

**Desarrollo del modelo cinético para la producción de galactooligosacaridos (GOS) a partir del lactosuero
usando la enzima β -galactosidasa libre e inmovilizada proveniente de *A.oryzae***

Carlos Fernando Pedraza Medina

Tesis de pregrado

Facultad de Ingeniería

Programa de Ingeniería de Alimentos

Director:

Germán Andrés Castro Moreno

Profesor de la Universidad de La Salle



Universidad de La Salle

Facultad de Ingeniería

Bogotá, Colombia

Desarrollo del modelo cinético para la producción de galactooligosacaridos (GOS) a partir del lactosuero
usando la enzima β -galactosidasa libre e inmovilizada proveniente de *A.oryzae*

Tesis presentada a la Facultad de Ingeniería

Programa de Ingeniería de Alimentos

Universidad de La Salle

para la obtención del título de profesional en Ingeniero de Alimentos

Director:

Germán Andrés Castro Moreno

Bogotá D.C.

2021

Agradecimientos

*A mi madre por el amor y la paciencia que me ha brindado, a mi padre
Por la confianza y la disciplina con la que me ha formado, a mi hermana
Por el apoyo que me ha dado a pesar de las circunstancias,
A la Universidad de la Salle y a la Universidad Nacional por ser los claustros que me formaron
A mis amigos, a mis compañeros y a todos los que me ayudaron y
de alguna manera y olvido mencionarlos aquí, a todos ellos infinitas gracias
por haber hecho posible finalizar este proyecto.*

“El coraje no es tener la fuerza para seguir;
es seguir cuando no tienes fuerza”

Napoleón Bonaparte

RESUMEN

Los galactooligosacaridos (GOS) son prebióticos funcionales que se producen a través de reacciones enzimáticas (hidrólisis y transgalactosilación), que son fundamentales para la conversión de lactosa en GOS. Productos como estos, son fundamentales en la industria alimentaria debido a las funciones digestivas benéficas que cumplen en el organismo. En este proyecto se correlacionaron los parámetros de un modelo cinético que describe la producción de GOS usando la enzima β -galactosidasa de *A.oryzae* en estado libre e inmovilizado. El lactosuero en polvo desmineralizado se dispuso como sustrato principal de la reacción, este se caracterizó evaluando los parámetros de pH, acidez, humedad y contenido de azúcares, al igual que la actividad catalítica de la enzima evaluada con el protocolo de o-NPG. El diseño experimental empleado incluyó 3 concentraciones enzimáticas: 0.16, 0.41 y 0.66 mg enzima/g lactosa evaluada a través del tiempo en 0, 10, 20, 40 y 80 minutos. Los experimentos fueron elaborados en dos repeticiones y los azúcares presentes en todas las muestras fueron cuantificadas por HPLC-RI. Se pudo comprobar que con el uso de la enzima libre se obtuvo una concentración máxima de 50 g/L en los primeros 40 minutos a comparación con su contraparte inmovilizada, en el que se obtuvo una producción máxima de 54 g/L en el mismo tiempo, evidenciando un aumento en el rendimiento de producción de GOS en un 7.4%, esta experimentación fue ajustada a un modelo de primer orden para la producción de oligosacáridos en tercer grado de polimerización, con el fin de obtener los mejores parámetros cinéticos a través de algoritmos genéticos, obteniendo así un índice de correlación de 0.9059 para la enzima libre y 0.9240 para la enzima inmovilizada lo que indica el buen ajuste de los datos experimentales con el modelo propuesto, de este modelo desarrollado a base de algoritmos genéticos, para finalizar este modelo propuesto fue validado con datos extraídos de otras investigaciones consultadas determinando también los parámetros cinéticos de estas y comparándolos con los resultados de este trabajo.

Palabras clave: Galactooligosacaridos, β -galactosidasa, prebióticos, modelo cinético, inmovilización enzimática, *A.oryzae*.

Contenido

RESUMEN.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xii
Lista de ecuaciones.....	xii
Glosario	xiii
Planteamiento del problema	xv
Objetivos.....	xvii
Marco de referencia	1
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Prebióticos.....	1
1.2 Galactooligosacaridos (GOS).....	1
1.2.1Definición	1
1.2.2 Propiedades	2
1.2.2.1 Propiedades fisicoquímicas.....	2
1.2.2.2 Propiedades fisiológicas.....	4
1.3 Producción.....	5

1.3.1 β -galactosidasa	5
1.3.2 Condiciones para el trabajo de la enzima β -galactosidasa	7
1.4 Factores que influyen el rendimiento de producción de GOS	9
1.5 Inmovilización de enzimas.....	10
1.5.1 Definición	10
1.5.2 Ventajas.....	11
1.5.3 Factores de rendimiento de inmovilización.....	12
1.5.4 Métodos de inmovilización	12
1.5.5 Elección del soporte de inmovilización:.....	13
1.6 Cinética enzimática	14
1.6.1 Modelo de Michaelis-Menten	15
1.6.2 Velocidad de reacción.....	17
1.6.3 Constante de Michaelis.....	17
1.7 Estado de arte.....	18
1.7.1 Evaluación de β -galactosidasas en la producción de galactooligosacaridos:	18
1.7.2 Caracterización de cinética de la síntesis de galactooligosacaridos por 3 β -galactosidasas comerciales.	18
1.7.3 Un modelo pseudoestacionario para la síntesis de galactooligosacaridos con β -galactosidasa <i>de</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	19
1.7.4 Aplicaciones potenciales de la enzima β -galactosidasa en procesos de la industria alimentaria.	20
1.7.5. Evaluación de la producción de galactooligosacaridos a partir de materias primas lácteas con β - galactosidasa inmovilizada.	20

1.7.6 Evaluación de un sistema mixto de enzimas para la producción de galactooligosacaridos y acido glucónico a partir de lactosuero como fuente de lactosa.	21
1.7.7 Ingeniería enzimática de β -galactosidasa de <i>Aspergillus oryzae</i> para su aplicación en procesos de transgalactosilación de lactosa.....	21
1.8 Marco legal.....	22
2. Metodología.....	23
2.1 Caracterización:	23
2.1.1 Caracterización de el lactosuero:	23
2.1.2 Caracterización de la enzima:.....	23
2.2 Producción con enzima libre:.....	24
2.3 Producción con enzima inmovilizada.....	25
2.4 Preparación y análisis de la muestra	27
2.5 Construcción del modelo	29
3. Resultados y discusión.....	34
3.1 Caracterización de materias primas:	34
3.2 Caracterización de la enzima:	35
3.3 Producción en enzima libre	36
3.4 Producción en enzima inmovilizada:	40
3.5 Modelo cinético	45
3.6 Validación del modelo.....	48

Conclusiones y recomendaciones	58
4.1 Conclusiones.....	58
4.2 Recomendaciones	59
5. Bibliografía.....	61
6. Anexos	68
6.1 Ficha técnica de el lactosuero:.....	68
6.2 ANOVA de tres factores para producción de GOS, lactosa, glucosa y galactosa	69
6.2.1 Análisis de varianza de GOS	69
6.2.2 Análisis de varianza de lactosa	70
6.2.3 Análisis de varianza de glucosa	71
6.2.4 Análisis de varianza de galactosa	71
6.2.5 Compilado de resultados de los ANOVAS por cada parámetro	72
6.3 Construcción del script de programación usado en el proyecto	72
6.4 Diagramas de Pareto parca cada nivel de concentración.....	76
6.5 Diagramas del algoritmo genético.....	81

Lista de figuras

<i>Figura 1. flujograma de proceso tomado de (Rico Rodríguez, 2018)</i>	8
<i>Figura 2. modelo gráfico de la cinética de Michaelis Menten, tomado de (Doran,2012)</i>	17
<i>Figura 3. Dilución del lactosuero en el buffer Mccilvane</i>	24
<i>Figura 4. esquema general del desarrollo de la cinética enzimática en el lactosuero</i>	25
<i>Figura 5. equipo de Kjeldahl para validar la inmovilización de la enzima</i>	27
<i>Figura 6. inactivación enzimática durante la reacción</i>	28
<i>Figura 7. Equipo de HPLC-IR marca thermo®</i>	29
<i>Figura 8. mecanismo de reacción para la producción de GOS</i>	30
<i>Figura 9. ecuaciones diferenciales usadas para la producción de GOS.</i>	31
<i>Figura 10. diagrama de funcionamiento del algoritmo genético tomado de Ladislao R. (2010)</i>	33
<i>Figura 11 perfiles de concentración en enzima libre obtenido de Matlab®</i>	36
<i>Figura 12 diagrama de Pareto para la enzima libre</i>	39
<i>Figura 13 modelado de la cinética enzimática en enzima inmovilizada obtenido de Matlab®</i>	41
<i>Figura 14 diagrama de Pareto para la enzima inmovilizada</i>	43
<i>Figura 15 diagrama barras en comparación con las constantes cinéticas</i>	47
<i>Figura 16 perfiles de concentración de (Hung & Lee, 2002) obtenido de Matlab®</i>	50
<i>Figura 17 diagrama de Pareto para (Hung & Lee, 2002)</i>	51
<i>Figura 18 diagrama de barras de todos los parámetros cinéticos de las investigaciones consultadas</i>	54
<i>Figura 19 diagrama de Pareto para la enzima libre en A= 0.16 mg lactosa/ g enzima</i>	76
<i>Figura 20 diagrama de Pareto para la enzima libre en B=0.41 mg lactosa/ g enzima</i>	77
<i>Figura 21 diagrama de Pareto para la enzima libre en C=0.66 mg lactosa/ g enzima</i>	78
<i>Figura 22 diagrama de Pareto para la enzima inmovilizada en A=0.16 mg lactosa/ g enzima</i>	78
<i>Figura 23 diagrama de Pareto para la enzima inmovilizada en B=0.41 mg lactosa/ g enzima</i>	79

<i>Figura 24 diagrama de Pareto para la enzima inmovilizada en C=0.66 mg lactosa/ g enzima</i>	<i>80</i>
<i>Figura 25 algoritmo genético calculado para las constantes de la enzima libre.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 26 algoritmo genético calculado para las constantes de la enzima inmovilizada</i>	<i>82</i>
<i>Figura 27 perfiles de concentración en enzima Enzeco® obtenido de Matlab®</i>	<i>83</i>
<i>Figura 28 algoritmo genético calculado para las constantes de la enzima Enzeco®.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 29 perfiles de concentración en enzima Megaenzime® obtenido de Matlab®</i>	<i>85</i>
<i>Figura 30 algoritmo genético calculado para las constantes de la enzima Megaenzime®.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 31 perfiles de concentración en enzima Maxilact® obtenido de Matlab®.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 32 algoritmo genético calculado para las constantes de la enzima Maxilact®.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 33 algoritmo genético calculado para las constantes de (Hung & Lee, 2002)</i>	<i>89</i>
<i>Figura 34 perfiles de concentración de (Manucci, 2009) obtenido de Matlab®</i>	<i>90</i>
<i>Figura 35 algoritmo genético calculado para las constantes de (Manucci, 2009)</i>	<i>91</i>
<i>Figura 36 perfiles de concentración en enzima libre de Andrés & Villarreal(2014).....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 37 algoritmo genético calculado para enzima libre de Andrés & Villarreal(2014).....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 38 perfiles de concentración en enzima inmovilizada de Andrés & Villarreal(2014)</i>	<i>94</i>
<i>Figura 39 algoritmo genético calculado para enzima inmovilizada de Andrés & Villarreal(2014)</i>	<i>95</i>
<i>Figura 40 sílica gel Merck®, usada para la inmovilización enzimática</i>	<i>96</i>

Lista de tablas

<i>Tabla 1. Fuentes de β-galactosidasa (Panesar et al., 2010)</i>	<i>5</i>
<i>Tabla 2. soportes para β-galactosidasa (Panesar, Kumari, & Panesar, 2010)</i>	<i>14</i>
<i>Tabla 3. variables de entrada y de salida para el modelo cinético desarrollado por Matlab®</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 4. caracterización fisicoquímica realizada en el laboratorio</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 5 constantes calculadas por algoritmo genético para enzima libre e inmovilizada</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 6 descripción de las condiciones de operación de la literatura investigada</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 7. parámetros cinéticos obtenidos por el algoritmo genético en todas las investigaciones consultadas</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 8 análisis de varianza de tres factores, calculado por cada parámetro</i>	<i>72</i>

Lista de ecuaciones

<i>Ecuación 1. determinación de velocidad de relación en ecuación Michaelis Menten _____</i>	<i>15</i>
<i>Ecuación 2. ecuación estandarizada de Michaelis Menten _____</i>	<i>15</i>
<i>Ecuación 3. relación enzima sustrato en Michaelis Menten _____</i>	<i>16</i>
<i>Ecuación 4. determinación de actividad enzimática en protocolo de oNPG _____</i>	<i>24</i>

Glosario

- **Bifidobacterias:** bacterias *Gram positivas anaerobias* abundantes en la flora intestinal del organismo, además se consideran importantes por su función de producir ácido láctico; están asociadas con la ayuda de digestión y por lo general residen en el colon.
- **Cinética enzimática:** Estudio de la velocidad de las reacciones químicas que son catalizadas por una enzima.
- **Enantiométricamente:** de enantiómetro, son una clase de isómeros en que la molécula de uno es la imagen especular de otro.
- **GOS:** Galactooligosacaridos o en su acrónimo GOS son productos de fibra soluble presente en la leche materna que está compuesto de cadenas entre 7-9 monosacáridos. Son productos funcionales ya que tienen efectos beneficiosos para la salud.
- **GRAS:** De sus siglas en inglés "*Generally Recognized As Safe*" son productos que según la FDA son seguros para el consumo humano.
- **Hidrólisis:** Reacción química entre una molécula de agua y otra molécula (por lo general ácido), en la que esta se divide y sus átomos van a formar otra unión química.
- **HPLC:** De sus siglas en inglés *high performance liquid chromatography* al español significa cromatografía líquida de alta precisión, es una técnica de separación de componentes basándose en diferentes tipos de interacciones químicas ocurridos al interior de una columna cromatográfica.
- **Inmovilización enzimática:** Proceso en el que se fija una enzima en un espacio determinado para mejorar su actividad catalítica.

- **Lactobacilo:** Bacterias Gram positivas, facultativas y microaerofilas que están presente el tracto intestinal de algunos animales incluidos los humanos.
- **Lactosa:** Tipo de disacárido formado de la unión de glucosa y galactosa presente en la leche de algunos mamíferos incluidos los humanos.
- **MATLAB®:** Sistema de cómputo numérico con lenguaje de programación propio, es vital en el campo matemático e ingenieril debido a su capacidad de realizar una gran cantidad de procesos incluido la programación y la simulación.
- **Modelación:** Procedimientos que analiza una serie de procedimientos matemáticos, con el fin de lograr predecir un acontecimiento futuro basado en el comportamiento general de los datos.
- **oNPG:** *Orto-nitrofenil-β-galactosidasa* es un indicador colorimétrico que determina la actividad enzimática de β-galactosidasa.
- **Prebiótico:** Son productos no digeribles en los que producen efectos beneficiosos en el cuerpo al estimular de modo selectivo el crecimiento de bacterias en el colon capaces de beneficiar la salud del consumidor.
- **Presión osmótica:** Presión necesaria para que una solución detenga el flujo neto del disolvente en el que está inmerso.
- **SCFA:** De su traducción al ingles *Short Chain Fatty Acids* son ácidos grasos de cadena corta son un subgrupo de ácidos grasos con cadenas carbonadas de menos de seis carbonos
- **Sustrato:** Es el tipo de especie química en el que sucede una reacción química, en el que reacciona con un reactivo para generar un producto
- **Termófilo:** Microorganismos que pueden soportar condiciones de vida extremas
- **Transgalactosilación:** Reacciones bioquímicas en las que se obtienen los GOS.
- **β-galactosidasa:** Enzima encargada de catalizar la hidrólisis de galactosidos a monosacáridos.

Planteamiento del problema

Colombia tiene una industria lechera muy importante, esta nación produce cerca de 7717 millones de litros anuales y tratados internacionales como el TLC, generan una presión muy grande sobre este sector con el fin de que pueda ser mas competitivo a nivel regional y pueda ofrecer un producto de calidad (Carulla Fornaguera & Ortega García, 2016), por otra parte se cuenta con una gran demanda de productos lácteos como: el queso, yogurt y lactosuero. En su mayoría el lactosuero está compuesto por agua, lactosa, proteína, grasa y varios minerales como calcio, hierro, fosforo y zinc, sin embargo este subproducto no tiene una gran demanda en el mercado debido a que esta considerado como materia prima no productiva, por lo que en algunos casos este producto es desechado y arrojado a los cauces fluviales, afectando los suelos en los cultivos adyacentes al lugar donde este se procesa (Andrés & Villarreal, 2014).

Este subproducto tiene poco valor comercial para los productores, solo una pequeña parte es utilizada en la alimentación de ganado, mientras que el volumen restante es arrojado en los sistemas de alcantarillado municipal sin ningún tipo de tratamiento o bien es arrojado al medio ambiente, dando como resultado efectos nocivos para los cuerpos de agua (Guerrero et al., 2003). En Colombia este tipo de proyectos para el aprovechamiento del suero son catalogados como “tecnologías emergentes”, debido a que a nivel nacional estas investigaciones se encuentran en fase de desarrollo, al exigir un alto costo de experimentación y tiempo, elevando de manera abrupta los costos de inversión por proyecto. Otro factor a tomar en cuenta es que los GOS no son productos demandados a nivel local, los costos de aduana y envío oscilan aproximadamente entre 15 y 45 *usd/kg* (alibaba, 2019), razón por la cual las investigaciones y producción de GOS a nivel nacional son bastante limitadas.

La siguiente pregunta plantea el génesis de este proyecto de investigación: ¿Qué consideraciones son necesarias para la correlación de un modelo cinético que describa la producción de GOS a partir del lactosuero, haciendo uso de la enzima β -galactosidasa proveniente de *A. oryzae* evaluado en estado libre e inmovilizado?

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar un modelo cinético para la producción de galactooligosacaridos (GOS) a partir del lactosuero usando la enzima β -galactosidasa libre e inmovilizada proveniente de *A. oryzae*

Objetivos específicos

- Evaluar la producción de GOS con la enzima β -galactosidasa de *A. oryzae* (libre e inmovilizada).
- Correlacionar los parámetros para un modelo cinético de la producción enzimática de GOS con el apoyo del software *MATLAB*[®].
- Validar el modelo desarrollado con datos de la literatura.

Marco de referencia

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Prebióticos

Los productos prebióticos son una clase de alimentos funcionales a base de fibras vegetales que actúan en el organismo como fertilizantes estimulando el crecimiento selectivo de una o más cepas de bacterias presentes en el tracto intestinal, modificando su actividad en la microbiota intestinal, logrando así una mejora en la salud y el bienestar del consumidor.

Dentro de las numerosas familias de bacterias anaerobias presentes en el intestino, las familias filogenéticas más usadas en la producción de prebióticos son la “Bifidobacteria” y “Lactobacilo”. Además, las bifidobacterias inhiben el crecimiento de bacterias putrefactivas (*Clostridium perfringens*) y patogénicas (*E. Coli*) presentes en el organismo (Huerta, L. M, 2010). Entre todos los ingredientes alimentarios, los carbohidratos no digeribles (oligo y polisacáridos) son los candidatos más importantes para ser prebióticos. Debido a su estructura química, estos compuestos no se absorben en la parte alta del tracto gastrointestinal, ni son hidrolizados por las enzimas digestivas humanas, por lo que son considerados como “ingredientes colónicos”.

Un compuesto capaz de alcanzar las porciones distales del intestino es un buen candidato para considerar como prebiótico. Así materiales biocomplejos como los hidrolizados de caseína bovina, el extracto de levadura, y péptidos que pueden mejorar tanto el crecimiento de bifidobacterias como de lactobacilos (Stanton y col., 2003).

1.2 Galactooligosacaridos (GOS)

1.2.1 Definición

Los GOS son productos prebióticos que ayudan a mejorar la salud del consumidor al estimular el crecimiento selectivo de algunas bifidobacterias y otras bacterias patógenas que se encuentran en el colon

de quienes los consumen. En otra definición más técnica los GOS son clasificados como carbohidratos no digeribles (NDOs), conocidos por resistir las enzimas digestivas gastrointestinales. Son además solubles actuando como fibra dietaria soluble (SDF). Varios estudios demuestran que los productos GOS pueden ayudar a aliviar problemas de constipación, mejorar la adsorción de minerales tales como calcio y magnesio, así como retardar el desarrollo de cáncer de colon (Huerta, 2010).

Además, han sido reconocidos como un aditivo alimentario GRAS (Generally Recognized as Safe), debido a que son componentes de la leche materna y son producidos a partir de la lactosa ingerida por las bacterias residentes en el intestino. (Huerta, 2010).

1.2.2 Propiedades

Varios estudios han demostrado que los GOS tienen efectos positivos en el organismo por lo que a continuación, se describirán las propiedades fisicoquímicas como fisiológicas que tienen estos productos

1.2.2.1 Propiedades fisicoquímicas

Los GOS proporciona varios beneficios fisicoquímicos para la salud por lo que su consumo lo hace atractivo, dado que los GOS de grado alimenticio disponibles comercialmente son mezclas y sus propiedades fisicoquímicas y fisiológicas varían dependiendo en cierta medida de la mezcla de oligosacáridos y el diferente grado de polimerización.

En general los galactooligosacaridos son incoloros, solubles en agua con una viscosidad similar a la del jarabe y con alto contenido de fructosa, lo que mejora la sensación corporal y bucal en su consumo. Son estables a pH entre 2 a 37 ° C durante varios meses, haciendo posible su aplicación en zumos de fruta no refrigerados, mientras que la presencia de enlaces de tipo β los hace ingredientes de mayor resistencia por altas temperaturas en medio ácido.(Cardelle, 2009).

- Permanecen sin cambios después de un tratamiento de 120-160 ° C durante 10 minutos a pH neutro, esto ofrece un potencial para un amplio rango de aplicaciones en el campo. Son levemente dulces, por lo general debido a su contenido de sacarosa entre 0.3-0.6% y se usa como edulcorante para mejorar otros sabores de los alimentos.
- Son resistentes a la degradación de la saliva, por lo tanto, pueden utilizarse como sustitutos del azúcar en gomas de mascar y confitería.
- No se hidrolizan por las enzimas, por lo que el índice glucémico es reducido y tiene un valor calorífico inferior al 50% de sacarosa, lo que los hace adecuados para diversos alimentos dietéticos bajos en calorías y para el consumo por parte de personas diagnosticadas con diabetes.
- Los GOS tienen una alta capacidad de retención de humedad, ya que previene el secado excesivo producido por lo general en productos horneados, en especial en el pan donde los GOS no se descomponen durante la fermentación con levadura y el proceso de horneado, lo que proporciona al pan un sabor y textura ideales. (Tzortzis, G., & Vulevic, J., 2009).

La estabilidad de los oligosacáridos depende del tipo de monosacáridos que está presente en su estructura con forma de anillo. Así los enlaces son más fuertes y las hexosas están más unidas que las pentosas con tratamientos ácidos ($\text{pH} < 4$), con elevadas temperaturas o un prolongado almacenamiento a temperatura ambiente (Cardelle, A, 2009).

1.2.2.2 Propiedades fisiológicas

- *Modificación de la flora bacteriana:* Favorece la proliferación de las bacterias conocidas como beneficiosas (bifidobacterias y lactobacilos), estas generan SCFAs produciendo como consecuencia un descenso de pH que a su vez inhibe el crecimiento de la flora patógena (Mussato y Mancilha, 2007).

- *Producción de nutrientes:* El género *Bifidobacterium* aporta a la síntesis de vitaminas de tipo B (B1, B2, B6 y B12, ácido nicotínico y ácido fólico) (Gibson y Roberfroid, 1995; Kasper, 1996), aunque no se sabe con certeza la biodisponibilidad de estas vitaminas en el medio (Vitoria Miñana, 2007)

- *Aumento de la movilidad intestinal e incremento de la excreción fecal:* La ingestión de oligosacáridos prebióticos previene el estreñimiento y tiene efectos similares a la ingesta de fibra alimentaria. Los productos finales de la fermentación, los SCFAs son absorbidos por las células epiteliales del colon, al estimular su crecimiento y mejorar la absorción de agua y sales, al incrementar la humedad del bolo fecal mediante presión osmótica, mejorando el movimiento intestinal. (Tungland y col, 2002)

- *Modulación del sistema inmune:* Parece ser que existe una cierta relación entre la ingesta de oligosacáridos con la modulación del sistema inmune. Aunque el mecanismo por el que este efecto tiene lugar no se ha establecido aún. (Schley y Field, 2002)

- *Efecto protector frente a infecciones en el tracto gastrointestinal, respiratorio y urogenital:* Son varios los mecanismos por los cuales las bacterias productoras de ácido láctico pueden reducir las infecciones. El

primero de ellos se encuentra relacionado con la disminución del pH que se origina como consecuencia de la producción de SCFAs. Además, muchas especies de lactobacilos y bifidobacterias son capaces de excretar antibióticos naturales con un amplio espectro de acción. (Gibson y col., 2005).

1.3 Producción

Los GOS son productos prebióticos a partir de la lactosa, para llegar al producto final es necesario llevar a cabo una serie de reacciones que van desde hidrólisis hasta la transgalactosilación. Sin embargo para que esto ocurra es necesario estandarizar las variables de producción como temperatura, pH y concentración, y así determinar los factores que influyen en la producción de GOS:

1.3.1 β -galactosidasa

Esta enzima vital para el desarrollo de este proyecto, posee la capacidad de catalizar las reacciones de hidrólisis de galactosidos complejos a monosacáridos, esta enzima fue una de las primeras en la industria biotecnológica en ser aislada y purificada a partir de diferentes microorganismos, en la *tabla 1* se observa la obtención de la enzima con base en el microorganismo elegido.

Tabla 1. Fuentes de β -galactosidasa (Panesar et al., 2010)

Bacterias	Hongos	Levaduras	Plantas	Órganos de animales
<i>Bacillus megaterium</i>				
<i>Clostridium acetobutylicum</i>				
<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus foetidus</i>	<i>Bullera singularis</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	Albaricoque	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Almendra	Cerebro
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Auerobasidium pullulans</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Fruto de café	Intestinos
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Melocotón	Tejido de la piel
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	<i>Penicillium canescens</i>	<i>Saccharomyces anamensis</i>	Semillas de Alfalfa	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Saccharomyces fragilis</i>		
<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Streptomyces violaceus</i>	<i>Saccharomyces lactis</i>		
<i>Streptococcus thermophilus</i>				
<i>Thermus aquaticus</i>				

Se han utilizado enzimas de especies pertenecientes a *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Cryptococcus* para la síntesis de GOS a partir de la lactosa, esto muestra diferentes requisitos para las

condiciones de reacción en términos de pH y temperatura al igual que formaciones de productos en términos de los enlaces de glucósidos, formados entre los restos de galactosa y el grado de polimerización de los oligosacáridos sintetizados.

