



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Efecto del ultrasonido en la producción y rendimiento de galactooligosacáridos a partir de suero ácido de yogurt griego y de una solución de lactosa utilizando la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* libre e inmovilizada”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:
Maestra en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Q.A. Laura Huicochea Castrejón

Dirigida por:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Centro Universitario, Santiago de Querétaro, Qro., enero de 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Efecto del ultrasonido en la producción y rendimiento
de galactooligosacáridos a partir de suero ácido de
yogurt griego y de una solución de lactosa utilizando la
 β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* libre e
inmovilizada

por

Laura Huicochea Castrejón

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQMAC-300234-0123-223



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Efecto del ultrasonido en la producción y rendimiento de galactooligosacáridos a partir de suero ácido de yogurt griego y de una solución de lactosa utilizando la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* libre e inmovilizada

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado:

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Q.A. Laura Huicochea Castrejón

Dirigida por:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Presidenta

Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Secretario

Firma

Dr. Carlos Regalado González
Vocal

Firma

Dra. Lucía Guadalupe Abadía García
Suplente

Firma

Dra. Flor de María Ascención González Cataño
Suplente

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario, Santiago de Querétaro, Qro., enero 2023

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que incluí los detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se desarrolló y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Laura Huicochea Castrejón', written in a cursive style.

Huicochea Castrejón Laura

DEDICATORIA

A **Dios**, por darme el privilegio y fortuna de tener una increíble familia, de darme las fuerzas para siempre salir adelante y ser resiliente.

A **mis papás, Martha y Alejandro**, por su apoyo incondicional, sus consejos y lecciones, por su cariño tan grande hacía mí, son las mejores personas de mi vida, con enorme corazón, los amo. Que Dios los bendiga siempre y les dé mucha salud. Este trabajo es de ustedes.

A mis hermanos, **Martha y Beto**, por siempre apoyarme y darme consejos, los quiero mucho.

A mi **amiga Dora**, que hubiera hecho sin tus consejos, tus lecciones de vida, tu apoyo y confianza en mí, eres grande Dora. Te quiero mucho.

A mi familia en general, por apoyarme y confiar en mis capacidades.

A todos los compañeros y doctores de la UAQ, que confiaron en mí y me brindaron todo su apoyo, mención especial a la Dra. Rocío, nunca olvidaré sus consejos en los momentos más difíciles que tuve en la maestría. Aprendí de cada uno de ustedes. Muchas gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico brindado que me permitió el desarrollo y la dedicación en tiempo completo a este proyecto (**No. CVU 899581**).

A mi comité evaluador por las aportaciones a este trabajo. Todos sus comentarios y sugerencias enriquecieron este proyecto. Muchas gracias por su apoyo y confianza.

A la Dra. Anaberta Cardador del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, por permitirme realizar parte de mis experimentos en su laboratorio.

RESUMEN

El suero ácido del yogurt griego es considerado un subproducto y un contaminante ambiental debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno, por lo que es necesario buscar soluciones, como sería su aprovechamiento para la generación de compuestos de interés industrial: los galactooligosacáridos (GOS), los cuales se sintetizan utilizando a la β -galactosidasa, la cual ha sido objeto de diferentes estrategias como la inmovilización enzimática, cuyo objetivo es dar mayor estabilidad y reutilización de la enzima frente a las condiciones experimentales. Otra tecnología de interés para la mejora en las reacciones enzimáticas, es el ultrasonido de alta intensidad, el cual, bajo ciertas condiciones, podría promover la generación de GOS. Hasta la fecha existen pocos estudios que hayan evaluado el efecto simultáneo del ultrasonido con la inmovilización de la lactasa para la producción de GOS. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del ultrasonido con la β -galactosidasa de *K. lactis* libre e inmovilizada por unión covalente para la producción de GOS utilizando como sustratos una solución de lactosa y suero ácido de yogurt griego adicionado con lactosa. Para ello, se llevó a cabo un diseño factorial 2^2 con punto al centro con tres réplicas variando la amplitud de onda (μm expresado en %) y pulsos (expresado en %) ultrasónicos. Los tratamientos con enzima libre y ultrasonido tuvieron un mayor rendimiento de GOS en comparación con la enzima inmovilizada. El tratamiento con 40% amplitud de onda y 10% pulsos presentó el mayor rendimiento de galactooligosacáridos ($35.809 \pm 1.811\%$) a los 120 min con solución de lactosa, seguido del tratamiento con suero ácido, 20% de amplitud y 10% pulsos ($28.316 \pm 0.103\%$). Estos resultados sugieren que el ultrasonido y el suero ácido de yogurt griego en conjunto tienen potencial para la obtención de rendimientos de GOS similares a los generados con solución de lactosa.

Palabras clave: beta-galactosidasa, ultrasonido, suero ácido de yogurt griego, galactooligosacáridos.

ABSTRACT

The acid whey from Greek yogurt is considered a by-product and an environmental pollutant due to its high biochemical oxygen demand, thus it is necessary to find solutions such as its use for the generation of compounds of industrial interest: galactooligosaccharides (GOS), which are synthesized using β -galactosidase. This, which has been the subject of different strategies such as enzymatic immobilization, whose objective is to provide greater stability and to reuse of the enzyme under experimental conditions. Furthermore, emergent technologies like high intensity ultrasound have recently shown interest for the improvement of enzymatic reactions which, under certain conditions, could promote both lactase activity and GOS yield. There are few studies that have evaluated the simultaneous effect of ultrasound and the immobilization of β -galactosidase for GOS production. The aim of this work was to evaluate the effect of ultrasound with free and immobilized β -galactosidase from *K. lactis* by covalent bonding for the production of GOS using lactose solution and lactose-added acid whey from Greek yogurt as substrates. For this purpose, a 2² factorial design was carried out with a center point, three replicates varying the ultrasonic wave amplitude (μm expressed in %) and duty cycle (expressed in %). The treatments with free enzyme and ultrasound had a higher GOS yield compared to the immobilized enzyme. The treatment with 40% wave amplitude and 10% duty cycle presented the highest yield of galactooligosaccharides ($35.809 \pm 1.811\%$) at 120 min with lactose solution, followed by the treatment with acid whey, 20% amplitude and 10% duty cycle ($28.316 \pm 0.103 \%$). These results suggest that ultrasound and Greek yogurt acid whey together have potential for obtaining GOS yields similar to those generated with lactose solution.

Keywords: beta-galactosidase, ultrasound, Greek yogurt acid whey, galactooligosaccharides.

ÍNDICE GENERAL	
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Generalidades del yogurt griego	3
2.1.1 Características del suero ácido de yogurt griego	5
2.1.2 Usos y aplicaciones del suero ácido de yogurt griego	6
2.1.3 Aprovechamiento de los componentes del suero ácido de yogurt griego: lactosa	7
2.1.4 Uso del suero ácido para producir galactooligosacáridos (GOS)	7
2.1.5 Obtención de GOS mediante β-galactosidasas	8
2.2 Estudios realizados para la síntesis de GOS a partir de suero ácido	10
2.3 Inmovilización de β-galactosidasa para la síntesis de GOS	14
2.3.1 Inmovilización por unión covalente	15
3. Uso de tecnologías emergentes para mejorar reacciones enzimáticas	16
3.1 Factores que afectan la actividad enzimática	19
3.1.1 Frecuencia de ultrasonido	19
3.1.2 Poder/intensidad de ultrasonido	19
3.1.3 Ciclos de trabajo de ultrasonido	19
3.1.4 Concentración de la enzima y medio de reacción	20
3.1.5 Parámetros cinéticos y termodinámicos	20
3.1.5 Inmovilización de enzimas	21
3.1.5.1 Tamaño de partícula y carga enzimática	21
3.1.6 Inmovilización de la enzima y ultrasonido	22
4. JUSTIFICACIÓN	24
5. OBJETIVOS	25

5.1	Objetivo general.....	25
5.2	Objetivos específicos.....	25
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1	Estrategia experimental	26
6.2	Materiales	27
6.3	Caracterización fisicoquímica del suero ácido de yogurt griego	27
6.4	Remoción de proteínas presentes en el suero ácido de yogurt griego 27	
6.5	Proceso de Inmovilización.....	28
6.6	Inmovilización de la β -galactosidasa.....	29
6.7	Método de Bradford (Bradford, 1976)	29
6.8	Determinación de la actividad enzimática	31
6.9	Tratamientos con ultrasonido	32
6.10	Tratamientos con ultrasonido utilizando como sustrato suero ácido de yogurt griego y solución de lactosa para la producción de galactooligosacáridos.....	34
6.11	Análisis de los productos de reacción de transgalactosilación.....	35
7.	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
8.1	Inmovilización covalente de la β -galactosidasa	40
8.2	Actividad enzimática relativa y productos de la reacción de la enzima inmovilizada y ultrasonido.....	41
8.3	Actividad enzimática relativa y productos de la reacción de la enzima libre y ultrasonido.....	53
8.4	Caracterización fisicoquímica del suero ácido de yogurt griego.....	62
8.5.	Actividad enzimática relativa y productos de la reacción con suero ácido, solución de lactosa y ultrasonido.....	63
9.	CONCLUSIONES	79
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	81

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro No.1 Diferencias en composición química del suero ácido de yogurt griego y de queso cottage. (Adaptado de Menchik et al., 2019)	5
Cuadro No.2 Curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA) (2 mg/mL) para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. (González, 2017).	30
Cuadro No.3 Curva estándar de o-nitrofenol (ONP) (1.8 g/L) para la determinación de la actividad enzimática	32
Cuadro No.4 Diseño factorial 2 ² con punto al centro	36
Cuadro No.5 Orden aleatorio en el que se corrieron los tratamientos con enzima inmovilizada y libre	37
Cuadro No.6 Tratamientos con suero ácido y solución de lactosa al 27% (m/v). ..	38
Cuadro No.7 Orden aleatorio en el que se corrieron los tratamientos con suero ácido y solución de lactosa con enzima libre y ultrasonido	38
Cuadro No.8 Resultados del proceso de inmovilización de la β -galactosidasa	40
Cuadro No.9 Abreviaturas de los diferentes tratamientos con ultrasonido	42
Cuadro No.10 Datos de rendimiento de trisacáridos con enzima inmovilizada y ultrasonido	46
Cuadro No.11 Datos de rendimiento de tetrasacáridos con enzima inmovilizada y ultrasonido.	47
Cuadro No.12 Concentración (mg/mL) de lactosa residual en los diferentes tratamientos con enzima inmovilizada y ultrasonido	49
Cuadro No.13 Concentración (mg/mL) galactosa en los diferentes tratamientos con enzima inmovilizada y ultrasonido	50
Cuadro No.14 Concentración (mg/mL) glucosa en los diferentes tratamientos con enzima inmovilizada y ultrasonido	51
Cuadro No.15 Porcentaje de trisacáridos generados en los diferentes tratamientos con enzima libre y ultrasonido.....	56

Cuadro No.16 Porcentaje de tetrasacáridos generados en los diferentes tratamientos con enzima libre y ultrasonido.....	57
Cuadro No.17 Concentración (mg/mL) de lactosa en los diferentes tratamientos con enzima libre y ultrasonido	59
Cuadro No.18 Concentración (mg/mL) de galactosa en los diferentes tratamientos con enzima libre y ultrasonido.....	60
Cuadro No.19 Concentración (mg/mL) de glucosa en los diferentes tratamientos con enzima libre y ultrasonido	61
Cuadro No.20 Datos fisicoquímicos del suero ácido de yogurt griego	63
Cuadro No.21 Abreviaturas de los tratamientos con y sin ultrasonido.....	63
Cuadro No.22 Actividad relativa (%) en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido	65
Cuadro No.23 Rendimiento de GOS (%) en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido	68
Cuadro No.24 Porcentaje de trisacáridos (%) generados en los tratamientos con y sin ultrasonido.....	70
Cuadro No.25 Porcentaje de tetrasacáridos (%) generados en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido.....	71
Cuadro No.26 Concentración de lactosa residual (mg/mL) en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido.....	73
Cuadro No.27 Concentración de glucosa (mg/mL) en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido	75
Cuadro No.28 Concentración de galactosa (mg/mL) en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura No.1 Proceso general de elaboración de yogurt griego	4
Figura No.2 Usos y beneficios del suero ácido del yogurt griego	6
Figura No.3 Mecanismo de hidrólisis y transgalactosilación de la lactosa por β -galactosidasa	9
Figura No.4 Rendimiento de GOS en función de la conversión de lactosa al máximo rendimiento en diferentes sustratos.	11
Figura No.5 Rendimiento de GOS obtenido con la β -galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i> en función de la conversión de lactosa al rendimiento máximo utilizando diferentes sustratos.....	12
Figura No.6 Gráfico de caja y bigotes del rendimiento de GOS en comparación con el medio (a =amortiguador, na = no amortiguador) y la fuente de enzima.	13
Figura No.7 Métodos generales de inmovilización de enzimas.	14
Figura No.8 Efecto del ultrasonido en reacciones enzimáticas.....	17
Figura No.9 Efecto del ultrasonido sobre la actividad enzimática de la β -galactosidasa inmovilizada de <i>K. lactis</i>	42
Figura No.10 Rendimiento de GOS para cada tratamiento con ultrasonido y enzima inmovilizada.	44
Figura No.11 Trisacáridos generados durante el tratamiento con ultrasonido y enzima inmovilizada.....	46
Figura No.12 Tetrasacáridos generados durante el tratamiento con ultrasonido y enzima inmovilizada.....	48
Figura No.13 Lactosa residual en tratamientos con ultrasonido y enzima inmovilizada.	49
Figura No.14 Galactosa liberada durante tratamientos con ultrasonido y enzima inmovilizada	50
Figura No.15 Glucosa liberada durante tratamientos con ultrasonido y enzima inmovilizada	52

Figura No.16 Efecto del ultrasonido sobre la actividad enzimática de la β -galactosidasa libre de <i>K. lactis</i>	54
Figura No.17 Rendimiento de GOS (%) para cada tratamiento con ultrasonido y enzima libre.....	55
Figura No.18 Trisacáridos generados durante el tratamiento con ultrasonido y enzima libre.....	56
Figura No.19 Tetrasacáridos generados durante el tratamiento con ultrasonido y enzima libre.....	58
Figura No.20 Lactosa residual durante tratamientos con ultrasonido y enzima libre	59
Figura No.21 Galactosa liberada durante tratamientos con ultrasonido y enzima libre	60
Figura No.22 Glucosa liberada durante tratamientos con ultrasonido y enzima libre.	61
Figura No.23 Actividad relativa (%) en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido	66
Figura No.24 Rendimiento de GOS (%) en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido	68
Figura No.25 Trisacáridos generados en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido	70
Figura No.26 Tetrasacáridos generados en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido	72
Figura No.27 Lactosa residual en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido	73
Figura No.28 Glucosa liberada en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido	76
Figura No.29 Galactosa liberada en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido	77

1. INTRODUCCIÓN

La producción de derivados lácteos como el yogurt griego, quesos frescos y queso crema, generan como subproducto suero ácido (Wherry et al., 2019). El suero representa la fase líquida de la leche, o el líquido que queda después de la remoción de grasa y caseínas, cuyo contenido mayoritario son lactosa, minerales, proteínas, ácido láctico, entre otros (Chandrapala et al., 2016). Éste se clasifica de manera general, en suero ácido y suero dulce dependiendo de la fuente de la cual se generó y de las condiciones del proceso.

El suero ácido es un subproducto de la coagulación ácida que involucra el proceso de fermentación o la adición de ácidos orgánicos como el ácido cítrico, acético, láctico o ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico y sulfúrico ((Ryan & Walsh, 2016). En el estudio realizado por Rocha et al., (2020), la demanda de productos lácteos altos en proteína y bajos en grasa, como el yogurt griego ha aumentado en los últimos años. Durante su producción, por cada 100 kg de leche se producen 33 kg de yogurt griego y se generan 67 kg de suero ácido. En 2019, el yogurt griego ocupó más de la mitad del mercado de yogurt en los Estados Unidos.

El suero ácido tiene un enorme impacto ambiental debido a su alta demanda de oxígeno, que puede conllevar al agotamiento de oxígeno en el agua (Erickson, 2017). En el estudio de Menchik et al. (2019) la demanda bioquímica de oxígeno para el suero ácido del yogurt griego fue de 45,800 a 50,500 mg/L y la demanda química de oxígeno entre 52,400 a 62,400 mg/L. Estos valores son alrededor de 30 veces más altos que el límite de efluente permitido para la industria láctea y 130 veces más que para la producción de quesos (Code of Federal Regulations (CFR), 2017). Por lo antes citado, actualmente se demanda a las industrias lácteas hacer uso de todos los componentes de la leche, sus derivados y sus subproductos mediante técnicas innovadoras que permitan darles un valor agregado (Zotta et al., 2020).

Entre los componentes del suero ácido de interés con fines tecnológicos, se encuentra la lactosa, la cual ha sido utilizada como sustrato para la síntesis de galactooligosacáridos (GOS), considerados prebióticos y que cuyas propiedades fisicoquímicas permiten su uso en la industria como humectantes, endulzantes de bajo índice glucémico, para las fórmulas infantiles o el desarrollo de nuevos productos. Se han investigado diferentes microorganismos como fuente de obtención de la lactasa, encargada de la generación de los GOS, diferentes concentraciones iniciales de lactosa, presencia de iones monovalentes y divalentes en sustratos lácteos, pH y temperatura óptimas, concentración de la enzima, inmovilización de ésta y actualmente se investiga el uso de tecnologías emergentes como el ultrasonido para mejorar la actividad catalítica de las enzimas y obtener mejores rendimientos de los productos de la reacción.

A la fecha, pocos estudios han evaluado el efecto del ultrasonido sobre la actividad enzimática de la lactasa en la síntesis de GOS utilizando el suero ácido de yogurt griego como sustrato (Fischer & Kleinschmidt, 2018). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del ultrasonido sobre el rendimiento de la reacción utilizando la lactasa de *K. lactis* inmovilizada por unión covalente, determinando los parámetros óptimos de trabajo del ultrasonido, parámetros termodinámicos y estructurales. Posteriormente, utilizar al suero ácido de yogurt griego adicionado con lactosa como sustrato para la síntesis de GOS mediante la lactasa inmovilizada con y sin ultrasonido.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades del yogurt griego

La NOM-181-SCFI-2010 define el yogurt como “producto obtenido de la fermentación de leche, estandarizada o no, por medio de la acción de microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, y teniendo como resultado la reducción del pH”.

Los yogures concentrados como el yogurt griego, son alimentos fermentados semi-sólidos derivados del paso de drenar parte del agua y componentes solubles del yogurt. Éste se obtiene generalmente mediante los métodos de centrifugación y ultrafiltración, como resultado se genera la fracción sólida y el suero ácido (Nsabimana et al., 2005).

También se puede fabricar yogurt estilo griego adicionando ingredientes secos, incluidos ingredientes lácteos proteicos u otros hidrocoloides, para proporcionar una textura espesa (Codex Alimentarius, 2003). Una de las características del yogurt griego es su alto contenido de proteína (mínimo 5.6 %), en comparación con el yogurt convencional, el cual tiene un contenido mínimo de 2.7% (Densai et al., 2013). En la Figura 1, se muestra el diagrama general de elaboración de yogurt griego.

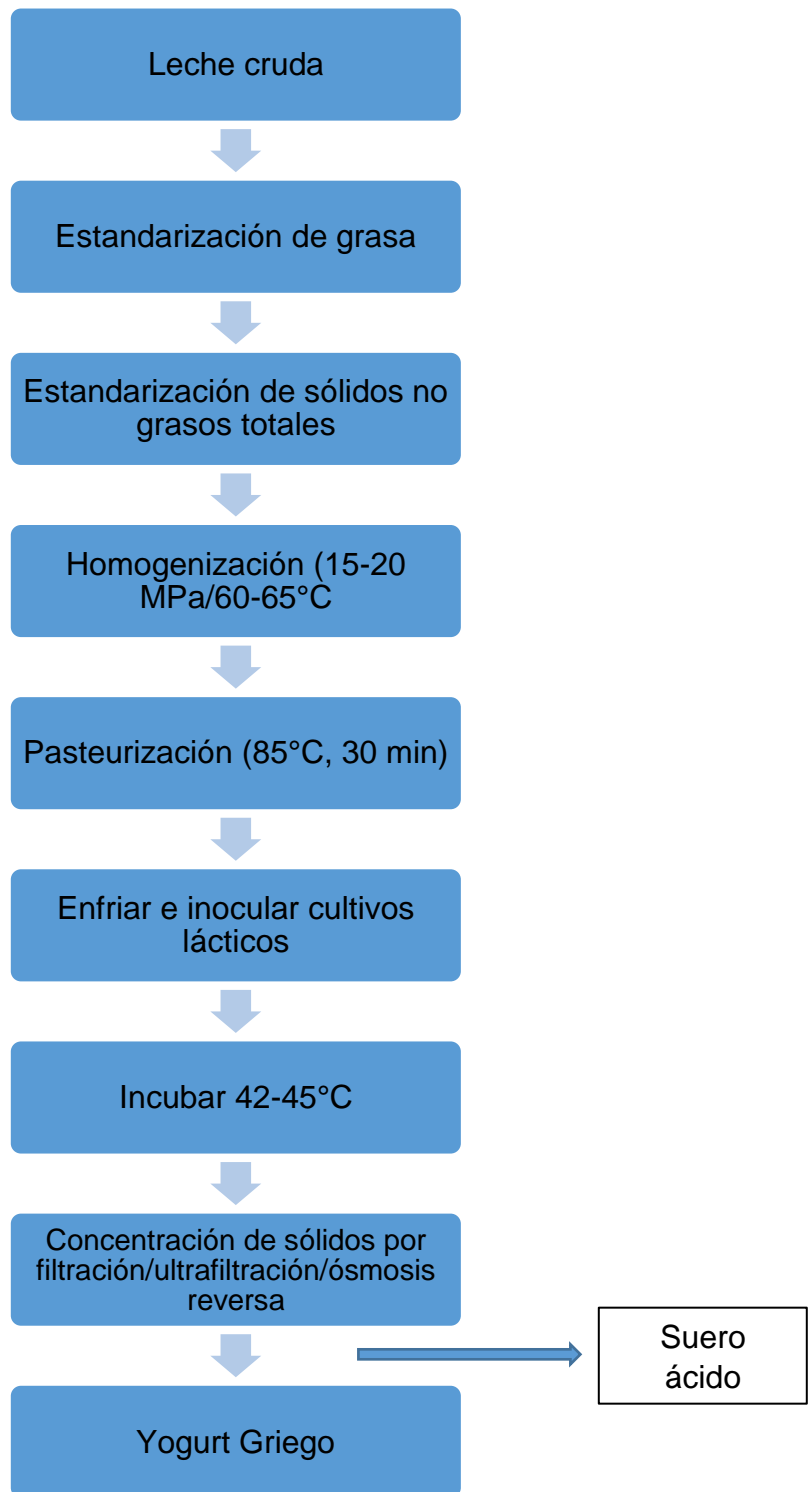


Figura No.1 Proceso general de elaboración de yogurt griego (Adaptado de Paredes et al., 2018).

2.1.1 Características del suero ácido de yogurt griego

La composición del suero ácido depende de varios factores, como la procedencia de la leche, el tipo de queso o yogurt que se procesa, tratamiento térmico de la leche, almacenamiento después del ordeño, entre otros. En el estudio realizado por Menchik et al. (2019), se analizaron y compararon muestras de suero ácido de queso cottage (QC) y yogurt griego (YG) de diferentes compañías lácteas en Nueva York entre los años 2015-2016 y se encontraron las características en el Cuadro 1.

Cuadro No.1 Diferencias en composición química del suero ácido de yogurt griego y de queso cottage. (Adaptado de Menchik et al., 2019)

Componente	Suero ácido de yogurt griego	Suero ácido de queso cottage
<i>Lactosa</i>	3.5 %	2.1 %
<i>Proteína cruda</i>	1.71 a 3.71 mg/g	5.05 mg/g
<i>pH</i>	4.21-4.48	4.35-4.51
<i>Ácido láctico</i>	0.65%	0.37%
<i>Acidez titulable</i>	0.43%	0.23%
<i>Calcio</i>	121 mg/100g	69.9 mg/100g
<i>Sodio</i>	38.7 mg/100g	23.1 mg/100g
<i>Magnesio</i>	10.6 mg/100g	6.78 mg/g
<i>Potasio</i>	164-169 mg/100g	95.2 mg/100 g
<i>Fosfatos</i>	66.8 mg/100g	95.5 mg/100g
<i>Cloruros totales</i>	0.94%	0.06%

2.1.2 Usos y aplicaciones del suero ácido de yogurt griego

En años recientes, compañías como Chobani y Danone han investigado formas de aprovechar el suero ácido proveniente de la elaboración de yogurt griego. En 2014, la compañía Chobani, instaló un equipo de filtración por ósmosis inversa, con el objetivo de recuperar el agua proveniente del suero ácido, reutilizarla y además reducir costos en el transporte del suero en polvo concentrado. Por otro lado, General Mills desarrolló un método para producir concentrado de suero de yogurt neutralizado con un pH de 6.0, el cual puede utilizarse en una variedad de productos alimenticios (Smith et al., 2014). General Mills también desarrolló un método para sintetizar fibra soluble a partir de la lactosa del suero ácido mediante un proceso enzimático (González & Smith, 2014). La empresa Arla Foods Ingredientes propuso la adición de sus proteínas de suero de leche Nutralic® para eliminar el paso de separación del suero ácido durante la producción de yogurt griego (Arla Foods Ingredientes, 2019).

