

REVALORIZACIÓN DEL LACTOSUERO: ESTUDIO DE LA HIDRÓLISIS PARA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLE

M.E. Vales^{1,3}; V.E. Capdevila³; C. Iraporda^{2,3};
I. Rubel^{2,3}; M.C. Gely³; A.M. Pagano³

¹Becaria de Iniciación Científico-Tecnológica -
Facultad de Ingeniería - Universidad Nacional del
Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNICEN).
Olavarría, Buenos Aires, Argentina

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas
y Técnicas (CONICET). Argentina

³Núcleo TECSE - Depto. de Ingeniería Química y
Tecnología de los Alimentos - Facultad de Ingeniería -
Universidad Nacional del Centro de la Provincia de
Buenos Aires (UNICEN). Olavarría, Buenos Aires,
Argentina.

INTRODUCCION

El lactosuero es un residuo de la industria láctea, proveniente de la elaboración de quesos, que suele ocasionar un problema ambiental importante por los grandes volúmenes con elevada carga orgánica que se generan: se estima que se requieren 10 L de leche para producir 1 a 2 kg de queso, mientras se eliminan 8-9 L de suero con valores DBO de 30-60 kg/m³ (López Ríos *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2010; Beltrán y Acosta, 2013). No obstante, este residuo orgánico ofrece diversas posibilidades de valorización, siendo una de ellas la producción de bioetanol (biocombustible usado en el corte de la nafta) a partir del aprovechamiento de su composición en carbohidratos.

La producción de combustible de segunda generación (bioetanol-2G) por conversión del lactosuero es una alternativa de gran interés para la utilización de este subproducto industrial (Dragone *et al.*, 2009; Parra Huertas *et al.*, 2009). El proceso fermentativo posterior a la hidrólisis origina un rendimiento de etanol en el rango de 75-85% del valor teórico, considerando que cada 0.538 kg de etanol producido se requiere de 1 kg de lactosa metabolizada. Esto refleja la importancia que tiene el aprovechamiento de la lactosa del lactosuero en la producción de etanol.

La obtención de bioetanol-2G a partir de este tipo de residuos alimenticios involucra cuatro etapas fundamentales: pretratamiento del residuo, hidrólisis, fermentación, separación y purificación del producto deseado (Dagnino *et al.*, 2013). La lactosa es un disacárido que

se encuentra en gran proporción en el lactosuero (70% del contenido total de sólidos) (Gajendragadkar *et al.*, 2017). A partir de la reacción de hidrólisis de la lactosa del lactosuero es posible obtener los monosacáridos α -glucosa y β -galactosa (Figura 1), facilitando el proceso fermentativo posterior para obtención de bioetanol 2G (α -glucosa y β -galactosa se equilibran con α -glucosa y β -galactosa por mutarrotación).

La reacción de hidrólisis de la lactosa puede ser catalizada tanto por ácidos inorgánicos (llamada hidrólisis ácida o química) como por catalizadores biológicos (denominada hidrólisis enzimática) (Santos *et al.*, 1998; López Ríos *et al.*, 2006). En la catálisis química se emplean ácidos fuertes como el ácido clorhídrico o el ácido sulfúrico y se trabaja en condiciones operativas de alta temperatura (100-150°C), alcanzándose mayor velocidad de reacción con ácido clorhídrico como catalizador (Vujicic *et al.*, 1976). En cambio, en la reacción enzimática comúnmente se utiliza la enzima lactasa (β -galactosidasa) a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente. Entre las desventajas de la reacción ácida del lactosuero se pueden mencionar la desnaturalización de las proteínas del suero y la formación de productos indeseados a temperaturas mayores de 100°C. Mientras tanto, para la reacción enzimática las principales desventajas son la polimerización de la lactosa o de la galactosa para producir GOS (mezcla de galacto-oligosacáridos) y las limitaciones en la transferencia de masa que conducen a tasas de procesamiento muy lentas y elevados costos de procesamiento y enzima cuando ésta no se reutiliza (Gajendragadkar *et al.*, 2017).