Por lo general, el 55% de la lactosa inicial se convierte en una mezcla de productos que contienen glucosa y galactosa debido a la actividad hidrolítica de la enzima, lactosa sin reaccionar, disacáridos de galactosa y glucosa con diferentes enlaces β -glucósidos de la lactosa. Debido a la transferencia de masa interna directa (Tzortzis, G., & Vulevic, J., 2009) las preparaciones comerciales de β -galactosidasas son derivadas de levaduras mesófilas como *Kluyveromyces lactis*. Sin embargo, los estudios sobre β -galactosidasas bacterianas de arqueas extremófilas son crecientes debido a que resisten amplio rango de pH, además de altas, bajas temperaturas y concentraciones salinas.

Tal es el caso de β -galactosidasas recombinantes aisladas de *Arthobacter sp.*, *Planococcus sp.* (psicrófilos), *Pseudoalteromonas haloplanktis* (alcalófila), *Pyrococcus woesei* (hipertermófilo) y *Haloferax alicantei* (halófilo). Estas enzimas y otras son utilizadas en glicotecnología para la síntesis de oligosacáridos enantiométricamente puros, con el fin de contribuir a la mejora de sus funciones biológicas cuando forman glicoproteínas o glicolípidos. En ambientes salinos se han descrito diversas especies del género *Bacillus*, tales como: *B. qingdaonensis*, *B. aidingensis*, *B. salarius* y *B. halochares*, conocidos por producir diversas enzimas hidrolíticas.

Asimismo, pueden existir otros miembros de este género que tengan capacidad para hidrolizar la lactosa, por lo que serían de gran interés como moldes para el diseño de β -galactosidasas con características

especiales para soportar condiciones exigentes de reacción, como altas temperaturas y concentraciones de sustratos.

1.3.2 Condiciones para el trabajo de la enzima β -galactosidasa

Los GOS como productos se pueden obtener mediante síntesis química o por catálisis con el uso de la enzima β -galactosidasa, los pasos fundamentales para que las condiciones de producción sean óptimas que son:

- **Caracterización de materia prima:** la materia prima tiene que estar desmineralizada por métodos de concentración, esto con el fin de que otros componentes no interfieran en la reacción para obtener el mayor contenido de lactosa posible.
- **Activación de la enzima:** es conocido que la enzima necesita unas condiciones ideales para poder funcionar, en este caso en función de la temperatura, por lo que es muy importante el control de la temperatura durante la reacción enzimática.
- **Transgalactosilación:** las reacciones de transgalactosilación son fundamentales para la formación del complejo enzima-galactosilo, es aquí donde se forma los oligosacáridos durante la cinética de reacción, pilar fundamental en la producción de GOS.
- **Purificación de GOS:** es necesario lograr purificar el producto debido a que también libera otros componentes en la reacción como lo es galactosa, así como la presencia de restos de enzima usada y agua.

En el primer paso tiene lugar la formación del complejo enzima-galactosa y la liberación simultánea de la glucosa. Posterior a esto la enzima transfiere la lactosa a aceptores nucleofílicos que contienen un grupo hidroxilo. La transferencia al agua produce galactosa y la transferencia a un azúcar, origina disacáridos, trisacáridos y oligosacáridos de mayor peso molecular.

Estos oligosacáridos formados se convierten a su vez en sustratos para la enzima, que son hidrolizados de modo lento. A mayor concentración de carbohidrato, mayor formación de oligosacáridos y a menor concentración, mayor porcentaje de hidrólisis. (Cardelle, 2009), este tipo de reacción queda mejor ejemplificada en la *Figura 1*:

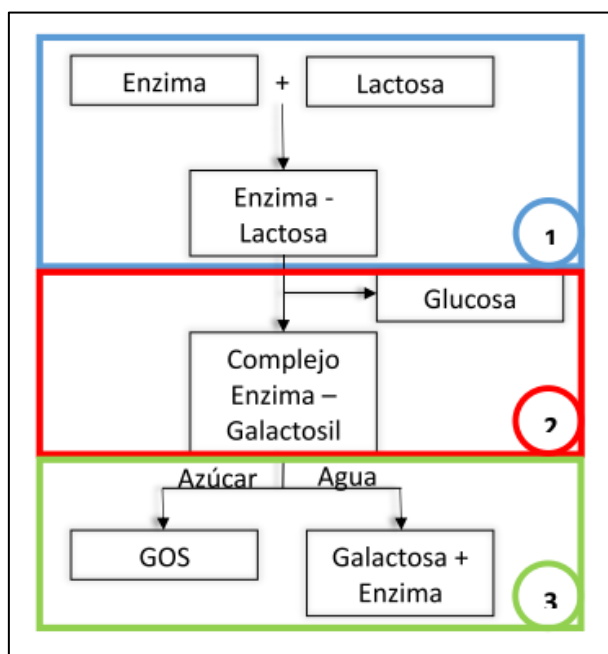


Figura 1. flujograma de proceso tomado de (Rico Rodríguez, 2018)

1.4 Factores que influyen el rendimiento de producción de GOS

➤ **Contenido de agua**

Los procesos de transgalactosilación son producidos en medios acuosos, sin embargo, hay que tener en cuenta que en la producción de GOS también ocurren reacciones de hidrólisis de lactosa, en las que el alto contenido de lactosa no favorece la producción enzimática de GOS. Para reducir el contenido de agua del medio reactante se han propuesto alternativas como aumentar la concentración de lactosa del medio, uso de fluidos presurizados (CO₂, propano, n-butano) o desarrollar la reacción en solventes orgánicos para buscar el cambio en su equilibrio.

➤ **Influencia iónica**

En los procesos de producción de GOS se ha demostrado que la influencia de algunos iones puede influir en las actividades catalíticas de la enzima β -galactosidasa al depender de la bacteria en la cual se extrae la enzima, el uso de iones puede aumentar o ralentizar la producción de GOS. La presencia de iones de potasio y magnesio funcionan como activador en la reacción de hidrólisis cuando se utiliza β -galactosidasa obtenida de *K. lactis*, en cambio con la presencia de iones de calcio, sodio, zinc o cobre el comportamiento de la enzima se ve inhibida, estos reportes son dados para bajas concentraciones de iones y no se reporta información para las cantidades de minerales que se encuentran en el lactosuero.

➤ **Concentración del sustrato**

La concentración de sustrato es un factor importante en la producción de GOS debido a que si la concentración es muy alta o baja, la producción de estos oligosacáridos no será eficiente. Por lo general se ha comprobado que la concentración ideal de lactosa está inicialmente en 25% de lactosa o 36% m/v de GOS con enzimas de microorganismos mesófilos. Por ejemplo *K. lactis* o *A. oryzae* son usadas como

alternativa para el uso de enzimas termoestables ya que permite trabajar a temperaturas más altas y abre el camino para solubilizar la mayor cantidad de lactosa disuelta en el medio.

➤ **Inhibición del sustrato**

En la producción de GOS se presenta una mayor eficiencia en el producto si se trabaja con medios concentrados de lactosa, esto con el fin de lograr una mayor rentabilidad en el producto escogido, sin embargo al superar el límite de solubilidad se puede producir inhibición por exceso, y puede ser una limitante en el desempeño de la enzima.

➤ ***PH y temperatura de reacción***

La estructura de la β -galactosidasa depende de la fuente de la cual es obtenida, esto lleva a que cada enzima presente diferentes condiciones de pH y temperatura óptimas para las reacciones de transgalactosilación, El intervalo óptimo de temperatura para la mayoría de las β -galactosidasas se encuentra entre 30 y 50 °C; temperaturas más altas conducen a la desnaturalización de la enzima, sin embargo las enzimas provenientes de microorganismos termófilos pueden soportar temperaturas superiores a los 70 °C al igual del pH que tiene que estar entre 5 y 7.5 para enzimas de bacterias termófilas.

factores de rendimiento tomado de (Rico Rodríguez, 2018)

1.5 Inmovilización de enzimas

1.5.1 Definición

La inmovilización enzimática es un procedimiento importante debido a que da la posibilidad de reutilizar la enzima al fijarla en un espacio físico determinado, esto es de vital importancia para el diseño del experimento ya que permite trabajar la enzima en varios niveles, lo que ayuda a mejorar la solidez en las reacciones de producción de GOS. Por definición general la inmovilización enzimática es el confinamiento

de una enzima en un área determinada de manera que su actividad catalítica se retenga y pueda ser reutilizada.

Esto ayuda a mejorar la eficiencia de la reacción, lo que ayuda a generar un medio más estable para la producción enzimática. Por razones técnicas y económicas, la mayoría de los procesos químicos catalizados por enzimas requieren su reutilización o el continuo uso de biocatalizadores durante largos periodos de tiempo. Bajo esta perspectiva esta técnica es definida como un método capaz de reutilizar o dar uso continuo de biocatalizadores y enzimas. Por lo tanto, la sencillez y el bajo costo de los métodos juegan un papel fundamental en la selección de protocolos de inmovilización. Es por ello que por medio este protocolo es posible no solo controlar la ubicación de las enzimas sino también modificar sus propiedades selectivas.

(Fajardo Ochoa, Osuna-Castro, Villavelazquez, & Escalante-Minutosakata, 2011)

1.5.2 Ventajas

- Al aislar la enzima en un espacio fijo, la enzima adquiere alta estabilidad, resistencia al esfuerzo cortante y contaminación que se pueda producir en el medio de la reacción.
- Debido a su capacidad de reutilización hace posible que se puedan estudiar procesos continuos haciendo que los costos del experimento disminuyan.
- Previene el acceso de proteasas y mantiene intacta la estructura de la proteína intacta, por lo que la actividad catalítica no se ve afectada.
- Hace posible que tengan rápidas tasas de reacción al igual que una separación fácil de los productos por lo que se puede hacer uso repetitivo del catalizador.

1.5.3 Factores de rendimiento de inmovilización.

En las reacciones de producción de GOS y más en la actividad enzimática existen una serie de problemas que pueden influir en la eficiencia de las reacciones enzimáticas, como se mencionó en los antecedentes, las actividades catalíticas de las enzimas también se ven influidas por variables como el pH, temperatura y agitación de la enzima.

Por otra parte, el mayor problema que presenta la inmovilización enzimática es el bloqueo que en ocasiones sufren los poros de la membrana, debido al diámetro de las partículas de la enzima. En otro contexto la inmovilización de células por adsorción sobre la superficie de materiales es fácil de conseguir, pero al ser la adsorción un fenómeno en su mayoría electrostático y en especial por efecto de la agitación, las células se liberan del soporte en algunos casos. (Jin y Speers, 1999)

1.5.4 Métodos de inmovilización

- **Adsorción de enzimas sobre resinas de intercambio iónico:**

Este es el protocolo más sencillo de inmovilización de enzimas sobre soportes preexistentes. La inmensa mayoría de las proteínas se adsorben a pH neutro en intercambiadores aniónicos o catiónicos. Los soportes que contienen altas concentraciones de sales de amonio cuaternarias o grupos sulfopropil son los más adecuados para una adsorción ideal de las enzimas.

- **Inmovilización covalente:**

La inmovilización covalente de las enzimas, son uno de los métodos de inmovilización más populares, su fundamento se basa en la formación de enlaces covalentes entre el soporte y la enzima al contener los grupos reactivos en la cinética enzimática.

- **Inmovilización de enzimas a través de grupos amino de su superficie:**

Otro método usado es a través de grupos amino, los soportes más ideales son sales de diazonio, las cisteínas, los aspárticos y glutámicos. Los grupos amino de la superficie de una enzima son los grupos más adecuados para la inmovilización de enzimas; los grupos amino cuando no están ionizados son excelentes nucleófilos al reaccionar muy bien con numerosos soportes reactivos.

- **Atrapamiento en geles:**

Otra manera sencilla de inmovilizar enzimas es atraparlas en el interior de geles microporosos que se forman en presencia de la enzima. Los nuevos sólidos tienen una porosidad pequeña que no permite la salida de las enzimas desde la estructura microporosa. Esta metodología de inmovilización no mejora de manera notable las propiedades de las enzimas, aunque puede servir para estabilizar enzimas multiméricas y evitar procesos de interacción intermoleculares indeseables. (Guisán, 2010).

1.5.5 Elección del soporte de inmovilización:

La elección del soporte de inmovilización en la enzima es uno de los factores fundamentales para la óptima reutilización de la enzima, esta depende del método en el que se realiza la inmovilización enzimática. A continuación, se expone en la *tabla 2* los soportes usados para varios tipos de enzimas β -galactosidasas:

Tabla 2. soportes para β -galactosidasa (Panesar, Kumari, & Panesar, 2010)

<i>Método de inmovilización</i>	<i>Organismo</i>	<i>Soporte</i>
Adsorción física	<i>K. fragilis</i> y <i>K. lactis</i>	Quitosano, perlas de quitosano, CPC-silica, PEI-Sepabeads, DEAE-agarosa, perlas de celulosa, agarosa, Celite y Sephadex G-75
	<i>A. oryzae</i>	Resina de fenolformaldehído Membrana de polivinil cloruro y sílica gel Chromosorb-W Polivinil cloruro y sílica
	<i>E. coli</i>	Quitosano
	<i>B. circulans</i>	Monolito cerámico poroso
	<i>B. stearrowthermophilus</i>	Perlas de quitosano
	<i>A. niger</i>	Quitosano
	<i>Thermus</i> sp. T2	Perlas de quitosano Celite, quitosano
	<i>Pisum sativum</i>	Perlas de quitosano
Entrampado	<i>K. bulgaricus</i>	Alginato, usando BaCl ₂
	<i>E. coli</i>	Gel de poliacrilamida
	<i>A. oryzae</i>	Nylon-6 y zeolita, esponja de polivinil alcohol Cryogel, perlas de agarosa
	<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	Perlas de agarosa Alginato de calcio
	<i>Penicillium expansum</i> F3	Hidrogel de polivinilalcohol
	<i>K. lactis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hidrogel de polivinilalcohol Hidrogel de polivinilalcohol
Unión covalente	<i>L. bulgaricus</i>	Cáscara de huevo
	<i>S. anamensis</i>	Alginato de calcio
	<i>E. coli</i>	Clara de huevo, polivinilalcohol, celulosa activada con cloruro de cianógeno, gelatina
	<i>A. oryzae</i>	Sílica, sílica gel activada con TiCl ₃ y FeCl ₃ , membrana de nylon, hidrogel de polivinilalcohol y partículas magnéticas de Fe ₃ O ₄ -quitosano
	<i>K. lactis</i>	Perlas de quitosano, algodón, algodón activado con cloruro de tosilo, Eugrit, grafito y tiolsulfonato/tiolsulfonato
	<i>B. circulans</i>	Eupergit C
	<i>K. fragilis</i>	Sílica-alúmina

1.6 Cinética enzimática

Debido a las condiciones del experimento, la enzima β -galactosidasa de *A. oryzae* tiene unas condiciones de operación específicas, se pretende determinar el comportamiento enzimático que tiene la enzima sobre el sustrato (lactosuero). Para esto las condiciones de operación enzimática necesarias, es necesario buscar un modelo matemático que permita describir el comportamiento enzimático en la producción de GOS, el

diseño de este experimento podrá ajustarse al modelo capaz de predecir la producción de oligosacáridos de tercer grado a través del tiempo.

1.6.1 Modelo de Michaelis-Menten

Este modelo describe la velocidad de reacción de varias reacciones enzimáticas, en reacciones de hidrólisis y fermentación alcohólica. Este modelo recibe este nombre en honor a Leonor Michaelis y Maude Menten. Este modelo sólo es válido cuando la concentración del sustrato es mayor que la concentración de la enzima y en condiciones de estado estacionario. Como se ve en la *Ecuación 1*, r_A representa la velocidad volumétrica de la reacción, C_A es la concentración del reactante A, v_m es la velocidad máxima de reacción y K_m la constante de Michaelis-Menten. (Fernández-Muñoz et al., 2007) datos necesarios para evaluar el comportamiento cinético en reacciones enzimáticas .

$$r_A = \frac{v_m * C_A}{K_m + C_A}$$

Ecuación 1. determinación de velocidad de relación en ecuación Michaelis Menten

En el caso de reacciones enzimáticas y biológicas la ecuación puede describirse como esta representado en la *Ecuación 2*, en esta se puede ver el modelo estandarizado en el que V_{max} es la velocidad volumétrica de reacción y S es la concentración como se expresó en la ecuación la velocidad volumétrica, cabe resaltar que v_m es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en el medio.

$$v = \frac{V_{max} * S}{K_m + S}$$

Ecuación 2. ecuación estandarizada de Michaelis Menten

La teoría propone que la enzima E se combina en primer lugar con el sustrato S para formar el complejo enzima-sustrato ES, A continuación, en la *Ecuación 3*, se explica de manera simple el proceso de reacción de la cinética enzimática.



Ecuación 3. relación enzima sustrato en Michaelis Menten

E corresponde a la enzima, *S* el sustrato, *P* el producto y *ES* es el complejo enzima sustrato, en donde pasa a una segunda etapa útil para formar el complejo enzima libre y producto *P*. Se supone que estas reacciones son reversibles. De manera posterior Briggs-Haldane desarrollaron la teoría que es fundamental para el análisis cuantitativo de todos los aspectos de la cinética de las enzimas para poder determinar de manera ideal el comportamiento enzimático (Doran,2012) .

Una de las características más importantes de la cinética de Michaelis Menten consiste en que el catalizador llega a saturarse a elevadas concentraciones de sustrato, en la siguiente gráfica se muestra que el comportamiento de la velocidad de reacción no aumenta con la concentración del sustrato, sino al contrario su valor de este tiene un valor límite V_{max} en elevadas concentraciones de sustrato como se ve en la *Figura*

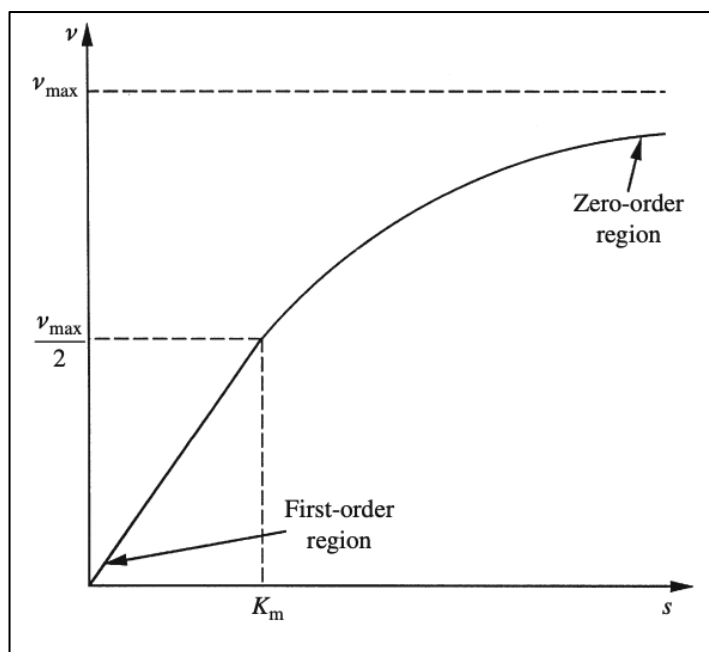


Figura 2. modelo gráfico de la cinética de Michaelis Menten, tomado de (Doran,2012)

1.6.2 Velocidad de reacción

La velocidad de reacción indica la cantidad de sustrato catalizado a través de la enzima en un lapso de tiempo(segundo), una de las características importantes es que la reacción enzimática puede verse afectada por altas concentraciones de sustrato, pH y temperatura por lo que es necesario ajustar la relación enzima-sustrato con el fin de no afectar el rendimiento de la cinética(Fernández-Muñoz et al., 2007.).

1.6.3 Constante de michaelis

La constante de michaelis K_m determina la concentración que tiene el sustrato para iniciar la activación de la enzima, la concentración del sustrato ideal depende de factores como relación de sustrato/enzima, pH y temperatura. A medida que el valor de K_m disminuye la unión del complejo enzima-sustrato (ES) aumenta. El primer paso para determinar el análisis cinético de las reacciones enzimáticas consiste en obtener los

datos de la velocidad de reacción en función de la concentración del sustrato, esto con el fin de estudiar el comportamiento que tiene el sustrato sobre la enzima (Doran,2012).

1.7 Estado de arte

A continuación, se muestran los trabajos mas influyentes en la realización de este proyecto:

1.7.1 Evaluación de β -galactosidasas en la producción de galactooligosacaridos:

En este trabajo se caracterizó y se compararon las actividades catalíticas de las enzimas β -galactosidasas *Enzeco*[®], *Maxilact A4*[®] y *Megazyme*[®] en los que se desarrollaron pruebas catalíticas como lo que es el oNPG en los cuales bajo los parámetros de 40°C, pH 4 y 30% enzima/lactosa. Se determinó que la enzima *Enzeco*[®] tienen una mayor actividad catalítica que las enzimas *Maxilact A4*[®] y *Megazyme*[®], esto fue útil para determinar cuál enzima tenía una mejor eficiencia sobre la actividad enzimática de la enzima en la producción de GOS. (Castro.G, 2017).

1.7.2 Caracterización de cinética de la síntesis de galactooligosacaridos por 3 β -galactosidasas comerciales.

Se desarrolla en este estudio un modelo cinético en el que el efecto de la lactosa, glucosa, galactosa, y los oligosacáridos, fue evaluado y comparado para medir su eficiencia; para este fue usado el sustrato colorimétrico oNPG que toma el papel de indicador y es útil para determinar la actividad de la β -galactosidasa, se comparó la velocidad de reacción con el uso de lactosa u oligosacáridos como sustrato. Se pretende demostrar que la actividad catalítica de β -galactosidasa de *Bacillus circulans* es mucho mayor que las β -galactosidasas de *Aspergillus oryzae* y *Kluyveromyces lactis*, además la β -galactosidasa de *B. circulans* tiene una alta velocidad de reacción de la galactosa como aceptor, en contraste con los de *A. oryzae* y *K. lactis*. Lo que indica que las dos últimas enzimas están inhibidas por la galactosa. Diferencias así explican por qué la β -galactosidasa de *B. circulans* produce mayores rendimientos en la producción de GOS que las

β -galactosidasas derivadas de otros microorganismos, esto sucede debido a que se evaluó la velocidad de reacción en el modelo cinético de cada experimento. Muchas de las constantes de velocidad de reacción para la β -galactosidasa de *B. circulans* fue mayor al aumentar el peso molecular de la isoforma. (Warmerdam, Zisopoulos, Boom, & Janssen, 2014).

1.7.3 Un modelo pseudoestacionario para la síntesis de galactooligosacaridos con β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*.

En esta investigación se construye un modelo en estado pseudoestacionario con el fin de analizar la síntesis cinéticamente controlada de galactooligosacaridos (GOS) a partir de la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*. Este modelo explica la dinámica del consumo de lactosa y la producción de galactosa, glucosa y la producción di, tri, tetra y Penta oligosacáridos durante el experimento. Los resultados experimentales muestran que la formación de GOS en la que contienen solo residuos de galactosa son más elevados en altas concentraciones de sustrato. El modelo desarrollado tiene ocho parámetros, dos de ellos se determinaron en el laboratorio y los otros seis se estimaron al ajustar a los datos experimentales con el uso la regresión de respuesta múltiple. El efecto de la temperatura sobre las constantes cinéticas se determinó en el intervalo del 40° a 55°C, y los datos se ajustaron a la ecuación de tipo Arrhenius. Los parámetros del modelo propuesto son independientes de la carga de la enzima en los medios de reacción usados. Se pudo determinar que la magnitud de las constantes cinéticas y la afinidad de la enzima. (Vera, Guerrero, Illanes, & Conejeros, 2011)

1.7.4 Aplicaciones potenciales de la enzima β -galactosidasa en procesos de la industria alimentaria.

Se plantea demostrar la cantidad de usos industriales que puede tener la enzima β -galactosidasa en el campo alimentario, la enzima β -galactosidasa fue obtenida de alrededor 60 microorganismos distribuidos en tres grupos principales (bacteria, hongos y levaduras), en estas se encuentran microorganismos como *A.oryzae*, *A. Níger*, *L.delbrueckii*, *L.bulgaricus*, *K lactis* y otros. Las enzimas β -galactosidasa fueron inmovilizadas en diferentes tipos de soportes para poder evaluar la capacidad de reutilización de estas enzimas en diferentes procesos. Este experimento se realizó en 3 métodos de inmovilización que son adsorción física, atrapamiento y unión covalente. Proyecto como este pretende mostrar las diversas aplicaciones que tienen la inmovilización de enzimas, en los que están los procesos de producción de GOS e hidrólisis de el lactosuero en procesos industriales.(Panesar et al., 2010).

1.7.5. Evaluación de la producción de galactooligosacaridos a partir de materias primas lácteas con β -galactosidasa inmovilizada.

En este estudio se evaluó la producción de GOS con el uso de lactosa y lactosuero deshidratado, con el uso de la enzima comercial Lactozym 6500 en estado libre e inmovilizado. La síntesis de hidrólisis de lactosa se realizó con temperaturas de 30, 40 y 50 ° C, pH 5.5, 6.0 y 6.5 , una concentración de lactosa 300, 400 y 500 g L⁻¹, y 1.00, 1.25 y 1.50 en relación en peso *enzima/lactosa*. La β -galactosidasa se inmovilizó por el método de atrapamiento en alginato de calcio y unión covalente en sílica gel. Además las enzimas inmovilizadas se caracterizaron con el indicador catalítico oNPG (orto-nitrofenol- β -D- galactopiranosido), al inicio del experimento en la producción de GOS es determinado cual es el soporte ideal para utilizar en la actividad enzimática. Los rendimientos de producción de GOS obtenidos para la enzima libre fue de 32,7% y 24,5% con lactosa y lactosuero. La inmovilización sobre sílice gel tratada mostró una retención de

actividad enzimática del 41,8%, en comparación con la técnica de atrapamiento en enzima libre con un 18,4%; por lo que en este estudio se demostró que al realizar los protocolos de inmovilización enzimática es posible aumentar la eficiencia de la enzima sobre la producción de GOS (Andrés & Villarreal, 2014).

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

En este trabajo se evaluó la producción de GOS a partir de la lactosa presente en el lactosuero, al estudiar el efecto de sus constituyentes sobre la β -galactosidasa de *Kluyveromyces Lactis*, que es la enzima encargada de transformar la lactosa en GOS. Además, se planteó como alternativa para la implementación de un sistema multienzimático (β -galactosidasa + glucosa oxidasa) en el que se aprovechó la glucosa para producción de ácido glucónico. Después fue evaluado el efecto del método de ultrasonido de potencia (US) sobre la actividad de ambas enzimas. Se encontró que la dosis empleada de β -galactosidasa para incrementar la actividad de transgalactosilación es más baja que aquella para favorecer la hidrólisis. Además, los monosacáridos y minerales como el calcio y el potasio, presentes en el suero, pueden tener un efecto inhibitor sobre la producción de GOS a las concentraciones en que se encuentran en el lactosuero. (Rico Rodríguez, 2018).

1.7.7 Ingeniería enzimática de β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* para su aplicación en procesos de transgalactosilación de lactosa.