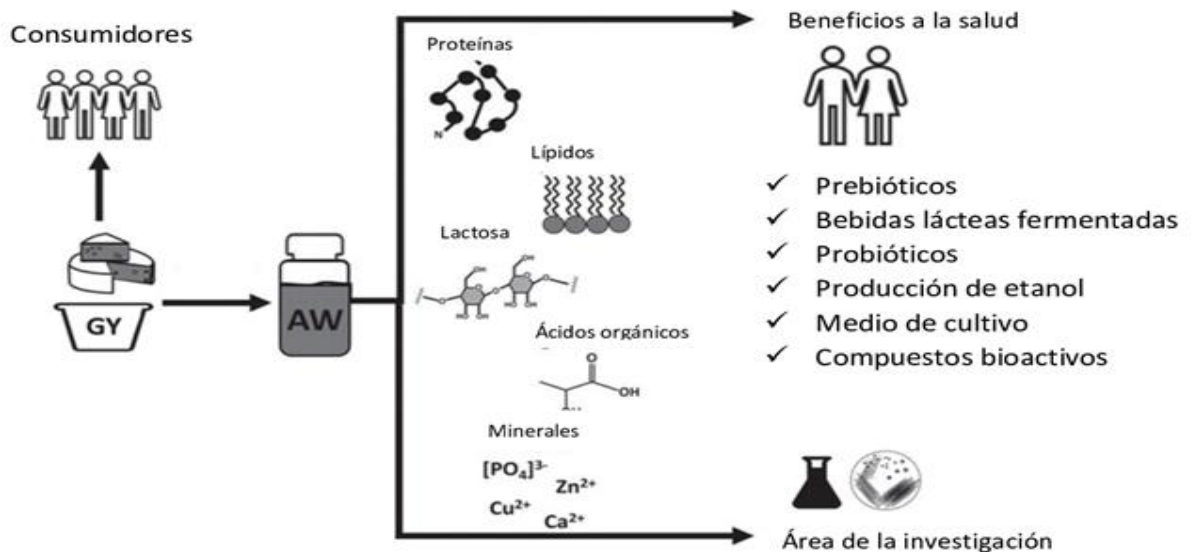


Figura No.2 Usos y beneficios del suero ácido del yogurt griego

(Adaptada de Rocha et al., 2020).

2.1.3 Aprovechamiento de los componentes del suero ácido de yogurt griego: lactosa

El principal carbohidrato en la leche de los mamíferos es la lactosa, un azúcar reductor, debido a que el grupo aldehído del residuo de glucosa se encuentra libre y puede actuar como donador de protones. Está compuesto de galactosa y glucosa unidos mediante un enlace glucosídico (β 1–4). A través de un enlace hemiacetal, estos monosacáridos forman una estructura de anillo piranosa con un centro quiral que da la posibilidad de dos formas esteroisoméricas: α y β . Los isómeros de lactosa presentan diferentes propiedades, siendo las más importantes las diferencias que presentan en su rotación específica ($+89^\circ$ y $+35^\circ$ para α y β - lactosa, respectivamente) y su solubilidad en agua (Walstra, 2006).

2.1.4 Uso del suero ácido para producir galactooligosacáridos (GOS)

Los galactooligosacáridos (GOS) son compuestos de 2-10 unidades de monosacáridos (galactosa, glucosa y fructosa). Éstos se pueden obtener por procesos de extracción y reacciones enzimáticas. Dependiendo de la fuente (vegetal o láctea) se pueden obtener GOS con enlaces α ó β -glucosídicos. Si la fuente es de origen vegetal, como las semillas de plantas, se obtienen α -GOS; destacando la rafinosa y la melibiosa, cuyas características es su unidad terminal de fructosa en su cadena de monosacáridos (Grabarics et al., 2017).

Cuando el sustrato es la lactosa, se obtienen β -GOS, también conocidos como oligogalactosas u oligolactosas, cuya unidad terminal puede ser una glucosa ó galactosa unida a través de enlaces β (1-4), β (1-6), β (1-3), β (1-2).

Los GOS son considerados prebióticos, cuya definición ha ido cambiando con el tiempo pero que, en general, se definen como “sustratos o sustancias utilizadas selectivamente por los microorganismos del hospedador confiriéndole beneficios a la salud de éste”. Debido a la complejidad en las interacciones entre los prebióticos

y las bacterias benéficas del hospedero, es necesario realizar estudios proteómicos y glucómicos (término análogo a la genómica y proteómica, que se refiere al estudio de los carbohidratos, abarcando los aspectos genéticos, fisiológicos, entre otros) para conocer los mecanismos por los cuales se llevan a cabo estas interacciones (Hutkins et al., 2016).

En la industria de los alimentos se han utilizado los GOS con fines tecnológicos: como endulzantes bajos en calorías, humectantes en productos de repostería y panadería, para la formulación de productos lácteos, confitería, para fórmulas infantiles, desarrollo de bebidas fermentadas y adicionados como prebióticos.

Los GOS que han sido estudiados por sus efectos prebióticos y por su semejanza a los oligosacáridos presentes en la leche materna, son los trisacáridos y tetrasacáridos sintetizados a partir de la lactosa (Torres et al., 2010).

2.1.5 Obtención de GOS mediante β -galactosidasas

Los β -GOS, se pueden sintetizar a partir de la lactosa, mediante reacciones de transgalactosilación utilizando a la β -galactosidasa como biocatalizador. Esta enzima puede provenir de diferentes fuentes: hongos como *Aspergillus oryzae*, levaduras como *Kluyveromyces lactis*, *Rhodotorula spp.*, bacterias como *Lactobacillus spp* o *Bacillus circulans*. Las β -galactosidasas tienen actividad de hidrolasas, por lo que se han utilizado para la hidrólisis de lactosa en productos lácteos libres de lactosa. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, estos biocatalizadores pueden utilizarse para la síntesis de GOS mediante reacciones de transgalactosilación (Martins et al., 2019).

Esta enzima forma un complejo con la lactosa, posteriormente, libera una molécula de glucosa y se forma un complejo enzima-galactosa (E-glc). Si en el medio de reacción se tiene una alta concentración de lactosa, ésta sirve como donador y como aceptor de galactosa a través de un ataque nucleofílico de la lactosa hacia el complejo E-glc formándose cadenas de GOS. Si, por el contrario, el agua está en

mayor proporción, ésta llevará a cabo el ataque nucleofílico y se favorecerá la hidrólisis de la lactosa como se muestra en la Figura 3.

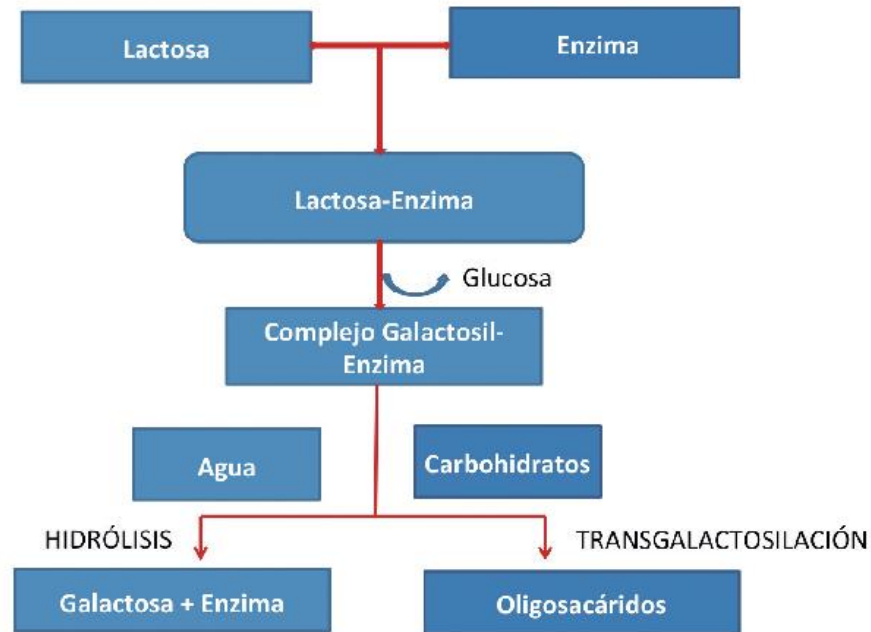


Figura No.3 Mecanismo de hidrólisis y transgalactosilación de la lactosa por β -galactosidasa
(Adaptado de Corredera et al., 2014).

Debido a que las dos reacciones se llevan a cabo simultáneamente, se han diseñado modelos matemáticos para evaluar los parámetros cinéticos de la reacción para la síntesis de GOS como son la concentración inicial de lactosa, el origen de obtención de la enzima, la composición del medio, los productos de la reacción (glucosa, galactosa, GOS y lactosa residual) y sus interacciones, para determinar cuáles de estos factores son los que influyen en el proceso de transgalactosilación.

Entre los factores que más influyen en el rendimiento, composición y tamaño de GOS se encuentra, la concentración inicial de lactosa, presencia de inhibidores o activadores para la actividad enzimática y la fuente de obtención de la enzima (Lamsal, 2012). El pH debe fijarse con base en la estabilidad y actividad de la enzima. Para la lactasa de *A. oryzae*, es más eficaz a pH ácido que neutro ,

mientras que la lactasa de *K. lactis* es más eficiente a pH neutro. En la mayoría de los estudios realizados sobre la lactasa de *K. lactis*, el sodio, amonio, magnesio y potasio actúan como activadores de la lactasa mientras que el calcio disminuye su actividad catalítica (Fischer & Kleinschmidt, 2015).

Es importante considerar que el suero y los permeados de leche contienen diferentes minerales que pueden tener un efecto sinérgico y compensar el efecto negativo del calcio en la actividad enzimática. Por ejemplo, en el estudio de Fischer & Kleinschmidt, (2018), la β -galactosidasa de *K. lactis* no mostró actividad catalítica en un medio de reacción libre de cationes monovalentes (amortiguador: 0.5 mM Trizma con 0.2 mM Mn^{2+} a pH 6.6), enfatizando el hecho que la presencia de sodio, magnesio o amonio es fundamental para esta enzima porque en su centro catalítico la enzima requiere de estos cofactores para su actividad enzimática.

2.2 Estudios realizados para la síntesis de GOS a partir de suero ácido

En 2015, Fisher & Kleinschmidt evaluaron la síntesis de GOS utilizando dos sueros de leche: ácido y dulce, una solución de lactosa y dos β -galactosidasas provenientes de *A. oryzae* y *K. lactis*, respectivamente. Determinaron los parámetros cinéticos óptimos para la actividad enzimática de cada enzima para la síntesis de GOS, además de evaluarse la influencia de varios cationes (sodio, magnesio, amonio, calcio, potasio, cloruros) en diferentes concentraciones sobre su actividad enzimática. Se encontró que para la lactasa de *A. oryzae* la presencia de cationes tuvo poca influencia para la síntesis de GOS en los tres sustratos utilizados, sin embargo, el rendimiento final de GOS fue menor en suero ácido que en solución de lactosa, mientras que para la lactasa de *K. lactis*, tuvo una fuerte dependencia el tipo de catión en el medio de reacción. El magnesio tuvo un moderado efecto como activador, al igual que el potasio, amonio y sodio. El calcio no influyó en la actividad de la enzima. El tipo y rendimiento de GOS varió dependiendo del sustrato utilizado y de la concentración inicial de lactosa. Para *K. lactis* el rendimiento máximo se obtuvo cuando se utilizó una concentración inicial de lactosa de 300 g/L y suero

ácido como sustrato, aunque la síntesis fue más lenta y el rendimiento máximo se dio después de 3.5 h en comparación con la solución de lactosa (30 min).

En el estudio realizado por Fischer & Kleinschmidt (2018), compararon y analizaron lactasas de diferentes microorganismos en diferentes medios de reacción y condiciones experimentales. En su estudio, la mayoría de los reportes realizados hasta el 2018 se han enfocado en suero dulce, leche y sus respectivos permeados y muy pocos estudios sobre el suero ácido y el permeado de suero ácido.

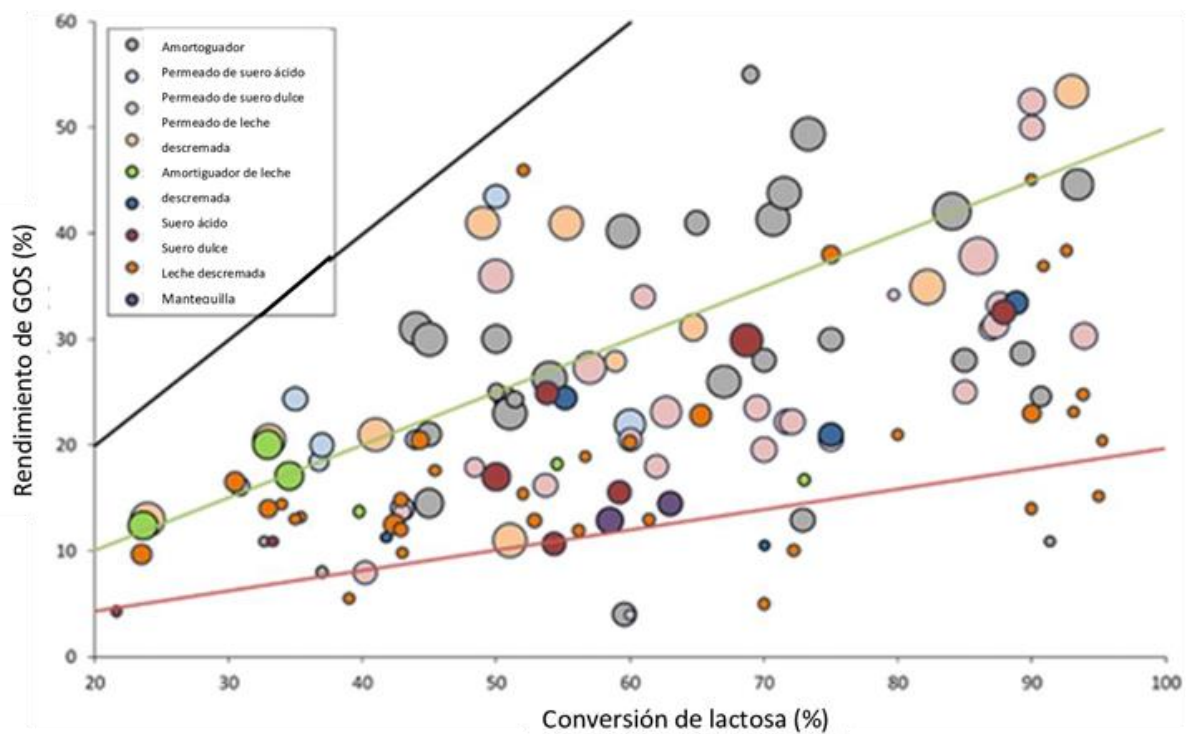


Figura No.4 Rendimiento de GOS en función de la conversión de lactosa al máximo rendimiento en diferentes sustratos.

El área de la burbuja representa la concentración inicial de lactosa, las líneas representan la afinidad por la transgalactosilación expresada como porcentaje de lactosa convertida en GOS (negro: 100%, verde: 50%, rojo: 20%). (Adaptada de Fischer & Kleinschmidt, 2018).

En la Figura 4 se observa que no hubo una distinción clara entre las soluciones amortiguadoras y los sustratos lácteos en el rendimiento de GOS. También se aprecia los bajos rendimientos de GOS obtenidos cuando se utiliza suero dulce o ácido como sustrato, aun utilizando una concentración inicial de lactosa alta.

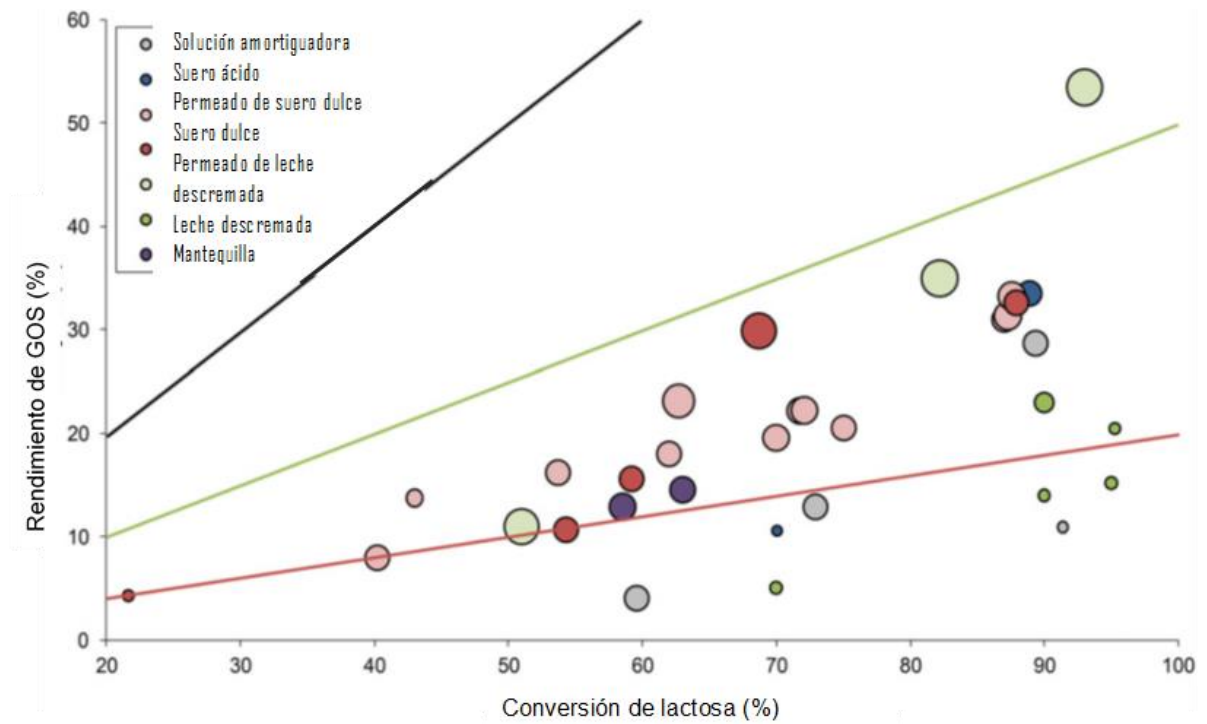


Figura No.5 Rendimiento de GOS obtenido con la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* en función de la conversión de lactosa al rendimiento máximo utilizando diferentes sustratos.

El área de la burbuja representa la concentración inicial de lactosa, las líneas representan la afinidad por la transgalactosilación expresada como porcentaje de lactosa convertida en GOS (negro: 100%, verde: 50%, rojo: 20%). (Adaptada de Fischer & Kleinschmidt, 2018).

Usando la β -galactosidasa de *K. lactis*, la actividad de transgalactosilación es baja con proporción de GOS / lactosa convertida por debajo de 0.5 para la mayoría de los casos (Figura 5). Sin embargo, al comparar los rendimientos obtenidos en solución amortiguadora y los sustratos lácteos, debido a los componentes de la leche, mejora su actividad de transferencia y los rendimientos de GOS. Esto es especialmente evidente cuando se compara la solución amortiguadora, el suero

dulce y su permeado con concentraciones iniciales de lactosa similares alrededor del 20%. Sin embargo, debido a las diferencias en la composición de cada sustrato lácteo se han obtenido resultados diferentes en el rendimiento de GOS.

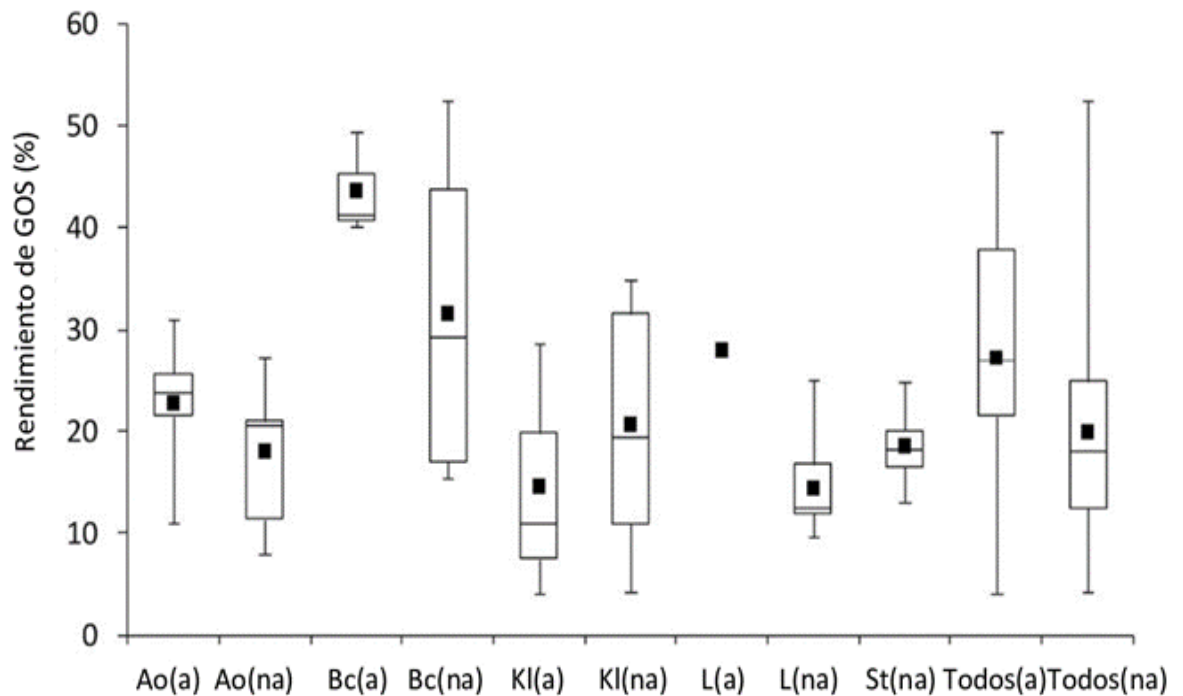


Figura No.6 Gráfico de caja y bigotes del rendimiento de GOS en comparación con el medio (a =amortiguador, na = no amortiguador) y la fuente de enzima.

(Ao = *A. oryzae*, Bc = *B. circulans*, Kl = *K. lactis*, L = *Lactobacillus sp.*, St = *S. thermophilus*, Todos= contiene todos los datos, incluidos también los valores obtenidos con *A. aculeatus*, *B. bifidum*, *E. coli* y *K. marxianus*), cuadrados negros = valor medio, bigotes = valor más bajo / más alto (Adaptado de Fischer & Kleinschmidt, 2018).

Aunque el rendimiento de GOS utilizando la β -galactosidasa de *K. lactis* no sea alto como el que se obtiene con *B. circulans* en sustratos lácteos, se presenta la misma tendencia y predicen una mayor actividad de transferencia de la enzima de *K. lactis* en los líquidos lácteos, al mismo tiempo que también resulta en un mayor rendimiento de GOS (Figura 6).

Por lo tanto, la composición de los GOS depende de la enzima utilizada, de la concentración inicial de lactosa, del sustrato utilizado, de la temperatura y de la presencia de inhibidores y activadores. El uso de sustratos lácteos reduce la fracción de GOS de cadena media-larga (4 a 6 unidades de galactosa-glucosa).

2.3 Inmovilización de β -galactosidasa para la síntesis de GOS

Uno de los principales desafíos en el estudio de biocatalizadores, es el mantenimiento de la estabilidad estructural de la enzima durante las reacciones enzimáticas. Con el fin de mejorar la estabilidad de la enzima, se han desarrollado varias técnicas para obtener enzimas inmovilizadas que tengan una eficiencia funcional (Datta et al., 2013). En general, la inmovilización se refiere al hecho de limitar o retardar el movimiento. La enzima inmovilizada está confinada en un espacio definido, que retiene su actividad catalítica y puede ser reutilizada de forma continua en comparación con las enzimas solubles, la inmovilización permite que el biocatalizador sea fácilmente separado de la reacción. Existen cuatro métodos generales para la inmovilización de enzimas que se muestran en la Figura 7.

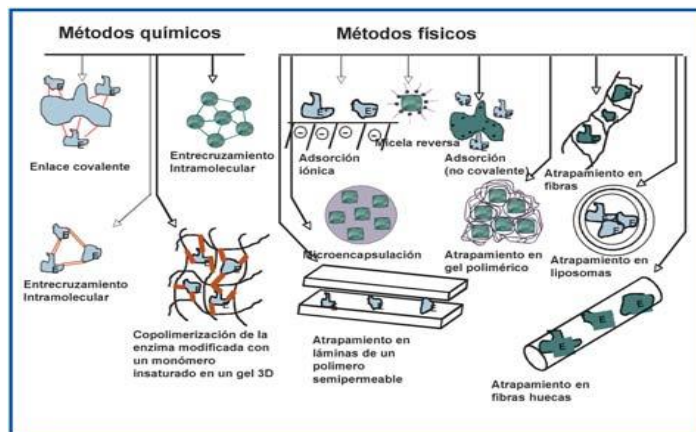


Figura No.7 Métodos generales de inmovilización de enzimas.
(Adaptado de Montero, 2021).

2.3.1 Inmovilización por unión covalente

Esta técnica se basa en el entrecruzamiento de la enzima y el material del soporte produciendo un enlace fuerte y estable. El enlace covalente es formado entre el grupo funcional de la matriz del soporte y la superficie de la enzima que contiene residuos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos que intervienen en la formación del enlace, son los grupos amino ($-NH_2$) de la lisina o la arginina, el grupo carboxilo ($-COOH$) del ácido aspártico o ácido glutámico, los grupos sulfhidrilo de cisteína y los grupos hidroxilo ($-OH$) de la serina o treonina

Los materiales utilizados en esta técnica incluyen la poliacrilamida, agarosa y sílica. La unión covalente de la enzima con el material del soporte, requiere de dos pasos: la activación del material de soporte con la adición de un compuesto reactivo y el segundo es la modificación del esqueleto del polímero para activar la matriz. El paso de activación genera un grupo electrofílico en el material del soporte, de esta forma el soporte reacciona con los nucleófilos de las proteínas. Por ejemplo, el glutaraldehído es activado cuando reacciona con los grupos amino de las proteínas (Nisha et al., 2012).

La unión covalente es la técnica más estudiada en el campo de la inmovilización de enzimas, debido a una alta estabilidad del biocatalizador frente a las condiciones de trabajo requerida en los procesos industriales en alimentos (Hirsh et al., 2010), ya que, en algunos casos existe un requerimiento estricto de ausencia de enzimas en el producto final. La principal ventaja frente a otros métodos físicos y químicos de inmovilización, además de la estabilidad, es la reutilización del material inmovilizado, así como su fácil separación del medio.

3. Uso de tecnologías emergentes para mejorar reacciones enzimáticas

Las tecnologías emergentes se han aplicado al procesamiento de alimentos para obtener productos inocuos, nutritivos y mínimamente procesados. El ultrasonido (US) ofrece un gran potencial para mejorar y acelerar los procesos sin dañar la calidad de los alimentos. Las aplicaciones de esta tecnología en la industria alimentaria, incluida la industria láctea, siguen siendo objeto de investigación.

El ultrasonido se define como ondas sonoras de alta frecuencia, arriba del umbral de audición humana (20 kHz), la aplicación de ultrasonido puede dividirse en alta intensidad - baja frecuencia ($I = 10\text{--}1000 \text{ W / cm}^2$ y $F = 20\text{--}100 \text{ kHz}$) y baja intensidad - alta frecuencia ($I < 1 \text{ W / cm}^2$ y $F > 1 \text{ MHz}$).