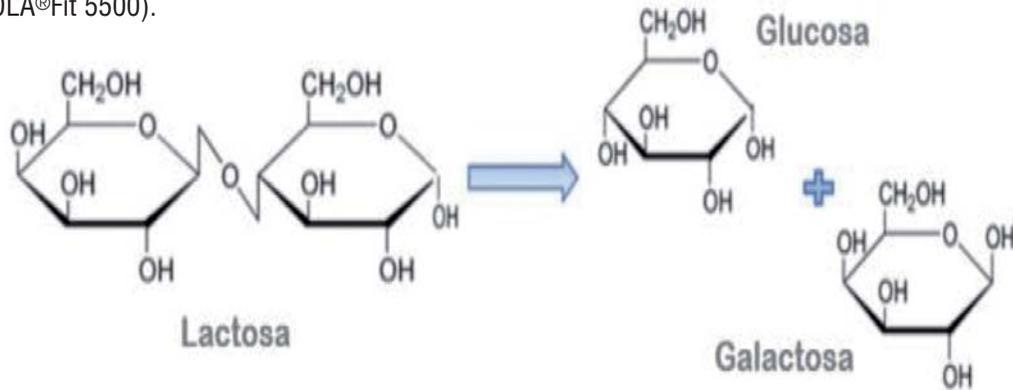
OBJETIVOS DEL TRABAJO

Estudiar experimentalmente la reacción de hidrólisis de la lactosa (principal carbohidrato del lactosuero) por vía química y enzimática con el objetivo de analizar sus ventajas comparativas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para evaluar los procesos de hidrólisis ácida y enzimática del lactosuero se preparó un sustrato modelo -representativo su composición en carbohidratos- a partir de la disolución de lactosa monohidratada (Merck Millipore®) en agua destilada, a una concentración de 50 g/L (•erner

FIGURA 1 - Reacción de hidrólisis de la lactosa
(Fuente: NOLA®Fit 5500).



et al., 2008; Heinzerling *et al.*, 2012; Fisher *et al.*, 2013). La cinética de ambos procesos se evaluó mediante una metodología alternativa no convencional de bajo costo comparativo (Heinzerling *et al.*, 2012) que consiste en emplear un glucómetro clínico automático (Accu-Chek® meter) de lectura directa de la concentración de glucosa durante la hidrólisis, realizándose la validación de este método a través de la técnica analítica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

El medidor digital automático de glucosa es un dispositivo frecuentemente empleado en pacientes con diabetes para controlar los niveles de glucosa en sangre. El instrumento funciona a través de un sistema electroquímico que permite obtener un resultado de medición inmediata, cuya lectura de pantalla expresa la concentración de glucosa total en mg/dL (Heinzerling *et al.*, 2012).

Diseño experimental

Hidrólisis química ácida de la lactosa

El estudio experimental de la hidrólisis ácida de la lactosa se llevó a cabo bajo condiciones operativas optimizadas según lo descrito por Gajendragadkar *et al.* (2017), con la finalidad de evitar los efectos indeseados del empleo de altas temperaturas. La reacción fue conducida en un reactor batch de 2000 mL termostatzado a la temperatura de reacción, empleando ácido clorhídrico 3 N (Merck®) como catalizador en una relación 1:1 con respecto al sustrato. El reactor fue sumergido en un baño ultrasónico (Testlab, frecuencia 40 kHz) a fin de lograr una eficiente agitación de la mezcla reaccionante que permite trabajar a 55°C, una temperatura notablemente inferior a las temperaturas habitualmente empleadas en la hidrólisis ácida (Gajendragadkar *et al.*, 2017). El seguimiento de la reacción se efectuó durante tres horas, extrayéndose muestras de 20 mL de la mezcla reaccionante a intervalos regularmente espacia-

dos. Una vez extraída cada muestra fue inmediatamente inactivada por neutralización con solución de hidróxido de potasio y en freezer (-18°C) hasta su análisis. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Hidrólisis enzimática (biológica) de la lactosa