En este estudio se define como una técnica de aprovechamiento para todo el lactosuero que es desechado al medio ambiente. En este artículo se plantea la posibilidad de aprovechar el lactosuero en la transformación de la lactosa para producir galactosidos y distribuirlos en el mercado industrial, esto debido

a que los galactosidos tienen propiedades tensoactivas para ser utilizados en agentes solubilizantes de membranas. Además, este producto es removible por métodos como diálisis, son biodegradables y no son tóxicos, todo esto como alternativa para aprovechar el lactosuero, debido a que, por lo general ya que este es desechado y produce graves problemas medioambientales (Giacomini. C, 2009).

1.8 Marco legal

Acerca de la producción de GOS en Colombia, no existe una legislación oficial para la investigación y producción de GOS debido a que se cataloga como tecnologías emergentes, por esto en este proyecto como marco legal se inspira en normatividad de Estados Unidos y la Unión Europea que llevan un gran adelanto en el trabajo con GOS

- **Reglamento 258/97 del parlamento europeo y del concejo del 27 de enero de 1997**

Este es un tratado que indica las normas oficiales según en el concejo de la unión europea que indica los parámetros y protocolos necesarios para el uso y el trabajo de los GOS, en la Unión Europea lo que se cataloga como “nuevos alimentos e ingredientes alimentarios”. En esta normatividad explica las generalidades, protocolos y directrices usados en la producción de GOS (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, (1997)).

- **Declaración de excepción en el uso de GRAS del 22 de diciembre del 2015**

Tratado aceptado y basado en la legislación federal FR 18938 del 17 de abril de 1997 publicado por la FDA en apoyo con Nestlé®. Este documento es una completa quía de generalidades, protocolos de obtención y tratamiento comercial de galactooligosacaridos en los Estados Unidos de américa de acuerdo con las leyes federales y las leyes de cada estado (Gaynor, P,2015).

2. Metodología

El proceso fue dividido en cuatro fases principales: caracterización, experimentación, modelación y validación.

2.1 Caracterización:

2.1.1 Caracterización de el lactosuero:

Para el sustrato fue escogido el lactosuero aportado por *lácteos la cristina*[®], según la descripción de la ficha técnica este viene pasterizado, deshidratado y desmineralizado, este sustrato es ideal para la cinética planteada debido a su bajo contenido de humedad y baja carga mineral, condiciones como estas son necesarias debido a que el alto contenido de iones metálicos como calcio y magnesio, puede limitar el desempeño óptimo de la enzima sobre el sustrato, al lactosuero fueron realizadas las pruebas de pH (método AOAC: 973.41), % acidez (método AOAC: 942.15), % humedad (método AOAC: 950.46), contenido de azúcares (método AOAC: 2005.06), conductividad (método AOAC:978.18).

2.1.2 Caracterización de la enzima:

Para la enzima de *A.oryzae* marca Enzeco[®]:FUNGAL LACTASE se aplicó el método de o-NPG (método AOAC:998.04) con el fin de determinar la actividad enzimática de esta β -galactosidasa, el contenido de o-NPG generado en las muestras obtenidas fue medido por espectrofotometría a una longitud de onda (λ) de 420 nm y calculado por la *Ecuación 4*, al comparar las absorbancias obtenidas en una curva de calibración con patrón de o-NPG. La actividad hidrolítica será definida como el número de micromoles de o-NP producidas en un gramo de enzima utilizada por unidad de tiempo (minutos) (Rico Rodríguez, 2018), las absorbancias de la muestra fueron calculadas según la siguiente ecuación:

$$U_{H1} = \frac{\mu\text{mol ONP}_{\text{final}} - \mu\text{mol ONP}_{\text{inicial}}}{\text{g enzima}(\text{ml}) * t(\text{minutos})}$$

Ecuación 4. determinación de actividad enzimática en protocolo de oNPG

2.2 Producción con enzima libre:

El lactosuero se disolvió en buffer Mcilvane a una concentración de 30%(p/v) (Castro.G.2017), con el fin de mantener el pH estable durante toda la reacción. A partir de la relación en concentración calculada de peso/volumen se usa 8.57g de suero en polvo y 11.43 ml en el diluyente buffer Mccilvane completando el aforo de 20 ml requeridos, la solubilización del sustrato se realizó con ayuda de la plancha de agitación magnética a temperatura de 30°C como se ve en la *Figura 3*.



Figura 3. Dilución del lactosuero en el buffer Mccilvane

Después se calienta la solución buffer ya preparada en un baño termostataado hasta alcanzar la temperatura de 55°C como se ve en la *Figura 4*, que es la condición ideal para el desarrollo de la enzima.



Figura 4. esquema general del desarrollo de la cinética enzimática en el lactosuero

Con ayuda de la balanza analítica se pesa la enzima según la concentración a evaluar de 0.14, 0.41 y 0.66 mg enzima/ g lactosa; se agrega el complejo enzimático sobre la solución de buffer Mccilvane en el lactosuero a 55°C, para iniciar la reacción, se tomaron muestras en los tiempos 0, 10, 20, 40, 80 minutos a lo largo de la cinética.

2.3 Producción con enzima inmovilizada

Para inmovilizar la enzima se usó el protocolo de unión covalente por sílica gel basado en la revisión bibliográfica. Se mezclan 10 ml de buffer Mccilvane (pH 4.5) con 1g de sílica gel 60 g/mol marca Merck® y 500µL de enzima β -Galactosidasa de *A. oryzae*, esta mezcla se deja en agitación magnética durante 12 horas para posterior a esto reposar en refrigeración a 4°C (Andrés & Villarreal, 2014).

Cabe resaltar que antes de realizar la cinética, fue necesario comprobar cuales eran los requerimientos de la sílica gel para ser un soporte ideal en la inmovilización, según la información bibliográfica recopilada, se demuestra que la sílica gel Merck® es la ideal en procesos de inmovilización enzimática, ya que este soporte cumple los parámetros de estabilidad requeridos para el desempeño de la enzima β -galactosidasa de *A.oryzae* (Panesar et al., 2010).

Para verificar la inmovilización de la enzima, esta se realizó mediante una prueba de *kjeldahl* (método AOAC:920.53) con el fin de determinar la cantidad de proteína en el medio, en este caso el protocolo tiende a dar valores más precisos debido a que determina el contenido total de nitrógeno en cada una de las muestras, sin embargo cabe resaltar que en este caso, se requiere que el resultado arroje una prueba negativa debido que al fijar la enzima en el soporte elegido esta no debe presentar actividad enzimática, si durante la titulación por acidez titulable esta presenta que existe productos disponibles de proteína, esto indica que la enzima no fue fijada al soporte, por lo que es requerido otro método de inmovilización, este resultado fue verificado debido a el resultado negativo arrojado por la prueba (Dussan, 2008), como se puede ver en la *Figura 5*



Figura 5. equipo de Kjeldahl para validar la inmovilización de la enzima

2.4 Preparación y análisis de la muestra

Las muestras tomadas en las reacciones con enzima libre e inmovilizada fueron de un volumen de 100 μL que se diluyeron 1:20 en buffer y se sometieron a un baño a 90°C para inactivar la enzima como se ve en la *Figura 6*. Después de esto se realizó un choque térmico en agua fría, para posteriormente centrifugar durante 15 minutos a una velocidad de 120 rpm, el líquido sobrenadante se hace pasar por un filtro jeringa de acetato de celulosa con un diámetro de poro de 0.22 μm , después de esto se almacena a 4°C a la espera del análisis HPLC-RI (Castro.G.(2017)).



Figura 6. inactivación enzimática durante la reacción

Cuando la experimentación en el laboratorio finalice, serán obtenidos 60 muestras experimentales que serán analizadas en el cromatógrafo marca Thermo®. Como fase móvil se utilizó agua desmasificada, destilada y desionizada, en una columna Benson BP100Na+, una temperatura de 80°C, caudal de 0.5 ml/min y un detector IR de marca shodex101a. El equipo de cromatografía líquida en alta eficiencia evalúa los 4 parámetros necesarios para la cinética, que son GOS-3, Galactosa, Glucosa y Lactosa, y estos datos experimentales fueron tomados en los laboratorios de ingeniería química de la Universidad Nacional de Colombia, como se ve representado en la *Figura 7*



Figura 7. Equipo de HPLC-IR marca thermo®

2.5 Construcción del modelo

En esta sección del proyecto serán correlacionados los parámetros de la producción de enzima libre e inmovilizada con el software Matlab®, este analiza los perfiles de concentración del modelo a través del tiempo cumpliendo un diseño experimental de $3^1(2)(2)$, debido a que el experimento consta de 3 niveles por cada concentración, solo fue manipulada una variable del experimento (concentración) y posee 2 factores que representan cada duplicado tanto como para la enzima libre como para la enzima inmovilizada. Fueron usados 3 soluciones de complejo enzimático en varias concentraciones (0.16, 0.41 y 0.66 mg enzima /g lactosa), esto quiere decir que en 5 lapsos de tiempo (0, 10, 20, 40, y 80 min), se tendrán 5 puntos muestrales por cada solución enzimática y debido a que el experimento tiene 2 repeticiones, se obtendrán un total de 30 datos con enzima libre y otros 30 datos de enzima inmovilizada, generando un total de 60 muestras experimentales.

En estas muestras fue cuantificado la cantidad de azúcares disponibles en cada muestra (medido por HPLC-RI), posterior a esto se tuvieron 60 puntos muestrales por cada parámetro evaluado (GOS, Lactosa, Glucosa y Galactosa), para obtener un total de 240 puntos muestrales que harán parte de las concentraciones experimentales correlacionadas por el modelo desarrollado.

Este modelo usado fue planteado por el autor (*Andrés & Villarreal, 2014*), en este se indica como obtener y evaluar la producción de oligosacáridos en tercer grado de polimerización (GOS) planteado en la *Figura 8* y en el que se explica el mecanismo de reacción de este modelo, este modelo ha sido planteado también por autores como (Boon et al., 1999; Chen et al., 2003) ya que tiene en cuenta la concentración de todos los compuestos involucrados en la reacción.

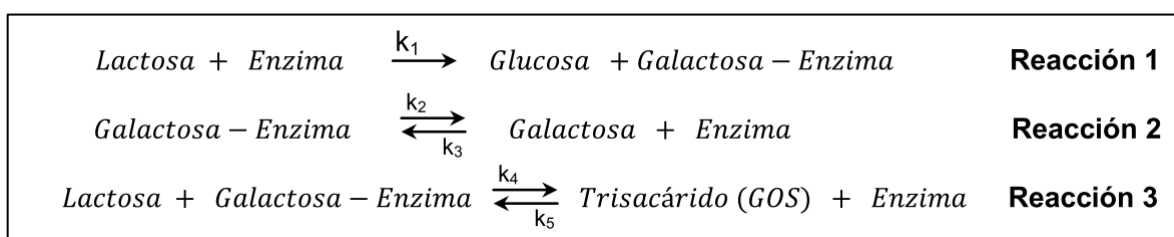


Figura 8. mecanismo de reacción para la producción de GOS

Tabla 3. variables de entrada y de salida para el modelo cinético desarrollado por Matlab®

Variables de entrada	Variables de salida
<p>Estado enzimático: uso la enzima β-galactosidasa de <i>A.oryzae</i> en estado libre e inmovilizado.</p> <p>Concentraciones de enzima: (0.16, 0.41 y 0.66 mg enzima /g lactosa).</p>	<p>Concentraciones calculadas: expresadas en el modelo de manera grafica por cada parámetro evaluado GOS, Lactosa, Glucosa y Galactosa.</p> <p>Constantes cinéticas: representadas como k_1, k_2, k_3, k_4 y k_5.</p>

Como se pueda apreciar en la Tabla 5 se detallan las variables de entrada y de salida del modelo, para las variables de entrada se tienen las concentraciones de enzima en los 4 parámetros evaluados y el estado enzimático en libre y inmovilizada, variables que son manipuladas en el trabajo.

Como variables de salida serán extraídos las concentraciones calculadas, quienes serán representadas gráficamente por una línea de color, las constantes cinéticas de reacción k_1 , k_2 , k_3 , k_4 y k_5 en los que k_4 y k_5 son los parámetros que regulan la producción de GOS y el error del modelo en la obtención de las constantes cinéticas, que determina que tan eficiente fue el algoritmo genético en determinar las constantes cinéticas de la reacción .

La resolución de las ecuaciones diferenciales y determinaciones de las constantes del modelo cinético, se realizaron a través de la herramienta de algoritmo genético de Matlab®, un algoritmo genético es una serie de pasos organizados a seguir, hasta dar con la solución de un problema determinado, esta herramienta es un método de optimización, en el que se emula la evolución biológica para la solución de un problema específico, básicamente el algoritmo desarrolla una serie de posibles soluciones al problema planteado y selecciona cuales soluciones son las mas aptas para pasar a la siguiente generación descartando aquellas que no son aptas con la solución buscada, este proceso es repetido una y otra vez,

hasta que a través de la selección natural se encuentra cual solución es la mas adecuada al problema planteado(Ladislao R. (2016) , así como se ve representado En el esquema presentado en la *Figura 10*.

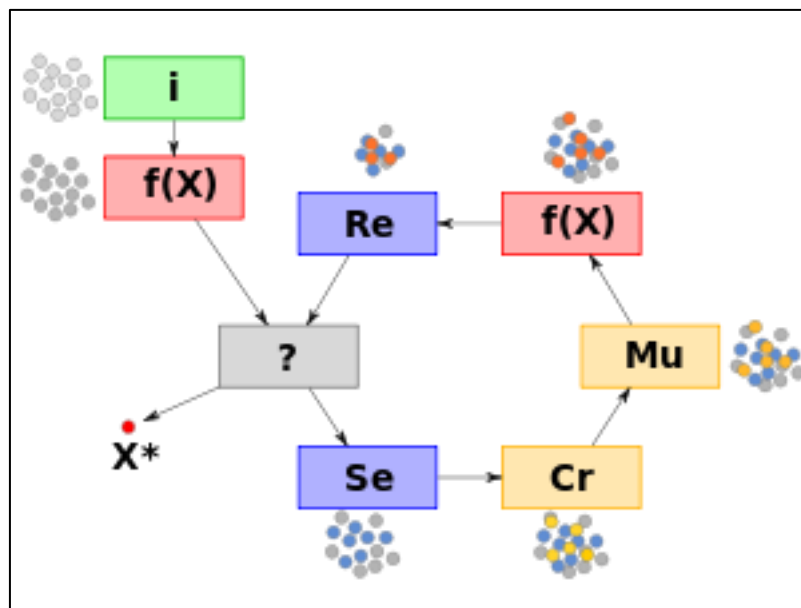


Figura 10. diagrama de funcionamiento del algoritmo genético tomado de Ladislao R. (2010)

Como se ve en la *Figura 10* y como se menciona anteriormente este método que busca replicar la selección natural darwiniana en procesos genéticos como lo son mutaciones y recombinaciones genéticas, este procedimiento consta de 5 niveles que son, *inicio, selección, cruzamiento, mutación y reconstrucción*; para el *inicio* se genera de modo aleatorio un conjunto de cromosomas que representan la posible solución del problema y evalúa si este cumple una solución que satisface la función objetiva mínima del problema planteado, de no hacerlo se procede a la *selección* en el que se eligen los mejores cromosomas para entrar a la siguiente fase, después en el *cruzamiento* se operan los cromosomas obteniendo la mejor selección de resultados y así pasar a la siguiente generación, para entrar a la *mutación* donde es modificada la función inicial y se *reconstruye* por la nueva función hasta obtener la mejor solución al

problema(MATLAB & Simulink(2020)), este proceso se repite una y otra vez con el fin de que se obtenga la mejor solución de la ecuación planteada. La población inicial hace parte del primer conjunto de cromosomas y el numero de veces que se repite este ciclo de producción del algoritmo es lo que se conoce como las generaciones, datos de entrada clave para el desarrollo del algoritmo genético y la obtención de la solución del problema planteado.

Cabe resaltar que para el funcionamiento del algoritmo genético, la población inicial tienen que estar entre un rango de 20-500 y las generaciones tiene que estar entre un rango de 200-2000, en este caso se seleccionó una población inicial de 200 y 500 generaciones(Xing & Gao, 2014),esto con el fin de encontrar las constantes del modelo, por otra parte el modelo indica cual fue el error de obtención de las constantes cinéticas por parte del modelo, por lo que entre mas cercano este error al 0 mejor correlacionado será el modelo.

3. Resultados y discusión

3.1 Caracterización de materias primas:

A continuación en la *Tabla 4* se presenta la caracterización fisicoquímica del sustrato y los datos teóricos de este extraídos de la ficha técnica aportada por *lácteos la cristina*[®] y que se puede revisar en la sección de anexos .

Tabla 4. caracterización fisicoquímica realizada en el laboratorio

Parámetro fisicoquímico	Datos experimentales	Datos teóricos
<i>pH</i>	6.2	6
<i>Acidez titulable</i>	4.1% <i>m/m</i>	2.0 % <i>m/m</i>
<i>% humedad</i>	7.3 %	3.5 %
<i>Lactosa</i>	67,31%	70 %
<i>conductividad</i>	1,21 <i>mS</i>	N/A

Los datos de pH son acordes a la ficha técnica, pero en el caso de la medición de parámetros como acidez titulable y porcentaje de humedad se nota la existencia de un leve aumento, en comparación con lo reportado en la ficha técnica. En el caso de acidez titulable se reporta un valor de 4.1% en la titulación al comparar con el valor de 2.0% reportado por la ficha técnica, con respecto a la humedad, también se puede evidenciar que la humedad reportada en la caracterización fue de 3.5% comparado con un 7.3% reportado por el proveedor. Estas diferencias corresponden a la forma como el producto fue almacenado, debido a las capacidades higroscópicas del lactosuero es posible que se haya humidificado un poco durante el almacenamiento previo a su uso, sin embargo este leve aumento no afecta, que el sustrato escogido pueda ser usado para la producción de GOS, ya que para poder realizar los procesos de hidrólisis y transgalactosilación de GOS es necesario tener una humedad sumamente baja (Andrés & Villarreal, 2014), por lo que en conclusión este lactosuero se encuentra dentro de los parámetros necesarios para pueda ser usado en este proyecto debido a su alto contenido de lactosa (70%) y bajo contenido de humedad.

3.2 Caracterización de la enzima:

Según el protocolo enzimático de o-NPG se determina que la actividad enzimática de la β -galactosidasa usada en el experimento fue de 1997 mmol oNP/g minutos, en comparación con la actividad enzimática de 1673 mmol oNP/g minutos referenciado en la bibliografía (Castro.G.(2017)), esto quiere decir que la desviación entre el dato teórico y experimental es diferente en un 16.22%, esto indica que las diferencias entre el dato teórico y el dato experimental son despreciables, demostrando la confiabilidad que tiene este valor para el desarrollo del proyecto.

3.3 Producción en enzima libre

Después de correlacionar los datos experimentales en el modelo diseñado por Matlab® se obtienen los perfiles de concentración con respecto al tiempo por cada parámetro evaluado (GOS, Lactosa, Glucosa y Galactosa) expresados por la *Figura 11* para la enzima libre, en la concentración de 0.16 mg enzima /g lactosa se denota con el color rojo y esta representado por la letra A, para 0.41 mg enzima /g lactosa con el color verde y esta representado por la letra B; para 0.66 mg enzima /g lactosa con el color azul y esta representado por la letra C. Las concentraciones experimentales están indicadas como puntos del mismo color dispersos en la grafica y el modelo cinético es representado también por las líneas del mismo color.

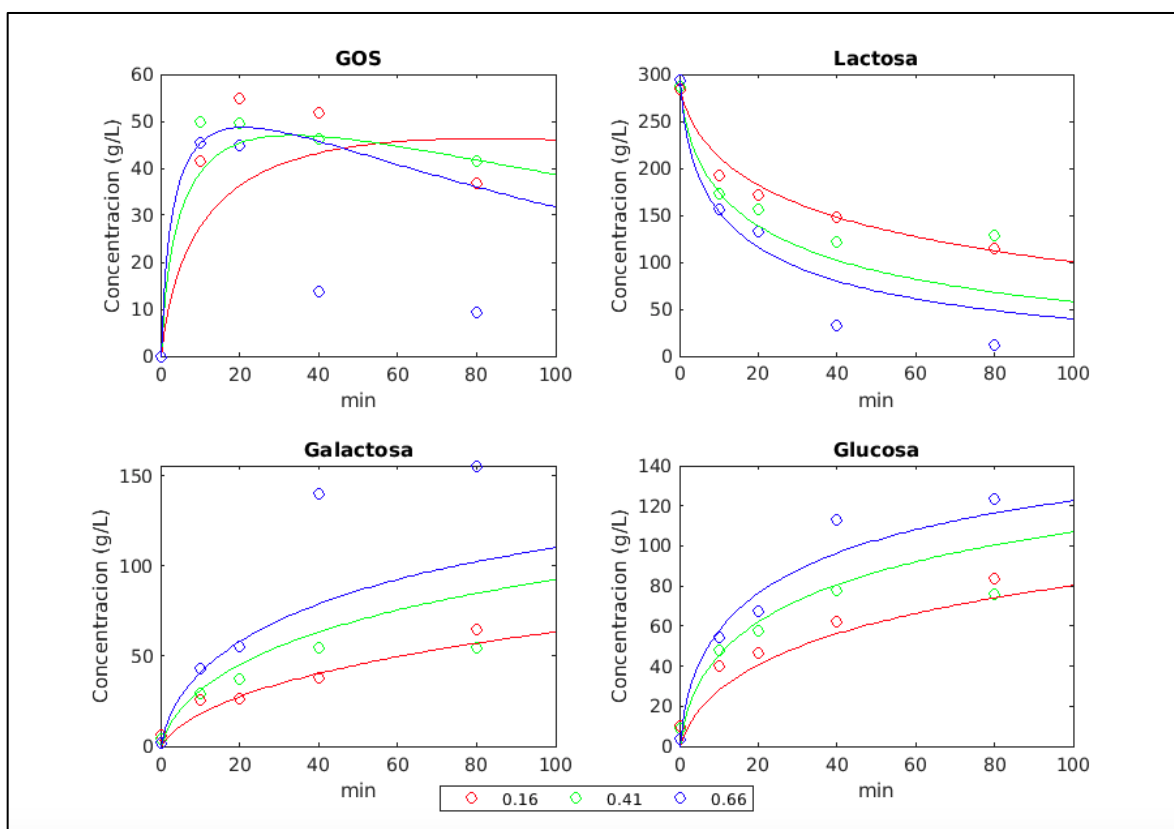


Figura 11. perfiles de concentración en enzima libre obtenido de Matlab®.

Después de ejecutar el programa se puede deducir que la producción de GOS presenta un mayor crecimiento durante los 20 minutos iniciales, para luego mantenerse estable durante los 40 minutos restantes de la reacción (50-55 g/L en producción de GOS). Al analizar este comportamiento de la cinética se deduce que en altas concentraciones de enzima la producción de GOS es mayor. Cuando se realiza la comparación entre las concentraciones experimentales contra las concentraciones calculadas por el modelo se tiene que el índice de correlación de A(0.16 mg enzima /g lactosa) fue de 0.9279, el de B(0.41 mg enzima /g lactosa) fue de 0.9526 y el C(0.66 mg enzima /g lactosa) fue de 0.8372, según esto las que mejor se ajustaron al modelo fueron la de B, a comparación con A y C.

Según la literatura disponible a mayor cantidad de enzima, la producción de oligosacáridos aumenta, sin embargo en el experimento se puede observar que con la concentración B(0.41 mg enzima /g lactosa) existe una mayor correlación con el modelo en comparación con C(0.66 mg enzima /g lactosa), este comportamiento es producido por que las enzimas β -galactosidasas realizan una doble función de hidrólisis y transgalactosilación, en el proceso de hidrólisis la lactosa produce glucosa y galactosa y en la transgalactosilación se transforman los oligómeros a partir de los azúcares simples formados (Boon et al., 2000 & Rico Rodríguez, 2018).

Al cabo de 20 minutos de reacción se produce una acumulación de galactosa y glucosa, que por sus efectos inhibitorios limita la producción de GOS. Si a esto se le suma el aparente comportamiento en que la hidrólisis supera a la transgalactosilación con el uso de la mayor concentración de enzima usada(0.66 mg enzima /g lactosa), puede así explicarse la disminución de la concentración de GOS observada al cabo del minuto 20, comportamiento como este ha sido reportado por autores en procesos enzimáticos en los que se trabajan con pH y temperatura constante(Zapata Montoya et al., 2018). Además, el modelo diseñado no contempla la producción de los inhibidores de la reacción, lo que explica el leve desajuste de

los datos experimentales frente al modelo, ya que este solo tiene en cuenta los parámetros necesarios para el modelo cinético desarrollado.

Como se observa en la *Figura 11*, cuando se incrementa la galactosa a la vez incrementa su efecto inhibitorio con respecto a la producción de GOS, este comportamiento está reportado en la literatura consultada (*Delgado(2017), Vera et al.(2011)*) y explica cómo este parámetro inhibe la producción de GOS ya que puede formar un intermediario galactosa-enzima, que puede desplazar a la lactosa del centro activo. La inhibición de la glucosa parece ser más compleja que en algunas β -galactosidasas, porque realiza una inhibición competitiva, rivalizando con el sustrato por el centro activo de la enzima y en otras realiza una inhibición acompetitiva uniéndose únicamente al complejo enzima-sustrato.

Se realizó también una comparación de Pareto para determinar la correlación existente entre las concentraciones experimentales y las concentraciones calculadas por cada parámetro evaluado (GOS, Lactosa, Glucosa y Galactosa), al igual se calculó el índice de correlación global de las muestras experimentales para la enzima libre al determinar el ajuste de la experimentación con el modelo desarrollado, esto representado a continuación en la *Figura 12*.

