero. Una revisión. *Ingeniería y Desarrollo*, 37(1), 129-158.

- González , I. (2017). *Producción de prebióticos galactooligosacáridos mediante técnicas biotecnológicas y de inmovilización enzimática* (Tesis Doctoral). Universidad Rey Juan Carlos, Madrid.
- Griep, E., Cheng, Y., & Moraru, C. (2016). Efficient removal of spores from skim milk using cold microfiltration: Spore size and surface property considerations. *Journal of Animal Science*, 94, 9703–9713.
- Guío, F. (2014). *Evaluación de la producción de galactooligosacáridos a partir de materias primas lácteas con β -galactosidasa inmovilizada* (Trabajo de Fin de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Gutiérrez, H., & Salazar, R. (2016). Análisis y diseño de experimentos. *McGraw-Hill Interamericana*, 2(46). ISBN:10 : 970-10-6526-3.
- Hermosa, P. (2021). *Últimos avances en el tratamiento de suero lácteo con tecnología de membranas (Realidad en el Ecuador)* (Trabajo de Fin de Grado). Universidad Central del Ecuador, Ecuador.
- Ibáñez, R. (2007). *Estudio de la Ultrafiltración de Proteínas Modelo con Membranas Cerámicas* (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, España.
- Illanes , A. (2016). Chapter 1: Lactose: Production and Upgrading, *Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective*. San Diego, United States: Elsevier Science Publishing Co Inc.
- Illanes , A., & Guerrero , C. (2016). Chapter 2: Functional foods and feeds: probiotics, prebiotics, and synbiotics, *Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective*. San Diego, United States: Elsevier Science Publishing Co Inc.
- Illanes , A., Vera , C., & Wilson , L. (2016). Chapter 4: Enzymatic production of galactooligosaccharides, *Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective*. San Diego, United States: Elsevier Science Publishing Co Inc.
- INEN. (2011). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2594:2011. Obtenido de Suero de leche líquido. Requisitos:
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/2594.pdf>

- Jaramillo, P. (2021). *Desarrollo de un suplemento nutricional a partir de lactosuero para deportistas adultos* (Trabajo de Fin de Grado). Universidad Técnica del Norte, Ecuador.
- Jelen, P. (2003). Whey Processing: Utilization and Products, *Encyclopedia of Dairy Sciences*. London: Academic Press.
- Lipnizki, F. (2010). Cross-Flow Membrane Applications in the Food Industry, *Membrane Technology: Membranes for Food Applications*. John Wiley & Sons, Inc.
- Lucero, D. (2022). *Evaluación de parámetros de operación por lotes para la obtención de galacto-oligosacáridos mediante beta galactosidasa inmovilizada* (Trabajo de Fin de Grado). Universidad Técnica del Norte, Ecuador.
- Martínez, C., & Cardelle, A. (2008). Optimization of conditions for galacto-oligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chemistry*, *107*, 258-264.
- Matella, N. J., Dolan, K. D., & Lee, Y. S. (2006). Comparison of Galactooligosaccharide Production in Free-Enzyme Ultrafiltration and in Immobilized-Enzyme Systems. *Food Chemistry and Toxicology*, *71*(7), C363 - C368.
- Meléndez, N., Aguilar, C., Nevárez, G., & Rodríguez, R. (2011). Compuestos prebióticos: de las moléculas al ser humano. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, *31*(1), 6-12.
- Mendoza, M., & González, P. (26 de Noviembre de 2018). EL COMERCIO. Obtenido de Industria usa el 10% del suero de la leche que se produce en el país: <https://www.elcomercio.com/actualidad/industria-suero-leche-produccion-ecuador.html>
- Montesdeoca, R., & Piloso, K. (2020). Evaluación físicoquímica del lactosuero obtenido del queso fresco pasteurizado producido en el taller de procesos lácteos en la ESPAM "MFL". *El Higo - Revista de Ciencia y Tecnología*, *10*(1), 2-10.
- Muñi, A., Páez, G., Faría, J., Ferrer, J., & Ramones, E. (2005). Eficiencia de un Sistema de Ultrafiltración/Nanofiltración Tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica*, *XV*(4), 361-367.

- Muset, G., & Castells, M. (2017). Capítulo I: El suero de quesería, *Valorización del lactosuero*. INTI.
- Novoa, C. (2019). *Obtención de ácido láctico por el método de células inmovilizadas Lactobacillus casei* (Trabajo de Fin de Grado). Universidad Técnica del Norte, Ecuador.
- Olivenza, D. (2015). *Estudio de la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de Kluyveromyces lactis* (Trabajo de Fin de Maestría). Universidad de Coruña, España.
- Osman, A. (2016). Synthesis of prebiotic galacto-oligosaccharides, *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*. Elsevier.
- Pais, J., Núñez, J., Lara, M., Rivera, L., Trujillo, L., & Cuaran, M. (20 de Agosto de 2017). Valorización del suero de leche: Una visión desde la biotecnología. *Bionatura*, 2, 468-476.
- Panesar , P. S., Panesar , R., Singh, R. S., Kennedy, J. F., & Kumar , H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of -galactosidase. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 530-543.
- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105, 1-14.
- Parra, R. A. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4967-4982.
- Parzanese, M. (2008). Alimentos Argentinos. Obtenido de Tecnologías para la Industria Alimentaria - Procesamiento de Lactosuero: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_13_Lactosuero.pdf
- Pinelo , M., Jonsson, G., & Meyer, A. (2009). Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance. *Separation and Purification Technology*, 70, 1-11.
- Pouliot, Y. (2008). Membrane processes in dairy technology - From a simple idea to worldwide panacea. *International Dairy Journal*, 18, 735-740.
- Poveda , E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista chilena de nutrición*, 397-403.