El ultrasonido genera presiones altas y bajas de manera alterna, lo que provoca ciclos de compresión y expansión (rarefacción) en el medio. La rarefacción conduce a la formación de burbujas de cavitación, que son pequeñas burbujas de vacío que se producen cuando se ejerce la presión hasta que no pueden absorber más energía y la burbuja de cavitación sufre un colapso implosivo que libera energía (Carrillo et al., 2021).

En las reacciones químicas, el efecto del ultrasonido se debe principalmente a la cavitación, la formación, crecimiento, implosión y colapso de burbujas (cavidades) generadas en los líquidos que liberan grandes cantidades de energía local y un aumento en la presión del medio. Como consecuencia, se inducen cambios fisicoquímicos en el medio y los solutos presentes en éste por la formación de turbulencias locales, promoviendo el transporte y la transferencia de masas (Nadar et al., 2017).

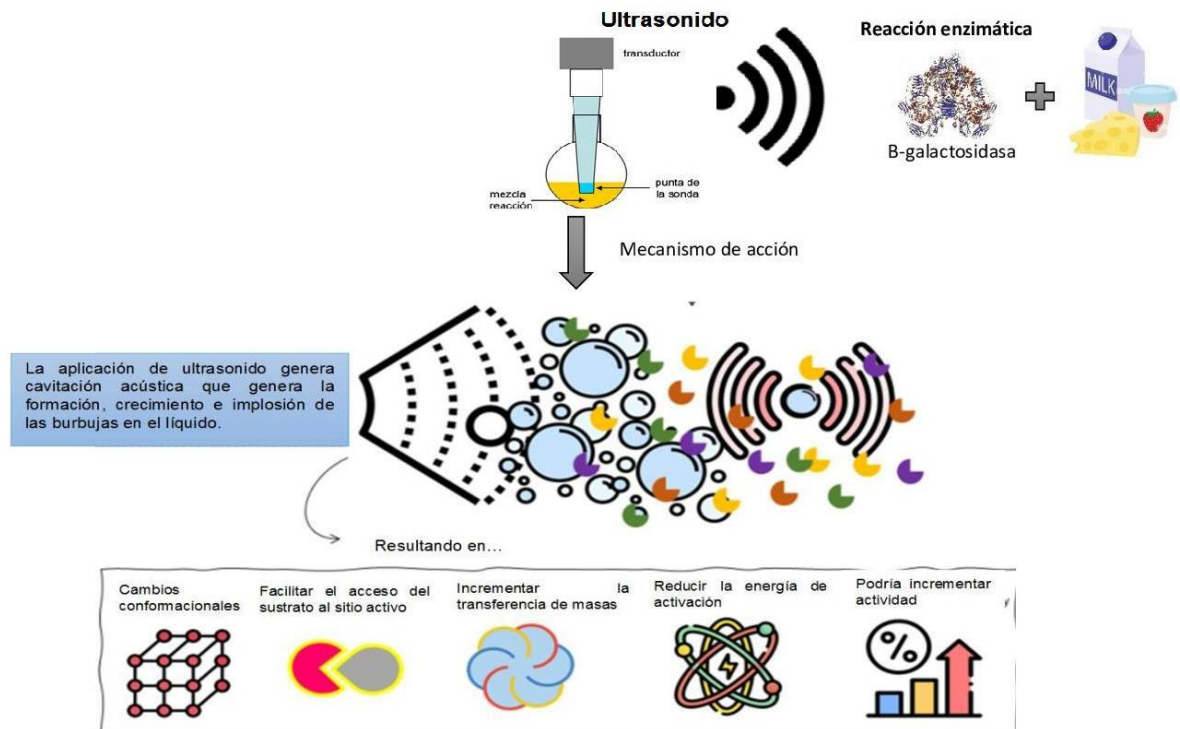


Figura No.8 Efecto del ultrasonido en reacciones enzimáticas.
(Adaptado de Silvello et al., 2022).

Para la catálisis enzimática, este proceso puede acelerar las reacciones enzimáticas. Dependiendo de los parámetros de ultrasonido elegidos, puede usarse para la inactivación de enzimas (altas frecuencias, mayor a los 30 kHz). Por el contrario, si el objetivo es modificar las propiedades fisicoquímicas de las enzimas y proteínas sin alterar su integridad estructural, se ha usado US de baja frecuencia. Cuando se utilizan bajas frecuencias de US, se inducen cambios en la estructura tridimensional de la enzima, perturbando sus dominios y como consecuencia se afecta su actividad enzimática (Duan et al., 2011).

La enzima es sensible a las irradiaciones US, que puede activarla o desactivarla. Esto depende de las propiedades fisiológicas y químicas de la enzima, de los parámetros operacionales de ultrasonido (intensidad, poder y frecuencia). Para cada enzima deben de optimizar estos parámetros de US para activar la

conformación de ésta. Existen dos tipos de equipo de ultrasonido utilizados a nivel industrial y a escala laboratorio: con sondas ultrasónicas y baños ultrasónicos. La mayoría de los estudios hasta 2017, han evaluado la eficacia del US en la actividad enzimática mediante la utilización de sondas ultrasónicas (Nadar et al., 2017). Una de las características del equipo con sondas es que permite introducir la energía acústica directamente en la mezcla de reacción a diferencia de los baños de ultrasonido en los cuales la energía se transfiere a través del agua y de las paredes del matraz. El método consiste en introducir la punta de la sonda en la mezcla. Las sondas ultrasónicas usan frecuencias alrededor de los 20 kHz.

Un ejemplo del efecto del ultrasonido en las reacciones enzimáticas es el estudio realizado por Rico et al., (2018), quienes evaluaron el efecto del ultrasonido sobre la generación de GOS y ácido glucónico (GA) en un sistema multienzimático utilizando la lactasa de *K. lactis*. Se encontró que la actividad y los cambios estructurales de la lactasa no tuvieron un efecto significativo cuando se utilizó ultrasonido a 30% de amplitud, 30% pulsos (3 s encendido/7 s apagado) en un ultrasonido tipo sonda (frecuencia de 20 kHz), solución de lactosa al 40% y una temperatura de 40°C. Sin embargo, se logró obtener un rendimiento máximo de GOS del 45%, principalmente trisacáridos y disacáridos. Finalmente, las muestras de β -gal exhibieron una distribución bimodal en todos los tratamientos que apenas cambia con el tiempo. Aunque la enzima sigue un patrón similar bajo tratamiento convencional y con ultrasonido se puede observar un ligero aumento en las muestras tratadas con US después de 60 y 300 min. Esto indica que la enzima podría haber sufrido una alteración estructural con la presencia del ultrasonido.

Como se puede observar, dependiendo de la enzima se tiene que optimizar las condiciones de trabajo de US (frecuencia, intensidad/poder acústico, ciclos de trabajo, tipo de ultrasonido) además de evaluar el pH y la temperatura óptima de la enzima con el fin de promover su actividad catalítica. A continuación, se explicará cada uno de los parámetros involucrados en el efecto del ultrasonido sobre la reacción.

3.1 Factores que afectan la actividad enzimática

3.1.1 Frecuencia de ultrasonido

El efecto cavitacional depende de la frecuencia de irradiación y el poder acústico depende directamente de la frecuencia usada (W/cm^2). Optimizar estos parámetros es importante para tener un efecto positivo en la actividad catalítica. Wang et al., (2011) estudiaron el efecto de diferentes frecuencias de US (18, 20, 24, y 29 kHz) en la actividad de la celulasa. Utilizando frecuencias de 20 y 24 kHz la actividad enzimática aumentó, mientras que a una frecuencia mayor a 29 kHz disminuyó su actividad. Debido a un aumento en el área superficial de las enzimas, incrementa la absorción de energía ultrasónica que afecta su estabilidad resultando en un cambio en la actividad catalítica. Si se aumenta la frecuencia, el calor local generado puede desnaturalizar a la enzima.

3.1.2 Poder/intensidad de ultrasonido

Utilizar una intensidad moderada con frecuencias bajas, genera una cavitación estable que induce fuerzas oscilatorias que cambian la estructura tridimensional de la enzima y como consecuencia su actividad catalítica, debido a la ruptura de los enlaces débiles que mantienen estable esta estructura. Sin embargo, si se aumenta la intensidad, la actividad enzimática podría disminuir o perderse por daños causados en la cadena polipeptídica. Además, a intensidades altas aumenta la temperatura y presión local generando radicales libres que reaccionan con los residuos de aminoácidos de la cadena polipeptídica inactivando a la enzima (Szibó & Csizar, 2013).

3.1.3 Ciclos de trabajo de ultrasonido

Se considera un parámetro crítico puesto que, permite controlar el tiempo de exposición al que es sometida la enzima a US (Nadar, et al., 2017). A menores ciclos de trabajo, se puede maximizar la actividad enzimática en un período más

largo de tiempo. La fijación de los ciclos dependerá de las características de la enzima y del medio de reacción.

3.1.4 Concentración de la enzima y medio de reacción

La concentración de las enzimas juega un papel importante en el impacto de los efectos de la sonicación. Jadhav & Gogate, (2014) estudiaron el efecto de la concentración de enzimas en su actividad utilizando ultrasonido. A una concentración de enzima muy baja, las moléculas de la enzima se distribuyen aleatoriamente con muy poca densidad que no permite interactuar eficazmente con las microcorrientes generadas debido a la cavitación acústica de forma continua. Por otro lado, si se supera la concentración óptima de enzima, el exceso de moléculas de enzima obstaculiza el proceso de transferencia de energía, lo que reduce la energía disponible para los eventos cavitacionales (Nadar et al., 2017).

3.1.5 Parámetros cinéticos y termodinámicos

La velocidad máxima (V_{max}) indica el límite de saturación de la enzima por el sustrato, es decir, cuando la enzima ya tiene saturados todos sus sitios activos por el sustrato. La constante de Michaelis-Menten (K_m) mide la afinidad de la enzima por el sustrato. La irradiación ultrasónica puede cambiar la estructura de la enzima y la exposición de su centro catalítico y como resultado un cambio en la afinidad del sustrato hacia el sitio activo de la enzima, estos cambios pueden atribuirse al aumento de presión local como resultado del fenómeno de cavitación (Nadar et al., 2017). Por otro lado, la estabilidad termodinámica de la enzima es importante para su actividad catalítica. La energía de activación (E_a) es un parámetro termodinámico que mide la cantidad mínima de energía necesaria para impulsar a que los reactivos superen el estado de transición para formar el producto. La E_a se determina mediante el ajuste lineal de la ecuación de Arrhenius.

Leaes et al. (2013) encontraron que el uso de ultrasonido era favorable tanto para la alfa amilasa y amiloglucosidasa, ya que la E_a se redujo en alrededor del 60 y 40%

respectivamente después de la sonicación. Se ha observado que ΔG disminuye después de tratamiento ultrasónico lo que indica la mejora en la actividad debido al cambio favorable en la conformación enzimática. Además, después del tratamiento US, el valor de ΔH disminuye, lo que podría atribuirse a la ruptura de enlaces no covalentes “resultando en cambios conformacionales irreversibles en la enzima que facilitan la estabilización de ésta” (Jadhav & Gogate, 2014).

3.1.5 Inmovilización de enzimas

3.1.5.1 Tamaño de partícula y carga enzimática

En general, una de las desventajas de la inmovilización es la pérdida de actividad enzimática durante el proceso que conlleva a limitaciones en la transferencia de masas (restricciones de difusión) para el transporte del sustrato en el medio de reacción hacia la fase sólida (biocatalizador) y del transporte de los productos a la fase líquida. La pérdida de actividad durante la inmovilización puede deberse a una distorsión de la estructura enzimática debido a las fuertes interacciones enzima-soporte que pueden producir impedimentos estéricos y bloquear el sitio activo (Bernal et al., 2012).

Dependiendo del tipo de inmovilización, las restricciones de difusión pueden ser externas cuando la enzima se une a la superficie externa del soporte (es decir, un soporte no poroso), y/o interna cuando la enzima está inmovilizada dentro de la estructura del soporte, las cuales se ven afectados por el tipo de material, forma, tamaño, microestructura y naturaleza fisicoquímica del soporte, y la carga enzimática y distribución dentro de ella (Hussain et al., 2018; Valencia et al., 2010). Se ha demostrado que el impacto de estas restricciones en el rendimiento del biocatalizador se puede ajustar modificando el tamaño de partícula del biocatalizador y la carga enzimática.

El rendimiento de inmovilización también puede reducirse al incrementar la carga enzimática debido a que se satura el soporte. Del mismo modo, la retención de la actividad puede verse reducida.

Este efecto puede atribuirse a algunos factores: (a) el bloqueo del sitio activo por el propio efecto de inmovilización, (b) la presencia de moléculas vecinas de enzima que reducen el acceso del sustrato a los sitios activos, (c) la unión aleatoria de proteínas en la superficie de las partículas que pueden sufrir cambios en la conformación de la enzima a una menos activa, y (d) la sobrecarga de soporte, con la consiguiente formación de una multicapa de moléculas de enzimas en la superficie de las partículas (Klein et al., 2012). Las moléculas de enzima inmovilizadas en la superficie del soporte podrían dificultar el acceso del sustrato a los sitios activos de las enzimas que podrían unirse a la superficie interna de las macropartículas.

Estos factores han sido estudiados por Suárez et al. (2018), quienes concluyen que el predominio de transgalactosilación o hidrólisis se puede ajustar manipulando tanto la carga enzimática como el tamaño de partícula del biocatalizador (en este caso la β -galactosidasa). Si se aumenta el tamaño de partícula, la carga de enzimas o ambos, una mayor concentración de lactosa inicial será necesaria para que la reacción de transgalactosilación prevalezca sobre la reacción de hidrólisis en comparación con el mismo soporte, pero de menor tamaño de partícula.

3.1.6 Inmovilización de la enzima y ultrasonido

La inmovilización mejora los parámetros operativos (temperatura y pH), estabilidad térmica, reutilización y estabilidad de almacenamiento del biocatalizador (Hanefeld, et al., 2013; Dalagnol et al., 2017). Hay tres formas de emplear el ultrasonido durante la inmovilización: (i) tratamiento con ultrasonido antes de la inmovilización, (ii) tratamiento con ultrasonido durante inmovilización y (iii) tratamiento con ultrasonido después de la inmovilización.

Ma et al. (2017) evaluaron a la pectinasa inmovilizada por entrecruzamiento con alginato de sodio y glutaraldehído en presencia de ultrasonido. Después del tratamiento con ultrasonido, la actividad de la pectinasa aumentó en un 30.05% con respecto al control, además de un rendimiento de inmovilización del 92.28% y un menor tiempo del proceso vs la enzima inmovilizada sin ultrasonido. Por otro lado, se mejoraron los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m), resultado de una mejor eficiencia catalítica y una mayor afinidad hacia el sustrato. Además, la pectinasa tratada con ultrasonido mostró una mayor estabilidad térmica en el intervalo de 40 a 60 °C en comparación con la pectinasa sin ultrasonido. Estos resultados muestran que, bajo condiciones específicas para cada enzima, el ultrasonido podría mejorar el proceso de inmovilización aumentando el rendimiento y reduciendo el tiempo del proceso.

En el 2017, Ladole et al., llevaron a cabo una hiperactivación de celulasa inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas bajo la influencia del ultrasonido. Después del proceso de inmovilización, las celulasas se expusieron a niveles óptimos de condiciones ultrasónicas (6.3 W durante 6 min). Se encontró que la actividad catalítica de la enzima inmovilizada mejoraba casi en 3.4 veces con respecto al control.

4. JUSTIFICACIÓN

Los galactooligosacáridos (GOS) son un grupo de oligosacáridos, que se pueden obtener a través de reacciones de transgalactosilación utilizando una β -galactosidasa como biocatalizador y lactosa como sustrato a partir de derivados lácteos como el suero ácido de yogurt griego. El uso del suero ácido para la obtención de estos compuestos permite generar subproductos con valor agregado y evitar la contaminación al ser desechado en los efluentes del proceso. En las últimas décadas ha ido en aumento el interés por la síntesis de GOS debido a las propiedades prebióticas y tecnológicas que éstos poseen, pudiendo ser incorporados a diferentes matrices alimentarias. Para la obtención de estos compuestos se utiliza la lactasa libre, cuya estabilidad, reúso y recuperación dependen de las condiciones de trabajo. Es por esto, que se han implementado estrategias para estabilizar la enzima durante el proceso, como es la inmovilización, la cual ofrece la ventaja de la reutilización enzimática, mayor estabilidad versus la enzima libre y la fácil separación del medio de reacción.

Por otro lado, el ultrasonido es una tecnología emergente que, bajo ciertos parámetros ultrasónicos induce, entre otros fenómenos físicos, la cavitación, la cual trae como consecuencia diversos efectos en los solutos presentes en el medio de reacción, particularmente en las enzimas, promoviendo una mayor interacción de la enzima ya que reduce la resistencia del sustrato a difundirse en la matriz, incrementando la transferencia de masa, homogeneización del medio de reacción, evitando la agregación de los solutos presentes, y cambios estructurales de la enzima que impactan en el rendimiento de los productos. Actualmente existen pocos estudios que evalúen el efecto del ultrasonido y la inmovilización de la lactasa para la producción de GOS.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

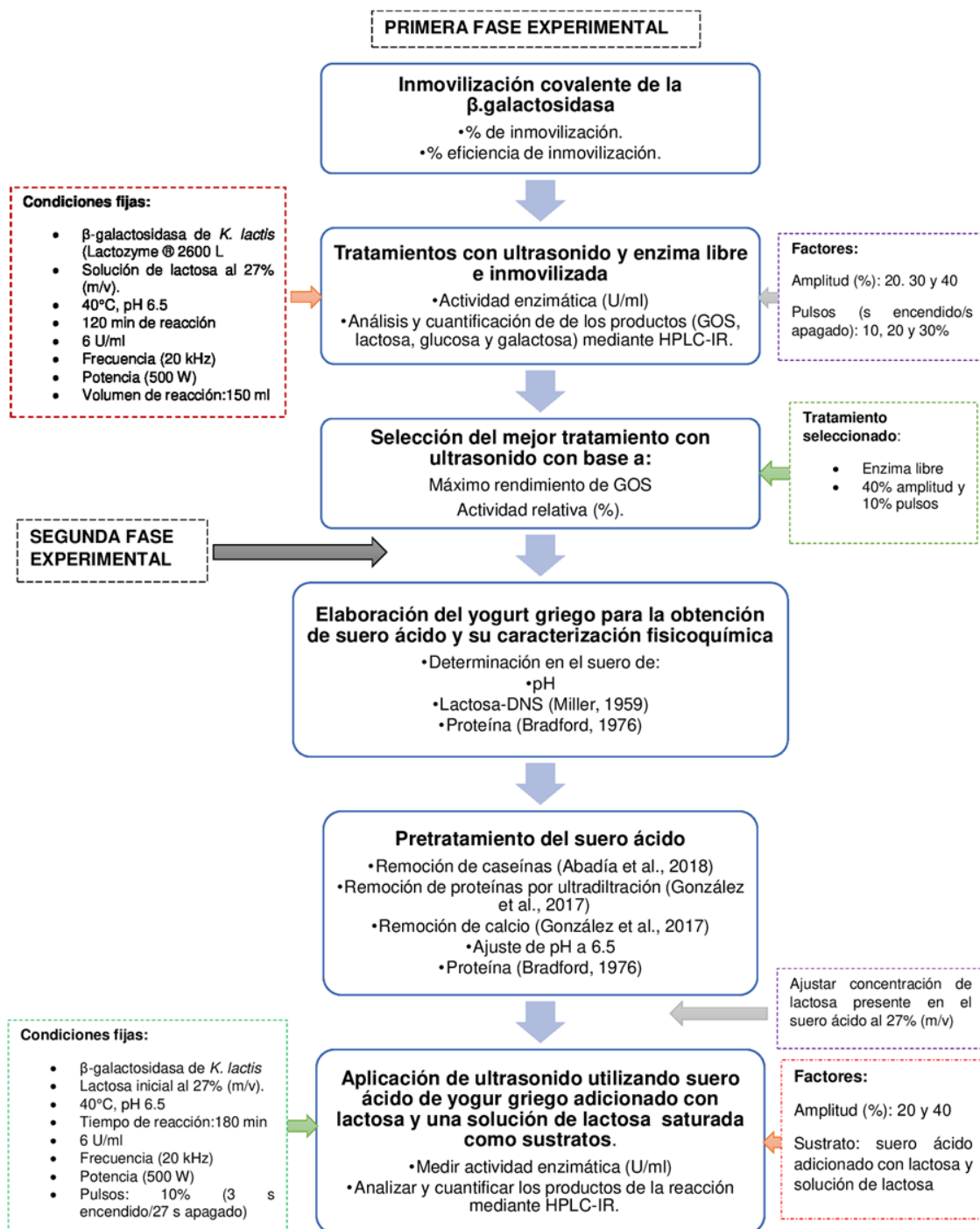
Evaluar el efecto del ultrasonido sobre la producción y rendimiento de galactooligosacáridos a partir de suero ácido de yogurt griego y de una solución de lactosa utilizando la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* libre e inmovilizada por unión covalente.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del ultrasonido, modificando amplitud de onda y pulsos sobre la actividad enzimática de la β -galactosidasa de *K. lactis* inmovilizada y libre.
- Evaluar el efecto del ultrasonido, modificando amplitud de onda y pulsos en la formación de GOS utilizando la enzima libre e inmovilizada.
- Determinar el rendimiento máximo de GOS utilizando la enzima inmovilizada y libre, con y sin ultrasonido.
- Determinar el rendimiento de GOS utilizando enzima libre y ultrasonido a partir de suero ácido de yogurt griego adicionado con lactosa como sustrato.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia experimental



6.2 Materiales

Se utilizó la β -galactosidasa de *K. lactis* (Lactozyme 2600L; 2,600 U/mL), reactivo de Bradford (Sigma Aldrich), estándares de glucosa, galactosa, maltotriosa (como estándar externo de trisacáridos) y estaquiosa (como estándar externo de tetrasacáridos) de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El ortosilicato de tetraetilo (TEOS), alcohol polivinílico (PVA), glutaraldehído (GA), ácido clorhídrico (HCl), ácido sulfúrico (H₂SO₄) de J.T. Baker (Philipsburg, Nueva Jersey, EE. UU.). Los fosfatos de sodio monobásicos y dibásicos de Fermont (Monterrey, México), lactosa de Proveedor Internacional de Químicos (Edo. de México, México), cloruro de magnesio de Meyer (Ciudad de México, México) y albúmina de suero bovino (BSA) de Bio-Rad (Hércules, CA, EE. UU.). Leche pasteurizada sin grasa marca Lala® y cultivos lácticos Yo-PROX® (Bioprox, México) para la elaboración de yogurt griego.

6.3 Caracterización fisicoquímica del suero ácido de yogurt griego

Para la caracterización fisicoquímica del suero ácido se analizó proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976) y se midió el pH con base a lo establecido por la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC) y para azúcares reductores (lactosa) por el método de DNS (Miller, 1959). Los análisis se realizaron por triplicado.

6.4 Remoción de proteínas presentes en el suero ácido de yogurt griego

Para la remoción de proteínas se siguieron dos metodologías: la primera consistió en remover las caseínas con base al método de Abadía, et al. (2018), en la cual el suero se centrifugó a 10000 *g* x 30 min a 4°C. Posteriormente las muestras se filtraron al vacío con papel filtro del número 4. Para el siguiente paso, el suero ya sin caseínas se ultrafiltró empleando una unidad de separación de membrana en placa marca GE modelo SEPA CF y la membrana PT (PES, 5000 Da y menor a 2 bar de presión) (GE Osmonics). Se ultrafiltraron 1300 mL de suero. La corriente del concentrado se recirculó al tanque de alimentación y la de permeado, se recolectó

en un contenedor por separado. Al final de este proceso se recuperó el permeado obtenido (600 mL) siguiendo la metodología de González et al. (2017). Finalmente, como parte del pretratamiento del suero, se removió el calcio ajustando el pH a 7.2 con NaOH 0.1 N, posteriormente se calentó a 80°C por 30 minutos, centrifugó a 6000 rpm x 30 min a 4°C y se filtró al vacío con papel filtro del número 4. La concentración de lactosa en el suero se determinó por el método de DNS (Miller et al., 1959). Los cálculos para determinar la concentración de lactosa presente en la muestra, se llevaron a cabo a partir de la ecuación de la recta que se obtiene al graficar los valores de absorbancia obtenidos de la curva de calibración utilizando como estándar una solución de lactosa. Cada determinación se realizó por triplicado. Por otro lado, para la determinación de proteínas en el suero antes y después de la remoción de proteínas se utilizó el método de Bradford siguiendo la metodología de González et al. (2017). El suero sin proteínas ni calcio resultante se utilizó para las determinaciones posteriores.

El pH y la concentración de lactosa del suero se ajustaron a 6.5 (con buffer de fosfatos 20 mM) y 270 g/L lactosa, respectivamente. Posteriormente, el suero ácido se calentó a 90°C (previo a las reacciones con ultrasonido) con el objetivo de superar el límite de solubilización de la lactosa para asegurar que la lactosa no precipite durante la mayor parte de la reacción enzimática.

6.5 Proceso de Inmovilización

Se utilizó el método descrito por González et al. (2017) con modificaciones, se mezclaron 6 mL de alcohol polivinílico al 2% (m/v) con 5 mL de etanol y 5 mL de TEOS. Este se calentó a 100 °C con agitación constante y luego se enfrió a temperatura ambiente, posteriormente, se adicionaron 100 µL de HCl concentrado y se incubó durante 50 min a temperatura de ebullición. Esta solución se distribuyó en placa de Petri y se cubrió con papel aluminio hasta solidificar por 72 h a temperatura ambiente. Las partículas resultantes se trituraron en un molino de café y posteriormente en un mortero y se tamizaron (tamiz w.s. Tyler 100 sieve, 150 µm).

El polvo resultante (POS-PVA) se lavó con amortiguador de fosfato de potasio 20 mM pH 6.5 hasta que se alcance este pH. Posteriormente se dejó secar a 50°C durante la noche. Para activar el soporte (POS-PVA), se incubaron 10 mg de las partículas tamizadas con 1 mL de glutaraldehído al 2.5% (v/v) en 9 ml de H₂SO₄ 0.1 M y se mantuvo en agitación durante 2 h a 25°C. Posteriormente, las partículas se lavaron 5 veces con agua destilada y 5 veces con solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM pH 6.5.