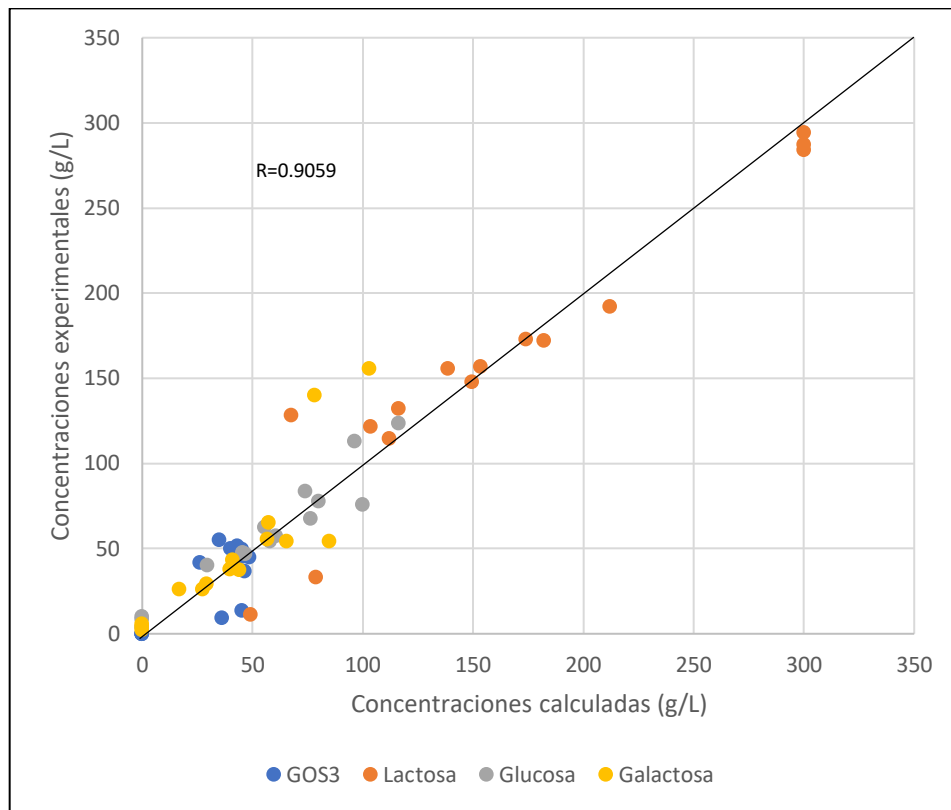


Figura 12. diagrama de Pareto para la enzima libre

En la *Figura 12* se representa el análisis de residuos en el que se observa la linealidad existente entre los datos experimentales y los datos predictorios calculados por el modelo, este análisis determina que Los residuos de las concentraciones calculadas de galactosa son mas altos que sus contrapartes experimentales cuando se supera el umbral de los 55 g/L, ya que en este espectro del grafico los puntos son mas alejados de la línea central de 45°, este comportamiento dado en esta región sucede debido a lo descrito anteriormente en que el modelo no contempla la inhibición de otros productos subsecuentes durante la formación de los oligosacáridos, explicando esta leve dispersión que se presenta en esta región del grafico, según el índice de correlación global que es de 0.9059 , se puede deducir que el modelo

planteado fue ajustado correctamente a los datos experimentales aportados por la enzima libre, debido a que este factor de correlación se acerca al 1 absoluto, demostrando así la confiabilidad tanto de la experimentación como de la predicción del modelo planteado.

3.4 Producción en enzima inmovilizada:

Empleando el mismo protocolo que se usó en evaluación de la enzima libre, se obtienen los perfiles de concentración con respecto al tiempo para la enzima inmovilizada en cada parámetro evaluado (GOS, Lactosa, Glucosa y Galactosa) expresados en la *Figura 13*. De igual modo que con el uso de la enzima libre las concentraciones experimentales están indicadas como puntos del mismo color dispersos en la gráfica y el modelo cinético es representado también por las líneas de color.

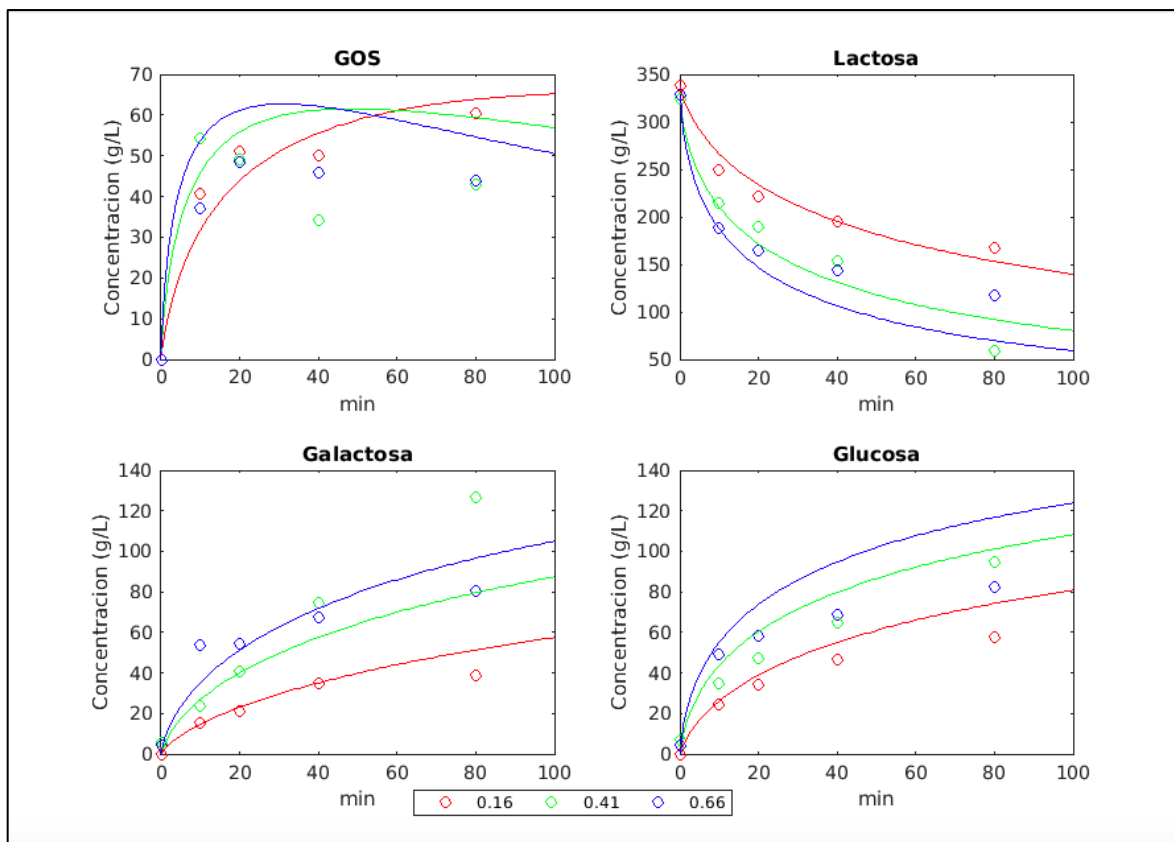


Figura 13. modelado de la cinética enzimática en enzima inmovilizada obtenido de Matlab®

Al ejecutar el código con el uso de la enzima inmovilizada, se puede analizar que en este ensayo obtuvo un crecimiento constante hasta un rango entre los 50 y 55 g/L, para mantenerse estable durante los 40 minutos restantes durante toda la reacción, cuando se correlacionan los parámetros se tiene que el índice de correlación de A(0.16 mg enzima /g lactosa) fue de 0.9443, para B(0.41 mg enzima /g lactosa) fue de 0.8834 y para C(0.66 mg enzima /g lactosa) fue de 0.9602, según esto el complejo enzimático que tuvo una mejor correlación fue C a comparación con A y B, presentando un mejor ajuste con la curva de calibración del modelo. La producción máxima en enzima libre fue de 50 g/L durante los primeros 20 minutos, en cambio cuando se realizó el protocolo de inmovilización a la enzima, la producción máxima fue de 54 g/L durante los primeros 20 minutos, indicando que el rendimiento de producción de GOS fue

diferente en un 7.4%, en comparación con la cinética sin inmovilizar, lo que indica una mayor estabilidad al realizar el protocolo de inmovilización.

Posterior a esto se determinaron las diferencias significativas entre las concentraciones experimentales usadas en el protocolo de enzima libre e inmovilizada, usando un análisis de varianza multivariado de tres factores por varias muestras por grupo en cada parámetro evaluado (GOS, lactosa, glucosa y galactosa), estableciendo si por cada parámetro escogido existen diferencias significativas entre cada tipo estado enzimático (libre e inmovilizado), fue usado un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ y se calculo a su vez el valor de R^2 calculado y R^2 ajustado. Los resultados del ANOVA indican que existen diferencias significativas aunque despreciables entre las concentraciones experimentales de los dos estados enzimáticos (libre e inmovilizado) ya que el valor de la probabilidad calculada es inferior al nivel de significancia usado, demostrando que si existen diferencias al inmovilizar la enzima, además el valor de R^2 calculado y R^2 ajustado son cercanos al 100% indicando la credibilidad de este análisis estadístico, estos resultados estas mas detallados en la sección de anexos indicando los resultados mas a detalle, y se deduce que al menos en las concentraciones experimentales de ambos tipos de estado existen algunas diferencias significativas. En la *Figura 14* representada a continuación se realiza un diagrama de Pareto con el fin de correlacionar las concentraciones experimentales en comparación con las curvas de calibración calculadas por el modelo, igualmente se determino el índice de correlación global de todas las muestras experimentales usadas para la enzima inmovilizada.

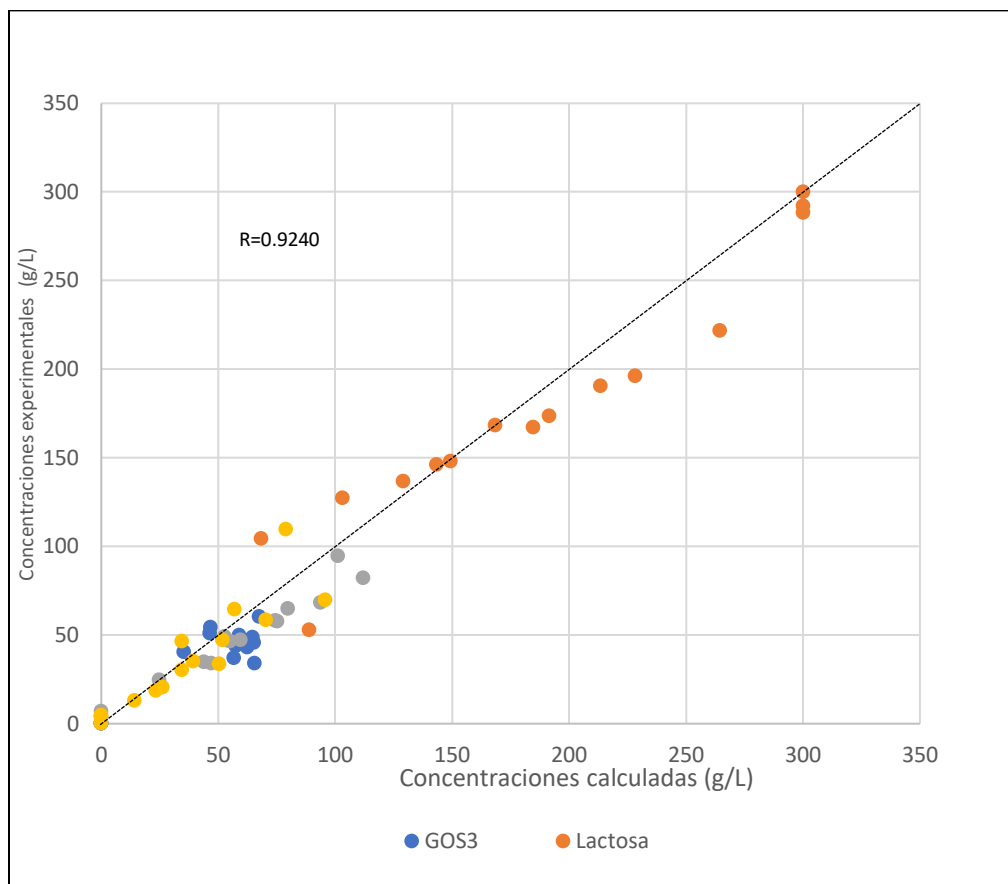


Figura 14. diagrama de Pareto para la enzima inmovilizada

En la Figura 14 se presenta el análisis de residuos representados por el grafico de Pareto entre las concentraciones experimentales y concentraciones calculadas por el modelo, el análisis de residuos establecido evidencia como hubo una mejor correlación de los datos experimentales con respecto la curva de calibración del modelo por parte de la enzima inmovilizada a comparación de la enzima libre, esto se demuestra debido que el índice de correlación global calculado con las muestra de la enzima inmovilizada fue de 0.9240 en comparación con la enzima libre que fue de 0.9059, es notable que con esta enzima los datos fueron mejor ajustados al modelo propuesto, ya que el índice de correlación se acerca mas al 1 absoluto. Se puede ver como los puntos residuales de GOS son mas cercanos a la línea de 45° presentando

menos dispersión, en el caso de la galactosa y la glucosa se ve un ajuste hacia la línea central del gráfico, presentando una leve dispersión después de superar el umbral de 54 g/L, debido que las concentraciones experimentales máximas obtenidas están en el umbral de los 50-60 g/L, este comportamiento es debido a que el modelo no contempla la inhibición consecuente por la galactosa y la glucosa, sin embargo es notable como inmovilización enzimática limita el desempeño de los inhibidores naturales de la reacción debido a que estos se mantiene menos dispersos a comparación con el uso de la enzima libre, este comportamiento es reportado por diversos investigadores (Panesar et al., 2010) en el que se evidencia la influencia que tiene la inmovilización sobre el comportamiento decreciente de los inhibidores en la cinética enzimática.

Si bien en la literatura consultada (*Castro.G(2017), Andrés & Villarreal(2014)*) son reportadas concentraciones experimentales superiores a la obtenidas en este trabajo, esto se explica por la ausencia de agitación en la determinación experimental de la cinética. Dicha consideración se planteó con el fin de que la cinética de producción de GOS pueda ser empleada en sistemas de hidrólisis y fermentación simultánea (fermentación una bebida fermentada láctea como el yogurt), en donde no es conveniente la aplicación de agitación, debido a que la mezcla necesita estar en un estado de reposo para la formación del gel y evitar los efectos de cizalla. (Vénica et al., 2015).

Adicionalmente, al retirar la agitación en la determinación experimental de la cinética se limita la dispersión completa de la enzima sobre el sustrato, esto en ciertos escenarios puede funcionar para limitar, regular y controlar la actividad enzimática en la cinética., Una alta resistencia a la transferencia de masa es favorable para reducir el grado de disminución de la actividad catalítica en reactores con enzimas inmovilizadas y desfavorable para la obtención de una mayor actividad catalítica inicial (Ooshima & Harano, 1983), razón por la cual estas restricciones físicas pueden servir para diseñar reactores

enzimáticos más eficientes al controlar el comportamiento de la transferencia de masa de la enzima sobre el sustrato . Previos estudios presentan comparaciones entre condiciones sin agitar, agitados o procesos con ambos intercalados con el fin de estudiar y diseñar procesos enzimáticos más eficientes (Jorge & Terenzi, 1980; Merieau et al., 1993; Qureshi et al., 2008).

3.5 Modelo cinético

Al ejecutar el algoritmo genético de Matlab®, este empieza a buscar la mejor solución para la función objetivo planteada, en un modelo cinético de primer orden para la obtención de oligosacáridos en tercer grado de polimerización *Andrés & Villarreal(2014)*, este método correlaciona las constantes optimas que cumplen el balance estequiométrico de las concentraciones experimentales con respecto a la curva de calibración del modelo. Según la literatura investigada, para suplir el balance del modelo se necesitan obtener las constantes k_1, k_2, k_3, k_4 y k_5 como es indicado en (*Andrés & Villarreal 2014*), estas constantes son obtenidas a través de ejecutar el código, en el que se busca la mejor solución para el problema planteado, para esto son evaluados distintas poblaciones de datos como posibles soluciones aleatorias en la función objetivo predeterminada, estas son recombinadas una y otra vez hasta seleccionar la mejor iteración de las constantes cinéticas. Los rangos de entrada del algoritmo genético escogidos consisten en la población de datos inicial y la cantidad de veces en las que se repite este ciclo conocido como generaciones, según la literatura investigada se seleccionaron 200 y 500 generaciones(*Xing & Gao, 2014*) para ejecutar el algoritmo genético. Las constantes del modelo cinético son representadas en la *Tabla 5*.

Tabla 5. constantes calculadas por algoritmo genético para enzima libre e inmovilizada

k	Contantes para enzima libre	Constantes para enzima inmovilizada	Unidades
k_1	3×10^1	3×10^1	$L/molE^{-1} \text{ min}^{-1}$
k_2	0.1772×10^5	0.1972×10^5	min^{-1}
k_3	3.2786×10^5	3.4786×10^5	$L/molE^{-1} \text{ min}^{-1}$
k_4	0.4768×10^5	0.5768×10^5	$L/molE\text{-gal}^{-1} \text{ min}^{-1}$
k_5	8.1089×10^5	9.0234×10^5	$L/molE^{-1} \text{ min}^{-1}$
% Error	4.38	4.14	

Cuando se ejecuta el algoritmo genético como se obtienen las constantes de integración del modelo k_1 , k_2 , k_3 , k_4 y k_5 en los que k_4 y k_5 son las que regulan la producción de GOS y su respectivo porcentaje de error en la obtención de las constantes cinéticas, esto para saber que tan eficiente fue el algoritmo en encontrar la solución mas adecuada, que en este caso consiste en la obtención de las constantes cinéticas, así cuando mas se acerque este valor al 0 absoluto mas confiable seste valor. Como es representado en la *Tabla 5*, en la obtención de las constantes de reacción con la enzima libre se logró obtener un porcentaje de error de 4.38% y para las constantes con la enzima inmovilizada se logró un porcentaje de error de 4.14%. por lo que se puede determinar que los datos fueron ajustados al modelo establecido por el autor, este comportamiento puede verse descrito en trabajos como (Vera et al., 2011) en el que las diferencias entre las concentraciones experimentales y las concentraciones calculadas son bastante significativas y cumpliendo los equilibrios en los balances de masa en cada una de las ecuaciones diferenciales planteadas.

De aquí se obtendrán las 5 constantes que cumplen las ecuaciones diferenciales establecidas en el modelo, estos valores obtenidos serán representados de manera grafica como se observa a continuación en la *Figura 15*

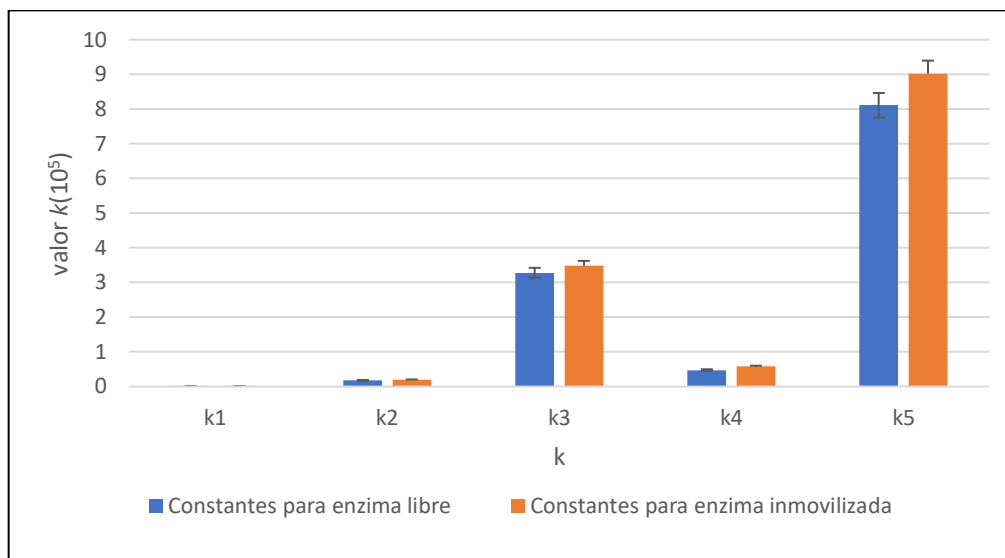


Figura 15. diagrama barras en comparación con las constantes cinéticas

En la *Figura 15* se ilustra el comportamiento cinético de las constantes, aquí se puede denotar que k_1 , k_3 y k_5 son las constantes que indican la producción del complejo enzima-galactosa, k_2 representa a la galactosa y k_4 denota la producción de GOS, en los que k_4 y k_5 son aquellos quienes están presentes en las reacciones de transgalactosilación. Es evidente como k_3 y k_5 están se muestran altas, esto significa que se esta cumpliendo la reacción de transgalactosilación en producción de GOS al presentar un buen comportamiento cinético. También podemos denotar que las constantes cinéticas mas bajas son k_1 y k_2 , esto quiere decir que debido a que la baja velocidad que reportan estas constantes, k_1 es la etapa limitante en la reacción de conversión de la lactosa y k_2 es la etapa limitante de la reacción de hidrolisis tanto como para enzima libre como para la enzima inmovilizada.

Si bien en la comparación entre las concentraciones experimentales de la enzima libre y la enzima inmovilizada, presentan algunas diferencias significativas dadas por el ANOVA, a nivel cinético se presenta otro comportamiento, según la literatura investigada la actividad enzimática con la enzima inmovilizada es generalmente menor que la enzima libre, esto se debe a que si es cierto que la inmovilización

representa una serie de ventajas para el desempeño de la enzima, también hace que la resistencia a procesos difusionales entre la enzima y el sustrato sea mas elevada (Mammarella et al., 2001.) al realizarse la experimentación de la cinética en ausencia de agitación, la ausencia de conversión forzada representada por la agitación influye en que la resistencia de transferencia de masa sea alta, lo que genera que a nivel cinético las constantes de ambas enzimas (libre e inmovilizada) sean bastantes similares.

3.6 Validación del modelo

El modelo matemático planteado es una herramienta que permite determinar el comportamiento cinético de la enzima β -galactosidasa de *A.oryzae* en enzima libre e inmovilizada, esta herramienta diseñada fue validada con varias investigaciones consultadas para determinar el desempeño de este con datos extraídos de estos trabajos, a continuación en la *Tabla 6* son representados mas a detalle las investigaciones consultadas.

Tabla 6. descripción de las condiciones de operación de la literatura investigada

Trabajo	Condición de operación	Enzima
<i>Castro.G.(2017). Evaluación De β-Galactosidasas Fúngicas En La Producción De Galactooligosacáridos.</i>	Tiempo: 0, 20 ,40 ,60 y 80 min Temperatura: 40, 50 y 60 °C pH: 4, 4.5 y 5.0 Concentraciones: 0.25, 0.5y 0.75	Enzima β -galactosidasa: <i>A.oryzae</i> (Enzeco®), <i>A.oryzae</i> (Maxilact®)y <i>A. Níger</i> (Megazyme®). En estado libre
<i>Andrés, F., & Villarreal, G. (2014). Evaluación de la producción de Galactooligosacáridos a partir de materias primas lácteas con β-galactosidasa inmovilizada</i>	Tiempo: 0, 5, 10, 15, 20, 40 y 80 min Temperatura: 30, 40 y 50 °C pH: 5.5, 6.0 y 6.5 Concentraciones: 1.00, 1.25 y 1.50	Enzima β -galactosidasa de <i>K.lactis</i> (Lactozym PURE® 6500L) en estado libre e inmovilizada

<p><i>Hung, M. N., & Lee, B. (2002). Purification and characterization of a recombinant β-galactosidase with transgalactosylation activity from Bifidobacterium infantis HL96</i></p>	<p>Tiempo: 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 horas Temperatura: 50 °C pH: 7.5 Concentraciones: 20%, 30% y 60%</p>	<p>Enzima β-galactosidasa de <i>B.infantis</i>(HL96) en estado libre</p>
<p><i>Manucci, F. (2009). Enzymatic Synthesis of Galactooligosaccharides From Whey Permeate</i></p>	<p>Tiempo: 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 horas Temperatura: 37°C pH: 6.8 Concentraciones: 1.2, 1.6 y 2.0</p>	<p>Enzima β-galactosidasa de <i>K.lactis</i> (Maxilact® LX 5000) en estado libre</p>

Como se puede observar en la *Tabla 6*, se tomaron 4 investigaciones 2 de ellas de origen nacional de (*Castro.G(2017)*; *Andrés & Villarreal(2014)*) y 2 investigaciones de origen extranjero (*Hung & Lee(2002)*; *Manucci(2009)*), todas estas investigaciones coinciden en producir GOS por medio de reacciones de hidrólisis y transgalactosilación con enzimas β -galactosidasas de varias cepas, sin embargo cabe resaltar el hecho de que cada investigador tiene un enfoque diferente en el desarrollo de sus proyectos, por lo que fueron tomados secciones de los datos extraídos en cada investigación, para cumplir las condiciones del modelo (variación de concentración y pH y temperatura constante). Esto implica que por lo general unos trabajos se ajusten en mayor o menor medida al modelo propuesto. Según las correlaciones obtenidas por el modelo, el trabajo que obtuvo un mejor ajuste al algoritmo propuesto fue el trabajo de *Hung & Lee(2002)*, esta correlación esta indicada por la *Figura 16* y las demás correlaciones se encuentran en la sección de Anexos.

Al ejecutar el algoritmo propuesto en el trabajo de (Hung & Lee, 2002) se obtiene la correlación de parámetros(GOS, Lactosa, Glucosa y Galactosa) por las concentraciones experimentales a través del tiempo, los puntos dispersos de color indican las concentraciones experimentales y las líneas de color representa las concentraciones calculadas por el modelo, para la concentración de 20% son denotadas por el color rojo y se representa por la letra A, para 30% se presenta con el color verde y esta representado por la letra B y para 60% se muestra con el color azul y esta representado por la letra C

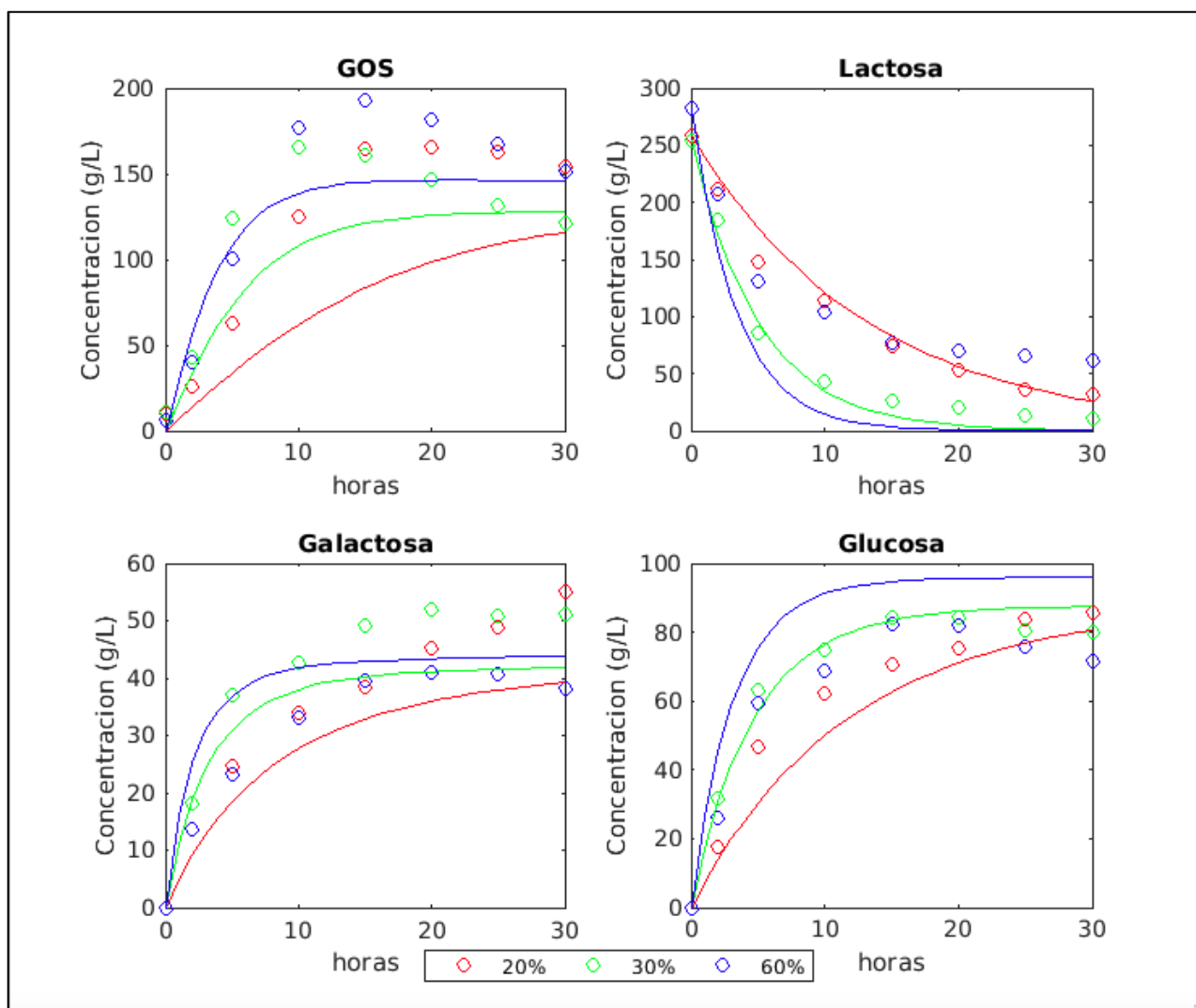


Figura 16. perfiles de concentración de (Hung & Lee, 2002) obtenido de Matlab®

En la *Figura 16* se ilustra la concentración de los parámetros obtenidos por el algoritmo propuesto, fueron calculados los índices de correlación en el que para A fue de 0.9199, de B fue de 0.9526 y C fue de 0,91285, según la correlación del modelo propuesto la concentración que mas se ajusta al modelo propuesto fue de B con respecto con A y C, comportamiento como este también es indicado por el autor evidenciando similitud entre los datos teóricos y experimentales reportados por (*Hung & Lee, 2002*). También es realizado el análisis de residuos para este trabajo ilustrado a continuación por la *Figura 17*.