- *Determinación preliminar de la concentración (dosis) de enzima necesaria.* La experiencia de hidrólisis enzimática se realizó utilizando una enzima comercial β -galactosidasa (NOLA®Fit 5500, CHR Hansen) en forma líquida altamente purificada obtenida de *Bifidobacterium bifidum* producida en *Bacillus licheniformis*, con actividad media de 5500 BLU/g (Bifido Lactase Units por gramo), densidad de 1.10-1.20, pH de 5.40-7.00. Esta enzima fue seleccionada por la ventaja de presentar alta actividad a bajos niveles de pH, comparativamente con otras lactasas tradicionales que pueden encontrarse en el mercado (McCall, 2019). A fin de evaluar el efecto de la concentración del biocatalizador NOLA®Fit 5500 sobre la cinética de reacción, se realizaron ensayos de hidrólisis de lactosa en una concentración de 50 g lactosa/L con diferentes dosis de enzima (rango: 5-29 μ L/mL de sustrato) bajo las condiciones recomendadas como óptimas para la enzima (40°C; pH 6) (CHR Hansen). A diferentes tiempos de reacción se extrajeron muestras del medio reaccionante, sobre las cuales se cuantificó el contenido de glucosa utilizando el glucómetro automático y mediante HPLC, a fin de determinar la máxima conversión de la lactosa en glucosa con la mínima concentración de enzima (μ L/mL de sustrato). En la técnica de HPLC se empleó un cromatógrafo (ThermoScientificDionexUltimate 3000) con una columna Phenomenex Monosaccharide RCM y un detector de Índice de Refracción. Las condiciones de corrida fueron: fase móvil agua desionizada, flujo de 0.6 mL/min, temperatura 60°C, presión de 22 bar.

- Cinética de hidrólisis enzimática. Una vez evaluada la actividad de la enzima, se definió la dosis mínima necesaria con máxima actividad a emplear en el estudio de la cinética de la reacción de hidrólisis. Se emplearon tubos de ensayos de 10 mL conteniendo el sustrato con una concentración de 50 g/L de lactosa a pH regulado a 6 (CHR Hansen, 2016), los cuales fueron colocados en un baño termostatzado (40°C). A tiempo cero se les añadió la enzima β-galactosidasa NOLA®Fit 5500 a la concentración determinada previamente (5 μL/mL de sustrato). El seguimiento de la reacción se llevó a cabo durante 20 minutos, extrayéndose muestras cada cinco minutos, las cuales se inactivaron por inmersión en un baño a 90°C durante tres minutos y luego se almacenaron en freezer (-18°C) hasta el momento de su análisis. Los ensayos se hicieron por duplicado.

Determinación del grado de hidrólisis por el método alternativo de glucómetro clínico

El grado de hidrólisis de la lactosa se cuantificó por el método clínico de análisis de glucosa utilizando un glucómetro que emplea tiras reactivas de sistema enzima-coenzima GDH/PQQ (Roche Diagnostic Accu-Chek meter). Las muestras obtenidas a cada tiempo de reacción fueron equilibradas a la temperatura ambiente y evaluadas utilizando un glucómetro de lectura directa para glucosa en sangre (rango 10 a 600 mg/dL, Accu-Chek Performa), realizándose diluciones adecuadas para el rango operativo del instrumento. La concentración de glucosa en las muestras hidrolizadas se estimó a través de una curva de calibración, obtenida por lectura con glucómetro de distintas soluciones patrón de concentración conocida de glucosa (Sigma Aldrich).