6.6 Inmovilización de la β -galactosidasa

Las partículas de POS-PVA (10 mg) activadas con GA se incubaron con la enzima libre (EL) (1 mL de solución de β -galactosidasa) que tendrá una concentración de 15 $\mu\text{g}_{\text{EL}}/\text{mg}_{\text{soporte}}$ en el mismo amortiguador de fosfato de potasio durante 18 h a 4°C bajo agitación media constante. El derivado enzimático generado se lavó 5 veces con el amortiguador de fosfatos previamente descrito. La enzima inmovilizada se mantuvo en amortiguador de fosfato de potasio a 4°C hasta su uso. Se analizaron las soluciones de lavado y sobrenadante para la determinación de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

6.7 Método de Bradford (Bradford, 1976)

El reactivo se preparó de la siguiente manera: se disuelven 100 mg de Azul de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol al 95%. Posteriormente se le agregaron 100 ml de ácido fosfórico al 85%. Esta solución se aforó a 1 L. Para la determinación de proteína en el suero, se colocaron 200 μL de la muestra o estándar en tubos de ensayo y posteriormente se agregó 1 mL del reactivo de Bradford, mezclándose con la ayuda de un Vórtex. La absorbancia se midió a 595 nm después de 5 minutos de reacción y antes de una hora. La curva estándar se llevó a cabo mediante diluciones seriadas a partir de una solución estándar de seroalbúmina bovina (2 mg/mL) (BioRad, México), se añadió al primer tubo (T1) 20 μL del estándar de BSA, se agregó 20 μL de agua y 1 mL de Bradford, de este tubo se tomaron 20 μL y se

colocaron en otro tubo (T2) y se llevó a cabo el mismo procedimiento para cada dilución hasta completar las 5 diluciones, quedando la curva como se muestra en la Cuadro 2.

Cuadro No.2 Curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA) (2 mg/mL) para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. (González, 2017).

Concentración de proteína (mg/mL)	Número de tubo	Estándar BSA (μL)	H₂O destilada (μL)	Bradford (mL)
<i>Blanco</i>	T0	0	20	1.0
1.0	T1	20 (estándar 2 mg/mL)	20	1.0
0.5	T2	20 T1	20	1.0
0.25	T3	20 T2	20	1.0
0.125	T4	20 T3	20	1.0
0.0625	T5	20 T4	20	1.0
0.03125	T6	20 T5	20	1.0

Las determinaciones se hicieron por triplicado, a partir de las absorbancias *versus* la concentración (mg/mL) de las diluciones de los estándares se obtuvo la ecuación de la recta y posteriormente la concentración de proteína en la enzima libre en mg/mL.

La cantidad de proteína inmovilizada se calculó por la diferencia entre la cantidad de enzima (en forma de proteína) que se ofrece al soporte para la inmovilización (IEL) y la encontrada en el sobrenadante (S) y la solución amortiguadora utilizada para lavado (WB), obteniendo el valor de la proteína inmovilizada ($[P]_{IEL} - ([P]_S + [P]_{WB})$). La concentración de proteína inmovilizada se expresó en mg/ml. Considerando el trabajo de González et al., (2017), en el cual la concentración de $15 \mu\text{g}_{enzima} / \text{mg}_{soporte}$ presentó la máxima inmovilización de la enzima, este valor se tomó como referencia y se evaluó el porcentaje usando la ecuación:

$$\% \text{ de inmovilización} = \frac{\text{actividad de la enzima inmovilizada}}{\text{actividad de la enzima libre}} * 100 \quad (1)$$

6.8 Determinación de la actividad enzimática

Se utilizó como referencia el procedimiento realizado por González et al., (2017) con modificaciones, para medir la actividad de la β -gal utilizando o-nitrofenol - β -D-galactopiranosido (o-NPG) como sustrato. Se agregaron 100 μ L de solución enzimática ó 0.1 g del biocatalizador (adecuadamente diluido en solución amortiguadora de fosfato de potasio pH 6.5 20 mM) a 1.35 mL de amortiguador de fosfato potásico 20 mM pH 6.5 y posteriormente 100 μ L de o-NPG 34 mM (preparado en amortiguador de fosfato potásico 20 mM, pH 6.5). La mezcla de reacción se incubó a 40 °C durante 10 min y pasado este tiempo, se añadió 100 μ L de Na₂CO₃ 1 M para detener la reacción. La densidad óptica se registró a 420 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 10). Una unidad de actividad de lactasa (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de ONP (o-nitrofenol) por minuto a 40°C durante 10 min. En el blanco de calibración sólo se sustituyó la enzima por agua destilada.

Para determinar la relación entre la concentración de o-NPG y la absorbancia máxima del ONP a 420 nm, se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones de o-NP: 0.4, 3.6, 6.8, 9.8, 12.8 mM a temperatura ambiente como se muestra en la Cuadro 3. La actividad enzimática se expresó como la media \pm desviación estándar de tres determinaciones.

Cuadro No.3 Curva estándar de o-nitrofenol (ONP) (1.8 g/L) para la determinación de la actividad enzimática

Concentración ONP (M)	ONP (mL)	Solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM (mL)	Na₂CO₃ (mL)
0.0004	0.0466	1.45	0.5
0.0036	0.4186	1.0814	0.5
0.0068	0.7906	0.7094	0.5
0.0098	1.1396	0.3604	0.5
0.0128	1.5	0	0.5

6.9 Tratamientos con ultrasonido

Un sonicador de sonda (Cole Parmer, Instruments Company, USA) con una potencia de 500 W, una frecuencia de 20 kHz y una sonda de titanio con diámetro de 13 mm se utilizó para los tratamientos con enzima inmovilizada y libre. Basado en el estudio de Rico et al., (2020) y Jadhav et al., (2014) los ensayos se llevaron a cabo utilizando tres niveles de amplitud (μm) y que de ahora en adelante se expresarán en %: 20, 30 y 40 y tres niveles de pulsos (%): 10 (3 s encendido/27 s apagado), 20 (3 s encendido/12 s apagado) y 30 (3 s encendido/7 s apagado) sobre la enzima inmovilizada y la enzima libre durante 120 minutos. Se tomaron muestras a intervalos de tiempo (a los 0, 20, 40, 60, 90 y 120 min) para medir la actividad enzimática y cuantificar los productos de la reacción. Esto con el objetivo de encontrar las condiciones de sonicación que generen un mayor rendimiento de GOS con la enzima inmovilizada y/o libre.

La concentración de enzima se mantuvo constante (6 U/mL) tanto en la enzima libre como inmovilizada de modo que la variación en la actividad fue una función exclusiva de la amplitud y los pulsos. Durante el tratamiento, la temperatura se mantuvo a 40 °C (utilizando un termobañó y un termopar marca HANNA). Para llevar

a cabo este proceso, se evaluó en solución amortiguadora de fosfato de potasio pH=6.5 20 mM y 4 mM de $MgCl_2$ cada tratamiento para determinar el incremento de la temperatura durante todo el experimento y conocer la temperatura del agua que recirculó en el equipo para mantener la temperatura constante. La lactasa inmovilizada se preparó como se describe en la sección 7.5.

Para cada tratamiento, se prepararon 150 mL de solución de lactosa (270 g/L) disuelta en amortiguador de fosfato de potasio a pH 6.5 20 mM (esta solución se calentó a 80°C para sobrepasar la solubilidad de la lactosa) y se dejó enfriar a 40°C, posteriormente se transfirió al reactor de ultrasonido y se añadió el biocatalizador (a una concentración de 6 U/mg bajo las condiciones previamente descritas. Para las reacciones con enzima libre, se agregó una concentración de 6 U/mL en 150 mL de solución de lactosa (270 g/L) bajo las mismas condiciones que las reacciones con enzima inmovilizada.

Para las muestras control (enzima inmovilizada y libre sin US), se incubaron a 40 °C en solución de lactosa (270 g/L) disuelta en amortiguador de fosfato de potasio a pH 6.5 20 mM y se agitó en parrilla magnética a 40°C.

Para determinar la actividad de ambas enzimas (inmovilizada y libre) se tomaron 100 μ L en cada intervalo de tiempo y se midió la actividad por el método de o-NPG descrito previamente. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Se tomaron alícuotas de la reacción enzimática (a los 0, 20, 40, 60, 90 y 120 min) tanto de las reacciones con enzima inmovilizada como con enzima libre, las cuales se calentaron a 100°C durante 10 min en un baño con agua para inactivar la enzima. Para el caso de la enzima inmovilizada, las muestras se filtraron al vacío con papel filtro número 4 y se colocaron y congelaron en tubos eppendorf hasta su uso. Para los tratamientos con enzima libre se siguieron los mismos pasos a excepción de la filtración al vacío.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado considerando el promedio y la desviación estándar, y los resultados se presentaron en términos de actividad enzimática relativa (%).

6.10 Tratamientos con ultrasonido utilizando como sustrato suero ácido de yogurt griego y solución de lactosa para la producción de galactooligosacáridos

Se elaboró yogurt griego a partir de leche descremada pasteurizada marca Lala® y con cultivos lácticos para yogurt griego marca YO-PROX® (Figura 9). Una vez obtenido el yogurt, se dejó drenar en una manta de cielo por dos días a 4°C (hasta un porcentaje de sólidos solubles de 21%) para la obtención del suero ácido. El suero ácido se pasteurizó y se guardó en refrigeración. Se tomaron muestras por triplicado para medir pH y determinar proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976) y determinación de lactosa mediante el método de DNS siguiendo la metodología de González et al., 2017. Posteriormente, se removieron caseínas siguiendo la metodología previamente descrita de Abadía et al. (2018). El siguiente paso fue la remoción de proteínas mediante la técnica de ultrafiltración con base en la metodología de González et al. (2017). Al suero ultrafiltrado se le ajustó el pH a 7.2 con NaOH 0.1 N, se calentó a 80°C por 30 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 6000 rpm por 20 min a 4°C hasta que el sobrenadante no saliera turbio. Se filtró al vacío con papel filtro Whatman n°4 y se ajustó nuevamente el pH del suero a 6.5 (óptimo de la enzima). Se refrigeró hasta su posterior uso.

Para cada tratamiento realizado con ultrasonido, la lactosa presente en el sustrato lácteo (suero ácido y solución de lactosa) se ajustó a 27% de lactosa. Durante los tratamientos se midió la actividad enzimática con el sustrato artificial o-NPG a los 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min de cada tratamiento por triplicado. Al mismo tiempo se tomaron alícuotas de 2 mL de cada tratamiento a los 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min por triplicado para el análisis de los productos de la reacción por HPLC. Para ello las muestras se colocaron en un baño de agua en ebullición por 10 min

para inactivar la enzima y se guardaron en el congelador. Finalmente, se prepararon las muestras y los estándares para ser analizados por HPLC siguiendo la metodología descrita en la sección 7.11.

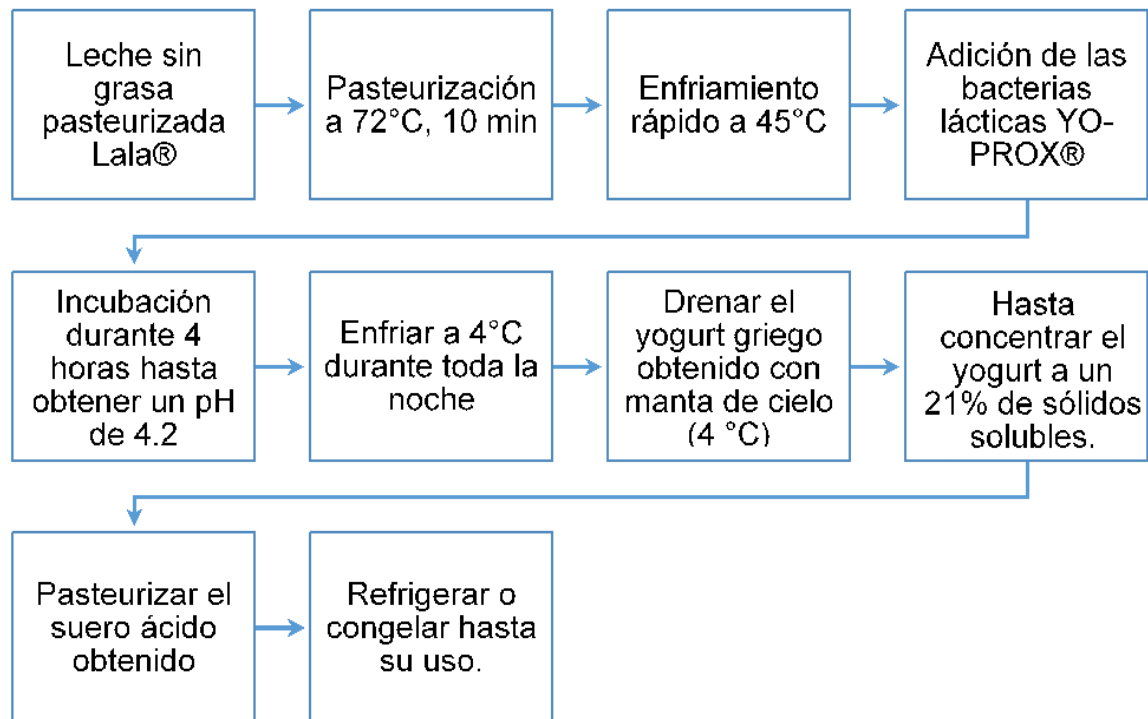


Figura No.9 Proceso de obtención del suero ácido de yogurt griego

6.11 Análisis de los productos de reacción de transgalactosilación

Se construyeron curvas de calibración para cada compuesto (lactosa, glucosa, galactosa, estaquiosa y maltotriosa, estas últimas como estándares externos para los tetrasacáridos y trisacáridos, respectivamente), usando 5 concentraciones diferentes de cada estándar (0.125, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 mg/mL) y se analizaron los productos de la reacción con base al trabajo de González et al., 2017.

Los productos de reacción tanto de los tratamientos con enzima inmovilizada como con enzima libre se diluyeron en agua grado HPLC a una concentración de 1 mg/mL, se filtraron con un filtro de 0.45 μm de poro y, posteriormente, se analizaron en un

sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés) (serie 1200, Agilent Technologies, CA, EE. UU.) acoplado a un detector de índice de refracción con una columna (Hi-Plex Ca (Duo), Agilent Technologies), con agua grado HPLC previamente desgasificada y filtrada como fase móvil. Las condiciones empleadas fueron 80°C de temperatura de columna, flujo de 0.4 mL/min, un volumen de inyección de 10 µL y tiempo de corrida de 20 min. Los datos se procesaron utilizando el software HP ChemStation software versión 10.02 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EE. UU.).

7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental para la obtención de GOS a partir de la lactasa libre e inmovilizada sometida a ultrasonido fue una factorial 2² con punto al centro, completamente aleatorizado. La respuesta de interés es el rendimiento de GOS. En el Cuadro 4 se muestra el diseño factorial llevado a cabo.

Cuadro No.4 Diseño factorial 2² con punto al centro

Factores	Nivel bajo	Punto al centro	Nivel alto
<i>Amplitud de onda (%)</i>	20	30	40
<i>Pulsos (%) (s encendido/s apagado)</i>	10 (3 s/27 s)	20 (3 s/12 s)	30 (3 s/7 s)

Los tratamientos se realizaron por triplicado, mientras que los datos se representaron con una media ± desviación estándar. Se utilizó un ANOVA para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos y pruebas de comparación de medias de Tukey.

Cuadro No.5 Orden aleatorio en el que se corrieron los tratamientos con enzima inmovilizada y libre

Orden de Corrida	Amplitud (%)	Pulsos (%)
1	40	10
2	40	10
3	30	20
4	20	10
5	20	30
6	40	30
7	20	10
8	30	20
9	20	10
10	30	20
11	40	10
12	40	30
13	40	30
14	20	30
15	20	30

Para la segunda fase experimental se realizaron los siguientes tratamientos en orden aleatorio.

Cuadro No.6 Tratamientos con suero ácido y solución de lactosa al 27% (m/v).

Tratamientos	Condiciones
<i>Suero ácido 1</i>	Amplitud: 20% y 10% pulsos
<i>Suero ácido 2</i>	Amplitud: 40% y 10% pulsos
<i>Control suero</i>	Agitación constante
<i>Lactosa 1</i>	Amplitud: 20% y 10% pulsos
<i>Lactosa 2</i>	Amplitud: 40% y 10% pulsos
<i>Control lactosa</i>	Agitación constante

Para este diseño las siguientes condiciones se mantuvieron fijas para los tratamientos con ultrasonido y los controles:

- Pulsos de ultrasonido: 10% (3 s encendido/ 27 s apagado).
- Concentración inicial de lactosa: 27% (m/v).
- Concentración de enzima: 6 U/mL.
- Tiempo de reacción: 180 min.
- Temperatura y pH: 40°C y 6.5.
- Intervalos de tiempo de muestreo: 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min.
- Volumen de reacción: 150 mL.

Cuadro No.7 Orden aleatorio en el que se corrieron los tratamientos con suero ácido y solución de lactosa con enzima libre y ultrasonido

Amplitud de onda (%)	Sustrato lácteo*
40.0	1
20.0	1
20.0	2
40.0	2
40.0	1
20.0	1

20.0	2
40.0	2
40.0	1
20.0	1
20.0	2
40.0	2

*Sustrato lácteo 1= lactosa y sustrato lácteo 2= suero ácido

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Inmovilización covalente de la β -galactosidasa

En el Cuadro 8 se presentan los resultados de eficiencia e inmovilización de este trabajo, así como los resultados reportados por González et al. (2017). Se puede observar que los valores obtenidos en esta investigación son menores para porcentaje y eficiencia de inmovilización. Este efecto puede deberse al tamaño de partícula del soporte utilizado en este experimento. Con base en los antecedentes estudiados (Klein et al. 2012; Suárez et al. 2018), uno de los factores que intervienen en el rendimiento y eficiencia de inmovilización, en este caso de la β -galactosidasa, es el tamaño de partícula del soporte el cual puede favorecer una mayor unión entre éste y la enzima, al disminuir su tamaño y por lo tanto una mayor cantidad de moléculas de enzima por área de superficie podrían quedar retenidas en el soporte favoreciendo un mayor rendimiento de inmovilización. Caso particular es lo investigado acerca de la influencia del tamaño de partícula en la reacción dual de la lactasa (Bernal et al., 2010; Suárez et al., 2018), encontrando que al aumentar el tamaño de partícula del soporte se favorecía la hidrólisis de lactosa en lugar de la transgalactosilación y que para favorecer esta última, se requería una mayor concentración de lactosa inicial que la que se utiliza cuando el tamaño de partícula del soporte es menor.

Cuadro No.8 Resultados del proceso de inmovilización de la β -galactosidasa

<i>Parámetros de inmovilización</i>	<i>Resultados experimentales</i>	<i>Datos reportados por González et al. (2017)</i>
<i>Porcentaje de inmovilización</i>	85.62 \pm 0.166 %*	99.57 %
<i>Eficiencia de inmovilización</i>	68.22 \pm 1.095 %*	76.8 %

<i>Tamaño de partícula del soporte</i>	150 μm	<100 μm^*
<i>Carga enzimática</i>	15 μg de enzima/mg de soporte	15 μg de enzima/mg de soporte*

*Los resultados son el promedio de triplicados \pm desviación estándar

8.2 Actividad enzimática relativa y productos de la reacción de la enzima inmovilizada y ultrasonido

En el Cuadro 9 se presentan las abreviaturas que aparecen en las gráficas de los diferentes tratamientos. En la Figura 10 se muestra la actividad relativa en cada tratamiento. A los 20 min los tratamientos T1, T3, T4 y T5 presentaron diferencias estadísticas ($\alpha=0.05$) con respecto al control. Al final de la reacción, T4 y T5 fueron significativamente diferentes al control, con una actividad relativa mayor que los demás tratamientos. Para T4 y T5 se utilizó un 30% pulsos, sugiriendo que la exposición constante al ultrasonido disminuyó la pérdida de actividad en el tiempo en comparación con los tratamientos con 10 y 20% pulsos y el control. Cabe resaltar que todos los tratamientos mantuvieron una actividad final por arriba del 50%. Estos resultados indican la estabilidad que da el soporte a la estructura enzimática al volverla más rígida y menos susceptible a los cambios en las condiciones experimentales.

Cuadro No.9 Abreviaturas de los diferentes tratamientos con ultrasonido

Tratamientos	Parámetros de ultrasonido
<i>T1</i>	Amplitud: 40% Pulsos: 10%
<i>T2</i>	Amplitud: 30% Pulsos: 20%
<i>T3</i>	Amplitud: 20% Pulsos: 10%
<i>T4</i>	Amplitud: 20% Pulsos: 30%
<i>T5</i>	Amplitud: 40% Pulsos: 30%

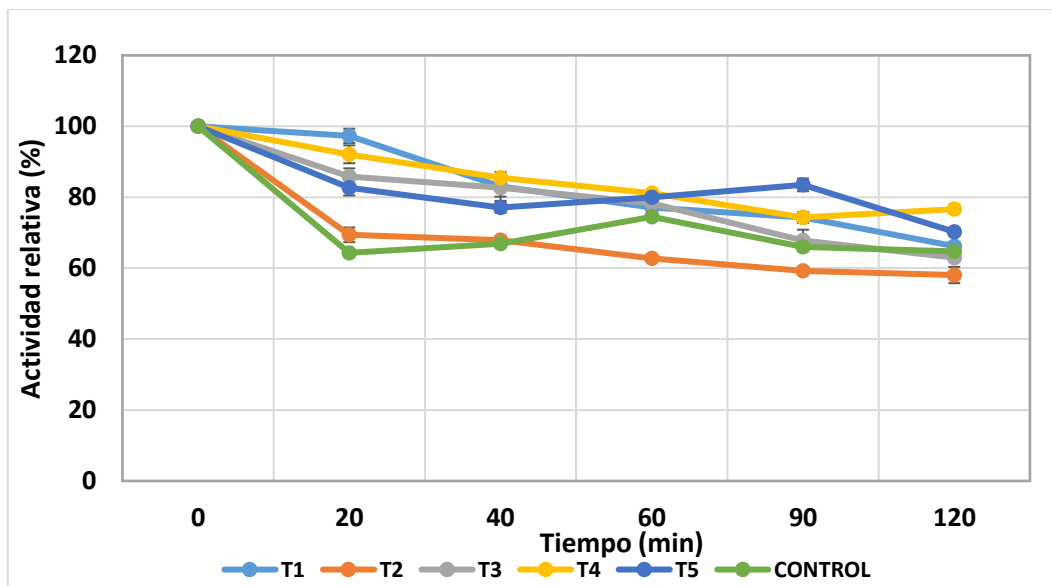


Figura No.9 Efecto del ultrasonido sobre la actividad enzimática de la β -galactosidasa inmovilizada de *K. lactis*.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos tanto de los productos de transgalactosilación como de hidrólisis en los diferentes tratamientos y el control con

el objetivo de determinar el efecto del ultrasonido y la inmovilización en la cinética de la reacción.

En la Figura 10, se muestra la cinética de formación de GOS. Se observa la diferencia en el tiempo de formación de éstos dependiendo de los parámetros ultrasónicos utilizados o no, como en el caso de T4 y T5, los cuales generaron el máximo porcentaje de GOS en un menor tiempo en comparación con el control y los demás tratamientos. En ambos tratamientos se utilizaron 30% pulsos (3 s encendido/7 s apagado), es decir, fueron expuestos a los efectos del ultrasonido en un lapso de tiempo mayor reflejándose en la aceleración de la reacción, sin embargo, una vez alcanzado el pico máximo, comienza la disminución de GOS, probablemente a la hidrólisis de éstos liberando moléculas de galactosa al medio de reacción. Para el caso del control, T1 y T3, la formación de GOS fue constante en el tiempo, siendo T3 el que presentó el máximo rendimiento a los 120 min. Es interesante notar que en estos tratamientos se utilizó un 10% de pulsos, un menor tiempo efectivo de exposición al ultrasonido, sugiriendo que a mayores pulsos mayor es la velocidad de la reacción en comparación con el control y los tratamientos con 10% pulsos, sin embargo, el rendimiento máximo, independientemente del tratamiento, no tuvo diferencias significativas ($\alpha=0.05$), indicando que el ultrasonido en la reacción con enzima inmovilizada afectó la velocidad de formación de GOS sin promover la actividad de transgalactosilación.

Caso particular es T2, el cual presentó el más bajo rendimiento de GOS y perdió más actividad (Figura 9) en el tiempo en comparación con los demás tratamientos, incluido el control. Los niveles de los factores de ultrasonido aplicadas a este tratamiento fueron valores intermedios: 30% amplitud y 20% pulsos, a diferencia de T4 y T5 con pulsos altos y caso contrario a T1 y T3 con pulsos bajos en los que se presentaron dos cinéticas de formación de GOS, encontrando similitudes en los tratamientos con 30% pulsos al requerir un menor tiempo para obtener el máximo de GOS, sin embargo, una vez alcanzado el pico máximo comenzó la degradación de éstos. Caso contrario para los tratamientos con 10% pulsos y el control, los

cuales generaron el máximo de GOS en un tiempo mayor y su cinética fue creciente en el tiempo de reacción. Conociendo estos datos, es probable que para T2 se haya dado una mayor formación de disacáridos trasgalactosilados, los cuales, bajo la técnica, los cuales, bajo la técnica y material utilizado de HPLC, no fue posible cuantificarlos por el traslape de su pico de retención con el de la lactosa.