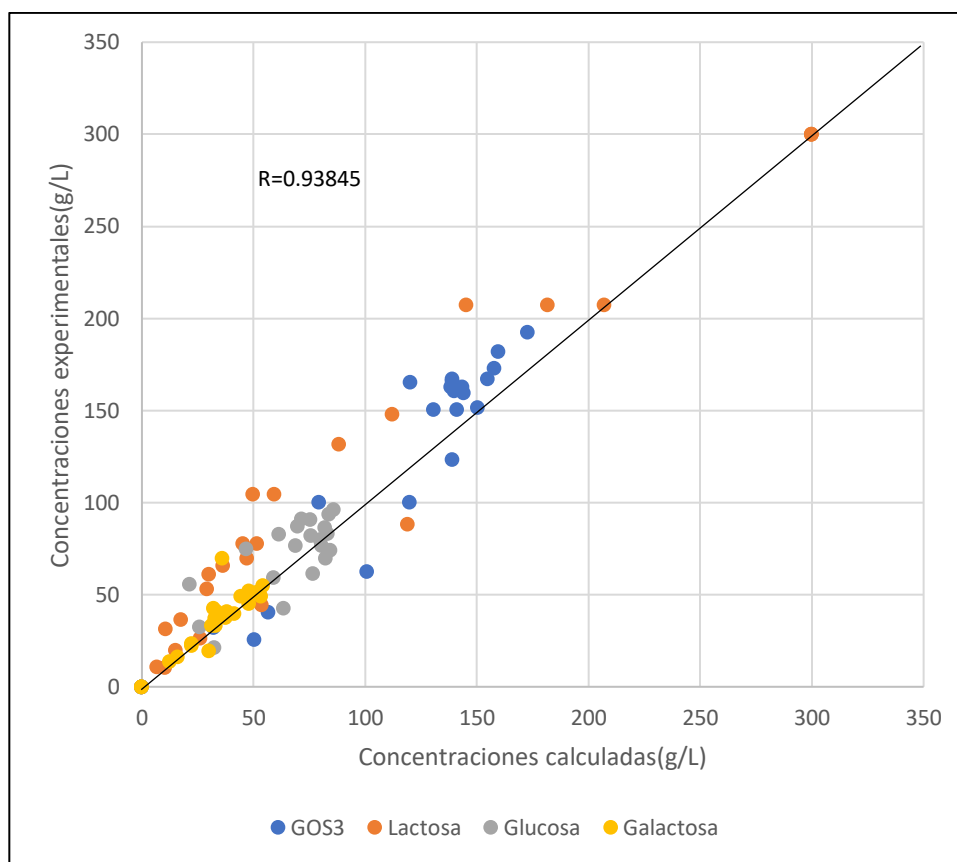


Figura 17. diagrama de Pareto para (Hung & Lee, 2002)

La *Figura 17* muestra la correlación existente entre las concentraciones experimentales y las concentraciones calculadas, podemos denotar como los puntos cumplen una linealidad sobre la línea de 45° central del grafico, el índice de correlación global de este trabajo fue de $R=0.92845$, lo que indica la confianza de los resultados obtenidos a través del modelo propuesto, los residuos de galactosa y glucosa son menos dispersos ya que son mas cercanos a la línea de 45°, a su vez los residuos de GOS y lactosa son un poco mas altos a comparación de sus concentraciones, esto se debe a la alta actividad catalítica de la enzima *B.infantis*, según la literatura consultada (*Zarate & Lopez-Leiva(1990)*), con el uso de la enzima *A.oryzae* se reporta que en 100 mg totales de sustrato se aíslan 11mg de GOS y en este trabajo se reporta que en 100 mg totales de sustrato se aíslan de 20mg en con esta enzima lo que explica la alta actividad catalítica de *B.infantis*, esta enzima es una de las β -galactosidasas que mayor actividad enzimática reporta a comparación con otras enzimas(Otieno, 2010), lo que explica porque las concentraciones calculadas superan a la predicción que tienen el modelo con respecto a las concentraciones experimentales.

Además de estudiar cual fue la investigación que represento un mejor comportamiento con el uso del modelo propuesto, como validación se realizo la comparación de los parámetros cinéticos de los autores investigados en comparación con los parámetros cinéticos obtenidos a través del algoritmo, en la *Tabla 7* se presentan los parámetros cinéticos de todas las investigaciones consultadas en comparación con los parámetros cinéticos obtenidos en este proyecto.

Tabla 7. parámetros cinéticos obtenidos por el algoritmo genético en todas las investigaciones consultadas

	$k_1(10^5)$	$k_2(10^5)$	$k_3(10^5)$	$k_4(10^5)$	$k_5(10^5)$	error
Libre	0,00030	0,17720	3,27860	0,47680	8,10890	4,38%
Inmovilizada	0,00030	0,19720	3,47860	0,57680	9,02340	4,14%
Libre Guio(2014)	1,01670	4,02310	5,60330	8,35970	5,55550	8,22%
Inmovilizada Guio(2014)	0,72620	4,82580	7,63520	6,37360	8,19720	7,66%
Enzeco [®] , Castro	0,07470	0,20200	8,28740	0,71610	9,93430	3,27%
Maxilact [®] , Castro	0,07660	0,20350	6,27920	0,71550	9,93530	3,38%
Megazyme [®] , Castro	0,06990	0,16020	6,27930	0,71500	9,93600	5,52%
Hung & Lee(2002)	0,96040	2,32970	5,13870	1,35600	0,00490	1,78%
Manucci(2009)	9,01380	8,22630	9,09560	6,28640	1,90980	11,27%

	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5
Unidades	L/molE ⁻¹ min ⁻¹	min ⁻¹	L/molE ⁻¹ min ⁻¹	L/molE-gal ⁻¹ min ⁻¹	L/molE ⁻¹ min ⁻¹

Como se puede ver en la *Tabla 7* se obtienen las constantes de integración del modelo propuesto de la literatura propuesta junto con las constantes obtenidas en este trabajo, así como y el porcentaje de error, que indica el desempeño del código en la obtención de las constantes cinéticas y es representado a continuación por la *Figura 18*.

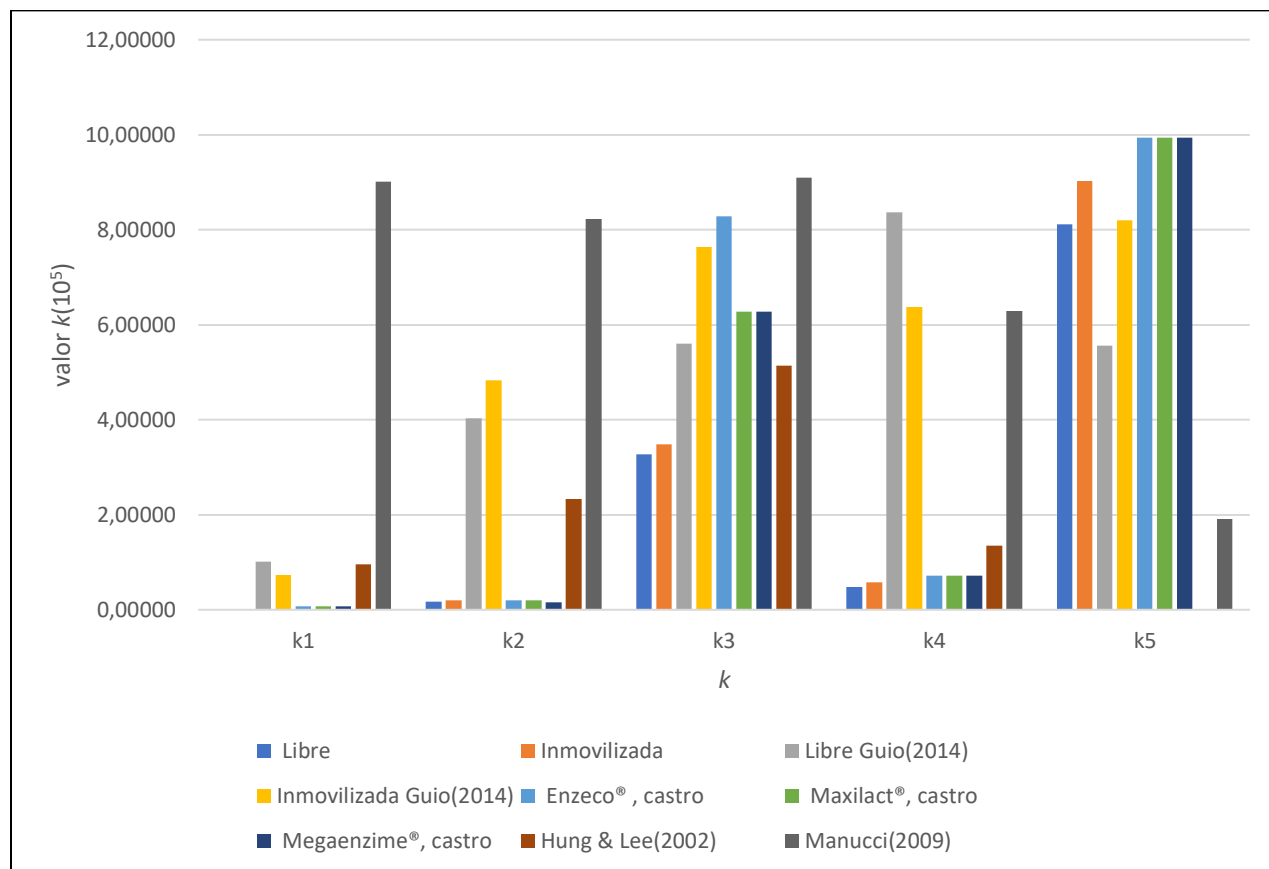


Figura 18. diagrama de barras de todos los parámetros cinéticos de las investigaciones consultadas

En la Figura 18 se representa de manera grafica el comportamiento cinético de las constantes de integración k_1 , k_2 , k_3 , k_4 y k_5 , de esta manera será posible realizar la comparación existente entre las constantes cinéticas obtenidas en este proyecto, en comparación con las constantes calculadas por el algoritmo genético de las demás investigaciones consultadas, debido a que la experimentación de este proyecto fue realizada en condiciones sin agitación, será posible determinar también que tan significativa es la resistencia a la transferencia de masa en comparación con base al comportamiento grafico de todas las constantes cinéticas obtenidas.

Se puede observar como las enzimas *A.oyzae* (Enzeco®), *A.oyzae* (Maxilact®), *A. Níger* (Megaenzime®) y *K.lactis*(Lactozym PURE® 6500L) tienen más tendencia a la transgalactosilación que a la hidrólisis, representados por las constantes k_3 y k_5 respectivamente, en comparación con las enzimas de *B.infantis*(HL96) y *K.lactis* (Maxilact® LX 5000) quienes presentan un comportamiento contrario en el que hay mayor tendencia hacia la hidrólisis que hacia la transgalactosilación. En los datos reportados por (Hung & Lee, 2002), esto puede deberse a la enzima *B.infantis* tiene una mayor actividad enzimática que otras enzimas β -galactosidasas(Otieno, 2010), pero en los datos obtenidos por (Manucci,2009) puede deberse a que los parámetros no fueron lo suficientemente ajustados con respecto al modelo matemático al presentar un error de 11.27%, además el comportamiento cinético debe ser similar a los datos reportados por Andrés & Villarreal(2014) ya que los dos hacen uso de la enzima β -galactosidasa *K.lactis*.

Al analizar los parámetros obtenidos en las investigaciones de (Andrés & Villarreal, 2014; Castro.G, 2017) se denota como existe una mayor afinidad de los parámetros cinéticos en comparación con las constantes cinéticas reportadas en este trabajo, es posible apreciar que en la *Figura 18* la actividad enzimática de las constantes cinéticas obtenidas por el algoritmo, es regulada por la resistencia de transferencia de masa bajo condiciones sin agitación. La formación del complejo enzima-galactosa representada por k_3 esta siendo regulada por la alta transferencia de masa en el medio en comparación con los datos extraídos de (Andrés & Villarreal, 2014) y (Castro.G, 2017).

Además es posible evidenciar que la constante k_5 , quien esta presente en la reacción de transgalactosilación y producción de GOS, es menos significativa en comparación con la constante k_3 , esto quiere decir que la resistencia a la transferencia de masa afecta más a la reacción de hidrólisis que a la reacción de transgalactosilación, además nótese como para todas la investigaciones consultadas al igual

que para los datos de este proyecto, se evidencia como la constante k_1 es la que tiene la velocidad mas baja para la mayoría de las investigaciones consultadas, ya que esta constante es la que determina es la etapa limitante de la reacción en la conversión de la lactosa, evidenciando que existe una similitud del comportamiento cinético entre los trabajos que realizan agitación a comparación de este trabajo en el que no se llevo a cabo el proceso de agitación.

El diseño de reactores sin agitación puede representar una serie de ventajas en los reactores enzimáticos, al no realizar agitación es posible comparar varios tipos de investigaciones(con o sin agitación) y determinar cual es influencia directa que tiene la transferencia de masa en estos procesos, por otro lado se pueden diseñar procesos enzimáticos con bajo costos de operación durante tiempos sumamente prolongados(Swirbutowicz, 2012), además el diseño de reactores sin agitación abre la puerta para que se pueda innovar y desarrollar métodos enzimáticos mas eficientes basándose en el comportamiento que tiene la resistencia de transferencia de masa de la enzima sobre el sustrato, ya que un sistema de agitado ineficiente puede generar problemas irreparables en el proceso, una agitación descontrolada puede afectar también la estructura tridimensional de las enzimas y limitar la actividad catalítica en el reactor cinético, por esta razón en el diseño y producción de reactores enzimáticos de gran escala en los que no se presente agitación, puede servir como una alternativa eficiente con el fin de regular, controlar y el desempeño de la enzima, sin la necesidad de usar protocolos de inmovilización(Wei et al., 2016).

En general se pudo realizar la correlación y la obtención de los parámetros cinéticos de los autores consultados en la literatura y compararlos con los parámetros cinéticos obtenidos en este proyecto, la investigación que presento un mejor ajuste con respecto al algoritmo propuesto fue el trabajo de (Hung & Lee, 2002) debido a que el diseño experimental es bastante similar al realizado en este proyecto, sin embargo fue posible correlacionar y comparar los parámetros evaluados de todas las investigaciones

consultadas así como las constantes cinéticas de los trabajos en los que por su naturaleza y criterio del investigador se presenta en mayor o menor medida el ajuste con respecto al modelo propuesto.

Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- En la evaluación experimental se evidencia que con el uso de la enzima libre se logro obtener una concentración máxima de 50 g/L en los primeros 40 minutos a comparación con el uso de la enzima inmovilizada, en el que se logro obtener una producción máxima de 54 g/L durante el mismo tiempo, evidenciando una aumento en los rendimiento de producción de GOS en un 7.4%
- Al realizar la inmovilización de la enzima es evidente como se mantiene mas estable la cinética a través del tiempo, generando así producciones mas altas de GOS durante tiempos prolongados, por otra parte este protocolo ayuda a controlar los inhibidores naturales de la reacción(galactosa y glucosa), lo que evita que estos subproductos interfieran con la producción total de los oligosacáridos.
- Los procesos enzimáticos sin agitación son útiles para estudiar la influencia que tiene la resistencia de transferencia de masa de la enzima sobre el sustrato, logrando así controlar y regular la actividad catalítica, al limitar el contacto directo que tiene la enzima sobre el sustrato en la reacción.
- Con los datos experimentales obtenidos en este trabajo y mediante el uso algoritmos genéticos aportados por el software Matlab®, se logro correlacionar los parámetros cinéticos de enzima libre($R=0.9059$) e inmovilizada($R=0.9240$), esto indica que se logro ajustar los datos de la experimentacion al modelo propuesto y la confiabilidad de los resultados reportados.

- En los parámetros cinéticos obtenidos por el algoritmo para ambas enzimas se pudo determinar que la constante con la velocidad más alta es k_5 y está relacionada a la reacción de GOS, las constantes con la velocidad mas baja son k_1 (hidrolisis) y k_2 (transgalactosilacion) y estas representan la etapa limitante de la reacción durante la cinética.
- Fue posible validar el algoritmo desarrollado con resultados extraídos de diversas investigaciones, se pudo deducir como las etapas limitantes de la reacción consultadas son las mismas a las que se reportaron en este trabajo, esto con el fin de determinar que tan significativo fue la resistencia a la transferencia de masa y así ayudar a diseñar reactores enzimáticos mas eficientes con costos reducidos.

4.2 Recomendaciones

- para futuras investigaciones, se recomienda el empleo del lactosuero obtenido de modo directo durante la producción del queso como sustrato en la producción de GOS, se recomienda que de usarse el lactosuero natural, controlar la conductividad por desmineralización, grado de acidez y otros factores que puedan influir en el desempeño optimo de la enzima sobre el sustrato
- se recomienda también el estudio de otros medios y soportes de inmovilización ya sea por métodos físicos como atrapamiento en gel poliméricos o en fibras, así como métodos físicos como entrecruzamiento intermolecular, y así poder obtener mejores resultados

durante la inmovilización, sin embargo cabe recalcar que estos métodos son mas costosos de implementar

- es recomendable también buscar otros modelos matemáticos para ajustar la experimentación y que permitan tener en cuenta la influencia de los inhibidores naturales de la reacción

5. Bibliografía

- Algoritmo genético - MATLAB & Simulink. (n.d.). tomado en Noviembre 23, 2020, de <https://la.mathworks.com/discovery/genetic-algorithm.html>
- alibaba. (2019). Grado Médico Prebiótico Galacto Oligosacáridos (gos)/xylo Oligosacárido (xos) - Buy Beneficios Prebióticos, Oligosacáridos De Grado Médico, Xylo Oligosaccharide Xos Product on Alibaba.com. tomado el 21 de febrero del 2019 de <https://spanish.alibaba.com/product-detail/medical-grade-prebiotic-galacto-oligosaccharides-gos-xylo-oligosaccharide-xos--60760163205.html?spm=a2700.8699010.normalList.1.42ad7f90N1C1H8&s=p>
- Alvírez-Morales, A., Edelia González-Martínez, B., & Jiménez-Salas, Z. (2002). Tendencia en la producción de alimentos funcionales (Vol. 3). Tomado de www.medigraphic.org.mx
- Andrés, F., & Villarreal, G. (2014). Evaluación de la producción de galactooligosacáridos a partir de materias primas lácteas con β -galactosidasa inmovilizada. Tomado de <http://bdigital.unal.edu.co/49957/1/80075266.2014.pdf>
- Belen, M (2011). revisión critica de procesos para el tratamiento de el lactosuero. características y aplicaciones de los productos obtenidos. Escenario actual.
- Beltrán Flórez, L., & Acosta Cárdenas, A. (2012). Empleo de una β -galactosidasa comercial de *Kluyveromyces lactis* en la hidrólisis de lactosuero. *Instname: Universidad de Antioquia*, 3(2), 25–35.
- Bermeo, S., & Cádiz, N. A. –. (2015). Extrusión de proteínas de suero lácteo Bermeo, Sebastián – LU 112174 Cádiz, Tutor: Nadia Alejandra – LU 112223

- Boon, M. A., Janssen, A. E. M., & Van Der Padt, A. (1999). *Modelling and Parameter Estimation of the Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides by-Galactosidase from Bacillus circulans*. In *Bio-technol Bioeng* (Vol. 64).
- Cardelle, A. (2009). *Síntesis, caracterización y estudio del carácter prebiótico de oligosacáridos derivados de la lactulosa*, 3–176. Tomado de <http://www.tdx.cat/handle/10803/280614>
- Carulla Fornaguera, J., & Ortega García, E. (2016). *Sistemas de producción lechera en Colombia: retos y oportunidades*. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 24(2), 83–87.
- Castro.G.(2017). *Evaluación De β -Galactosidasas Fúngicas En La Producción De Galactooligosacáridos*.
- Chen, C. W., Ou-Yang, C. C., & Yeh, C. W. (2003). *Synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles*. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(4), 497–507. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00155-8)
- Clara Álvarez & Moreno, F. M. (2013). *Caracterización fisicoquímica de los diferentes tipos lactosueros producidos en la Cooperativa Colanta LTDA*. Tomado de http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1036/1/Caracterización_fisicoquímica_diferentes_tipos_lactosueros_producidos_Colanta.pdf
- Delgado, I. M. G. (2017). *Producción De Prebióticos Galactooligosacáridos Mediante Técnicas Biotecnológicas Y De Inmovilización Enzimática*.
- Doran, Pauline M. *Bioprocess. Engineering principles*, 2012. xiv, 468 p. ISBN 9788420008530.
- Dussan K(2008). *Inmovilización de enzimas en nanoestructuras magnéticas para aplicaciones industriales*: Universidad Nacional de Colombia sede Manizales
- Fajardo Ochoa, R., Osuna-Castro, J. A., Villa Velázquez, C., & Escalante-Minutosakata, P. (2011). *Inmovilización de células y enzimas Banana juice View project*. Tomado de

<https://www.researchgate.net/publication/220007839>

Fernández-Muñoz, J. L., Gruintal-Santos, M. A., Hernández-Osorio, I., San, E., Martínez, M., Calderón, A., ...

Aguilar-Méndez, M. A. (2007). *Modelo matemático de la cinética y velocidad de hidratación del grano de maíz blanco dentado durante la cocción alcalina*. Tomado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/sv/v20n4/v20n4a2.pdf>

Gaynor, P. (2015). *Re: GRAS Exemption Claim for Galacto-oligosaccharides*. Tomado de <https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm504605.pdf>

Giacomini, C. (2009). *ingeniería enzimática de β -galactosidasa de *A.oryzae* para su aplicación en procesos de transgalactosilación de lactosa. funcionalidades de componentes lácteos, (1), 25-48,*

Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2010). *Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose*. *Food Chemistry*, 121(2), 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.063>

Guerrero, W., Gómez, C., González, C., & Castro, J. (2003). *Lactosuero y su Problemática en El Medio Ambiente*. XI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 1–6.

Guisán, J. M., & Resumen, S. (2010.) *Purificación e inmovilización de enzimas industriales*. tomado de <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1315/1373>

Huerta, L. M. (2010). *Revisión: Síntesis enzimática de galactooligosacáridos a partir de residuos de la industria láctea: Desafíos tecnológicos y oportunidades*, 1–14.

Hung, M. N., & Lee, B. (2002). *Purification and characterization of a recombinant β -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4), 439–445. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0911-6>

- Iwasaki, K. I., Nakajima, M., & Nakao, S. I. (1996). Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymic batch reaction using β -galactosidase. *Process Biochemistry*, 31(1), 69–76. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)00067-0](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)00067-0)
- Jin, Y & Speers, R.A. 1999. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Research International*, vol 31, pp 421-440.
- Jorge, J. A., & Terenzi, H. F. (1980). An enzymatic alteration secondary to adenylyl cyclase deficiency in the cr-1 (crisp) mutant of *Neurospora crassa*. Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) glycohydrolase overproduction. *Developmental Biology*, 74(1), 231–238. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(80\)90065-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(80)90065-2)
- Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., & Vicaria, J. M. (2004). Kinetic models of activity for β -galactosidases: Influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.07.004>
- Kim, C. S., Ji, E. S., & Oh, D. K. (2004). A new kinetic model of recombinant β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(3), 738–743. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.118>
- Ladislao R (2016). Optimizacion de estructuras metalicas para puentes mediante algoritmos geneticos.
- Macfarlane, G. T. & Cumminutogs, J. H. (1991). The colonic fermentation and large bowel digestive function. In *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*. Ed. S. F. Philips, J. H. Pemberton and R. G. Shorter. Pp. 51-92. New York: Raven Press Ltd.
- Mahoney, R. R. (1998). Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. *Food Chemistry*, 63(2), 147–154. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00020-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00020-X)
- Manucci, F. (2009). ARROW@TU Dublin ARROW@TU Dublin Masters Tourism and Food Enzymatic Synthesis

of Galactooligosaccharides From Whey Enzymatic Synthesis of Galactooligosaccharides From Whey Permeate Permeate. <https://arrow.tudublin.ie/tourmas>

Merieau, A., Gugi, B., Guespin-Michel, J. F., & Orange, N. (1993). Temperature regulation of lipase secretion by *Pseudomonas fluorescens* strain MFO. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 104–109. <https://doi.org/10.1007/BF00166857>

Mussato, S. I & Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: a review. 68: 587-597.

Nº L. (1997). *Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Tomado de* <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:31997R0258&from=ES>

Panesar, P. S.; Kumari, S., and Panesar, R. (2010), Potential applications of immobilized - galactosidase in food processing industries, *Enzyme Research*, 1 - 16.

Perú, M., & Saltern, P. (2013). Caracterización Parcial Del Gen B-Galactosidasa De, 16(1), 18–23.

Qureshi, N., Saha, B. C., Hector, R. E., Hughes, S. R., & Cotta, M. A. (2008). Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I-Batch fermentation. *Biomass and Bioenergy*, 32(2), 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.07.004>

Rico Rodríguez, F. (2018). Evaluación de un sistema mixto de enzimas para la producción de galactooligosacáridos y ácido glucónico a partir de lactosuero como fuente de lactosa. Tomado de http://bdigital.unal.edu.co/64519/2/80525886_2018.pdf

Schley, P. D & Field, C. J. (2002). The immune-enhancing effects of dietary fibers and prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 87: S221-S230 (Suppl. 2).