- Prashanth, S. J., & Mulimani, V. (2004). Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* α -galactosidase immobilized in calcium alginate, *Process Biochemistry*, 40 (3-4), 1199-1205.
- Ramírez , J. (2015). *Diseño de procesos en la Industria Láctea: Transformación de lactosuero*. UNIMAR.
- Ramírez, J. (2012). Aprovechamiento industrial de lactosuero mediante procesos fermentativos. *Publicaciones e Investigación*, 6, 69-83.
- Ramírez, J. R. (2014). Enzimas: ¿Qué son y cómo funcionan?, *Revista Digital Universitaria*, 15, 1-13.
- Ramírez, J., Solís, C., & Vélez, C. (2018). Tecnología de membranas: Obtención de proteínas de lactosuero. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 12(24), 52-59.
- Rastall, R. (2010). Functional Oligosaccharides: Application and Manufacture. *Food Science and Technology*, 1, 305-339.
- Revilla, A. (2000). Tecnología de la leche. 3 ed. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras, Centroamérica. 396p.
- Riquelme, L. F. (2010). Desarrollo por Ultrafiltración de un Concentrado Proteico a partir del Lactosuero. (Trabajo de Fin de Grado). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Rodríguez Colinas , B. (2013). *Obtención enzimática, caracterización y propiedades prebióticas de oligosacáridos empleados en leches infantiles* (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Rodríguez, D. (02 de Febrero de 2015). *Estudio de la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis** (Trabajo de fin de Maestría). Univeridad de Coruña, Coruña.
- Saboya, L., & Maubois, J. (2000). Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. *Le Lait, INRA Editions*, 80, 541-553.
- Sako, T., Matsumoto, K., & Tanaka , R. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 9, 69-80.

- Sanz, J. (2009). *Production of galacto-oligosaccharides from lactose by immobilized β -galactosidase and posterior chromatographic separation* (Doctoral Thesis). Ohio State University, United States.
- Schaafsma, G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18, 458-465.
- Sterlitech Corporation. (2018). Sterlitech Corporation. Obtenido de CF042SS cell assembly & operation manual: https://www.sterlitech.com/media/wysiwyg/Manual2018/Manual_CF042SS_CF.pdf
- Torres, D., Gonçalves, M. d., Teixeira, J., & Rodrigues, L. (2010). Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. *Food Science and Food Safety*, 9, 438 - 454.
- Torres, J. (Abril de 2001). Utilización del ultrafiltrado de suero pasteurizado del queso para el desarrollo de una bebida isotónica. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1332/1/AGI-2001-T007.pdf>
- Vegas, R., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J., Alvarez, J. R., & Luque, S. (2008). Evaluation of ultra- and nanofiltration for refining soluble products from rice husk xylan. *Bioresource Technology*, 99, 5341-5351.
- Vélez, J. (2018). Leche concentrada, evaporada y/o condensada, *Leches concentradas azucaradas: de la tradición a la ciencia*. Cali: Editorial Universidad Santiago de Cali
- Vera, C., & Illanes, A. (2016). Chapter 3: Lactose-derived nondigestible oligosaccharides and other high added-value products, *Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective*. San Diego, United States: Elsevier Science Publishing Co Inc.
- Weather Spark. (2015). Weather Spark. Obtenido de <https://es.weatherspark.com/y/20035/Clima-promedio-en-Ibarra-Ecuador-durante-todo-el-a%C3%B1o>
- Wit, J. N. (1998). Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *Journal of Dairy Science*, 81(3), 597 - 608.
- Zeman, L., & Zydney, A. (1996). *Microfiltration and ultrafiltration : principles and applications*. New York: M. Dekker.

ANEXOS

Anexo 1

Análisis de proteína y lactosa del lactosuero de queso fresco.