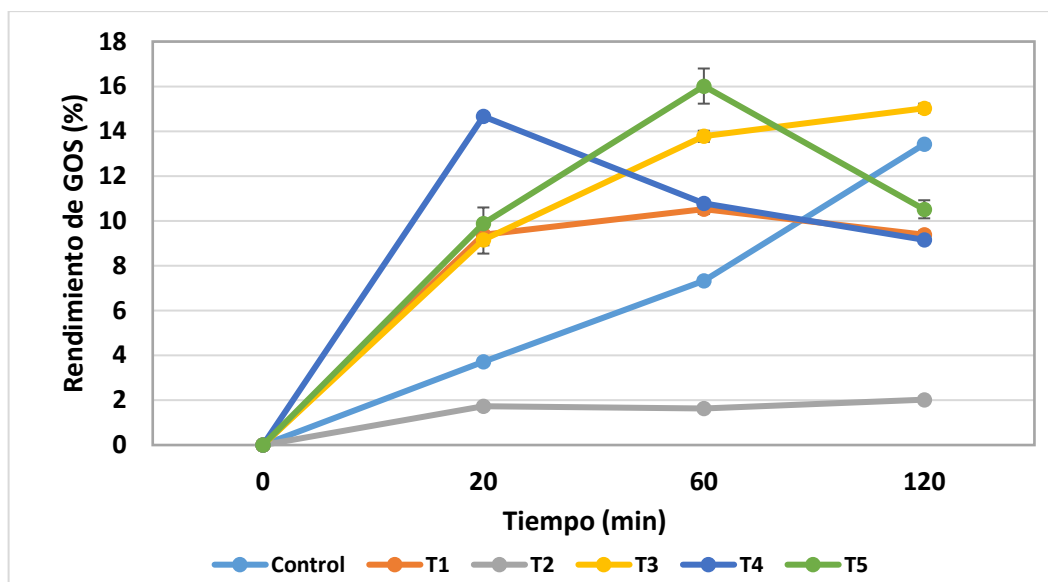


Figura No.10 Rendimiento de GOS para cada tratamiento con ultrasonido y enzima inmovilizada.

Procediendo con el análisis de los trisacáridos, en el Cuadro 10 y Figura 11 se presentan los resultados de cada tratamiento. El control presentó un 2% de rendimiento a los 20 min e incrementa hasta alcanzar un 11.66% a los 120 minutos. Los tratamientos 4 y 5 presentaron los mayores porcentajes de trisacáridos en un menor tiempo en comparación con los demás tratamientos y el control. Para T4 y T5 se utilizaron pulsos altos (30%), es decir, una exposición más prolongada en el tiempo a los fenómenos físicos y mecánicos del ultrasonido, cuyos efectos principales que han sido estudiados en las enzimas inmovilizadas son: la modificación en la estructura del soporte-enzima haciéndolo más flexible y poroso,

así como una mayor transferencia de masas, homogeneización del medio promoviendo la interacción enzima-sustrato e impactando en el rendimiento de la reacción, mayor generación de GOS. Resultados similares han sido estudiados previamente por Rico et al. (2018); Su et al. (2018) y Su et al. (2021), siendo estos últimos los que evaluaron el efecto del ultrasonido sobre la composición de los polímeros generados por la lacasa con y sin ultrasonido encontrando diferencias en la estructura de los productos entre las muestras sometidas a ultrasonido y el control, es decir, no sólo afectó el rendimiento de los productos sino en el tipo y grado de polimerización que éstos presentaron. Este mismo efecto pudo darse en el control y T3, ya que ambos tuvieron un porcentaje de trisacáridos sin diferencias estadísticas ($\alpha=0.05$) en toda la reacción.

Es de resaltar el aumento en la velocidad de la reacción en los tratamientos con pulsos altos (30%) obteniéndose un máximo de rendimiento a los 20 min para T4 y a los 60 min para T5 como consecuencia de los fenómenos físicos descritos con anterioridad (Nadar et al. (2017); Rico et al. (2020); Su et al. (2018) y Zhao et al. (2016)). Sin embargo, también se observa que, una vez alcanzado esté máximo de rendimiento de trisacáridos en ambos casos, su generación comienza a decrecer durante la reacción y simultáneamente aumenta la presencia de tetrasacáridos (Cuadro 11 y Figura 12), es decir, comienza la hidrólisis de los trisacáridos para formar GOS de mayor grado de polimerización.

Cuadro No.10 Datos de rendimiento de trisacáridos con enzima inmovilizada y ultrasonido

<i>Tratamiento</i>	<i>Trisacáridos a los 20 min (%)</i>	<i>Trisacáridos a los 60 min (%)</i>	<i>Trisacáridos a los 120 min (%)</i>
Control	1.84 ± 0.21 ^c	5.34 ± 0.38 ^d	11.66 ± 0.08 ^a
T1	8.27 ± 0.13 ^b	9.24 ± 0.23 ^c	6.45 ± 0.39 ^c
T2	0.11 ± 0.01 ^c	0.27 ± 0.02 ^e	0.37 ± 0.07 ^d
T3	7.23 ± 0.08 ^b	12.07 ± 0.15 ^b	12.77 ± 0.23 ^a
T4	13.35 ± 1.66 ^a	9.01 ± 0.47 ^c	6.87 ± 0.42 ^c
T5	8.89 ± 0.38 ^b	14.18 ± 0.80 ^a	8.10 ± 0.23 ^b

Los valores son el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una columna son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$).

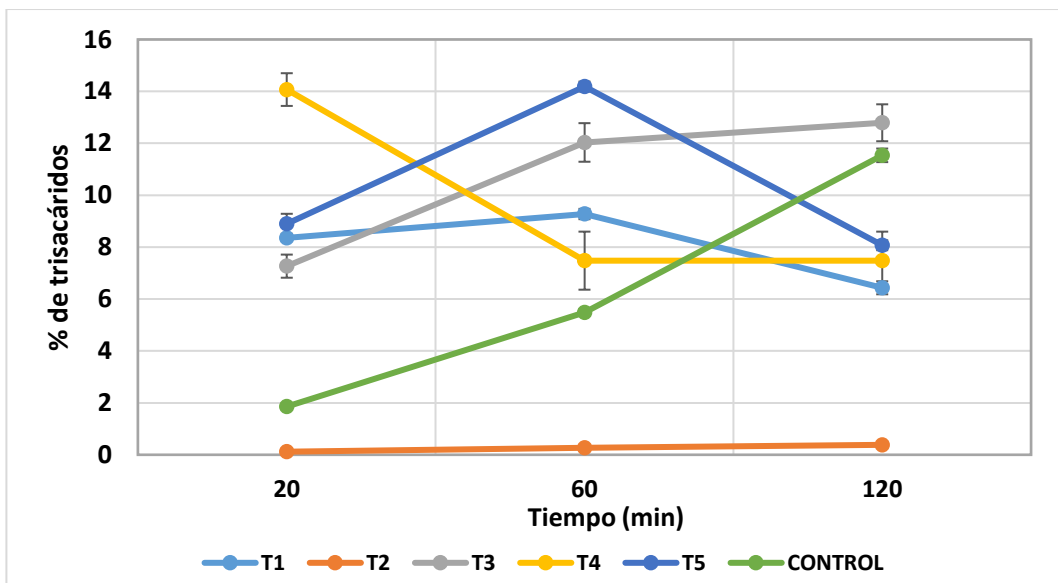


Figura No.11 Trisacáridos generados durante el tratamiento con ultrasonido y enzima inmovilizada

En el Cuadro 11 y Figura 12, se presenta el porcentaje de tetrasacáridos para cada tratamiento. En general, el rendimiento obtenido fue menor en comparación con los trisacáridos. La cinética de formación para T1, T4 y T5 es creciente, en tanto que,

para el control T2, y T3 se mantiene constante. Estos datos coinciden con la hidrólisis de los trisacáridos para la formación de tetrasacáridos en T1, T4 y T5, a diferencia del control y T3 con un aumento en la formación de trisacáridos en el tiempo y constante en la formación de tetrasacáridos, posiblemente a la hidrólisis de estos últimos para la formación de trisacáridos o la liberación de galactosa al medio de reacción, por consiguiente, no aumentó la concentración de éstos. Caso aparte es T2 con un mayor porcentaje de tetrasacáridos no así de trisacáridos, sugiriendo la posible formación de disacáridos trasgalactosilados o la hidrólisis de la lactosa.

En general, se presentó bajo rendimiento de tetrasacáridos en todos los tratamientos debido a lo anteriormente mencionado, así mismo por la preferencia de la β -galactosidasa de *K. lactis* de formar disacáridos y trisacáridos.

Cuadro No.11 Datos de rendimiento de tetrasacáridos con enzima inmovilizada y ultrasonido.

Tratamiento	Tetrasacáridos a los 20 min (%)	Tetrasacáridos a los 60 min (%)	Tetrasacáridos a los 120 min (%)
Control	1.90 ± 0.07 ^{ab}	1.98 ± 0.093 ^a	1.84 ± 0.07 ^{ab}
T1	1.07 ± 0.42 ^b	1.28 ± 0.038 ^c	2.51 ± 0.12 ^a
T2	1.62 ± 0.12 ^{ab}	1.34 ± 0.070 ^{cb}	1.63 ± 0.10 ^b
T3	1.92 ± 0.21 ^a	1.75 ± 0.022 ^{ab}	1.65 ± 0.01 ^b
T4	0.55 ± 0.03 ^c	1.79 ± 0.330 ^a	1.65 ± 0.16 ^b
T5	1.67 ± 0.03 ^{ab}	1.78 ± 0.082 ^{ab}	1.87 ± 0.33 ^b

Los valores son el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una columna son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$).

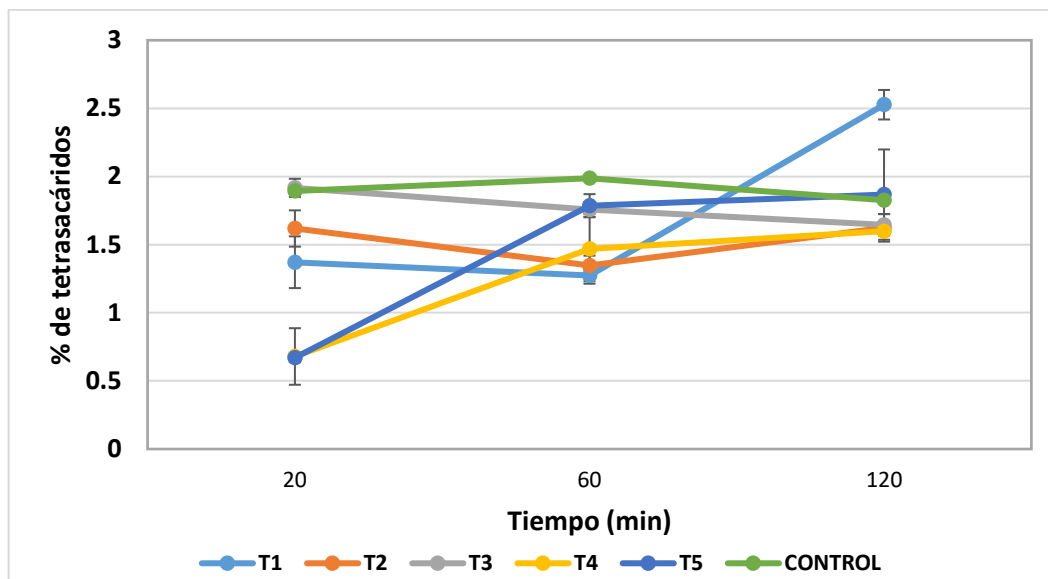


Figura No.12 Tetrasacáridos generados durante el tratamiento con ultrasonido y enzima inmovilizada.

Para la concentración de lactosa residual (Cuadro 12 y Figura 13) y galactosa (Cuadro 13 y Figura 14), observamos diferencias significativas ($\alpha= 0.05$) entre tratamientos, siendo T2 el tratamiento con una mayor concentración de lactosa al final de la reacción (186.08 ± 2.28 mg/mL) seguido del control (103.51 ± 0.20 mg/mL), mientras que T1, T4 y T5 hidrolizaron la mayor cantidad de lactosa (4.27 ± 2.28 mg/mL). Por otro lado, para la concentración de galactosa, el control liberó una menor concentración a los 120 min (52.96 ± 0.52 mg/mL), seguido de T1 y T3 (75.58 ± 0.34 y 69.67 ± 0.57 mg/mL, respectivamente) y finalmente T4 y T5 los tratamientos que liberaron mayor concentración de este monosacárido a los 120 min (85.58 ± 0.52 y 84.57 ± 0.55 mg/mL, respectivamente). La presencia de una menor concentración de galactosa en el medio de reacción en algunos tratamientos podría deberse, por una parte, a su utilización para la formación de GOS como en T1, formación e hidrólisis de GOS para T4 y T5, hidrólisis de lactosa en el caso del control y/o formación de disacáridos transgalactosilados, ya que en el Cuadro 12, se observa mayor concentración de lactosa aunado a una menor concentración de galactosa, del mismo modo para T2, a lo largo de la reacción a diferencia de los demás tratamientos, como anteriormente se mencionó, no fue posible cuantificar

otros disacáridos presentes en la reacción pero sí se observó su presencia en los cromatogramas correspondientes, asimismo, previamente ha sido reportado (Rico et al, 2020), en general, una mayor formación de disacáridos y trisacáridos al utilizar la enzima de *K. lactis*.

Cuadro No.12 Concentración (mg/mL) de lactosa residual en los diferentes tratamientos con enzima inmovilizada y ultrasonido

Tiempo (min)	Control	T1	T2	T3	T4	T5
0	268.28±1.73 ^a	268.28±2.00 ^a	267.29±4.00 ^b	266.28±4.36 ^b	267.94±1.15 ^a	268.28±1.73 ^a
20	248.15±1.00 ^a	76.35± 0.95 ^b	214.45±0.85 ^c	133.09±4.44 ^d	78.34 ±2.51 ^b	104.52±5.49 ^b
60	186.11±1.02 ^a	33.63 ±2.65 ^b	185.76±1.53 ^a	74.54± 5.29 ^b	35.92 ±0.68 ^b	36.63±1.31 ^b
120	103.51±0.20 ^a	4.27±2.28 ^b	186.08±2.28 ^c	38.29 ±2.62 ^d	5.72 ± 0.25 ^b	8.66 ± 0.37 ^e

Los valores son el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una fila son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$).

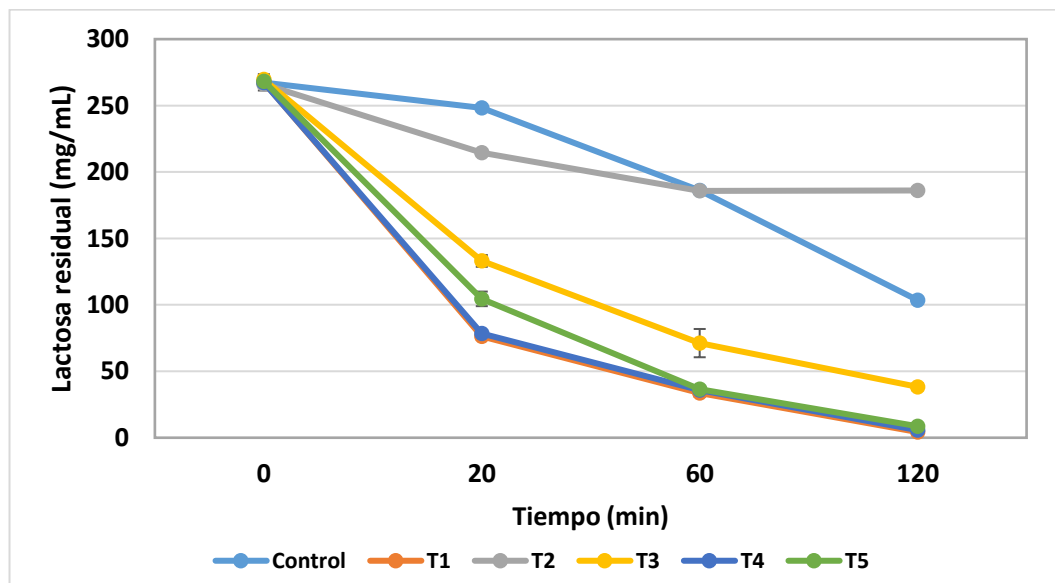


Figura No.13 Lactosa residual en tratamientos con ultrasonido y enzima inmovilizada.

Continuando con el análisis, resulta interesante las diferencias encontradas de galactosa en el control y en T3, aun cuando en ambos casos se presentó un rendimiento de trisacáridos similar. Posiblemente T3 presente en la composición de

GOS tanto monómeros de glucosa como de galactosa mientras que para el control sea mayoritariamente unidades de galactosa, o bien la presencia de disacáridos trasgalactosilados diferentes a la lactosa, sin embargo, para poder corroborar esta se necesitan estudios específicos que aporten información sobre las estructuras y tipos de GOS presentes en cada muestra bajo estudio.

Cuadro No.13 Concentración (mg/mL) galactosa en los diferentes tratamientos con enzima inmovilizada y ultrasonido

Tiempo (min)	Control	T1	T3	T4	T5
20	3.66 ± 2.35 ^a	29.27 ± 1.30 ^b	20.76 ± 0.38 ^c	44.17 ± 0.34 ^d	32.99 ± 0.66 ^e
60	15.67 ± 1.36 ^a	52.28 ± 1.04 ^b	44.17 ± 0.70 ^c	68.36 ± 0.62 ^d	54.38 ± 0.59 ^b
120	52.96 ± 0.52 ^a	75.58 ± 0.34 ^b	69.66 ± 3.57 ^c	85.58 ± 0.52 ^d	84.57 ± 0.55 ^d

Los valores son el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una fila son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$).

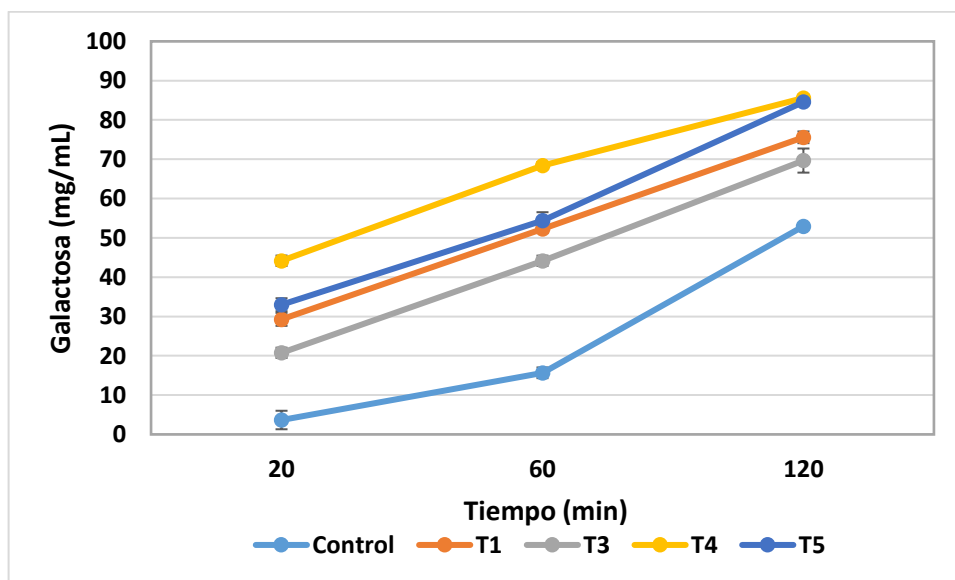


Figura No.14 Galactosa liberada durante tratamientos con ultrasonido y enzima inmovilizada

Finalmente, la concentración de glucosa (Figura 15 y Cuadro 14) fue diferente estadísticamente ($\alpha = 0.05$) en los tratamientos. El control presentó una menor concentración seguido de T4, T1, T3 y por último T5 que liberó mayor cantidad de

glucosa al final de la reacción. Estos resultados coinciden con lo analizado previamente en la formación e hidrólisis de GOS para cada tratamiento. Es importante aclarar que la concentración de glucosa tanto en el control (a los 20 min) como en T2 (en toda la reacción) fue menor al límite de detección del método utilizado y por tanto no fue posible cuantificarlo, sin embargo, en los cromatogramas correspondientes, se presentó el pico en el tiempo de retención de la glucosa en ambos casos. Los datos sugieren una mayor actividad de transgalactosilación en los primeros 60 min de reacción cuando se aplican pulsos altos (T4 y T5) seguido de una actividad hidrolítica hasta el final de la reacción, caso contrario con pulsos bajos (T3), sin diferencias significativas en el rendimiento total de GOS en todos los tratamientos, demostrando el efecto del ultrasonido en la aceleración de la reacción.

Cuadro No.14 Concentración (mg/mL) glucosa en los diferentes tratamientos con enzima inmovilizada y ultrasonido

Tiempo (min)	Control	T1	T3	T4	T5
20	n.d.*	34.66 ± 1.60 ^b	21.57 ± 1.51 ^c	45.82 ± 0.98 ^d	38.34 ± 1.68 ^e
60	12.66 ± 0.31 ^a	55.78 ± 1.80 ^b	45.96 ± 1.07 ^c	59.29 ± 2.48 ^d	56.03 ± 1.42 ^b
120	57.09 ± 0.14 ^a	74.27 ± 1.42 ^b	72.34 ± 0.41 ^{bc}	70.97 ± 1.58 ^c	82.75 ± 1.84 ^d

*n.d. (por fuera del límite de detección). Los valores son el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una fila son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$).

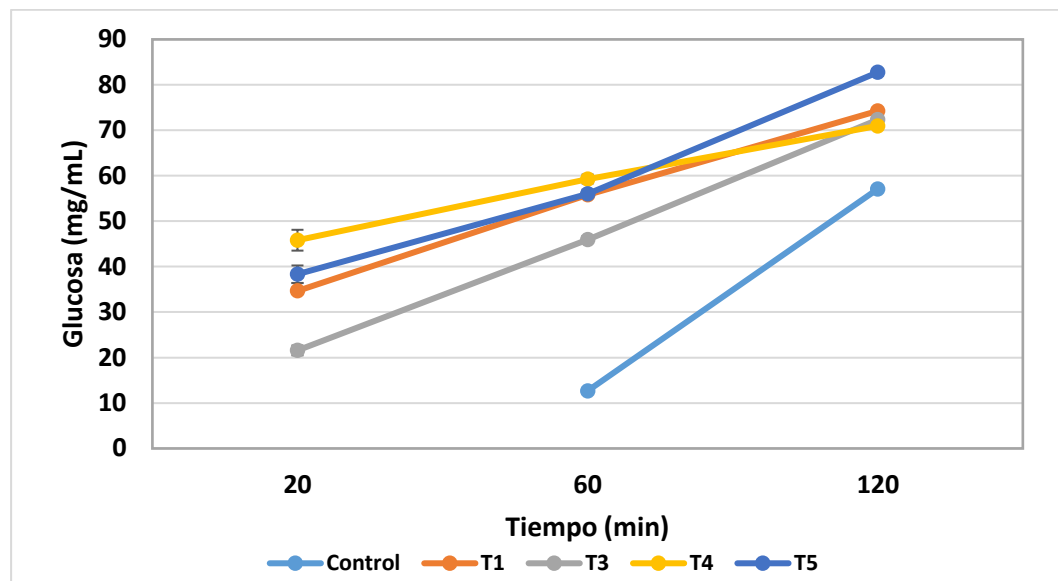


Figura No.15 Glucosa liberada durante tratamientos con ultrasonido y enzima inmovilizada

Con los resultados previamente analizados, principalmente en el rendimiento de GOS y la eficiencia de inmovilización, es probable que la diferencia en el tamaño de partícula del soporte de ambos trabajos influyera en la reacción enzimática y en los productos generados, siendo mayor la concentración de GOS generados en el trabajo de González et al. (2017) ($\geq 30\%$ de GOS) en comparación con los obtenidos ($13.35 \pm 1.66\%$) en este trabajo (Figura 11) bajo la misma concentración inicial de lactosa (27% m/v) y el mismo proceso de inmovilización covalente, además de un menor porcentaje y eficiencia en la inmovilización a lo reportado por González et al. (2017).

En estudios como los realizados por Dalagnol et al. (2017); Jadhav et al. (2014); Leaes et al (2013); Nadar et al. (2017) & Ma et al. (2017), se han analizado la relación entre el porcentaje y la eficiencia de inmovilización sobre el rendimiento de los productos de reacción, en los cuales destacan tres posibles escenarios:

1. Es más probable que con un bajo porcentaje de inmovilización y eficiencia se obtengan bajos rendimientos de productos, indicando que no se retuvo la suficiente cantidad de enzima para tener un buen rendimiento y la enzima

que se retuvo perdió actividad ya sea por un cambio conformacional cerca del sitio catalítico o por impedimento del sitio activo.

2. Un bajo porcentaje de inmovilización, pero alta eficiencia podría presentar mejores rendimientos de productos en comparación con la enzima sin inmovilizar, sugiriendo que la enzima retenida en el soporte mantuvo su actividad, mayor estabilidad en las condiciones experimentales y una reacción más eficiente.
3. Una alta inmovilización y alta eficiencia probablemente favorezca la reacción y aumente el rendimiento de los productos en comparación con la enzima sin inmovilizar.

Con estos datos, posiblemente la pérdida de actividad de la enzima después de la inmovilización por cambios estructurales/conformacionales o impedimentos en el sitio activo, aunado a los efectos del ultrasonido, afectó la cinética de formación de GOS teniendo como resultado un menor rendimiento a lo esperado.

Finalmente, para poder lograr efectos positivos en la actividad y estabilidad del biocatalizador, se sugiere explorar el uso del ultrasonido en cortos tiempos para evitar efectos negativos en la enzima inmovilizada, aplicarlo sólo a al biocatalizador sin el sustrato y posteriormente llevar a cabo la reacción enzimática.

8.3 Actividad enzimática relativa y productos de la reacción de la enzima libre y ultrasonido

En esta sección se presentan los resultados del efecto del ultrasonido sobre la formación de GOS, de los productos de hidrólisis y la actividad relativa con la β -galactosidasa libre.

En la Figura 16 se observa que los tratamientos con una actividad mayor fueron aquellos con amplitudes y/o pulsos altos (T1, T2, T4 y T5), en comparación con el tratamiento T3 (pulsos y amplitud bajos) y el control. Estos resultados sugieren que, dependiendo del tiempo efectivo de exposición y de la intensidad del sonido

aplicado, la estabilidad y actividad de la enzima se verá afectada, aumentando o permaneciendo constante al incrementar la amplitud de onda.

Por otro lado, se presentaron diferencias en la actividad entre la enzima libre e inmovilizada, siendo la primera más susceptible a los fenómenos ultrasónicos, mientras que enzima inmovilizada por unión covalente logró mantener la actividad (mejor estabilidad) durante la reacción en la mayoría de los tratamientos.