Swirbutowicz, K. (2012). *Hydrodynamics and mass transfer performance of rotating disc contactor.*

Tapias, Y. R. (2018). *Desarrollo De Biocatalizadores Inmovilizados Y Su Aplicación En La Industria Alimentaria*

Y Ambiental. 166.

Torres, D. P. M., Gonçalves, M. do P. F., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2010). Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 438–454. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x>

Tungland, B. C., y Meyer, D. (2002). Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3: 73-92.

Tzortzis, G., & Vulevic, J. (2009). *Galacto-Oligosaccharide Prebiotics*.

Vera, C., Guerrero, C., Illanes, A., & Conejeros, R. (2011). A pseudo steady-state model for galacto-oligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(10), 2270–2279. <https://doi.org/10.1002/bit.23201>

Vitoria Miñana, I. (2007). Probióticos, prebióticos y simbióticos. *Pediatría Integral*, XI (5): 425-433.

Warmerdam, A., Zisopoulos, F. K., Boom, R. M., & Janssen, A. E. M. (2014). Kinetic characterization of galacto-oligosaccharide (GOS) synthesis by three commercially important β -galactosidases. *Biotechnology Progress*, 30(1), 38–47. <https://doi.org/10.1002/btpr.1828>

Wei, L., Zhang, M., Zhang, X., Xin, H., & Yang, H. (2016). Pickering Emulsion as an Efficient Platform for Enzymatic Reactions without Stirring. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(12), 6838–6843. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01776>

Xing, B., & Gao, W. (2014). *Innovative computational intelligence: a rough guide to 134 clever algorithms* (pp. 105-121). Cham, Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer International Publishing.


Zapata Montoya, J. E., Giraldo-Rios, D. E., & Baéz-Suarez, A. J. (2018). Kinetic modeling of the enzymatic hydrolysis of proteins of viscera from red tilapia (*Oreochromis sp.*): Effect of substrate and enzyme

concentration. *Vitae*, 25(1), 17–25. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v25n1a03>

Zarate, S., & Lopez-Leyva, M. H. (1990). Oligosaccharide Formation During Enzymatic Lactose Hydrolysis: A Literature Review. *Journal of Food Protection*, 53(3), 262–268. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.3.262>

6. Anexos

6.1 Ficha técnica de el lactosuero:

	LACTEOS LA CRISTINA S.A. Av Gral Savio 3.500 Villa María – Córdoba Argentina								
ESPECIFICACIÓN DE PRODUCTO SUERO DE QUESO PARCIALMENTE DESMINERALIZADO EN POLVO	<table border="1"> <tr> <td>Documento</td> <td>FTP-02-01</td> </tr> <tr> <td>Fecha de emisión</td> <td>20071030</td> </tr> <tr> <td>Fecha de revisión</td> <td>20170918</td> </tr> <tr> <td>Página</td> <td>1 de 1</td> </tr> </table>	Documento	FTP-02-01	Fecha de emisión	20071030	Fecha de revisión	20170918	Página	1 de 1
Documento	FTP-02-01								
Fecha de emisión	20071030								
Fecha de revisión	20170918								
Página	1 de 1								
<p>Descripción del producto:</p> <p>Polvo lácteo de composición homogénea y baja higroscopicidad, de color blanco crema, sabor suave y dulce. Obtenido por pasteurización, desmineralización y deshidratación del suero de quesería.</p>									
<p>Parámetros fisicoquímicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Humedad (%): máx. 3,5 % ✓ Grasa (%): máx. 1,5% ✓ pH: mín. 4,00 ✓ Acidez titulable: max 2,0 % m/m ✓ Proteínas (%): mín. 11,00 % ✓ Cenizas (%): máx. 5,5 % ✓ Lactosa: mín. 70,0 % ✓ Partículas quemadas: máx. Disco B ✓ Antibióticos y pesticidas: No contiene 									
<p>Parámetros microbiológicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Aerobios mesófilos totales: menor a 10.000 U.F.C. /g. ✓ Coliformes totales: menor a 3 NMP/g. ✓ Coliformes fecales: menor a 3 NMP/g. ✓ Enterobacterias: menor a 10 U.F.C. /g. ✓ Staphilococcus aureus: menor a 100 U.F.C/g. ✓ Salmonella: Ausencia en 25 gr. ✓ Hongos y Levaduras: menor a 10 U.F.C. /g. ✓ Bacillus cereus: menor a 100 U.F.C/g. ✓ Listeria Monocytogenes: Ausencia en 25 g. ✓ Esporas de Clotridium sulfitorreductores: menor a 100 U.F.C/g. 									
<p>Presentación:</p> <p>Bolsas x 25 kg netos de triple papel kraft, con bolsa interna de polietileno cristal.</p>									
<p>Parámetros de conservación:</p> <p>Mantener en lugar fresco (10-25 °C) y seco.</p> <p>Mantener al abrigo de la luz. Evitar exponer a la luz solar y olores fuertes.</p>									
<p>Vida útil:</p> <p>La vida útil del producto es de 24 meses a partir de la fecha de elaboración, bajo las condiciones de conservación recomendadas.</p>									
<hr/> <p><i>Juan Diaz de Soto 1.270, Piso 3º- VICENTE LOPEZ, BUENOS AIRES, ARGENTINA. TEL 54- 01- 48378000</i></p>									

6.2 ANOVA de tres factores para producción de GOS, lactosa, glucosa y galactosa

_____ 16/02/2021 09:11:03 a. m. _____

Bienvenido a Minitab, presione F1 para obtener ayuda.

ANOVA: gos vs. estado; tiempo; []

Factor	Tipo	Niveles	Valores
estado	fijo	2	inmovilizada; libre
tiempo	fijo	5	0; 10; 20; 40; 80
[]	fijo	3	0.14 mgEZ/gLAC; 0.41 mgEZ/gLAC; 0.66 mgEZ/gLAC

6.2.1 Análisis de varianza de GOS

Fuente	GL	SC	MC	F	P
estado	1	308,43	308,43	4,63	0,040
tiempo	4	14682,80	3670,70	55,07	0,000
[]	2	1235,13	617,57	9,26	0,001
estado*tiempo	4	1134,47	283,62	4,25	0,008
estado*[]	2	389,66	194,83	2,92	0,069
tiempo*[]	8	1040,53	130,07	1,95	0,089
estado*tiempo*[]	8	1526,43	190,80	2,86	0,017
Error	30	1999,69	66,66		
Total	59	22317,14			

S = 8,16434 R-cuad. = 91,04% R-cuad.(ajustado) = 82,38%

ANOVA: lactosa vs. estado_1; tiempo_1; []_1

Factor	Tipo	Niveles	Valores
estado_1	fijo	2	inmovilizada; libre
tiempo_1	fijo	5	0; 10; 20; 40; 80

[]_1 fijo 3 0.14 mgEZ/gLAC; 0.41 mgEZ/gLAC; 0.66 mgEZ/gLAC

6.2.2 Análisis de varianza de lactosa

Fuente	GL	SC	MC	F	P
estado_1	1	6276	6276	12,23	0,001
tiempo_1	4	253453	63363	123,50	0,000
[]_1	2	24520	12260	23,90	0,000
estado_1*tiempo_1	4	2284	571	1,11	0,369
estado_1*[]_1	2	6996	3498	6,82	0,004
tiempo_1*[]_1	8	8287	1036	2,02	0,078
estado_1*tiempo_1*[]_1	8	12870	1609	3,14	0,011
Error	30	15391	513		
Total	59	330077			

S = 22,6505 R-cuad. = 95,34% R-cuad.(ajustado) = 90,83%

ANOVA: glucosa vs. estado_2; tiempo_2; []_2

Factor	Tipo	Niveles	Valores
estado_2	fijo	2	inmovilizada; libre
tiempo_2	fijo	5	0; 10; 20; 40; 80
[]_2	fijo	3	0.14 mgEZ/gLAC; 0.41 mgEZ/gLAC; 0.66 mgEZ/gLAC

6.2.3 Análisis de varianza de glucosa

Fuente	GL	SC	MC	F	P
estado_2	1	1776,1	1776,1	17,52	0,000
tiempo_2	4	41659,4	10414,8	102,74	0,000
[]_2	2	3700,3	1850,2	18,25	0,000
estado_2*tiempo_2	4	478,4	119,6	1,18	0,340
estado_2*[]_2	2	576,4	288,2	2,84	0,074
tiempo_2*[]_2	8	1216,7	152,1	1,50	0,199
estado_2*tiempo_2*[]_2	8	1532,7	191,6	1,89	0,099
Error	30	3041,2	101,4		
Total	59	53981,2			

S = 10,0684 R-cuad. = 94,37% R-cuad. (ajustado) = 88,92%

ANOVA: galactosa vs. estado_3; tiempo_3; []_3

Factor	Tipo	Niveles	Valores
estado_3	fijo	2	inmovilizada; libre
tiempo_3	fijo	5	0; 10; 20; 40; 80
[]_3	fijo	3	0.14 mgEZ/gLAC; 0.41 mgEZ/gLAC; 0.66 mgEZ/gLAC

6.2.4 Análisis de varianza de galactosa

Fuente	GL	SC	MC	F	P
estado_3	1	29478	29478	4,74	0,038
tiempo_3	4	75953	18988	3,05	0,032
[]_3	2	56155	28077	4,51	0,019
estado_3*tiempo_3	4	10571	2643	0,42	0,790
estado_3*[]_3	2	10916	5458	0,88	0,426
tiempo_3*[]_3	8	25006	3126	0,50	0,845
estado_3*tiempo_3*[]_3	8	23661	2958	0,48	0,864
Error	30	186719	6224		
Total	59	418459			

S = 78,8921 R-cuad. = 85,38% R-cuad. (ajustado) = 72,25%

6.2.5 Compilado de resultados de los ANOVAS por cada parámetro

Tabla 8. análisis de varianza de tres factores, calculado por cada parámetro

	Probabilidad	R ² calculado	R ² ajustado
GOS	0,040	91,04%	82,38%
Lactosa	0,001	95,34%	90,83%
Glucosa	0,000	94,37%	88,92%
Galactosa	0,038	85,38%	72,25%

6.3 Construcción del script de programación usado en el proyecto

	A	B	C	D
1	0	0	0	
2	0,01513725	0,17247774	0,04905249	
3	0,11685225	0,31505547	0,20288084	
4	0,18535325	0,3805043	0,25795274	
5	0,37266536	0,56816352	0,48037238	
6	0,4774279	0,7060085	0,65114974	
7	0,61833652	0,75805728	0,7358728	
8				
9				

en el software Matlab® se compilaron los datos a través de Excel, y son transportados al software Matlab®, mediante el comando `xlsread` para poder evaluar los datos desde Matlab®

```

Editor - /Users/user/Documents/MATLAB/matrizdat.m
1- klc
2- %mat1=GOSLibre
3- %mat2=GOSInmovilizada
4- %mat3=LACTOSAlibre
5- %mat4=LACTOSAInmovilizada
6- %mat5=GALALACTOSA libre
7- %mat6=GALALACTOSAInmovilizada
8- %mat7=GLUCOSAlibre
9- %mat8=GLUCOSAInmovilizada
10- mat1=xlsread('datostesis11.xlsx')
11- mat2=xlsread('datostesis11.xlsx',2)
12- mat3=xlsread('datostesis11.xlsx',3)
13- mat4=xlsread('datostesis11.xlsx',4)
14- mat5=xlsread('datostesis11.xlsx',5)
15- mat6=xlsread('datostesis11.xlsx',6)
16- mat7=xlsread('datostesis11.xlsx',7)
17- mat8=xlsread('datostesis11.xlsx',8)
18
19
20

```

Trabajo de las ecuaciones diferenciales del trabajo de (Andrés & Villarreal, 2014), en las cuales se ingresaron en forma de código Matlab® distribuido bajo los 4 parámetros (GOS, galactosa, glucosa y lactosa), y se representaron de manera grafica esto con el fin de determinar las constantes y como optimizar la obtención de la k

```

Editor - /Users/user/Documents/MATLAB/Gosfun.m
1- function dc = Gosfun(t,c)
2- %vector columna de derivadas
3- dc = zeros(6,1); %vector columna de derivadas
4- dc(1) = -(k(1)*c(1)*c(5))-(k(4)*c(6)*c(1))+k(5)*c(4)*c(5); %Lactosa
5- dc(2) = (k(1)*c(1)*c(5)); % Glucosa
6- dc(3) = (k(2)*c(6))-(k(3)*c(5)*c(3)); % Galactosa
7- dc(4) = (k(4)*c(6)*c(1))-(k(5)*c(4)*c(5)); % GOS
8- dc(5) = -(k(1)*c(1)*c(5))+(k(2)*c(6))-(k(3)*c(5)*c(3))+k(4)*c(6)*c(1)-(k(5)*c(4)*c(5)); % Enzima
9- dc(6) = (k(1)*c(1)*c(5))-(k(2)*c(6))+(k(3)*c(5)*c(3))-(k(4)*c(6)*c(1))+k(5)*c(4)*c(5); % E-GAL
10- end

```

```

Editor - /Users/user/Documents/MATLAB/MadreGosfun.m
Gosfun.m  MadreGosfun.m  matrizdat.m  Fobj.m  ModeloGOSFUN.m
12 %aca se hace el calculo para libre
13 tiempos=[0 2.5 5 10 20 40 90 1
14 pesos=[342.3 180.156 180.156 504.16];
15 %distribucion cuando se usa relacion 1:00 1:25 1:50 en enzima libre
16 t=[0:1:100];%limites
17 CF(:,1)=[1.46 0 0 0.14 0];%Sustrato glucosa galactosa gos enzima enzgal
18 CF(:,2)=[1.16 0 0 0.14 0];%Sustrato glucosa galactosa gos enzima enzgal
19 CF(:,3)=[0.97 0 0 0.14 0];%Sustrato glucosa galactosa gos enzima enzgal
20 [X, Y(1,:)] = ode15s@(c,t)Gosfun(c,t,k),t,CF(:,1));
21 [X, Y(2,:)] = ode15s@(c,t)Gosfun(c,t,k),t,CF(:,2));
22 [X, Y(3,:)] = ode15s@(c,t)Gosfun(c,t,k),t,CF(:,3));
23
24 disp('para calculo de contenido de G05')
25 %figure('Name','estado libre','off')
26 figure('Name','Enzima Libre','NumberTitle','off')
27 subplot(2,2,1)
28 plot(tiempos,mat1(:,1)*pesos(4),'or',tiempos,mat1(:,2)*pesos(4),'og',tiempos,mat1(:,3)*pesos(4),'ob',X,Y(1,:),4)*pesos(4),'-r',X,Y(2,:),4)*pesos(4),'-g',X,Y(3,:),4)*pesos(4),
29 title('cuantificacion de azucares (G05)')
30 xlabel('min')
31 ylabel('moles(G05)')
32 subplot(2,2,2)
33 plot(tiempos,mat3(:,1)*pesos(1),'or',tiempos,mat3(:,2)*pesos(1),'og',tiempos,mat3(:,3)*pesos(1),'ob',X,Y(1,:),1)*pesos(1),'-r',X,Y(2,:),1)*pesos(1),'-g',X,Y(3,:),1)*pesos(1),
34 title('cuantificacion de azucares (Lactosa)')
35 xlabel('min')
36 ylabel('moles(Lactosa)')
37 subplot(2,2,3)
38 plot(tiempos,mat5(:,1)*pesos(3),'or',tiempos,mat5(:,2)*pesos(3),'og',tiempos,mat5(:,3)*pesos(3),'ob',X,Y(1,:),3)*pesos(3),'-r',X,Y(2,:),3)*pesos(3),'-g',X,Y(3,:),3)*pesos(3),
39 title('cuantificacion de azucares (Galactosa)')
40 xlabel('min')
41 ylabel('moles(Galactosa)')
42 subplot(2,2,4)
43 plot(tiempos,mat7(:,1)*pesos(2),'or',tiempos,mat7(:,2)*pesos(2),'og',tiempos,mat7(:,3)*pesos(2),'ob',X,Y(1,:),4)*pesos(2),'-r',X,Y(2,:),4)*pesos(2),'-g',X,Y(3,:),4)*pesos(2),
44 title('cuantificacion de azucares (Glucosa)')
45 xlabel('min')
46 ylabel('moles(Glucosa)')
47 legend('1:00','1:25','1:50','Location','northoutside','Orientation','Horizontal')
48

```

```

Editor - /Users/user/Documents/MATLAB/MadreGosfun.m
Gosfun.m  MadreGosfun.m  matrizdat.m  Fobj.m  ModeloGOSFUN.m
49 %aca se hace el calculo para inmovilizada
50
51 t=[0:1:100];%limites
52 CF(:,1)=[1.46 0 0 0.14 0];%Sustrato glucosa galactosa gos enzima enzgal
53 CF(:,2)=[1.16 0 0 0.14 0];%Sustrato glucosa galactosa gos enzima enzgal
54 CF(:,3)=[0.97 0 0 0.14 0];%Sustrato glucosa galactosa gos enzima enzgal
55 [X, Y(1,:)] = ode15s@(c,t)Gosfun(c,t,k),t,CF(:,1));
56 [X, Y(2,:)] = ode15s@(c,t)Gosfun(c,t,k),t,CF(:,2));
57 [X, Y(3,:)] = ode15s@(c,t)Gosfun(c,t,k),t,CF(:,3));
58
59 disp('para calculo de contenido de G05')
60 %figure('Name','estado libre','off')
61 figure('Name','Enzima Inmovilizada','NumberTitle','off')
62 subplot(2,2,1)
63 plot(tiempos,mat2(:,1)*pesos(4),'or',tiempos,mat2(:,2)*pesos(4),'og',tiempos,mat2(:,3)*pesos(4),'ob',X,Y(1,:),4)*pesos(4),'-r',X,Y(2,:),4)*pesos(4),'-g',X,Y(3,:),4)*pesos(4),
64 title('cuantificacion de azucares (G05)')
65 xlabel('min')
66 ylabel('moles(G05)')
67 subplot(2,2,2)
68 plot(tiempos,mat4(:,1)*pesos(1),'or',tiempos,mat4(:,2)*pesos(1),'og',tiempos,mat4(:,3)*pesos(1),'ob',X,Y(1,:),1)*pesos(1),'-r',X,Y(2,:),1)*pesos(1),'-g',X,Y(3,:),1)*pesos(1),
69 title('cuantificacion de azucares (Lactosa)')
70 xlabel('min')
71 ylabel('moles(Lactosa)')
72 subplot(2,2,3)
73 plot(tiempos,mat6(:,1)*pesos(3),'or',tiempos,mat6(:,2)*pesos(3),'og',tiempos,mat6(:,3)*pesos(3),'ob',X,Y(1,:),3)*pesos(3),'-r',X,Y(2,:),3)*pesos(3),'-g',X,Y(3,:),3)*pesos(3),
74 title('cuantificacion de azucares (Galactosa)')
75 xlabel('min')
76 ylabel('moles(Galactosa)')
77 subplot(2,2,4)
78 plot(tiempos,mat8(:,1)*pesos(2),'or',tiempos,mat8(:,2)*pesos(2),'og',tiempos,mat8(:,3)*pesos(2),'ob',X,Y(1,:),4)*pesos(2),'-r',X,Y(2,:),4)*pesos(2),'-g',X,Y(3,:),4)*pesos(2),
79 title('cuantificacion de azucares (Glucosa)')
80 xlabel('min')
81 ylabel('moles(Glucosa)')
82 legend('1:00','1:25','1:50','Location','northoutside','Orientation','Horizontal')
83 disp('se determinaran los limites y las condiciones de frontera para el modelo planteado')
84

```

Posterior, se realiza la obtención de las constantes cinéticas de cada reacción, con el uso la optimización de algoritmo genético basado en selección de poblaciones, se introducen los parámetros de nuestro modelo una población inicial, ella se encargará de calcular la mejor constante cinética que represente esta ecuación diferencial

```
Editor - /Users/user/Documents/MATLAB/ModeloGOSFUN.m
Gosfun.m x MadreGosfun.m x matrizdat.m x Fobj.m x ModeloGOSFUN.m x +
1 - clc
2 - clear all
3 - close all
4 - clear
5 - %carga de las matrices de los datos obtenidos en la experimentacion
6 - disp('de la experimentacion se obtubieron los contenidos de GOS, lactosa, glucosa Y galactosa')
7 - disp('el experimento se realizo con la enzima en estado libre e inmobilizado')
8 - disp('obteniendo 8 matrices de 6X3 cada una')
9 - load('workspacestesis.mat')
10 - load('k.mat');
11 - k=k2;
12 - %Aca se hace el calculo para libre
13 - tiempos=[0 2.5 5 10 20 40 90 ];
14 - pesosm=[342.3 180.156 180.156 504.16];
15 - %distribucion cuando se usa relacion 1:00 1:25 1:50 en enzima libre
16 - t=[0:1:100];%limites
17 - Error=Fobj(k,t,tiempos)
18 - options = gaoptimset;
19 - options = gaoptimset(options,'PopulationSize', 200);
20 - options = gaoptimset(options,'Generations', 100);
21 - options = gaoptimset(options,'InitialPopulation', k);
22 - options = gaoptimset(options,'Display', 'off');
23 - options = gaoptimset(options,'PlotFcns', { @gaplotbestf @gaplotbestindiv });
24 - lb=zeros(6,1);
25 - ub=lb+10000;
26 - k1=ga(@(k)Fobj(k,t,tiempos),6,[],[],[],[],lb,ub,[],[],options);
27 - k2 = fmincon(@(k)Fobj(k,t,tiempos),k1,[],[],[],[],lb,ub)
28 - Error=Fobj(k,t,tiempos)
29 - Error=Fobj(k2,t,tiempos)
30 - save('k.mat','k2');
31
32
33
```

```

Editor - /Users/user/Documents/MATLAB/Fobj.m
Gosfun.m  MadreGosfun.m  matrizdat.m  Fobj.m  ModeloGOSFUN.m
1 function [Error] = Fobj(k,t,tiempos)
2 load('workspacestesis.mat');
3 CF(:,1)=[1.46 0 0 0.14 0];%Sustrato glucosa galactosa gos enzima enzgal
4 CF(:,2)=[1.16 0 0 0.14 0];%Sustrato glucosa galactosa gos enzima enzgal
5 CF(:,3)=[0.97 0 0 0.14 0];%Sustrato glucosa galactosa gos enzima enzgal
6 Y(1) = ode15s(@(c,t)Gosfun(c,t,k),t,CF(:,1));
7 Y(2) = ode15s(@(c,t)Gosfun(c,t,k),t,CF(:,2));
8 Y(3) = ode15s(@(c,t)Gosfun(c,t,k),t,CF(:,3));
9 mat1exp(:,1)=deval(Y(1),tiempos,4);
10 mat1exp(:,2)=deval(Y(2),tiempos,4);
11 mat1exp(:,3)=deval(Y(3),tiempos,4);
12 mat3exp(:,1)=deval(Y(1),tiempos,1);
13 mat3exp(:,2)=deval(Y(2),tiempos,1);
14 mat3exp(:,3)=deval(Y(3),tiempos,1);
15 mat5exp(:,1)=deval(Y(1),tiempos,2);
16 mat5exp(:,2)=deval(Y(2),tiempos,2);
17 mat5exp(:,3)=deval(Y(3),tiempos,2);
18 mat7exp(:,1)=deval(Y(1),tiempos,3);
19 mat7exp(:,2)=deval(Y(2),tiempos,3);
20 mat7exp(:,3)=deval(Y(3),tiempos,3);
21 Error1=(mat1-mat1exp).^2;
22 Error2=(mat3-mat3exp).^2;
23 Error3=(mat5-mat5exp).^2;
24 Error4=(mat7-mat7exp).^2;
25 Error=sum(sum(Error1))+sum(sum(Error2))+sum(sum(Error3))+sum(sum(Error4));
26
27 end
28

```

6.4 Diagramas de Pareto para cada nivel de concentración

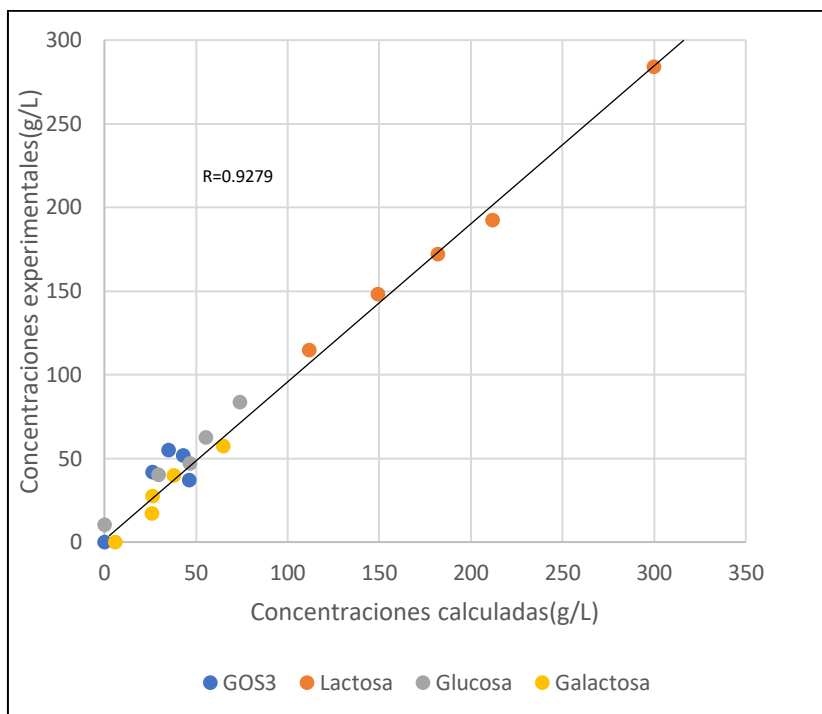


Figura 19. diagrama de Pareto para la enzima libre en $A= 0.16$ mg lactosa/ g enzima

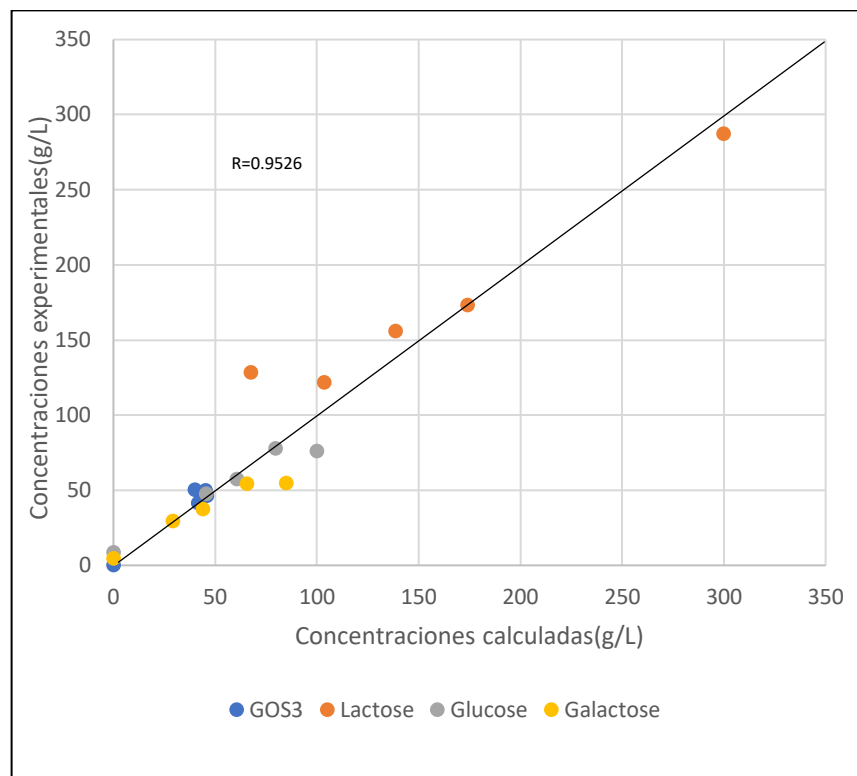


Figura 20. diagrama de Pareto para la enzima libre en $B=0.41$ mg lactosa/ g enzima