Orden de trabajo N° 212948
Informe N° 212948
Hoja 1 de 1

DATOS PROPORCIONADOS POR EL CLIENTE

Nombre: KATHERINE VICTORIA MARTÍNEZ LEINTON
Dirección: Ibarra
Muestra: Lactosuero de queso fresco
Descripción: Líquido
Fecha Elaboración: 03 de agosto del 2021
Fecha Vencimiento: 07 de agosto del 2021
Fecha de Toma: ---
Lote: ---
Envase: Frasco de vidrio color ámbar
Conservación de la muestra: Refrigeración

DATOS DEL LABORATORIO

Fecha de recepción: 05 de agosto del 2021
Toma de muestra por: Cliente
Fecha de realización del ensayo: 05 - 13 de agosto del 2021
Fecha de emisión del informe: 13 de agosto del 2021
Condiciones ambientales: 24,3°C 36% HR

ANÁLISIS QUÍMICO:

PARÁMETRO	UNIDAD	MÉTODOS	RESULTADOS
Proteína	%	PEE/LA/01 INEN ISO 8968	0,53
Lactosa	%	PEE/LA/09 AOAC 977.20	4,68

Cecilia Luzuriaga
Dra. Cecilia Luzuriaga
GERENTE GENERAL

El presente informe es válido sólo para la muestra analizada, tal como fue recibida en LABOLAB.
LABOLAB no se responsabiliza por los datos proporcionados por el cliente.
Este informe no debe reproducirse más que en su totalidad previa autorización escrita de LABOLAB.
Las opiniones e interpretaciones no se encuentran dentro del alcance de acreditación del SAE.



INFORME TÉCNICO, FICHA DE ESTABILIDAD, INFORMACIÓN NUTRICIONAL PARA NOTIFICACION SANITARIA

Análisis físico, químico, microbiológico, entomológico de: alimentos, aguas, bebidas, materias primas, balanceados, cosméticos, pesticidas, suelos, metales pesados y otros.
Feo. Andrade Marín E7-29 y Diego de Almagro Telf.: 2563-225 / 2561-350 / 3238-503 / 3238-504 Cel.: 099 959 0412 / 099 944 2153 / 098 700 1591
E-mails: secretaria@labolab.com.ec / servicioalcliente@labolab.com.ec / ceciliacruzuriaga@labolab.com.ec / informes@labolab.com.ec

www.labolab.com.ec

Quito - Ecuador

Anexo 2

Análisis de grasa del lactosuero de queso fresco.



INFORME DE RESULTADOS

INF.DIV-FQ.56058b

DATOS DEL CLIENTE

Cliente:	KATHERINE VICTORIA MARTINEZ LEITON
Dirección:	CIUADELA LA VICTORIA
Teléfono:	0997799327

DATOS DE LA MUESTRA

Muestra de:	ALIMENTO		
Descripción:	LACTOSUERO DE QUESO FRESCO		
Lote	---	Contenido Declarado:	110mL
Fecha de Elaboración:	2021-08-03	Fecha de Vencimiento:	---
Fecha de Recepción:	2021-08-05	Hora de Recepción	11:16:27
Fecha de Análisis:	2021-08-05	Fecha de Emisión:	2021-08-10
Material de Envase:	---		
Toma de Muestra realizada por:	El cliente.		
Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a los datos y las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio.		

CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

Color:	Característico.	Olor:	Característico.
Estado:	Líquido.	Conservación:	Refrigeración
Temperatura de la muestra:	5°C		

RESULTADOS FISICOQUÍMICO

PARAMETROS	RESULTADO	UNIDAD	METODO DE ANALISIS INTERNO	METODO DE ANALISIS DE REFERENCIA
GRASA	0.22	%	MFQ-02	AOAC 2003.06

Se prohíbe la reproducción del presente informe de resultados, excepto en su totalidad previa autorización escrita de Multianalityca S.A.

Cualquier información adicional correspondiente a los ensayos está a disposición del cliente cuando lo solicite.

El Tiempo de Retención de las Muestras en el Laboratorio a partir de la fecha de ingreso será de 15 días para muestras perecibles y 1 mes calendario para muestras medianamente perecibles y estables. Muestras para análisis microbiológicos 5 días laborables a partir de la fecha de análisis, posterior a este tiempo, el laboratorio no podrá realizar reensayos para verificación de datos o valores no conformes por parte del cliente.

Toda la información relacionada con datos del cliente e ítems de ensayo (muestras) y que pueda afectar a la validez de los resultados, ha sido proporcionada y son responsabilidad exclusiva del cliente. El laboratorio se responsabiliza únicamente de los resultados emitidos los cuales corresponden a la muestra analizada y descrita en el presente documento.

El laboratorio declina toda responsabilidad, acerca de desvíos encontrados en las muestras entregadas por el cliente y que pueden afectar a la validez de los resultados, particular que es comunicado al cliente en caso de ser detectado por el laboratorio.

El tiempo de almacenamiento de los informes de resultados y toda la información técnica relacionada al mismo para dar trazabilidad será de 5 años a partir de su fecha de emisión. (Punto 8.4.2 CR GA01 Criterios Generales Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración según NTE INEN- ISO/IEC 17025:2018).

Quim. Mercedes Parra
Jefe División Instrumental



EDMUNDO CHIRIBOGA N47-154 Y JORGE ANIBAL PAEZ
La concepcion - QUITO - PICHINCHA - ECUADOR
Telf. (02) 226 7895, 226 9743, 244 4670 / email: informes@multianalityca.com