Determinación del grado de hidrólisis por el método HPLC

A fin de realizar la cuantificación del grado de hidrólisis de la lactosa mediante HPLC, se obtuvieron curvas de calibración de los patrones puros de lactosa, glucosa y galactosa de grado analítico (Sigma Aldrich). Se prepararon soluciones de los patrones puros a distintas concentraciones (volumen de inyección 20 μL, eluyente agua, flujo de 0.6 mL/min), las cuales se inyectaron en el equipo obteniéndose cromatogramas como los que se muestran a modo de ejemplo en las figuras 2 y 3 para lactosa y galactosa. En estos cromatogramas es posible diferenciar los azúcares por su tiempo de retención, lo cual evidencia la selectividad que el método

presenta para cuantificar o cualificar los analitos (Figuroa *et al.*, 2013). Asimismo, evaluando la resolución (r) del método mediante la Ec. (1) (Figuroa *et al.*, 2013), entre los picos de galactosa y lactosa en función de los tiempos de retención correspondientes (t_{gal} y t_{lac}) y del ancho de los picos en la base (w_{gal} y w_{lac}) de cada patrón, se obtuvo un valor de 1.97 lo que evidencia una muy buena separación de analitos mediante esta metodología.

$$r = 2(t_{gal} - t_{lac}) / (w_{gal} + w_{lac}) \quad (1)$$

Para el patrón glucosa, la resolución tanto con respecto a la galactosa como a la lactosa fue r=1, demostrando también la elevada resolución de la técnica. En la bibliografía se han referenciado valores de resolución por HPLC en este orden para carbohidratos (Kamal y Klein, 2011; Figuroa *et al.*, 2013). Para la evaluación, las muestras extraídas durante las experiencias de hidrólisis catalítica, previo a la determinación cromatográfica, se equilibraron con la temperatura ambiente y se filtraron con filtros de membrana de acetato celulosa (0.45 μm).

RESULTADOS

Comparación de metodologías analíticas de cuantificación de la hidrólisis de lactosa

Tanto en la experiencia de hidrólisis ácida como en la enzimática, las muestras extraídas se analizaron por ambas metodologías, glucómetro clínico y HPLC. Las figuras 4 y 5 muestran correlación entre las observaciones (R²>0,96) realizadas por ambas técnicas, lo cual permite validar el método alternativo no convencional en el rango de estudio. Otros autores (Nieto y Pirola, 2007) también han validado este método alternativo para cal-

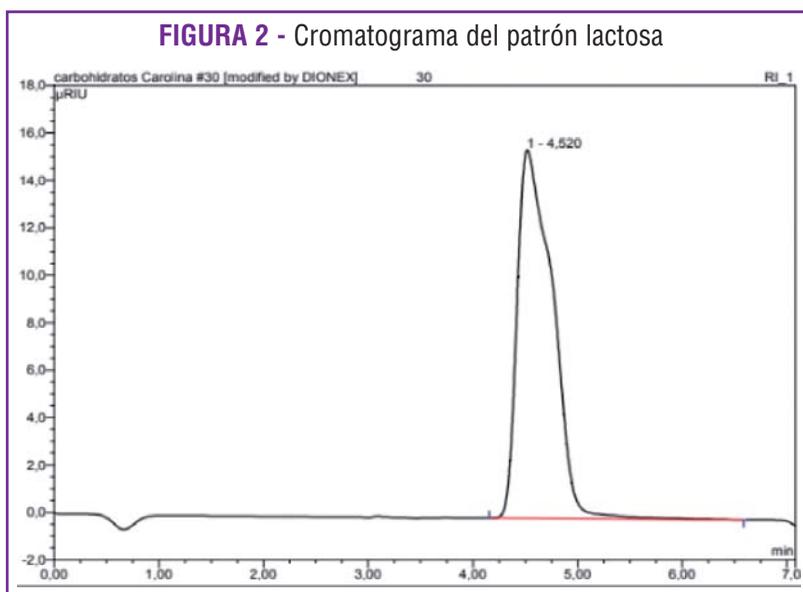


FIGURA 2 - Cromatograma del patrón lactosa

cular indirectamente los porcentajes de hidrólisis de la lactosa de la leche mediante el uso de un aparato medidor de glucosa en sangre, obteniendo resultados comparables con los que se obtienen por el método de crioscopia.