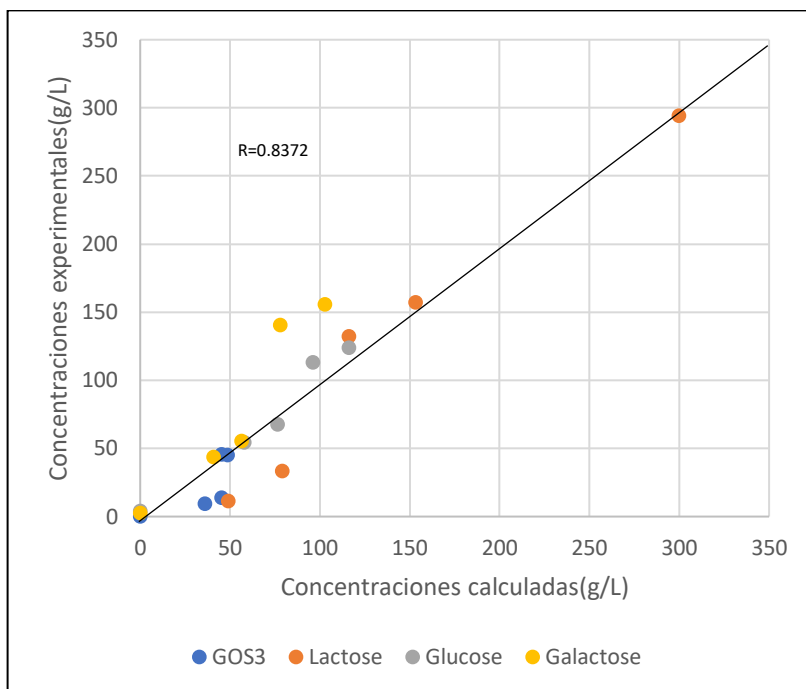


Figura 21. diagrama de Pareto para la enzima libre en $C=0.66$ mg lactosa/ g enzima

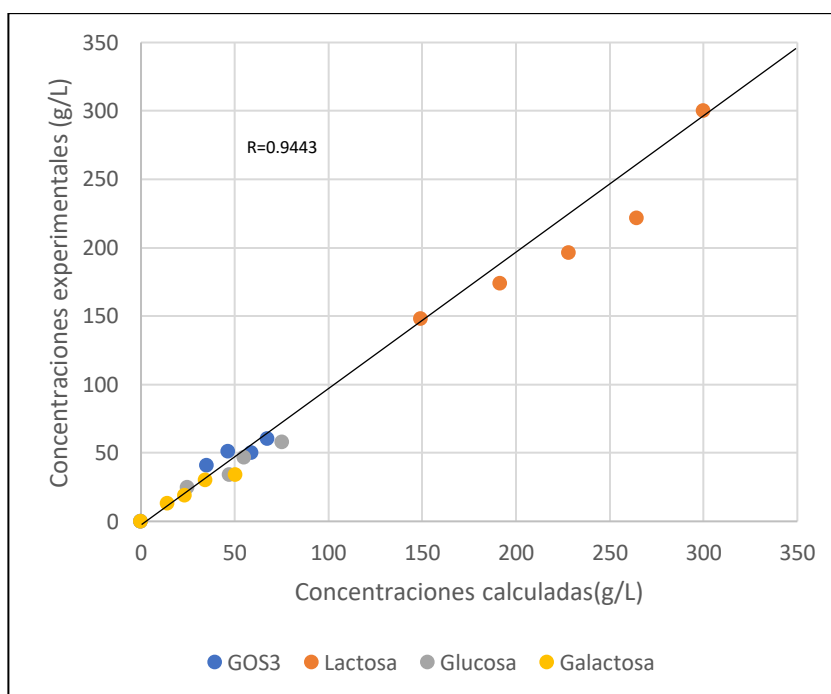


Figura 22. diagrama de Pareto para la enzima inmovilizada en $A=0.16$ mg lactosa/ g enzima

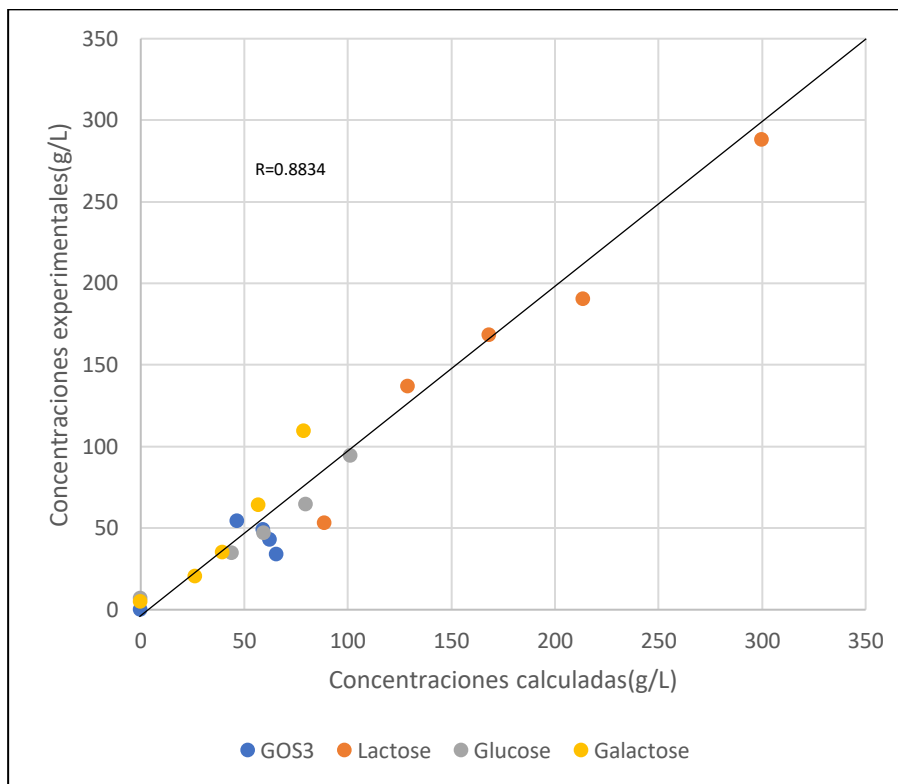


Figura 23. diagrama de Pareto para la enzima inmovilizada en $B=0.41$ mg lactosa/ g enzima

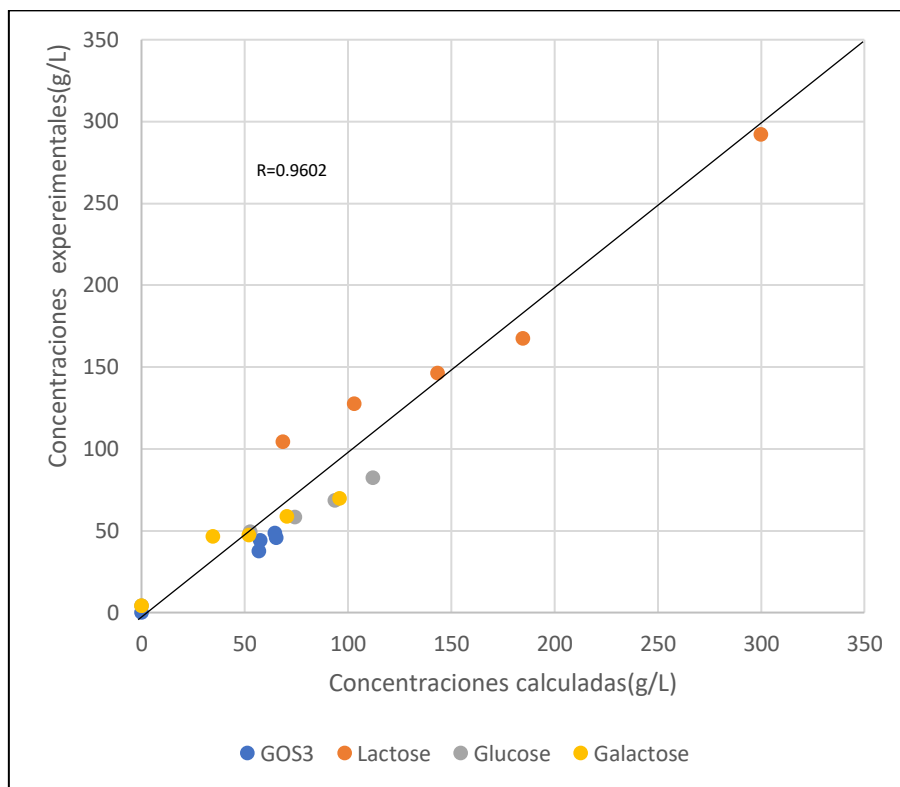


Figura 24. diagrama de Pareto para la enzima inmovilizada en $C=0.66$ mg lactosa/ g enzima

6.5 Diagramas del algoritmo genético

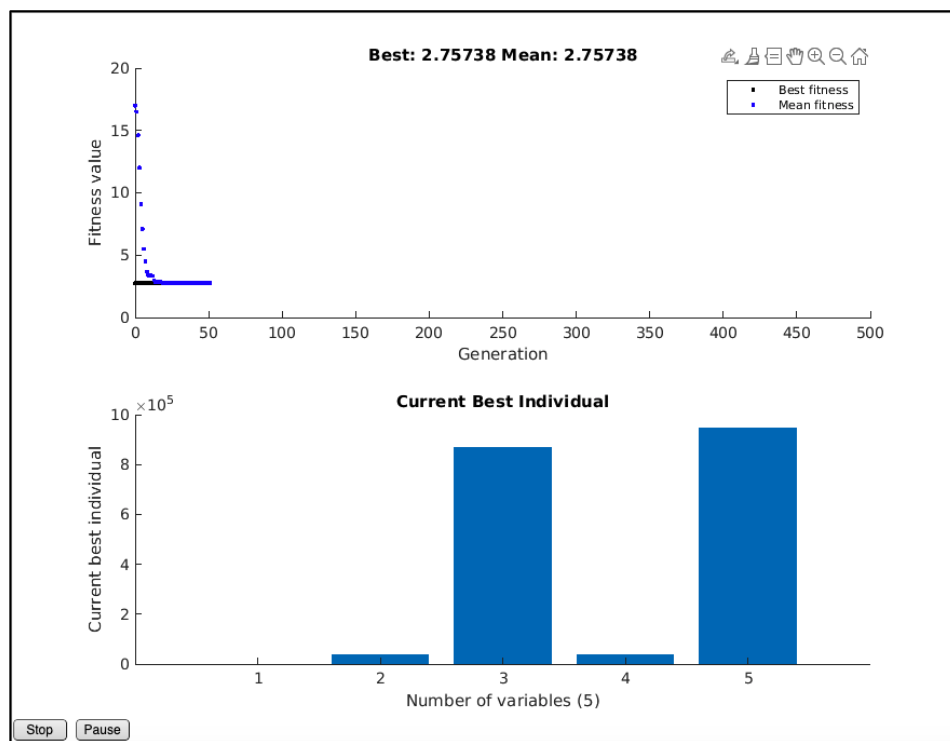


Figura 25. algoritmo genético calculado para las constantes de la enzima libre

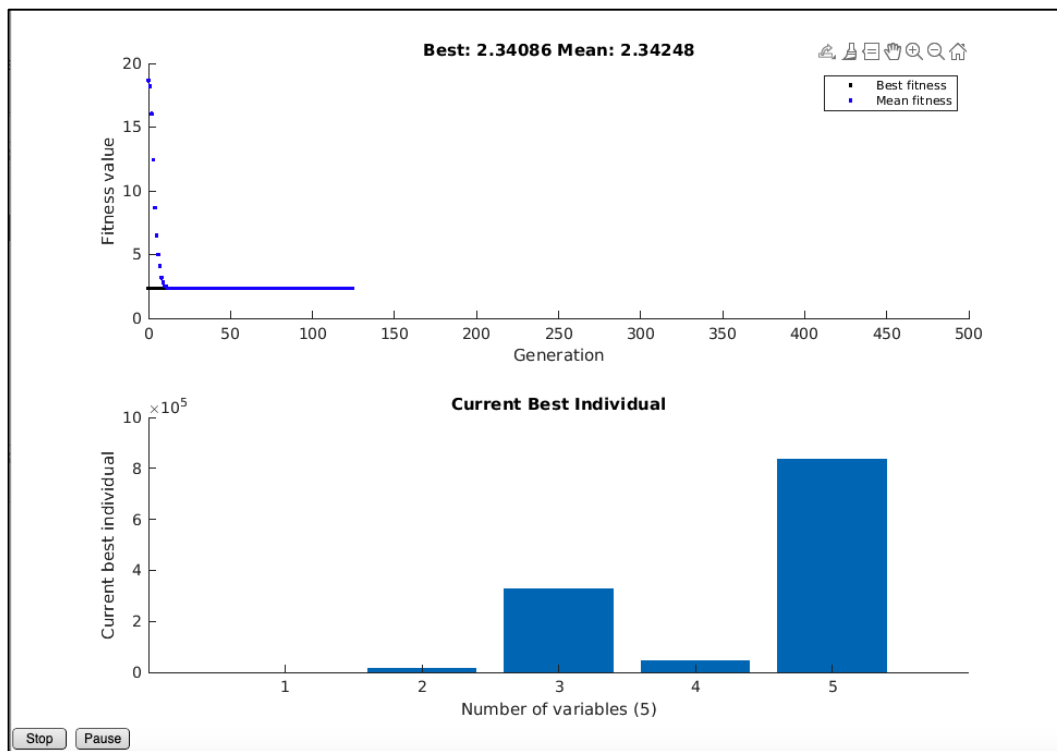


Figura 26. algoritmo genético calculado para las constantes de la enzima inmovilizada

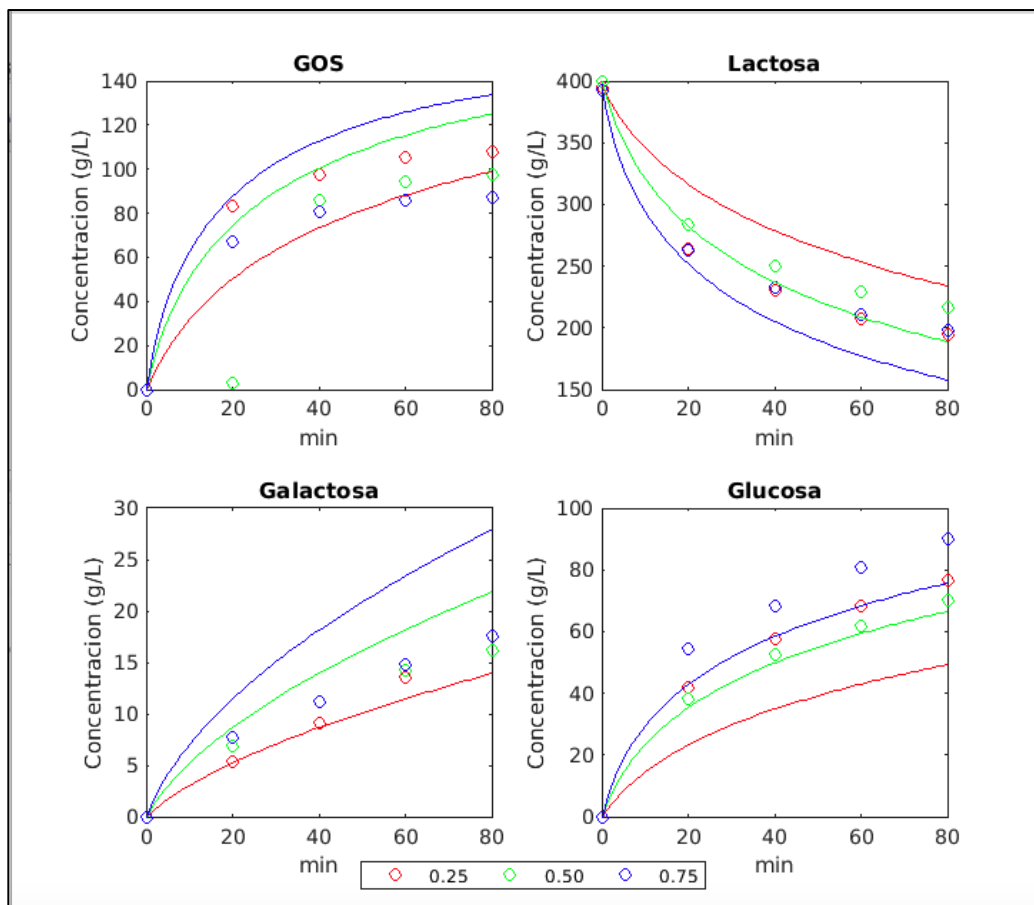


Figura 27. perfiles de concentración en enzima Enzeco® obtenido de Matlab®

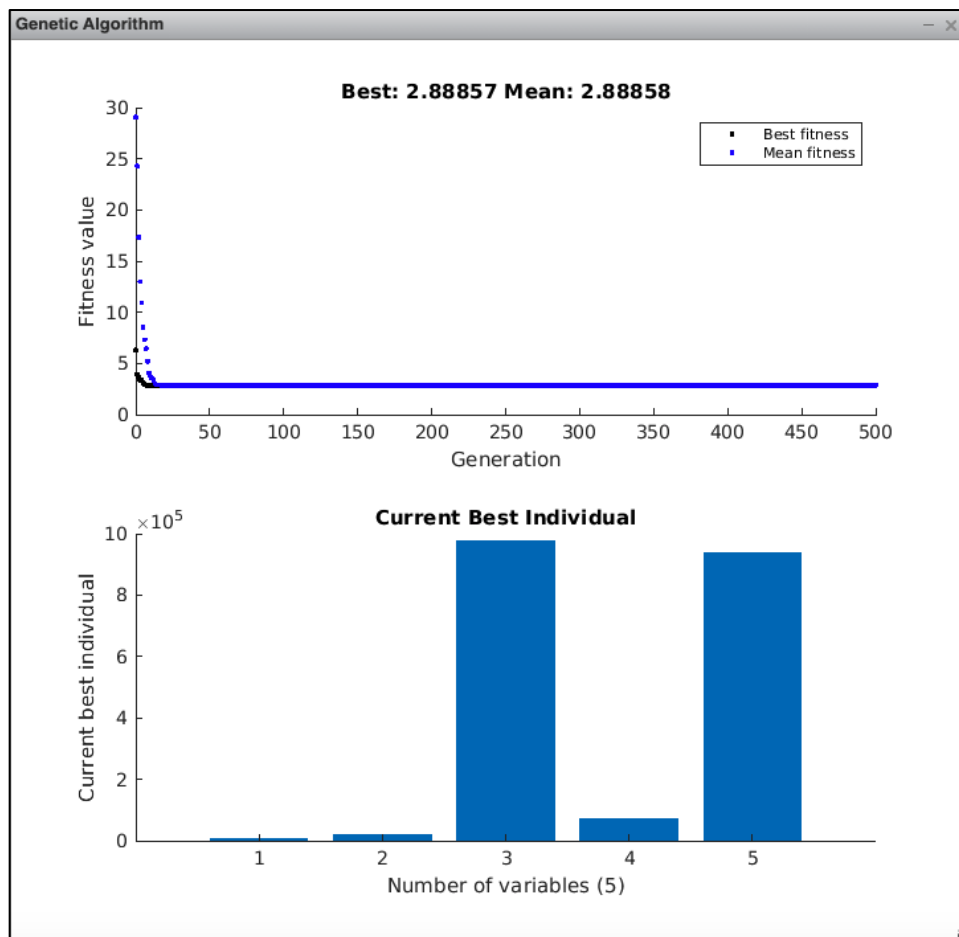


Figura 28. algoritmo genético calculado para las constantes de la enzima Enzeco®

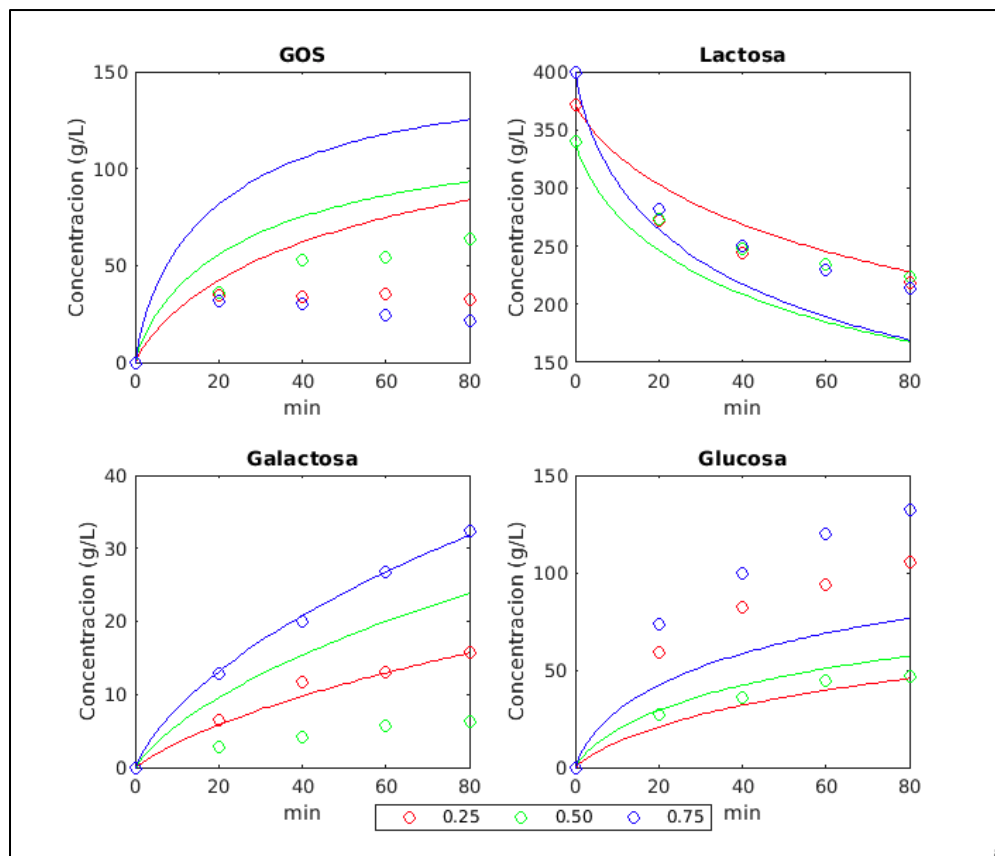


Figura 29. perfiles de concentración en enzima Megazyme® obtenido de Matlab®

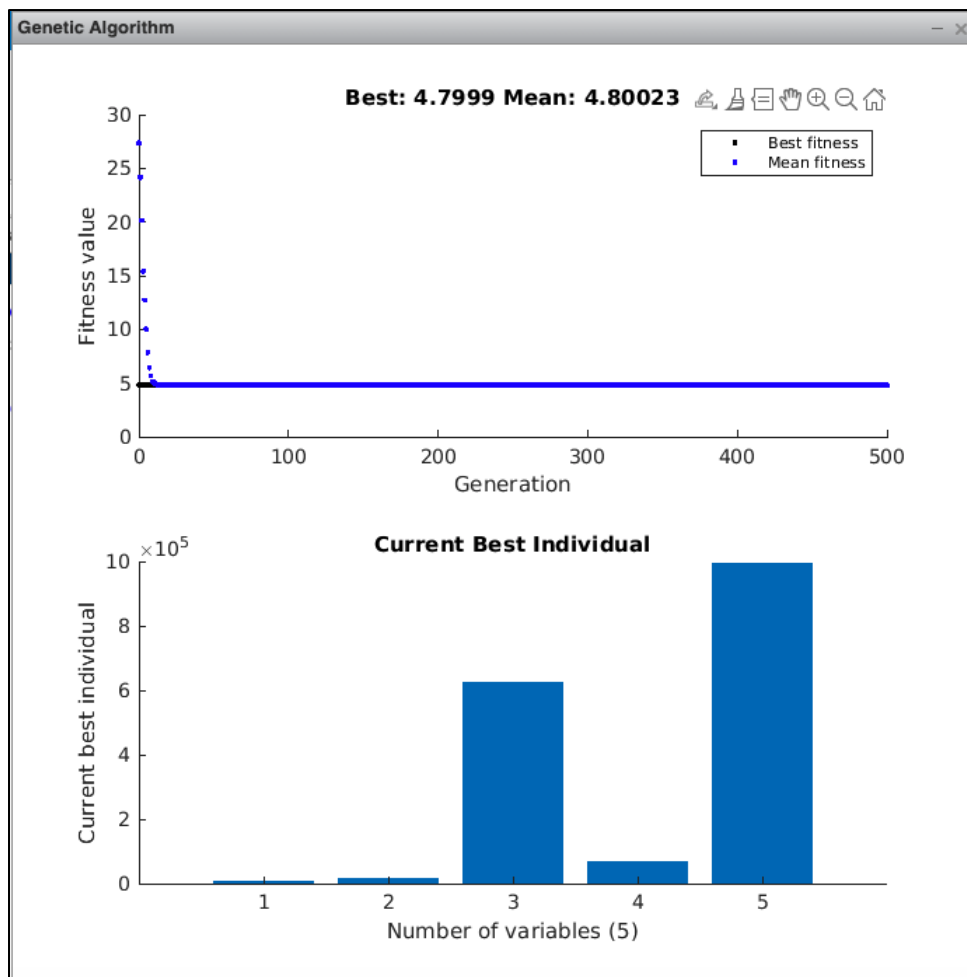


Figura 30. algoritmo genético calculado para las constantes de la enzima Megazyme®