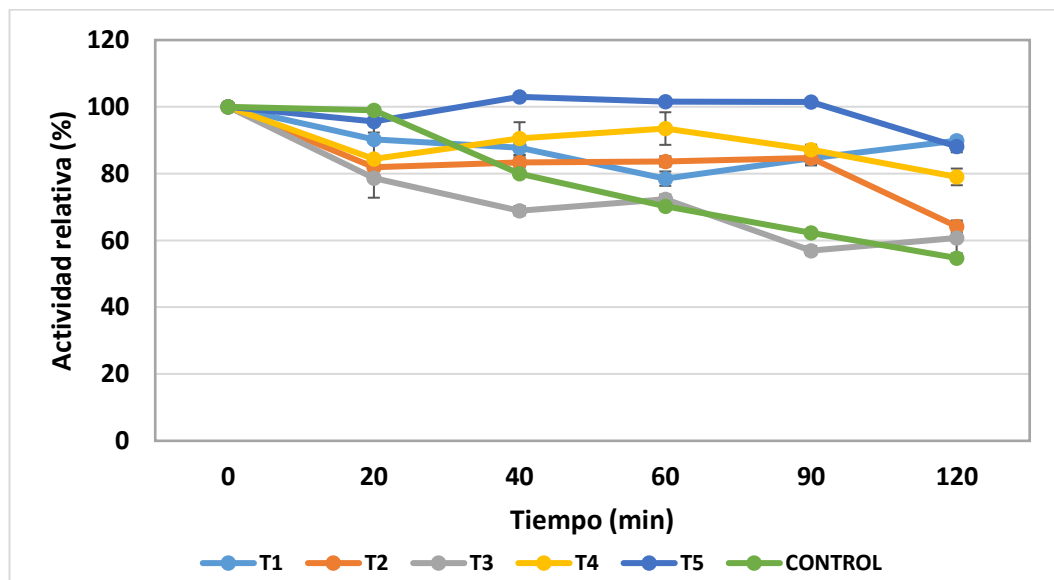


Figura No.16 Efecto del ultrasonido sobre la actividad enzimática de la β -galactosidasa libre de *K. lactis*.

Prosiguiendo con el análisis, en la Figura 17, se muestra la cinética de formación de GOS, en todos los tratamientos existe un aumento en el porcentaje de GOS hasta los 60 min y a partir de ahí T1 y T5 exhiben un incremento de éstos a diferencia de T2, T3, T4 y el control, en los cuales, la concentración de GOS permanece casi constante. Retomando los resultados previos de actividad relativa, T1 y T4 fueron de los tratamientos con mayor actividad durante la reacción, es decir, el uso de intensidades y pulsos altos favoreció la actividad de transgalactosilación de la enzima, por consiguiente, un mayor rendimiento de GOS. A continuación, se

analizará el porcentaje de trisacáridos y tetrasacáridos formados en los tratamientos y el control y evaluar si existen diferencias o no en la cantidad y cinética de cada uno en los tratamientos.

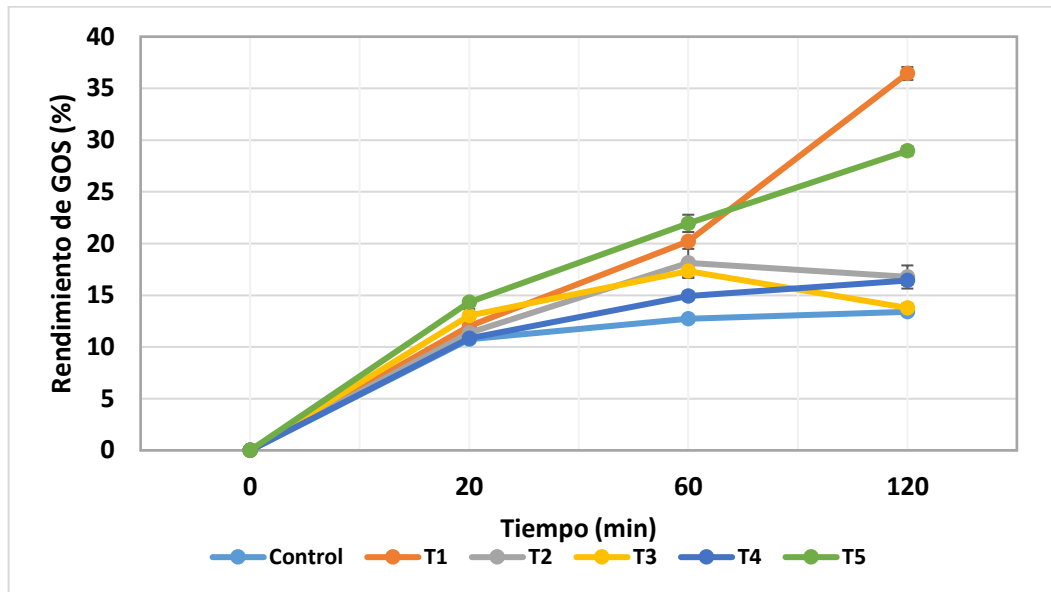


Figura No.17 Rendimiento de GOS (%) para cada tratamiento con ultrasonido y enzima libre.

Para el rendimiento de trisacáridos (Cuadro 15 y Figura 18) se observó que, a los 20 min de reacción, los tratamientos T1, T2, T5 y el control generaron más trisacáridos y en menor proporción T3. Sin embargo, a partir del min 60, T1 y T5 presentaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en el rendimiento con respecto a los demás tratamientos y el control, siendo mayor el porcentaje de trisacáridos en los tratamientos con amplitudes del 30% (T1 y T5), seguido del tratamiento con una amplitud del 30% (T2), en tanto que T3 y T4 formaron menos trisacáridos al igual que el control. Estas diferencias entre los tratamientos con amplitudes altas (30 y 40%), el control y el tratamiento con amplitud baja (20%), sugieren la promoción de la interacción entre la enzima y la lactosa, principalmente la homogeneización del medio y mayor transferencia de masas, al aumentar la intensidad del sonido en la formación de GOS en el tiempo, contrario a la cinética que el control presentó con

un descenso en su generación durante la reacción, mientras que en los tratamientos T1 y T5, el porcentaje de éstos incrementó hasta alcanzar el máximo a los 120 min, siendo T1 con mayor porcentaje de trisacáridos obtenidos ($30.41 \pm 1.58\%$) seguido de T5 ($21.03 \pm 0.23\%$).

Cuadro No.15 Porcentaje de trisacáridos generados en los diferentes tratamientos con enzima libre y ultrasonido

<i>Tratamiento</i>	<i>Trisacáridos a los 20 min (%)</i>	<i>Trisacáridos a los 60 min (%)</i>	<i>Trisacáridos a los 120 min (%)</i>
Control	10.73 ± 0.13^a	12.71 ± 0.08^c	13.46 ± 0.08^c
T1	10.08 ± 0.46^{ab}	17.74 ± 0.50^a	30.41 ± 1.57^a
T2	9.67 ± 0.39^{ab}	13.84 ± 1.19^{bc}	12.87 ± 1.04^c
T3	7.97 ± 0.25^c	12.40 ± 0.95^c	11.95 ± 0.23^c
T4	9.17 ± 0.03^b	12.76 ± 0.58^c	11.38 ± 0.18^c
T5	9.44 ± 0.26^{ab}	16.43 ± 0.69^{ab}	21.03 ± 0.23^b

Los valores son el promedio de tres réplicas \pm desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una columna son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$).

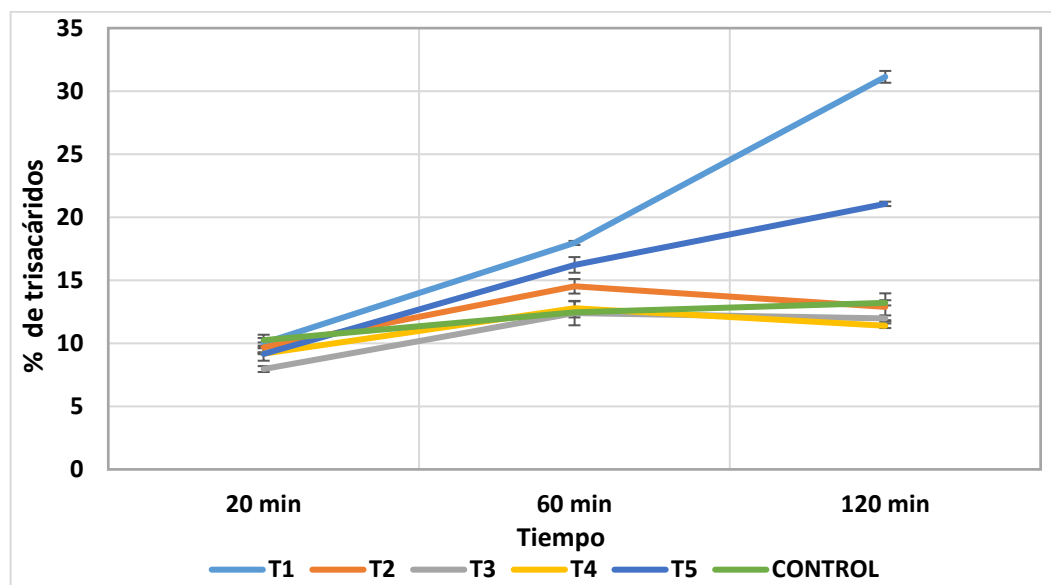


Figura No.18 Trisacáridos generados durante el tratamiento con ultrasonido y enzima libre

Con respecto a la generación de tetrasacáridos se presentaron diferentes comportamientos en los tratamientos y el control Cuadro 16 y Figura 19), teniendo T3 y T5 el mayor rendimiento en el intervalo de 20 a 60 min con diferencias

estadísticas ($\alpha=0.05$) respecto al control, en tanto éste presentó el menor rendimiento a lo largo de la reacción ($0.01 \pm 0.00\%$) y fue diferente a todos los tratamientos ($\alpha=0.05$). Finalmente, a los 120 min, T1 y T5 formaron la mayor cantidad de tetrasacáridos, caso contrario a T3 (20% amplitud), el cual, la menor cantidad de todos los tratamientos, coincidiendo con su cinética de formación e hidrólisis de GOS, a los 120 min T3 presentó una disminución en el rendimiento general, es decir, los tetrasacáridos comenzaron a hidrolizarse en el intervalo de 60-120 min como se observó en las respectivas gráficas. Con estos datos y los anteriores corroboramos que, bajo las condiciones experimentales en estudio, la reacción de transgalactosilación se favoreció con amplitudes y/o pulsos altos tal como lo sugieren Bera et al. (2015), quienes encontraron que la cavitación acústica producida por las ondas ultrasónicas tiene un impacto indirecto en las reacciones enzimáticas, ya sea cambiando la conformación terciaria de la enzima y exponiendo los sitios activos y/o promoviendo el contacto entre la enzima y el sustrato por los fenómenos físicos del ultrasonido.

Cuadro No.16 Porcentaje de tetrasacáridos generados en los diferentes tratamientos con enzima libre y ultrasonido

Tratamiento	Tetrasacáridos a los 20 min (%)	Tetrasacáridos a los 60 min (%)	Tetrasacáridos a los 120 min (%)
Control	0.01 ± 0.00^c	0.01 ± 0.00^e	0.02 ± 0.00^e
T1	1.92 ± 0.26^b	2.44 ± 0.06^c	5.40 ± 0.24^{ab}
T2	1.71 ± 0.03^b	4.27 ± 0.13^b	3.87 ± 0.11^c
T3	5.09 ± 0.47^a	4.92 ± 0.27^{ab}	1.81 ± 0.16^d
T4	1.65 ± 0.04^b	1.74 ± 0.21^d	5.02 ± 0.24^b
T5	5.08 ± 0.24^a	5.51 ± 0.44^a	5.86 ± 0.24^a

Los valores son el promedio de tres réplicas \pm desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una columna son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$).

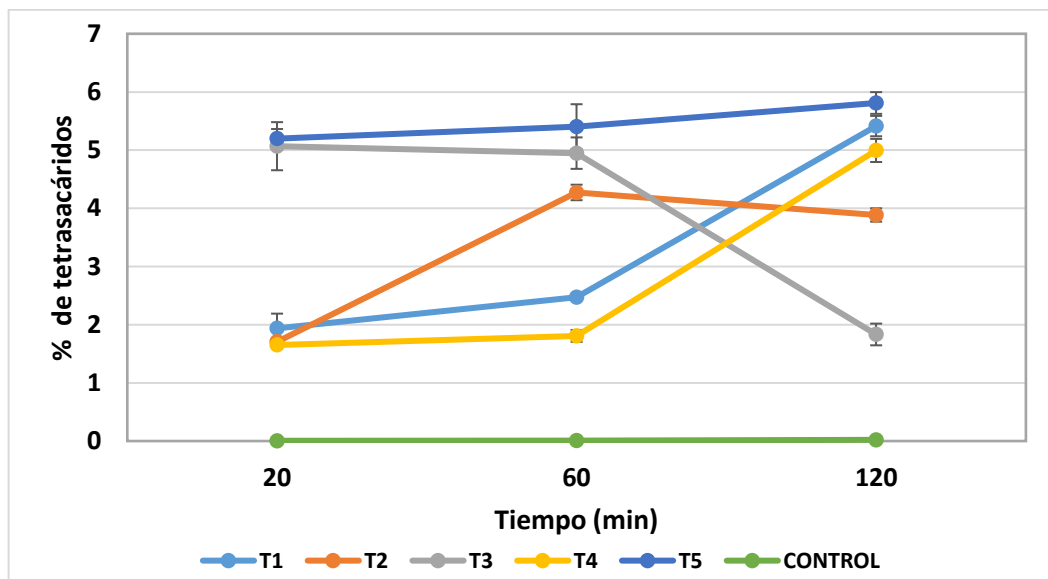


Figura No.19 Tetrasacáridos generados durante el tratamiento con ultrasonido y enzima libre.

Continuando con el análisis, para la concentración de lactosa residual (Cuadro 17 y Figura 20), a los 120 min de reacción, la concentración en los tratamientos fue diferente significativamente ($\alpha=0.05$), siendo T5 el que presentó la concentración más alta, probablemente a la presencia de otros disacáridos formados, los cuales, bajo la técnica de HPLC y la columna empleada, no fue posible separarlos y por tanto cuantificarlos, además de presentar el segundo mayor rendimiento de GOS de todos los tratamientos, esto es, en T5 se favoreció la transgalactosilación de la lactosa y la alta concentración de lactosa a los 120 min se deba a la presencia de alolactosa y 6-galactobiosa, detectados y cuantificados previamente por Rodríguez, et al. (2011) al llevar a cabo la reacción con la lactasa de *K. lactis*.

Por otro lado, en toda la reacción, el control fue diferente estadísticamente, con un descenso menos pronunciado de la lactosa, en comparación con los demás tratamientos, posiblemente a una menor actividad de transgalactosilación, tal como se observó y analizó en las gráficas previas. Con estos resultados, fue posible evidenciar el efecto del ultrasonido en la reacción enzimática bajo las condiciones de estudio, ya que, dependiendo de los parámetros ultrasónicos utilizados, la actividad que prevaleció en la reacción fue distinta: transgalactosilación, en el caso

de los tratamientos con amplitudes de onda al 40%, e hidrólisis en el control y en el tratamiento con amplitud del 20%.

Cuadro No.17 Concentración (mg/mL) de lactosa en los diferentes tratamientos con enzima libre y ultrasonido

Tiempo (min)	Control	T1	T2	T3	T4	T5
0	263.30±2.82 ^a	267.44±0.16 ^b	265.76±0.94 ^a c	267.38±0.20 ^b d	267.47±0.41 ^b	266.95±0.58 ^{cd}
20	165.26±0.01 ^a	139.14±0.24 ^b	139.67±0.48 ^b	129.34±0.21 ^c	141.78±0.43 ^d	123.70±0.64 ^e
60	130.64±0.07 ^a	74.17±0.01 ^b	76.94±0.08 ^c	78.48±0.27 ^d	73.70±0.77 ^b	100.47±0.13 ^e
120	60.33±0.01 ^a	44.73±0.41 ^b	46.30±0.14 ^c	55.48±0.31 ^d	51.70±0.28 ^e	89.37±0.29 ^f

Los valores son el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una fila son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$).

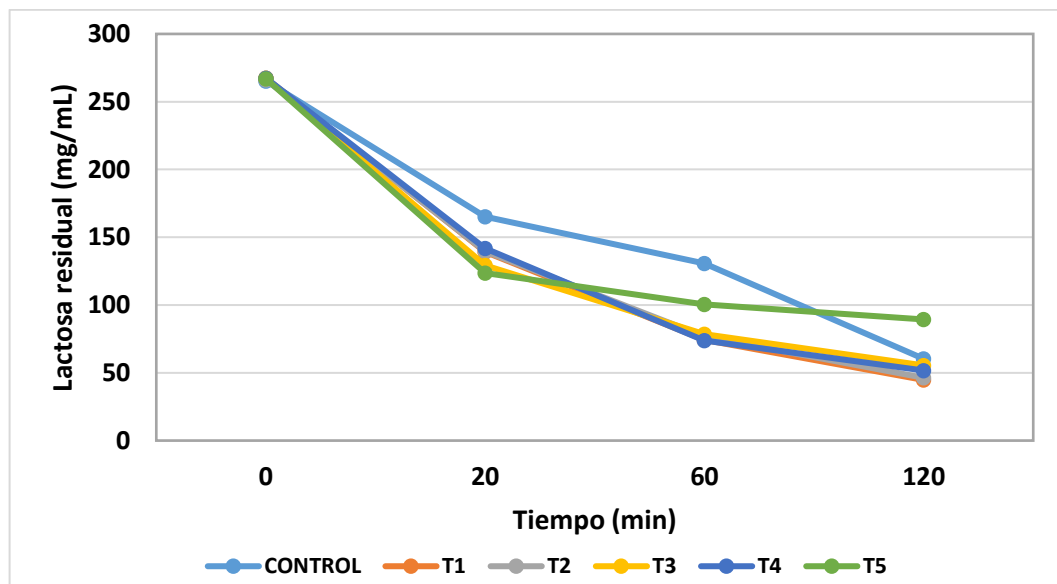


Figura No.20 Lactosa residual durante tratamientos con ultrasonido y enzima libre

Finalmente, en el Cuadro 18 y Figura 21 se muestra la concentración de galactosa en los diferentes tratamientos y el control. En el min 20, T1 liberó la mayor cantidad de galactosa al medio seguido del control y por último T2, T3, T4 y T5. Sin embargo, a diferencia del control, el cual presentó un bajo rendimiento de GOS, en T1 se formó la mayor cantidad de éstos de todos los tratamientos. Estos resultados indican

el predominio de la transgalactosilación de la lactosa en presencia del ultrasonido, mientras que, en el control predominó la hidrólisis.

Cuadro No.18 Concentración (mg/mL) de galactosa en los diferentes tratamientos con enzima libre y ultrasonido

Tiempo (min)	Control	T1	T2	T3	T4	T5
20	30.70±0.18 ^a	45.89±0.07 ^b	28.37±0.23 ^c	28.52±0.07 ^c	27.24±0.14 ^d	28.54±0.11 ^c
60	41.57±0.22 ^a	50.68±0.28 ^b	39.99±0.05 ^a	36.69±0.29 ^c	38.07±0.16 ^d	45.05±0.47 ^e
120	52.47±0.70 ^a	55.34±0.39 ^b	51.74±0.40 ^c	44.72±0.31 ^d	49.12±0.27 ^e	61.82± 0.03 ^f

Los valores son el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una fila son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$).

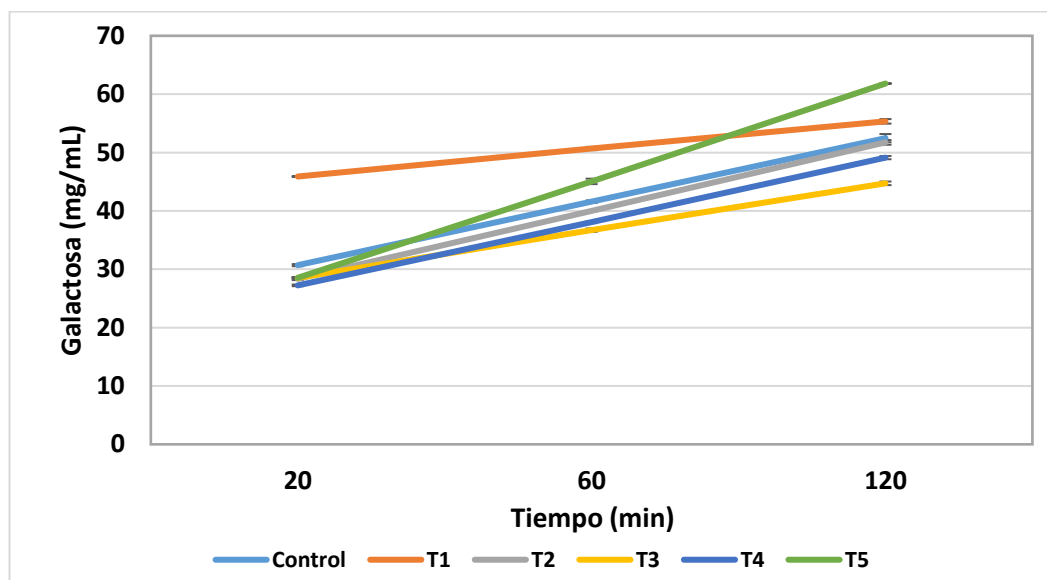


Figura No.21 Galactosa liberada durante tratamientos con ultrasonido y enzima libre

Finalmente, en el Cuadro 19 y Figura 22, se presenta la concentración de glucosa para cada tratamiento. Resulta interesante observar que, en los tratamientos con amplitudes intermedias-altas, en T1y T2, existió un incremento en el tiempo, a diferencia de T5, en el cual aumentó la glucosa en el medio hasta los 60 min para

disminuir hasta el final de la reacción, posiblemente este decremento se deba a la utilización de moléculas de glucosa para la formación de disacáridos transgalactosilados (discutido previamente, Cuadro 17), además de los trisacáridos y tetrasacáridos generados, es decir, no sólo afectó la intensidad del sonido sino también el tiempo efectivo de exposición al ultrasonido tanto en el rendimiento como en el tipo de GOS formados. Caso contrario para el control, en el cual prevaleció la hidrólisis de la lactosa en toda la reacción (Cuadro 18 y Cuadro 19).

Cuadro No.19 Concentración (mg/mL) de glucosa en los diferentes tratamientos con enzima libre y ultrasonido

Tiempo (min)	Control	T1	T2	T3	T4	T5
20	32.72 ± 0.17 ^a	31.47 ± 0.05 ^b	31.74 ± 0.32 ^b	26.81 ± 0.44 ^c	27.63 ± 0.52 ^d	33.29 ± 3.23 ^a
60	54.24 ± 0.03 ^a	57.55 ± 0.18 ^b	60.97 ± 1.62 ^c	57.36 ± 1.76 ^b	56.55 ± 0.50 ^d	70.86 ± 2.07 ^e
120	78.55 ± 0.56 ^a	74.54 ± 0.17 ^b	77.49 ± 1.55 ^c	74.49 ± 1.69 ^b	69.04 ± 0.24 ^d	59.69 ± 2.05 ^e

Los valores son el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una fila son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$).

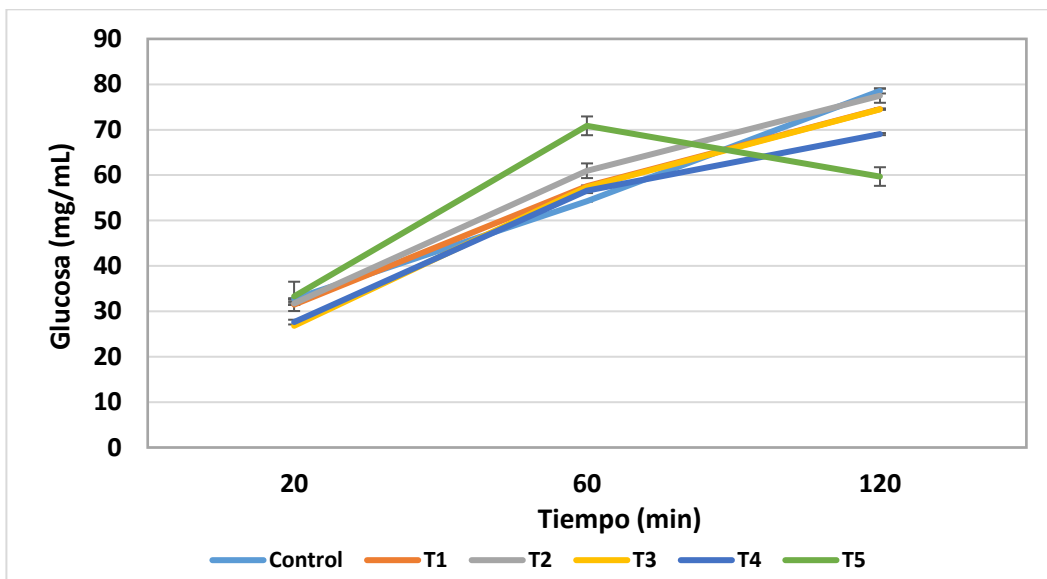


Figura No.22 Glucosa liberada durante tratamientos con ultrasonido y enzima libre.

Con estos resultados, se eligió el tratamiento con una amplitud del 40% y pulsos del 10%, debido a que uno de los objetivos principales de este trabajo fue evaluar el rendimiento máximo de GOS siendo T1 el tratamiento con mayor producción de éstos. A partir de estos datos, se siguió explorando el efecto del ultrasonido en la producción de GOS, pero ahora con dos sustratos: suero ácido de yogurt griego y una solución de lactosa en dos amplitudes de onda: 20 y 40% manteniendo fijo los pulsos (10%) y con un tiempo total de reacción de 180 min.

8.4 Caracterización fisicoquímica del suero ácido de yogurt griego

Para cumplir con el último objetivo de esta investigación, se obtuvo el suero ácido a partir de yogurt griego y posteriormente se caracterizó fisicoquímicamente.

En el Cuadro 20, se muestran los resultados fisicoquímicos del suero ácido obtenido de la elaboración del yogur griego antes y después del pretratamiento por ultrafiltración. Se observa que los valores iniciales de pH, proteínas y lactosa, antes del pretratamiento, son similares a los reportado Menchick et al. (2019) & Rocha et al. (2020). Después del pretratamiento, el pH se ajustó a 6.5 (óptimo para la enzima) y la cantidad de proteínas se modificó, éstas últimas se eliminaron para evitar reacciones de Maillard y para no dañar la columna Hi Plex Duo (Ca) (Agilent Technologies) durante el análisis de las muestras por medio del HPLC (González et al., 2017). Finalmente, fue posible eliminar las proteínas presentes en el suero ácido con la tecnología de membranas, siendo una técnica adecuada para este tipo de muestras.