Determinación de dosis requerida de enzima

Como resultado de la evaluación del efecto de la dosis de la enzima ($\mu\text{L}/\text{mL}$) sobre el porcentaje de sustrato hidrolizado en el tiempo bajo las condiciones óptimas ($40\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$), se obtuvieron las curvas que se muestran en la Figura 6 (valores promedio de duplicados). Para ambas dosis de enzima, la hidrólisis alcanzó el equilibrio luego de 20 minutos, obteniéndose conversiones estadísticamente equivalentes ($p > 0.05$) del orden del 75%. En función de ello, desde el punto de vista de la economía del proceso se seleccionó la menor concentración de enzima ensayada, $5\text{ }\mu\text{L}/\text{mL}$ de sustrato modelo para llevar a cabo el proceso de hidrólisis de la lactosa bajo las condiciones operativas fijadas.

Cinética de los procesos de hidrólisis ácida y enzimática

Como resultado de los ensayos de hidrólisis ácida (a) y enzimática (e) desarrollados bajo las condiciones antes descritas, se obtuvieron las curvas experimentales que se muestran en la Figura 7, en términos de conversión porcentual del sustrato (lactosa) en función del tiempo de reacción (líneas continuas con símbolos). Comparativamente, se incluyen resultados informados por otros autores para condiciones experimentales y sustratos similares. En primer lugar puede observarse que la curva experimental obtenida para la hidrólisis ácida es análoga a la reportada por Gajendragadkar *et al.* (2016) para el proceso ultrasónico. Para la hidrólisis enzimática en las condiciones del presente trabajo se obtuvieron conversiones del orden del 80%, al igual que han reportado otros autores, como Jurado *et al.* (2002) y Beltrán y Acosta (2012), pero a menor tiempo de proceso. Ello puede atribuirse a diferentes aspectos que influyen sobre la velocidad de reacción. Estos autores emplearon menores dosis de la enzima β -galactosidasa ($0.5\text{ }\mu\text{L}/\text{mL}$ y $0.1\text{ }\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente), lo cual podría redundar en procesos de hidrólisis más lentos, y por otra parte, utilizaron enzimas β -galactosidasa de otros orígenes (*K. lactis* y *K. fragilis*, respectivamente).

FIGURA 3 - Cromatograma del patrón galactosa

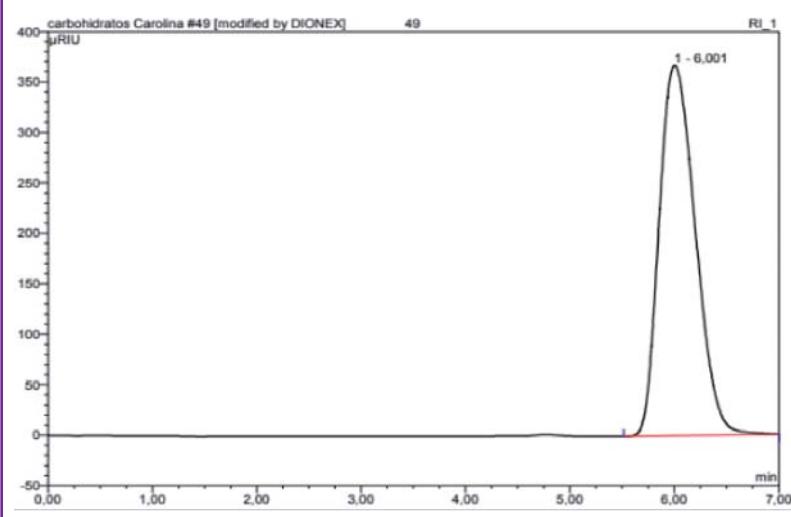


FIGURA 4 - Correlación lineal entre la conversión porcentual de la lactosa determinada por glucómetro y la obtenida por HPLC durante la hidrólisis ácida