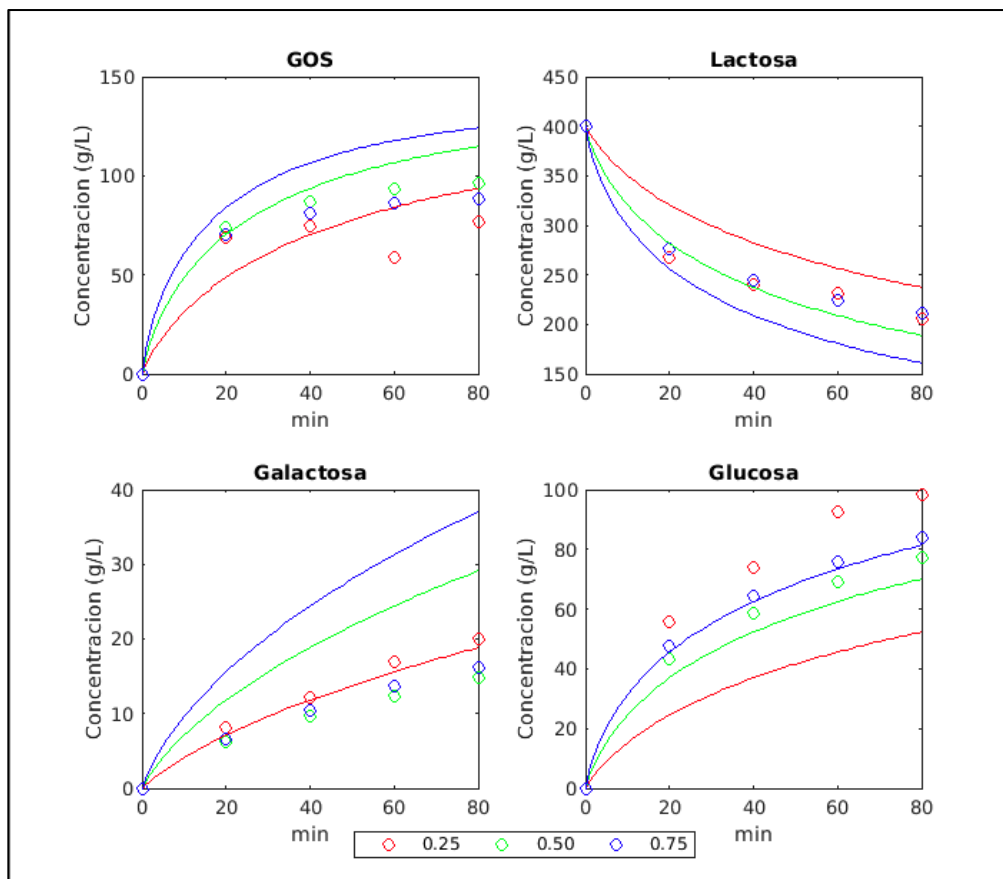


Figura 31. perfiles de concentración en enzima Maxilact® obtenido de Matlab®

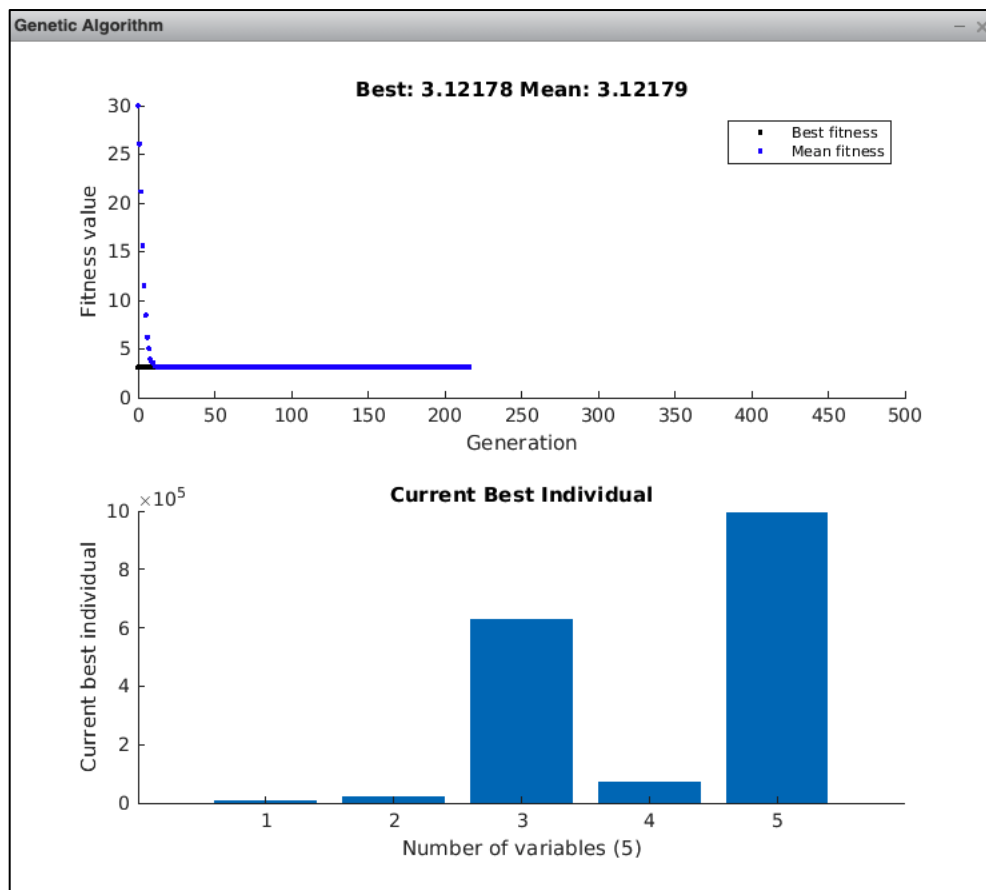


Figura 32. algoritmo genético calculado para las constantes de la enzima Maxilact®

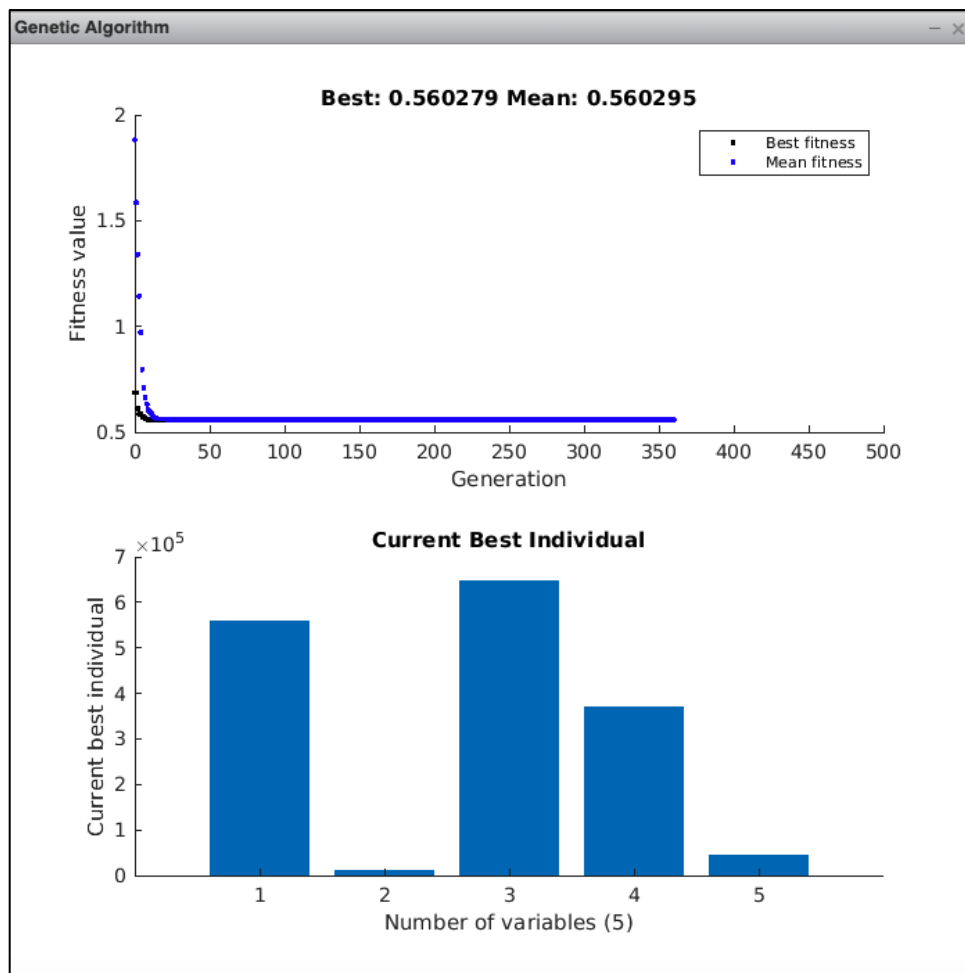


Figura 33. algoritmo genético calculado para las constantes de (Hung & Lee, 2002)

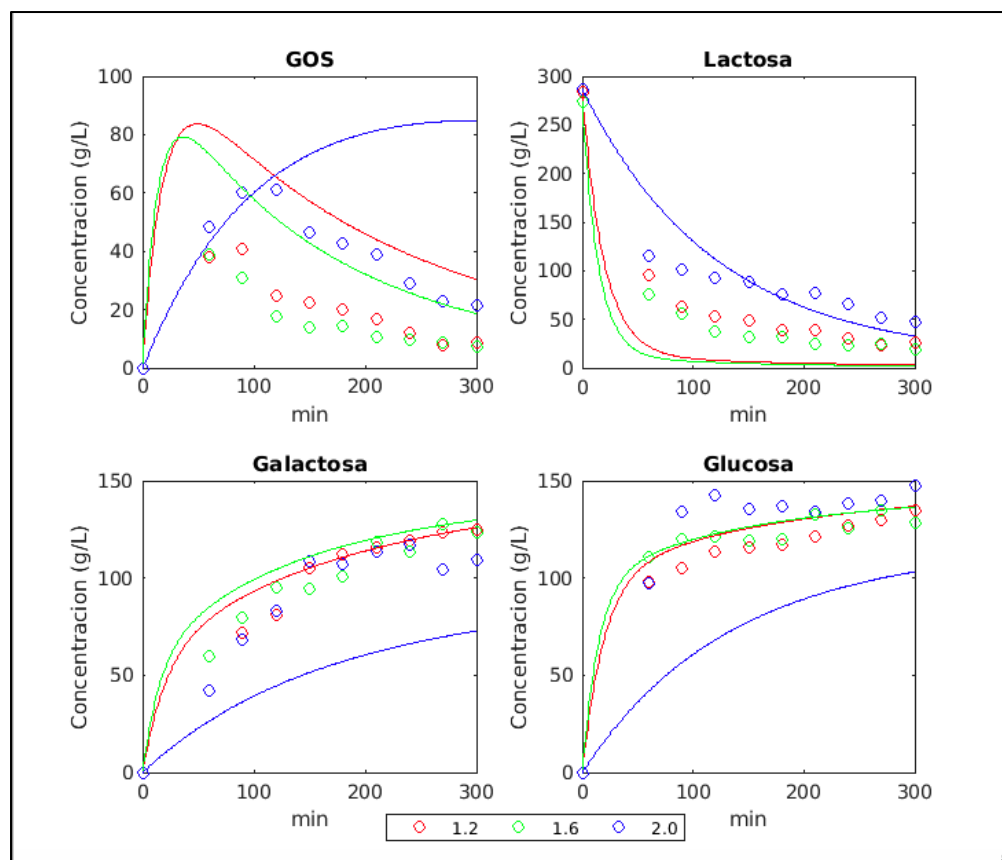


Figura 34. perfiles de concentración de (Manucci, 2009) obtenido de Matlab®

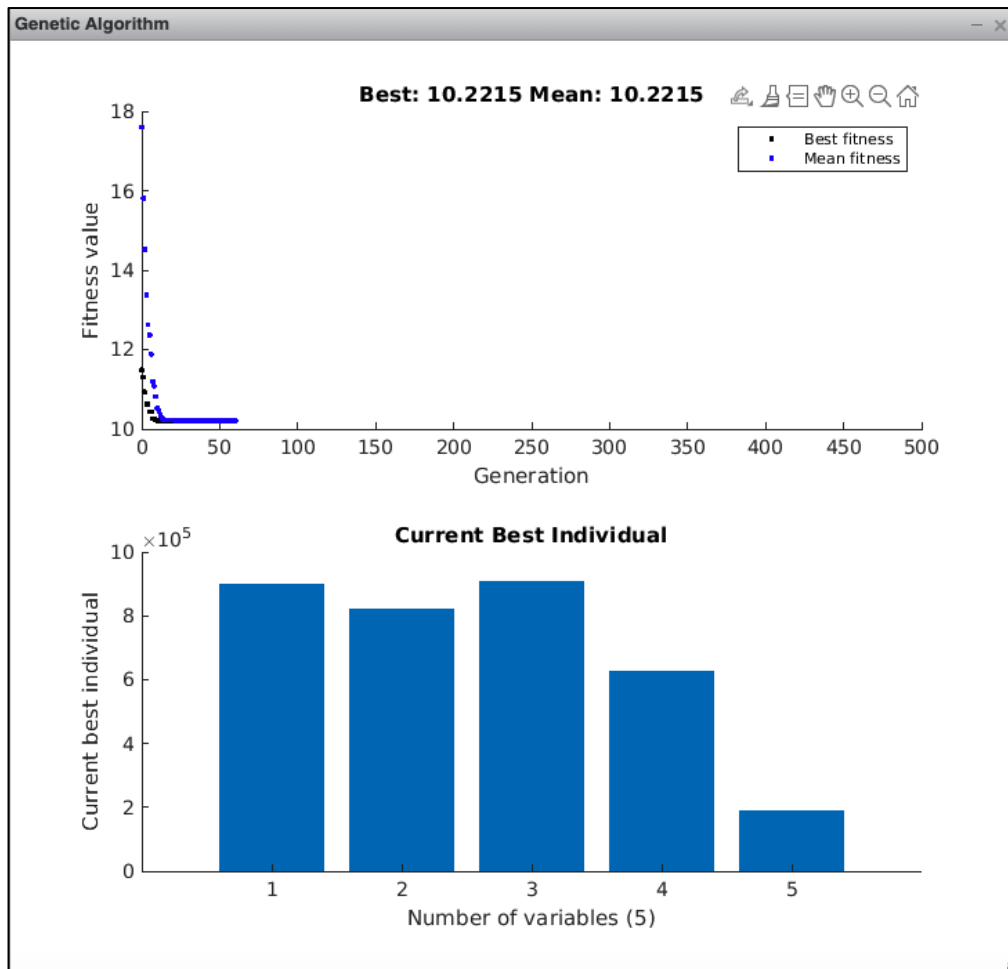


Figura 35. algoritmo genético calculado para las constantes de (Manucci, 2009)

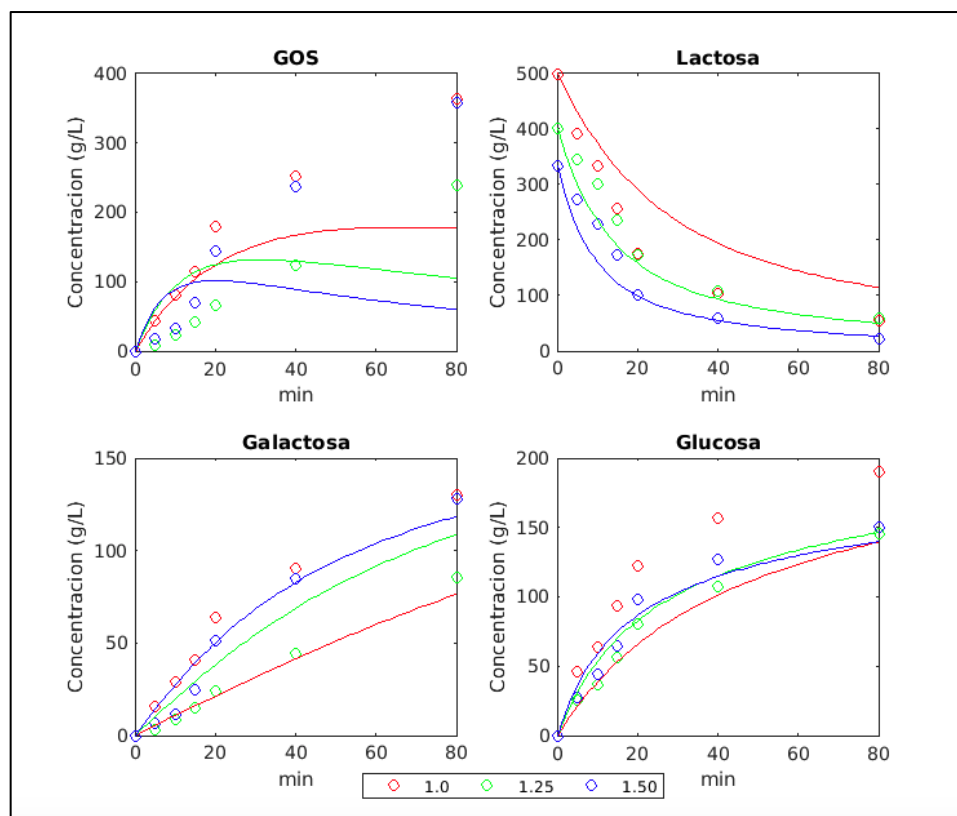


Figura 36. perfiles de concentración en enzima libre de Andrés & Villarreal(2014)

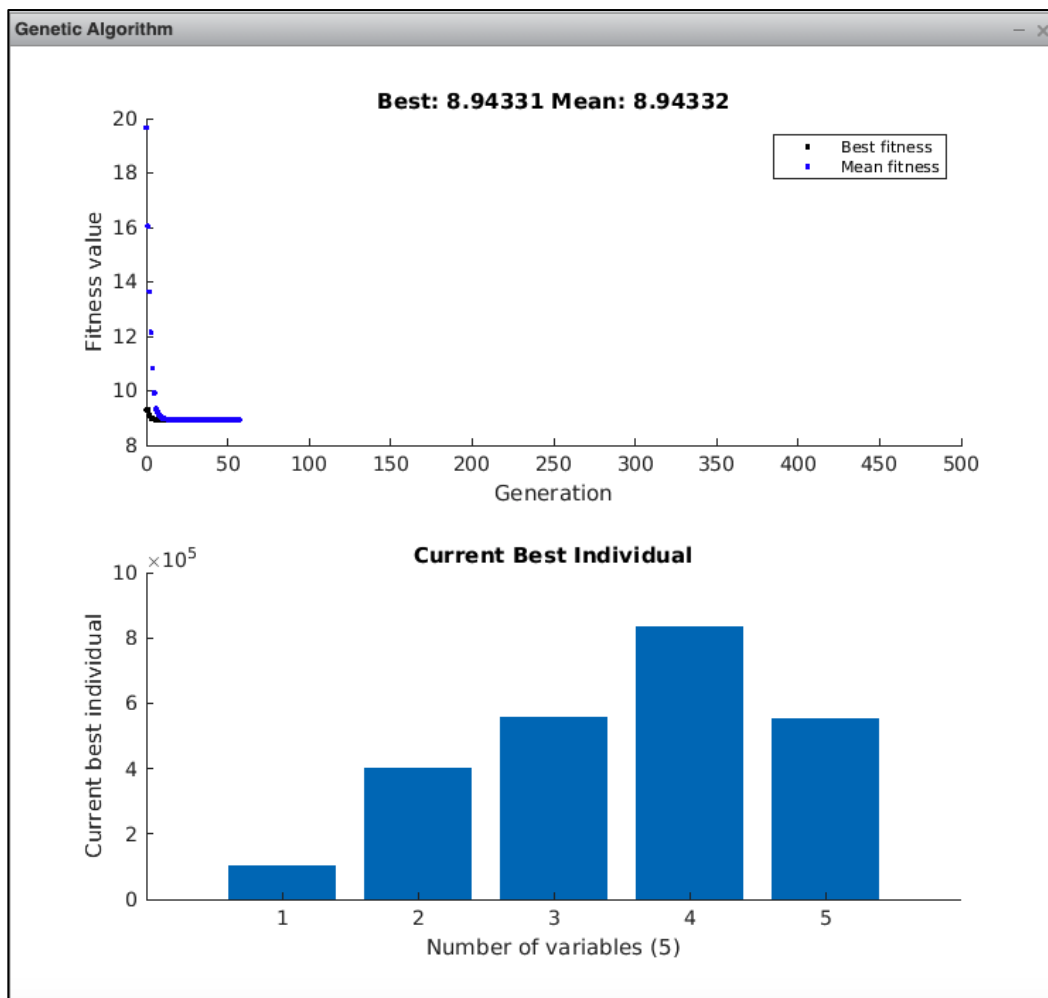


Figura 37. algoritmo genético calculado para enzima libre de Andrés & Villarreal(2014)

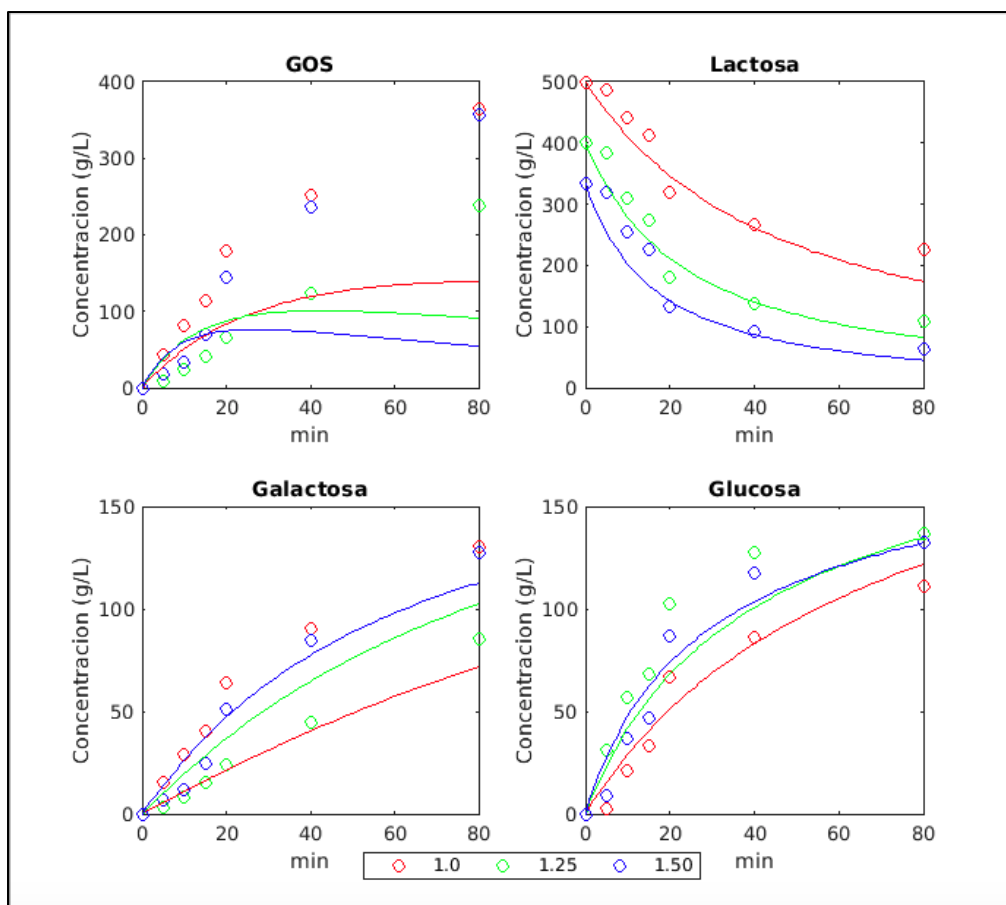


Figura 38. perfiles de concentración en enzima inmovilizada de Andrés & Villarreal(2014)

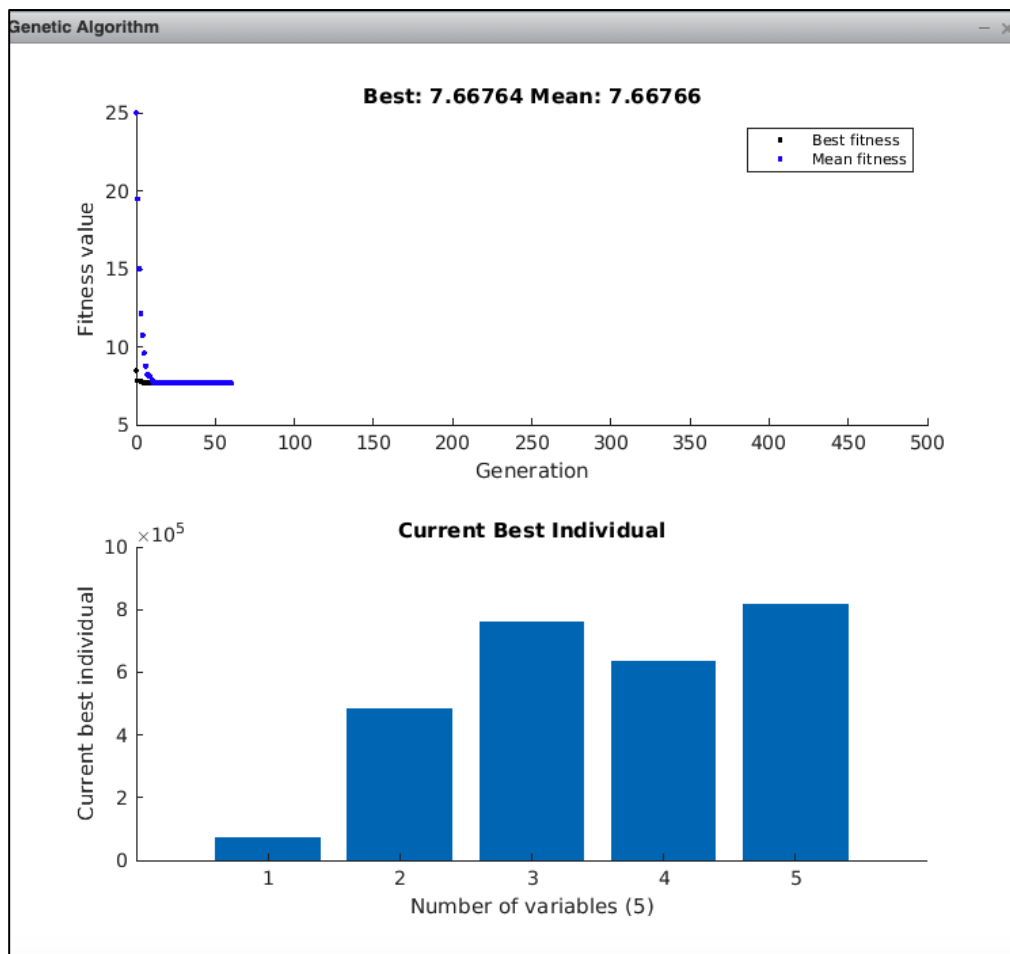


Figura 39. algoritmo genético calculado para enzima inmovilizada de Andrés & Villarreal(2014)

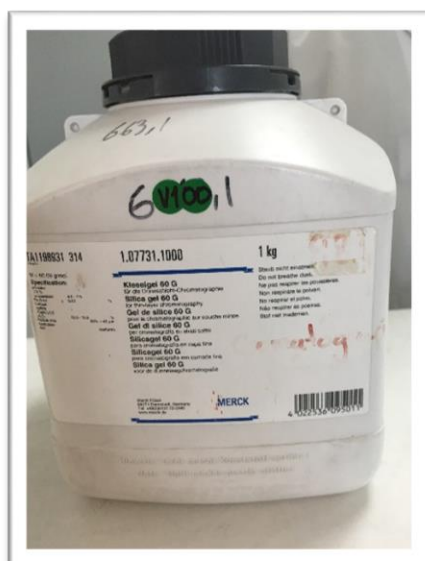


Figura 40. sílica gel Merck®, usada para la inmovilización enzimática