Cuadro No.20 Datos fisicoquímicos del suero ácido de yogurt griego

Parámetros	Suero ácido	Permeado de suero	Referencia (Menchik et al., 2019)
<i>pH</i>	4.21±0.02	7.2±0.01	4.21-4.48
<i>Proteínas (g/L)</i>	3.09±0.03	n.d.**	2.49-3.71 (mg/g)
<i>Lactosa (%)</i>	3.50±0.06	3.41±0.10	3.33-3.50 (%)

* Los resultados se expresan como la media (n=3) ± desviación estándar. **n.d. (no detectado) por el Método de Bradford

Prosiguiendo con el análisis, a continuación, se presentan los resultados de actividad relativa y productos de la reacción de los tratamientos con ultrasonido y el control, utilizando suero ácido adicionado con lactosa y una solución de lactosa como sustratos.

8.5. Actividad enzimática relativa y productos de la reacción con suero ácido, solución de lactosa y ultrasonido

En el Cuadro 21 se muestran las abreviaturas utilizadas en las gráficas de los diferentes tratamientos y los controles.

Cuadro No.21 Abreviaturas de los tratamientos con y sin ultrasonido

Tratamientos	Parámetros de ultrasonido
C-S: control con suero ácido	Sin ultrasonido
C-L: control con lactosa	Sin ultrasonido
S20A10P: con suero	Amplitud: 20% Pulsos: 10%
S40A10P: con suero	Amplitud: 40% Pulsos: 10%
L20A10P: con lactosa	Amplitud: 20% Pulsos: 10%

L40A10P: con lactosa	Amplitud: 40% Pulsos: 10%
-----------------------------	------------------------------

En el Cuadro 22 y Figura 23 se presentan los datos de actividad relativa (%) de la β -galactosidasa en cada tratamiento. Tanto los controles como los tratamientos con 20% amplitud mostraron una disminución de la actividad a través del tiempo en comparación con los tratamientos con 40% de amplitud para ambos sustratos, presentando una actividad relativa final de $38.0 \pm 0.3\%$ (S20A10P), $47.0 \pm 0.8\%$ (L20A10P), $63.6 \pm 0.1\%$ (L40A10P) y $60.5 \pm 0.4\%$ (S40A10P). Estos resultados sugieren el efecto no sólo del ultrasonido sino también de la composición del sustrato utilizado sobre la actividad. La presencia de diferentes minerales, así como su concentración tanto en el suero ácido como en la solución de lactosa (preparada en solución amortiguadora de fosfato de potasio y magnesio) impactó en la actividad hidrolítica y de transgalactosilación. Montilla et al. (2012), observaron una disminución de la actividad de la β -galactosidasa en presencia de sodio en comparación con el potasio presente en la solución amortiguadora utilizada. Por su parte, Rico et al. (2020), demuestran que la presencia de potasio y magnesio en altas concentraciones presentes en el permeado de suero favoreció la actividad hidrolítica y un menor rendimiento de GOS, mientras que se obtuvieron mayores rendimientos con el suero de queso el cual alta contenía altas concentraciones de sodio y calcio, así como proteínas, contrario a lo reportado por González et al. (2017). Finalmente, Fischer & Kleinschmidt (2015) determinaron un aumento en la actividad de la lactasa de *K. lactis* en presencia de calcio, magnesio, sodio, potasio y amonio en un rango de 10-100 mM, lo que sugiere la dependencia del tipo y concentración de cationes, así como la sinergia entre los minerales presentes y su impacto actividad y estabilidad de la enzima. Por otro lado, resulta interesante que tanto C-L como L20A10P, así como C-S y S20A10P, tuvieron una actividad relativa final sin diferencias significativas. En el caso del control y el tratamiento con lactosa, el comportamiento cinético de la enzima a lo largo de la reacción fue similar a diferencia del control y el tratamiento con suero ácido, lo que nos indica que no

existió un efecto significativo del ultrasonido con amplitud del 20% en la actividad, pero sí entre los tratamientos con los dos sustratos utilizados, cuya cinética de la reacción fue diferente. Resultados similares han sido reportados por Rico et al. (2021) y Fisher & Kleinschmidt (2018), quienes evaluaron el efecto en el rendimiento de GOS utilizando sustratos lácteos y encontraron diferencias significativas, en el rendimiento máximo de GOS, así como en el tiempo en el que se alcanzó este máximo y en la actividad dependiendo del sustrato.

Cuadro No.22 Actividad relativa (%) en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido

Tratamiento	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
S20A10P	100.0±0.2 ^a	99.3±0.2 ^a	91.8±1.3 ^a	63.2±0.3 ^a	50.7±0.5 ^a	61.0±1.0 ^a	38.0±0.3 ^a
S40A10P	100.0±0.2 ^a	66.8±0.2 ^b	59.1±0.2 ^b	70.5±0.4 ^b	68.1±0.4 ^b	67.8±0.4 ^b	63.6±0.1 ^b
L20A10P	100.0±0.3 ^a	59.0±0.3 ^c	57.5±0.7 ^b	54.8±0.7 ^c	51.0±0.4 ^a	53.1±0.4 ^c	47.0±0.8 ^c
L40A10P	100.0±0.5 ^a	94.5±0.3 ^d	67.5±0.2 ^c	57.0±0.3 ^d	79.9±0.2 ^c	72.8±0.2 ^d	60.5±0.4 ^d
C-L *	100.0±0.1	66.2±0.8	61.6±0.6	52.8±0.9	51.4±0.5	46.6±0.3	49.5±1.2
C-S *	100.0±2.2	70.8±2.9	65.7±1.2	55.4±2.3	59.9±1.2	53.5±1.3	41.9±0.5

Los valores son el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una columna son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$). "Para los controles (C-L y C-S) se presenta los valores el promedio ± desviación estándar de triplicado.

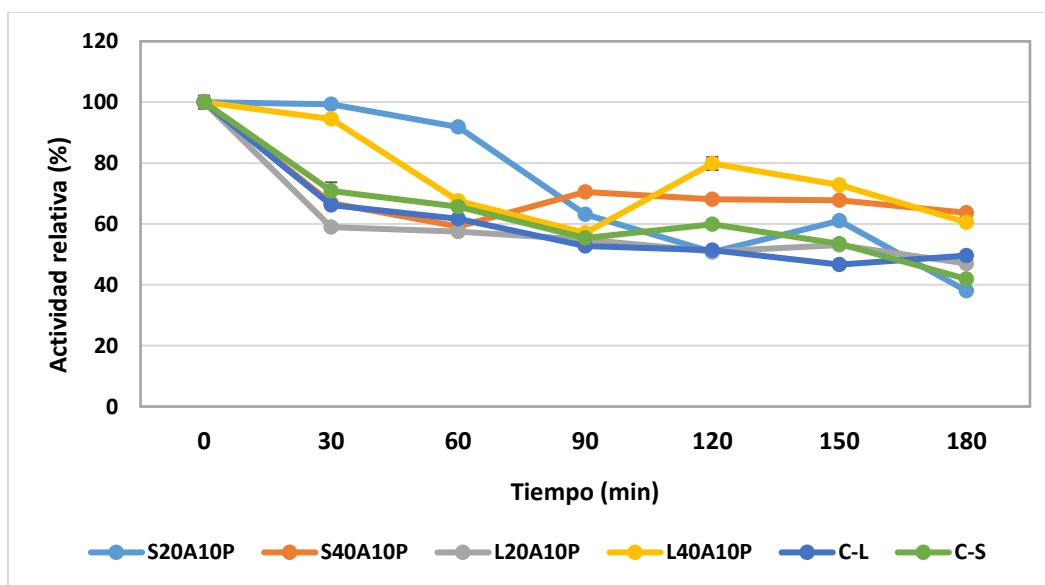


Figura No.23 Actividad relativa (%) en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido

Continuando con el análisis, en el Cuadro 23 y Figura 24, se muestra el rendimiento de GOS (%) en los diferentes tratamientos y los controles. Los tratamientos con una mayor concentración de éstos fueron: suero ácido y 20% amplitud ($28.10 \pm 0.10\%$) a los 150 min, suero ácido y 40 % amplitud ($25.16 \pm 1.35\%$) a los 90 min, y finalmente con solución de lactosa y 40% amplitud ($31.06 \pm 0.36\%$) a los 150 min, presentando diferencias estadísticas ($\alpha=0.05$) con respecto a los controles.

Resulta evidente el efecto que tuvo no sólo el ultrasonido, sino también los minerales presentes en los sustratos tanto en la actividad enzimática (previamente discutido) como en la producción de GOS y el tiempo de máxima formación de éstos, obteniendo un mayor rendimiento al utilizar 40% de amplitud con lactosa seguido del tratamiento con suero ácido y 20% amplitud. Estos datos sugieren que la presencia de cationes en el medio influyó en el proceso de transgalactosilación y/o hidrólisis de la lactosa como lo reportan Montilla et al. (2012), quienes encontraron una mayor actividad hidrolítica de la lactasa de *K. lactis* presencia de altas concentraciones de potasio que de calcio.

También se observó que una vez alcanzado el pico máximo de GOS comienza su descenso debido al consumo del sustrato (lactosa) así como a la hidrólisis de los trisacáridos y tetrasacáridos (utilizados como sustratos para la enzima). Este comportamiento cinético es característico de la β -galactosidasa de *K. lactis*, analizado previamente por Rico et al. (2021).

Continuando con el análisis, se comparó el tiempo de formación máxima y decremento de GOS, encontrándose que al utilizar amplitudes de onda del 40% se presentó una cinética creciente hasta llegar al rendimiento máximo de GOS y posteriormente su descenso, probablemente a la hidrólisis de éstos. Caso contrario al tratamiento con suero ácido y 20% amplitud, y su control, los cuales presentan mayor variación (aumento y disminución en el tiempo) en la formación de GOS,

posiblemente por la presencia de minerales en el suero influyendo en el predominio de la hidrólisis o transgalactosilación de la lactosa.

En suma, el rendimiento máximo de GOS obtenido con suero ácido y 20% de amplitud fue diferente (25.16 ± 1.35 %) a lo reportado por Fisher & Kleinschmidt (2015), quienes obtuvieron un porcentaje de GOS del 10.6 % utilizando lactasa (*K. lactis*) y suero ácido a una concentración inicial de lactosa del 3.8% (m/v) y un rendimiento del 33.5% con suero ácido a una concentración inicial de lactosa del 20% (m/v). Cabe mencionar que las diferencias encontradas en ambos trabajos, se deben, a las variaciones en las condiciones experimentales como son el tipo de suero ácido utilizado, marca comercial de la enzima, concentración enzimática, pH, temperatura, entre otros.

Finalmente, resulta importante señalar la presencia de GOS al tiempo cero en los tratamientos con suero ácido, debido a su formación durante el proceso de elaboración de yogurt griego, porque los ácidos presentes en éste, como el ácido láctico, pueden actuar como catalizadores de la polimerización de la lactosa como lo reporta Menchick et al. (2019), quienes encontraron pequeñas cantidades de fibra soluble (0.4% m/v) en el suero ácido de yogurt griego y de queso cottage. En tanto que, Barile et al. (2009), quienes caracterizaron oligosacáridos presentes en el permeado de suero de queso bovino mediante una combinación de espectrometría de masas de nanoelectrospray por transformada de Fourier (nESI-FTICR). Dependiendo del procesamiento, tipo y pretratamiento del suero, éste tendrá una concentración y variedad diferente de GOS tal como se presentó en este proyecto y los trabajos citados.

Cuadro No.23 Rendimiento de GOS (%) en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido

Tiempo(min)	S20A10P	S40A10P	L20A10P	L40A10P	C-L	C-S
0	12.83±0.24 ^a	12.70±0.08 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00	12.41±0.24
60	22.23±0.57 ^a	22.64±0.72 ^b	3.52±0.77 ^c	19.18±0.85 ^d	18.41±0.38	16.07±0.40
90	24.91±0.01 ^a	25.16±1.35 ^b	13.79±0.76 ^c	26.64±1.68 ^d	17.14±0.77	16.28±0.07
120	21.81±0.60 ^a	25.03±1.74 ^b	14.00±0.66 ^c	27.18±0.58 ^d	16.71±0.42	18.19±0.57
150	28.10±0.10 ^a	24.66±1.02 ^b	14.11±0.45 ^c	31.06±0.36 ^d	17.47±0.63	16.22±0.87
180	25.72±0.67 ^a	24.76±0.92 ^b	15.19±0.45 ^c	26.83±0.68 ^d	18.66±0.68	13.83±0.42

Los valores son el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una columna son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$). *Para los controles (C-L y C-S) se presentan los valores del promedio ± desviación estándar de triplicado.

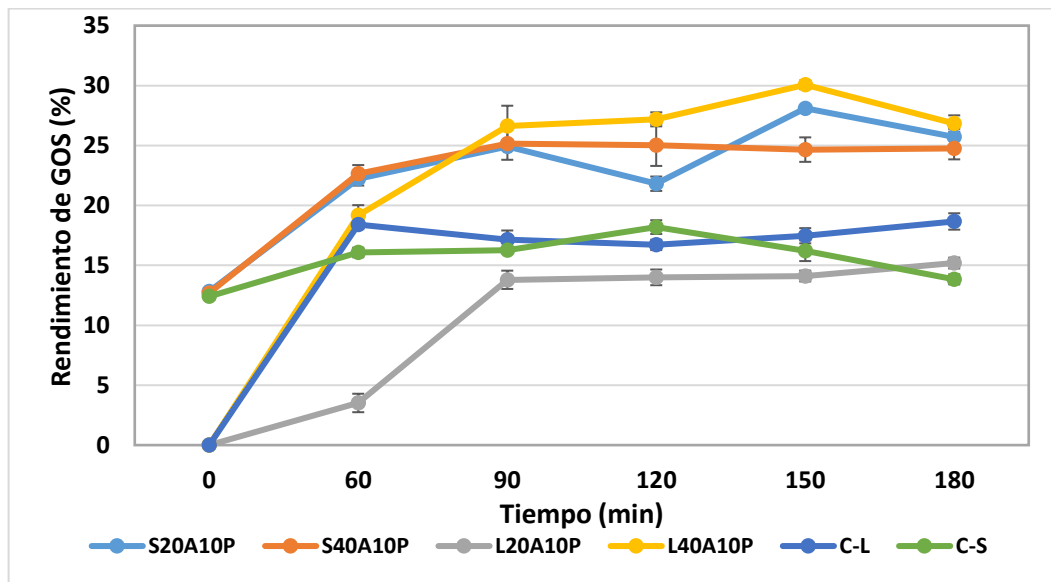


Figura No.24 Rendimiento de GOS (%) en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido

Prosiguiendo con el análisis, en el Cuadro 24 y Figura 25, se muestran los resultados del porcentaje de trisacáridos obtenidos en cada tratamiento y los controles. Para el tratamiento con solución de lactosa y 40% de amplitud, existió un incremento en la formación de éstos alcanzando la concentración máxima ($16.75 \pm$

0.30%) a los 120 min, mientras que con suero ácido y 20% de amplitud se obtuvo un porcentaje máximo de trisacáridos a los 90 min ($17.73 \pm 0.00\%$), cuyos rendimientos fueron diferentes significativamente a ambos controles ($\alpha=0.05$). Por otro lado, el tratamiento con solución de lactosa y 20 % de amplitud no generó una concentración de trisacáridos importante ($7.03 \pm 0.20\%$ a los 180 min) en comparación con los demás tratamientos con ultrasonido, sin embargo, a partir del min 120 al 180, la concentración de trisacáridos no presentó diferencias significativas con el control de suero ácido ($6.67 \pm 0.14\%$), pero sí con el control de lactosa ($4.00 \pm 0.24\%$), evidenciando la prevalencia en la transgalactosilación al aumentar la intensidad del sonido al utilizar la solución de lactosa como sustrato. Estos resultados son similares a lo reportado por Rico et al. (2018) y Sener et al. (2006), quienes evaluaron el efecto del ultrasonido en la hidrólisis de la lactosa y cuyos resultados fueron: aceleración en la reacción, mayor actividad transgalactolítica en las muestras sometidas a ultrasonido y cambios estructurales en la enzima tratada con US. Finalmente, el control con suero ácido presentó una mayor formación de trisacáridos en comparación con el control de lactosa y el tratamiento L20A10P (de los 60 a los 120 min), siendo C-L el que generó menor concentración de trisacáridos de todos los tratamientos no así en el rendimiento de GOS, probablemente a una mayor formación de tetrasacáridos. Estas diferencias en los controles se deben a la diferencia en el tipo y concentración de cationes, los cuales influyen en la actividad de hidrólisis o transgalactosilación con base a los resultados de Montilla et al. (2012).

Cuadro No.24 Porcentaje de trisacáridos (%) generados en los tratamientos con y sin ultrasonido

Tiempo (min)	S20A10P	S40A10P	L20A10P	L40A10P	C-L	C-S
0	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00	0.00±0.00
60	11.29±0.29 ^a	10.41±0.54 ^a	3.52±0.77 ^b	7.69±0.30 ^c	3.56±0.16	7.62±0.23
90	17.73±0.00 ^a	11.15±0.75 ^b	4.15±0.53 ^c	10.57±0.77 ^b	3.18±0.52	5.82±0.03
120	13.09±0.30 ^a	15.29±0.76 ^b	5.84±0.33 ^c	16.75±0.30 ^d	2.95±0.19	5.56±0.18
150	15.07±0.05 ^a	15.66±0.71 ^{ac}	5.83±0.31 ^b	15.23±0.16 ^c	3.57±0.52	5.90±0.47
180	13.44±0.34 ^a	15.58±0.45 ^b	7.03±0.20 ^c	13.03±0.52 ^d	4.00±0.24	6.67±0.14

Los valores son el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una columna son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$). "Para los controles (C-L y C-S) se presenta los valores del promedio ± desviación estándar de triplicado.

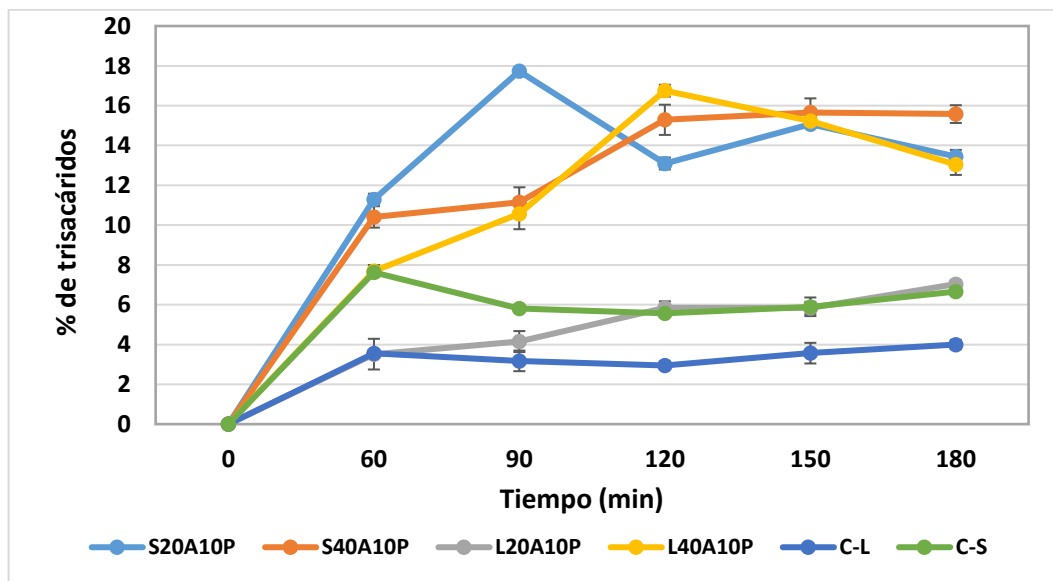


Figura No.25 Trisacáridos generados en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido

En el Cuadro 25 y Figura 26, se muestra el porcentaje de tetrasacáridos en cada tratamiento y sus controles. El tratamiento con suero ácido y 20% de amplitud, presentó un comportamiento contrario al de los trisacáridos, de los 120 a los 150 min, la producción de tetrasacáridos ($13.04 \pm 0.05\%$) aumentó para finalmente disminuir su concentración hasta los 180 min, sugiriendo que los trisacáridos fueron utilizados para la formación de éstos. Para el tratamiento con suero y 40% de

amplitud, desde el inicio hasta el final de la reacción, se presentó un descenso de los tetrasacáridos, sin embargo, como se discutió previamente, produjo una formación constante de trisacáridos, indicando que los tetrasacáridos se hidrolizaron en disacáridos, trisacáridos o en monosacáridos a diferencia del tratamiento con 20% amplitud y suero. Por otro lado, el tratamiento con solución de lactosa y 40% amplitud presentó un incremento a partir de los 120 min hasta el final de la reacción, siendo uno de los tratamientos, junto con el control de lactosa, con mayor formación de éstos ($14.07 \pm 0.20\%$), mientras que en L40A10P se formó tanto trisacáridos como tetrasacáridos en el control prevalecieron estos últimos. Caso contrario en el tratamiento con solución de lactosa y 20% de amplitud, el cual se detectó la presencia de éstos hasta los 90 min siendo el tratamiento con menor formación ($8.16 \pm 0.25\%$). Por último, observamos que el control con lactosa presentó el mayor rendimiento de tetrasacáridos durante la reacción ($14.84 \pm 0.22\%$), sin embargo, el rendimiento de GOS fue bajo posiblemente a la hidrólisis de los trisacáridos, ya sea para formar los tetrasacáridos o hidrolizarse en disacáridos o monosacáridos. Por otro lado, el control con suero ácido alcanzó el máximo de rendimiento a los 120 min y finalmente, una disminución importante en su formación ($7.16 \pm 0.27\%$) hasta los 180 min por la hidrólisis de los GOS como se observó en las Figuras 24 y 25.

Cuadro No.25 Porcentaje de tetrasacáridos (%) generados en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido

Tiempo (min)	S20A10P	S40A10P	L20A10P	L40A10P	C-L	C-S
0	13.35±0.24 ^a	13.11±0.08 ^a	n.d.*	n.d.*	n.d.*	12.41±0.24
60	10.94±0.29 ^a	12.23±0.19 ^b	n.d.*	11.48±0.55 ^a	14.84±0.22	8.45±0.17
90	11.82±0.00 ^a	9.87±0.45 ^{ac}	7.96±0.24 ^b	10.27±0.53 ^c	14.18±0.25	10.71±0.04
120	8.72±0.30 ^{abc}	9.74±0.90 ^a	8.16±0.32 ^b	10.81±0.29 ^c	13.75±0.24	12.63±0.40
150	13.04±0.05 ^a	9.00±0.21 ^b	8.27±0.14 ^c	14.07±0.20 ^d	13.90±0.12	10.33±0.40
180	12.28±0.34 ^a	9.19±0.47 ^b	8.16±0.25 ^c	13.80±0.17 ^a	14.66±0.45	7.16±0.27

Los valores son el promedio de tres réplicas \pm desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una columna son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$). *n.d. (por fuera del límite de detección). **Para los controles (C-L y C-S) se presentan los valores del promedio \pm desviación estándar de triplicado.

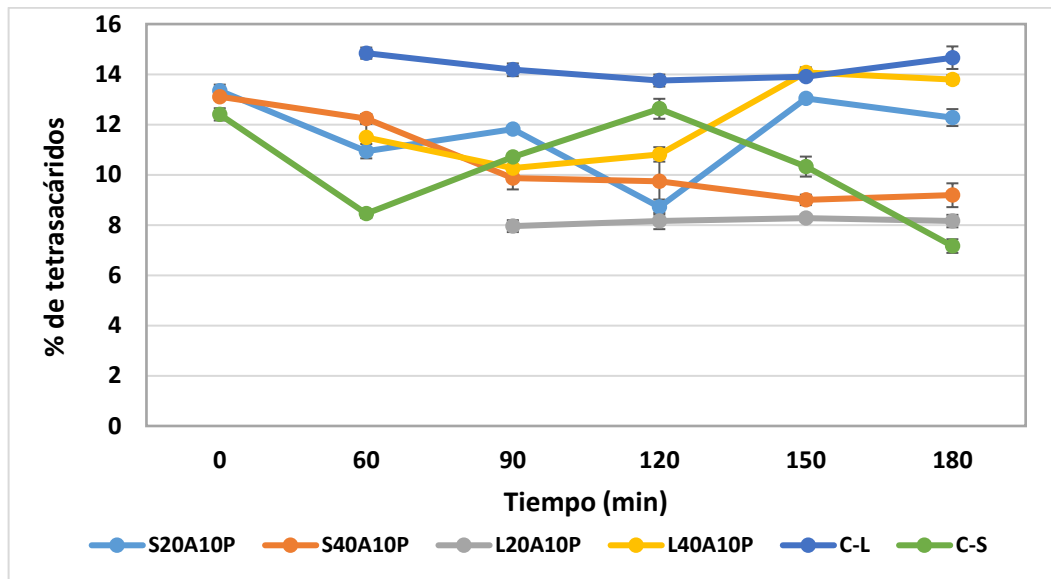


Figura No.26 Tetrasacáridos generados en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido

Para analizar el comportamiento de la lactosa residual en cada tratamiento, aparecen los resultados en el Cuadro 26 y Figura 27. El tratamiento con suero ácido y 20% de amplitud, con suero y 40% de amplitud y con solución de lactosa y 40% de amplitud, presentaron una hidrólisis más rápida de lactosa en toda la reacción en comparación con los controles ($\alpha=0.05$), cuyos resultados concuerdan con el rendimiento máximo de GOS obtenidos en los tres tratamientos. Caso contrario para el tratamiento con solución de lactosa y 20% de amplitud, en el cual la concentración de lactosa durante la reacción fue mayor, junto con los controles, ya sea por la presencia de otros disacáridos transgalactosilados o por una menor actividad enzimática. Por ello, resulta importante recalcar que las concentraciones mostradas en el Cuadro 26 no solamente representan la lactosa, sino que también se incluyen otros disacáridos.

Cuadro No.26 Concentración de lactosa residual (mg/mL) en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido.

Tratamientos	0 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
C-S*	282.48±11.98	202.17±11.78	165.42±8.50	154.63±3.70	132.02±5.92	132.68±1.99
C-L*	264.05±1.93	167.56±2.59	150.64±1.60	156.35±0.71	136.92±1.82	121.95±1.24
S20A10P	263.10±4.68 ^a	109.17±3.43 ^a	101.43±3.82 ^a	78.57±1.03 ^a	69.04±4.43 ^a	70.52±1.28 ^a
S40A10P	267.37±2.09 ^a	134.10±9.39 ^a	124.75±2.61 ^b	125.02±6.78 ^b	124.41±6.91 ^b	117.84±2.19 ^b
L20A10P	261.74±5.02 ^a	164.27±3.47 ^b	151.45±4.31 ^c	153.32±3.26 ^c	130.08±2.42 ^b	128.45±3.25 ^c
L40A10P	262.57±5.80 ^a	40.22±2.58 ^c	29.25±2.51 ^d	15.75±0.79 ^d	12.94±0.48 ^c	9.80±0.81 ^d

Los valores son el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una columna son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$). "Para los controles (C-L y C-S) se presentan los valores del promedio ± desviación estándar de triplicado.