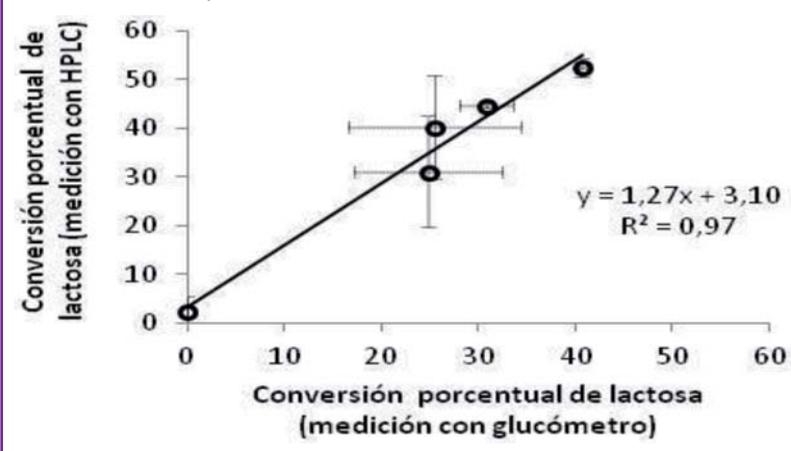


FIGURA 5 - Correlación lineal entre la conversión porcentual de la lactosa determinada por glucómetro y la obtenida por HPLC durante la hidrólisis enzimática

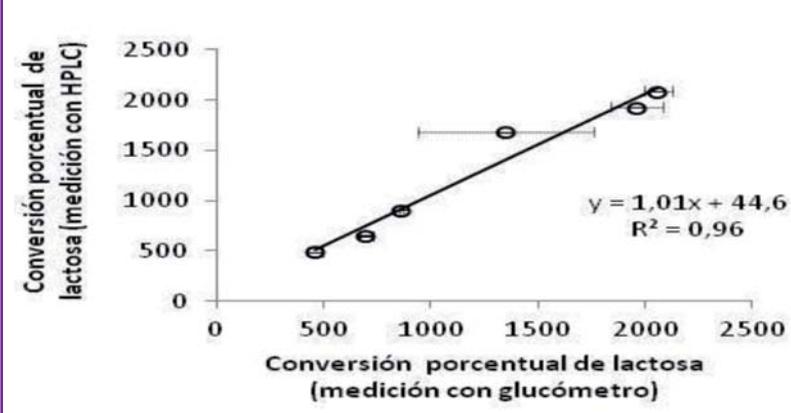


FIGURA 6 - Efecto de la dosis de enzima β -galactosidasa utilizada en la hidrólisis sobre el porcentaje de sustrato hidrolizado por unidad de tiempo

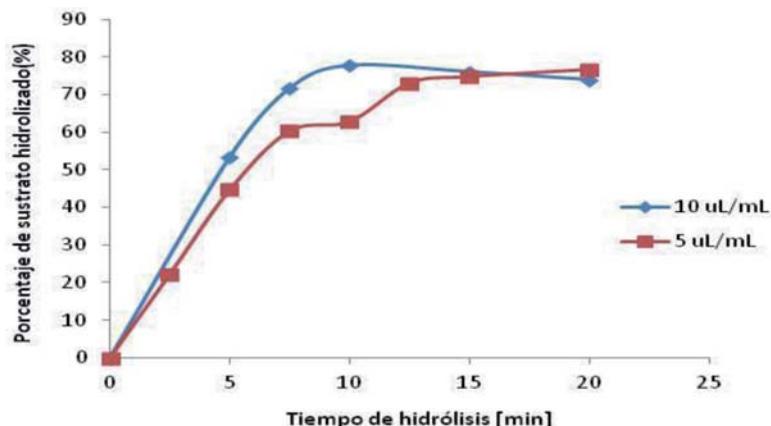
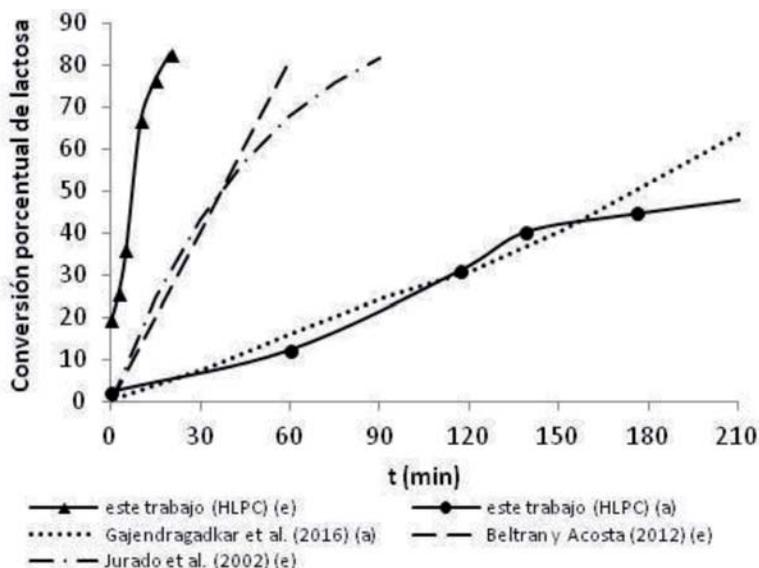