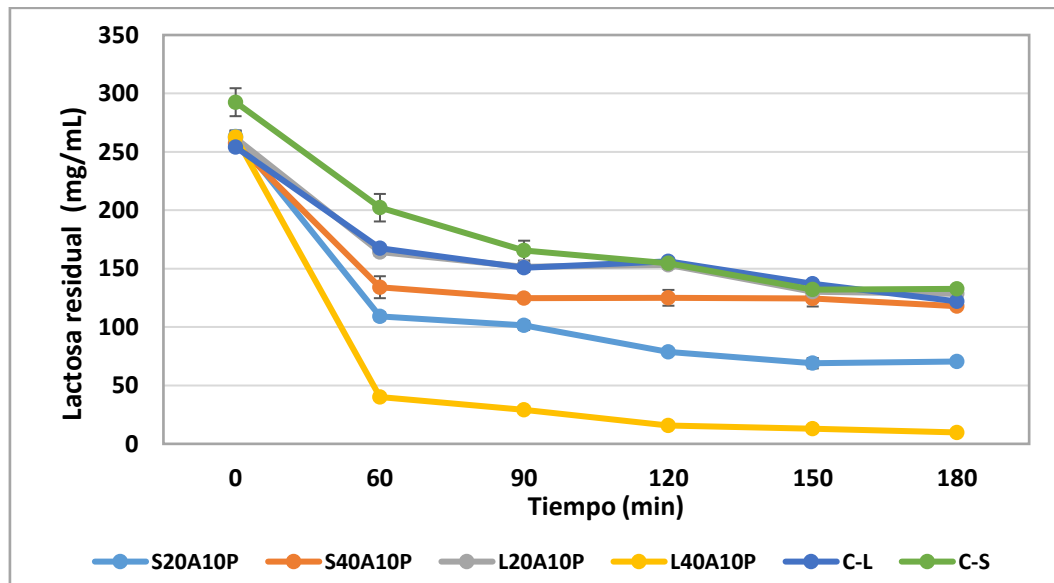


Figura No.27 Lactosa residual en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido

Procediendo con el análisis de los productos de hidrólisis, en los Cuadros (27 y 28) y Figuras (28 y 29), aparecen los datos de concentración de glucosa y galactosa de cada tratamiento. Los tratamientos con suero ácido y 20% de amplitud, suero y 40% de amplitud presentaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con su control, en tanto que, el tratamiento con lactosa y 40% de amplitud fue diferente estadísticamente a C-L, asimismo, los tres tratamientos liberaron mayor concentración de galactosa y glucosa. Por otro lado, tanto el control de lactosa como el tratamiento con 20% de amplitud (sin diferencias estadísticas entre ambos), presentaron la menor concentración de ambos monosacáridos durante toda la reacción. En el control con suero ácido, tuvo variaciones en la concentración de glucosa a lo largo de la reacción, mientras que la concentración de galactosa disminuyó a los 90 min y posteriormente, se mantuvo constante hasta el final de la reacción, coincidiendo con los datos obtenidos de GOS, corroborando la actividad dual de la enzima, la disminución de GOS se reflejó en un aumento en la concentración de galactosa en el medio y viceversa. Para el caso de los tratamientos con suero, observamos que mientras la concentración de lactosa desciende rápidamente en los primeros 60 min, la liberación de los monosacáridos es constante durante el tiempo de reacción, sin embargo, el aumento de la concentración de glucosa fue mayor en comparación que la concentración de galactosa en ambos casos. Este comportamiento coincide con la formación de los trisacáridos, ya que, a los 60 min, cuando la hidrólisis de la lactosa fue más rápida, para el caso de S20A10P, se consiguió la máxima cantidad de éstos de todos los tratamientos, es decir, la galactosa se utilizó para la polimerización y por ende su concentración en el medio de reacción es menor en comparación con la glucosa. Mismo caso para el tratamiento S40A10P, en el cual la concentración máxima de trisacáridos se alcanza después de los 90 min, y esto concuerda con el comportamiento en la hidrólisis de la lactosa, además de que liberó una mayor cantidad de galactosa y glucosa que el tratamiento antes mencionado, sin embargo, al comparar la generación de trisacáridos y tetrasacáridos, observamos que, mientras la formación de los primeros es a través del tiempo, para los tetrasacáridos existió una disminución en los 180 min de

reacción por la disminución de la lactosa durante la reacción y como consecuencia la hidrólisis de éstos para la formación de trisacáridos y/o liberación de galactosa al medio de reacción, recalando que, aunque la lactasa de *K. lactis* forma principalmente disacáridos y trisacáridos, bajo ciertas condiciones experimentales, puede generar tetrasacáridos como los reportado por Fisher & Kleinschmidt (2015), quienes determinaron que la formación de disacáridos y trisacáridos se dio cuando se utilizó suero ácido y una concentración inicial de lactosa del 3.8 % (m/v), mientras que al aumentar la concentración de lactosa al 20% (m/v) con suero ácido concentrado se formaban disacáridos, trisacáridos y tetrasacáridos, encontrando una relación entre la concentración de lactosa inicial, los minerales presentes y el origen de la enzima en la formación de diferentes GOS como ocurrió en este trabajo.

Cuadro No.27 Concentración de glucosa (mg/mL) en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido

Tratamiento	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
C-S*	75.10 ±0.20	85.63 ±0.22	28.39 ±0.43	23.03 ±0.18	37.33 ±0.44
C-L*	20.70 ±3.33	22.25 ±0.58	31.46 ±2.31	33.50 ±0.66	33.86 ±0.23
S20A10P	76.95 ±3.79 ^a	87.47 ±0.64 ^a	94.03 ±0.32 ^a	94.03 ±0.29 ^a	97.98 ±0.41 ^a
S40A10P	49.13 ±1.40 ^b	57.96 ±4.10 ^b	64.34 ±4.34 ^b	75.90 ±1.88 ^b	68.48 ±3.85 ^b
L20A10P	23.42 ±0.39 ^c	24.33 ±3.52 ^c	35.21 ±1.94 ^c	36.91 ±1.60 ^c	41.65 ±1.28 ^c
L40A10P	84.50 ±4.10 ^a	92.51 ±4.78 ^a	98.80 ±2.16 ^a	95.37 ±1.87 ^a	100.23 ±2.26 ^a

Los valores son el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una columna son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$). "Para los controles (C-L y C-S) se presenta los valores del promedio ± desviación estándar de triplicado

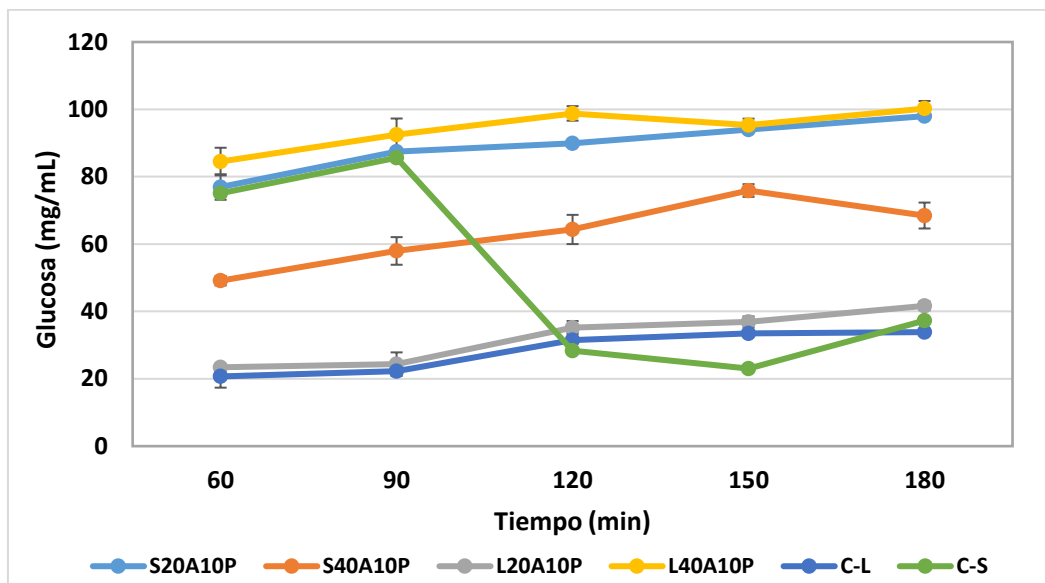


Figura No.28 Glucosa liberada en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido

Por otra parte, el tratamiento L20A10P, presentó un comportamiento similar al control con lactosa, si bien fueron de los tratamientos que liberaron menos lactosa al igual que la glucosa no así en la galactosa (Figura 28 y 29), siendo mayor la liberación en el control que en tratamiento, es decir, en el control predominó la hidrólisis (se reflejó en la baja concentración de GOS) y en L20A10P la transgalactosilación. Caso contrario para el tratamiento L40A10P, el cual liberó la mayor cantidad de glucosa en toda la reacción en comparación con los demás tratamientos y los controles. Estos resultados sugieren que dependiendo de la intensidad del ultrasonido seleccionada, además del tipo de sustrato utilizado, la formación, concentración y grado de polimerización de GOS será diferente, resultado de la prevalencia en la actividad hidrolítica (bajas amplitudes) o de transgalactosilación (amplitudes altas, suero ácido y solución de lactosa) presentada por la β -galactosidasa.

Cuadro No.28 Concentración de galactosa (mg/mL) en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido

<i>Tratamiento</i>	<i>60 min</i>	<i>90 min</i>	<i>120 min</i>	<i>150 min</i>	<i>180 min</i>
C-S*	73.00 ±1.46	86.80 ±0.18	35.64 ±0.32	36.06 ±0.94	38.30 ±6.14
C-L*	16.08 ±0.09	30.95 ±0.39	36.45 ±0.04	41.74 ±0.44	43.52 ±0.61
S20A10P	65.68 ±7.37 ^a	79.64 ±0.65 ^a	80.85 ±1.49 ^a	81.27 ±2.06 ^a	89.34 ±1.68 ^a
S40A10P	41.24 ±0.51 ^b	51.27 ±4.81 ^b	59.72 ±1.33 ^b	69.27 ±2.00 ^b	58.83 ±4.53 ^b
L20A10P	28.98 ±1.49 ^c	33.13 ±1.02 ^c	37.57 ±1.25 ^c	38.71 ±1.94 ^c	42.61 ±2.63 ^c
L40A10P	74.52 ±0.31 ^a	86.71 ±1.31 ^a	104.39 ±3.33 ^d	97.27 ±0.88 ^d	101.85 ±1.57 ^d

Los valores son el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de una letra minúscula dentro de una columna son significativamente diferentes (prueba de Tukey $\alpha = 0.05$). "Para los controles (C-L y C-S) se presentan los valores del promedio ± desviación estándar de triplicado

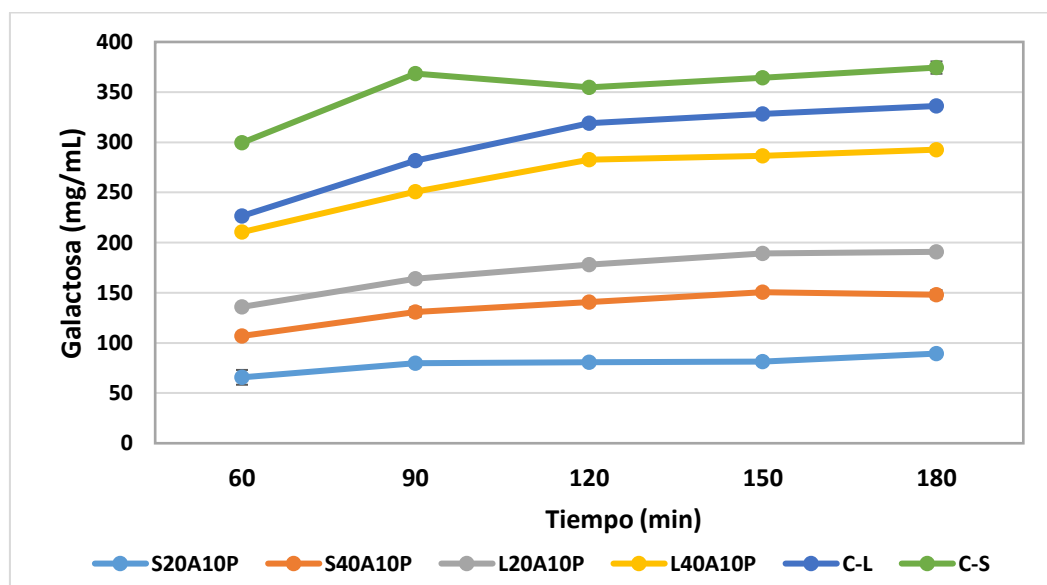


Figura No.29 Galactosa liberada en los diferentes tratamientos con y sin ultrasonido

Finalmente, los tratamientos con suero ácido presentaron altos rendimientos en menor tiempo en comparación con los tratamientos con solución de lactosa, sin embargo, en estos últimos fue más notorio el efecto del ultrasonido, ya que, a amplitudes altas se generó mayor concentración de GOS, mientras que, con amplitudes bajas, el rendimiento fue el más bajo, incluso por debajo de los dos controles evaluados. Por tanto, los cationes presentes en el suero ácido jugaron un papel importante en la estabilidad y actividad de transgalactosilación.

Estos resultados demuestran el potencial uso este subproducto lácteo para producir GOS con propiedades tecnológicas y posibles funciones prebióticas y darle un valor agregado, además de demostrar las ventajas de utilizar tecnologías como el ultrasonido tipo sonda para favorecer la formación de los estos compuestos y obtener mayores rendimientos de los reportados sin el uso de ultrasonido.

9. CONCLUSIONES

- El tamaño de partícula del soporte y la carga enzimática para la inmovilización de la β -galactosidasa fueron parámetros importantes que impactaron tanto en la eficiencia como en el porcentaje de inmovilización y por tanto en la cinética de la reacción, como se observó en este trabajo, en el cual la enzima inmovilizada presentó una mayor actividad hidrolítica en comparación con su contraparte soluble.
- Con la enzima libre y amplitudes de onda altas (40%) se favoreció la formación GOS en comparación con el control y los tratamientos con amplitudes bajas (20%).
- La enzima inmovilizada presentó un rendimiento máximo de trisacáridos en menor tiempo (20 min) al utilizar pulsos altos (30%) independientemente de la amplitud utilizada. El rendimiento de GOS fue menor con enzima inmovilizada que con enzima libre.
- La enzima libre generó el máximo rendimiento a los 120 min de reacción y con 40% de amplitud y 10% pulsos. En estos tratamientos predominó una actividad de transgalactosilación.
- La actividad de la enzima inmovilizada en todos los tratamientos presentó menos variaciones y disminución en el tiempo en comparación con los tratamientos con enzima libre, evidenciando el efecto estabilizador de la inmovilización en la enzima.
- El suero ácido de yogurt griego presentó un buen rendimiento de GOS, obteniendo rendimientos cercanos al del tratamiento con solución de lactosa y 40% de amplitud.
- El suero ácido de yogurt griego demostró tener potencial como sustrato para formar GOS. Su aprovechamiento permite no sólo darle un valor agregado sino también evitar su desperdicio, desecharse al medio ambiente y considerarse un contaminante.

- El uso de ultrasonido es una tecnología con potencial en el área de las reacciones enzimáticas, específicamente, en la producción de GOS, ya que mejoró los rendimientos de éstos en comparación con el control.
- Como perspectivas se tienen el estudio de los tipos de GOS generados en las muestras sometidas o no a ultrasonido y al tipo de sustrato utilizado. También se sugiere evaluar los cambios estructurales y parámetros termodinámicos de la enzima sometida a ultrasonido para conocer con mayor profundidad el efecto tanto del ultrasonido de baja frecuencia como los cationes presentes en sustratos lácteos en la enzima y en su cinética y poder estandarizar el proceso eligiendo los parámetros experimentales que permitan mayor estabilidad enzimática y rendimientos más altos en un menor tiempo.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abadía, L., Castaño, E., Ozimek, L., Romero, S., Ozuna, C., & Amaya, S. (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 84-90.
- Arla Foods Ingredients. (2019). Acid whey isn't waste—It's a goldmine, says Arla Foods Ingredients. Arla Foods Ingredients. Recuperado el 15 de mayo de 2021 en <https://www.arlafoodsingredients.com/about/press-centre/2016/pressrelease/acid-whey-isn-t-waste-it-s-a-goldmine-says-arla-foods-ingredients-1422934/>
- Association of Official Analytical Chemists (2002). Official Methods of analysis of AOAC International (17th ed.). Gaithersburg, Maryland: AOAC International.
- Barile, D., Tao, N., Lebrilla, C., Coisson, J., Arlorio, M., & German, J. (2009). Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 19(9), 524–530.
- Bera, S., Mondal, D., Martin, J. T., & Singh, M. (2015). Potential effect of ultrasound on carbohydrates. *Carbohydrate research*, 410, 15–35.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Carrillo, M., Garcia, A., Tirado, M., Sanchez, R., Huerta, M., Ashokkumar, M., & Alarcon, A. (2021). Recent advances in the application of ultrasound in dairy products: Effect on functional, physical, chemical, microbiological and sensory properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73, 105467.
- Chandrapala, J., & Vasiljevic, T. (2017). Properties of spray dried lactose powders influenced by presence of lactic acid and calcium. *Journal of Food Engineering*, 198, 63-71.

Codex Alimentarius. (2003). Codex Standard for Fermented Milks. Codex Stan 243-2003. Recuperado el 19 de mayo de 2021 de http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B243-2003%252FCXS_243e.pdf

Corredera, A., Sánchez, N., Andújar, F., Olano, A., & Villamiel, M. (2014). Oligosacáridos derivados de la lactosa: síntesis, análisis y bioactividad. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 21(3), 72-81.

Code of Federal Regulations (CFR). (2017). Dairy products processing point source category. *Cornell Law School*. Recuperado el 11 de mayo de 2021 en <https://www.law.cornell.edu/cfr/text/40/part-405>.

Dalagnol, L., Silveira, V., da Silva, H., Manfroi, V., & Rodrigues, R. (2017). Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. *Process Biochemistry*, 61, 80-87.

Duan, X., Zhou, J., Qiao, S. & Wei H. (2011). Application of low intensity ultrasound to enhance the activity of anammox microbial consortium for nitrogen removal. *Bioresource Technology*, 102 (5), 4290–4293

Erickson, E. (2017). Acid whey: Is the waste product an untapped goldmine?. *Chemical & Engineering News*, 95(6), 26-30.

Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2015). Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*, 48, 15-22.

Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2018). Synthesis of galactooligosaccharides in milk and whey: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 678-697.

Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2021). Synthesis of galactooligosaccharides by *Cryptococcus laurentii* and *Aspergillus oryzae* using different kinds of acid whey. *International Dairy Journal*, 112, 104867.

González, F. (2017). Aprovechamiento del suero lácteo como sustrato para la producción de galactooligosacáridos empleando enzima inmovilizada. [Tesis de doctorado]. Universidad Autónoma de Querétaro.

González, F., Tovar, L., Castaño, E., Regalado, C., García, B., Cardador, A., & Amaya, S. (2017). Improvement of covalent immobilization procedure of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for galactooligosaccharides production: Modeling and kinetic study. *Biotechnology Progress*, 33(6), 1568–1578.

Gonzalez, T., & Smith, E. (2014). Soluble fiber from yogurt whey. (U.S. Patent Application No. 14/138,621). U.S. Patent and Trademark Office. <https://patentimages.storage.googleapis.com/a7/80/4f/da27ac1a7f7fec/US20140348979A1.pdf>

Grabarics, M., Csernak, O., Balogh, R., & Beni, S. (2017). Analytical characterization of human milk oligosaccharides – potential applications in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 146, 168–178.

Hanefeld, U., Cao, L., & Magner, E. (2013). Enzyme immobilization: fundamentals and application. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6211-6212.

Hirsh, S., Bilek, M., Nosworthy, N., Kondyurin, A., Dos Remedios, C. & McKenzie, D. (2010). A comparison of covalent immobilization and physical adsorption of a cellulase enzyme mixture. *Langmuir*, 26(17), 14380-1438.

Hutkins, R., Krumbeck, J., Bindels, L., Cani, P., Fahey, G., Jr, Goh, Y. J., Hamaker, B., Martens, E., Mills, D., Rastal, R., Vaughan, E., & Sanders, M. (2016). Prebiotics: why definitions matter. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 1–7.

- Jadhav, S., & Gogate, P. (2014). Intensification in the activity of lipase enzyme using ultrasonic irradiation and stability studies. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(4), 1377-1385.
- Klein, M., Nunes, M., Rodrigues, R., Benvenuto, E., Costa, T., Hertz, P., & Ninow, J. (2012). Effect of the support size on the properties of β -galactosidase immobilized on chitosan: advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. *Biomacromolecules*, 13(8), 2456–2464.
- Ladole, M., Mevada, J., & Pandit, A. (2017). Ultrasonic hyperactivation of cellulase immobilized on magnetic nanoparticles. *Bioresource Technology*, 239, 117-126.
- Lamsal, B. (2012). Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2020–2028.
- Leaes, E., Lima, D., Miklasevicius, L., Ramon, A., Dal Prá, V., Bassaco, M. & Mazutti, M. (2013). Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(1), 21-25.
- Ma X, Wang, D, Yin, M., Lucente J., Wang, W., Ding, T., Ye, X., Liu, D. (2017) Characteristics of pectinase treated with ultrasound both during and after the immobilization process. *Ultrasonics Sonochemistry*, 36, 1–10
- Menchik, P., Zuber, T., Zuber, A., & Moraru, C. (2019). Composition of coproduct streams from dairy processing: Acid whey and milk permeate. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 3978-3984.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 426-428.
- Montilla, A., Corzo, N., & Olano, A. (2012). Effects of monovalent cations (Na^+ and K^+) on galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase. *Milchwissenschaft*. 67, 14-18.

Nadar, S., & Rathod, V. (2017). Ultrasound assisted intensification of enzyme activity and its properties: a mini-review. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 33(9), 170.

Neri, D., Balcão, V., Costa, R., Rocha, I., Ferreira, E., Torres, D., Rodrigues, L., Carvalho, L., & Teixeira, J. (2009). Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry*, 115, 92-99.

Nisha, S., Karthick, A.S., Gobi, N. (2012). A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chemical Science Review and Letters*, 1 (3), 148-155.

NOM-181-SCFI-2010. (2010). NORMA Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, Información comercial y métodos de prueba.

Nsabimana, C., Jiang, B., & Kossah, R. (2005). Manufacturing, properties and shelf life of Labneh: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 58, 129 – 137

Paredes V., Doyen, A., Benoit, S., Margni, M., & Pouliot, Y. (2018). Effect of ultrafiltration of milk prior to fermentation on mass balance and process efficiency in Greek-style yogurt manufacture. *Foods*, 7(9), 144.

Rico, F., Villamiel, M., Ruiz, L., Serrato, J., & Montilla, A. (2020). Effect of the lactose source on the ultrasound-assisted enzymatic production of galactooligosaccharides and gluconic acid. *Ultrasonics Sonochemistry*, 67, 104945.

Rico, F., Serrato, J. C., Montilla, A., & Villamiel, M. (2018). Impact of ultrasound on galactooligosaccharides and gluconic acid production throughout a multienzymatic system. *Ultrasonics Sonochemistry*, 44, 177–183.

Rico, F., Noriega, M., Lancheros, R., & Serrato, J. (2021). Kinetics of galactooligosaccharide (GOS) production with two β -galactosidases combined:

Mathematical model and raw material effects. *International Dairy Journal*, 118, 10-15.

Rocha, D., Kosmerl, E., Krentz, A., Zhang, L., Badiger, S., Miyagusuku, G., Mayta, A., Giusti, M., Jiménez, R., & García, I. (2021). Invited review: Acid whey trends and health benefits. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 1262–1275.

Rodriguez, B., de Abreu, M., Fernandez, L., de Beer, R., Poveda, A., Jimenez, J., Haltrich, D., Ballesteros, A., Fernandez, M., & Plou, F. J. (2011). Production of Galacto-oligosaccharides by the β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(19), 10477–10484.

Ryan, M. & Walsh, G. (2016). The biotechnological potential of whey. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 15(3), 479-498.

Şener, N., Apar, D. K., & Özbek, B. (2006). A modelling study on milk lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication. *Process Biochemistry*, 41(7), 1493-1500.

Su, J., Castro, T. G., Noro, J., Fu, J., Wang, Q., Silva, C., & Cavaco, A. (2018). The effect of high-energy environments on the structure of laccase-polymerized poly (catechol). *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 275-280.

Su, J., Fu, J., Silva, C., & Cavaco, A. (2019). Can laccase-assisted processing conditions influence the structure of the reaction products? *Trends in Biotechnology*, 37(7), 683-686.

Su, J., & Cavaco, A. (2021). Effect of ultrasound on protein functionality. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 105-653.

Suárez, S., Guerrero, C., Vera, C., & Illanes, A. (2018). Effect of particle size and enzyme load on the simultaneous reactions of lactose hydrolysis and transgalactosylation with glyoxyl-agarose immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry*, 73, 56-64.

- Torres, D., Gonçalves, M., Teixeira, J., & Rodrigues, L. (2010). Galactooligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 438-454.
- Valencia, P., Wilson, L., Aguirre, C., & Illanes, A. (2010). Evaluation of the incidence of diffusional restrictions on the enzymatic reactions of hydrolysis of penicillin G and synthesis of cephalexin. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(6), 268–276.
- Wang, Z., Lin, X., Li, P., Zhang, J., Wang, S., & Ma, H. (2012). Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment. *Bioresource Technology*, 117, 222-227.
- Wherry, B., Barbano, D., & Drake, M. (2019). Use of acid whey protein concentrate as an ingredient in nonfat cup set-style yogurt. *Journal of Dairy Science*, 102(10), 8768-8784.
- Zotta, T., Solieri, L., Iacumin, L., Picozzi, C., & Gullo, M. (2020). Valorization of cheese whey using microbial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(7), 2749-2764.