FIGURA 7 - Conversión porcentual de lactosa en función del tiempo de hidrólisis ácida y enzimática



Finalmente, analizando las curvas obtenidas en este trabajo experimental resulta evidente la importante ventaja de la hidrólisis enzimática comparada con la hidrólisis química, en cuanto a la marcada reducción de tiempo de proceso (Figura 7).

CONCLUSIONES

Se estudiaron experimentalmente las reacciones de hidrólisis ácida y enzimática de la lactosa (azúcar mayoritario del lactosuero) bajo diferentes condiciones, como etapa inicial para la obtención de bioetanol-2G a partir de ese residuo de la industria de alimentos. Ambos procesos fueron evaluados mediante dos metodologías de cuantificación del grado de hidrólisis del sustrato: un método alternativo no convencional basado en el uso de un glucómetro clínico y la técnica analítica basada en cromatografía por HPLC, encontrándose buena correlación

($R^2 > 0.96$) entre las determinaciones de ambos métodos. La hidrólisis ácida de la lactosa (50 g/L) catalizada por HCl 3 N a 55°C asistida por ultrasonido permitió obtener conversiones de lactosa del orden de 45% en tres horas. Mientras que mediante la hidrólisis biológica catalizada por la enzima β -galactosidasa se alcanzó una conversión de lactosa del 83% en 20 minutos, empleando una dosis de enzima de 5 μ L/mL de sustrato a una temperatura de 40°C en solución tamponada a pH 6.

REFERENCIAS

Beltrán F., L.J.; Acosta C., A. (2013). Empleo de una β -galactosidasa comercial de *Kluyveromyces lactis* en la hidrólisis de lactosuero, *Hechos Microbiológicos* 3(2), 25–35.

CHR Hansen (2016). NOLA® Fit 5500. Información del producto, Versión 1 PI GLOB ES, www.chr-hansen.com.

Dagnino, E.P.; Chamorro, R.E.; Romano, D.S.; Felissia, F.; Área, M.C. (2013). Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production, *Industrial Crops and Products* 42, 363–368.

Dragone, G.; Mussatto, S.; Oliveira, J.; Teixeira, J. (2009). Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation, *Food Chemistry* 112(4), 929–935.

Figueroa, L.B.; Hernaez, L.; Bello, M. (2013). Validación de un método de determinación de fructosa, glucosa y sacarosa por Cromatografía Líquida de Alta Performance, *SNS* 1(2), 27–35.

Fisher, J.; Zanella Guidini, C.; Soares Santana, L.N.; de Resende, M.M.; Luiz Cardoso, V.; Ribeiro, E.J. (2013). Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 85–86, 178–186.

Gajendragadkar, C.N.; Gogate, P.R. (2017). Ultrasound assisted acid catalyzed lactose hydrolysis: understanding into effect of operating parameters and scale up studies, *Ultrasonics Sonochemistry* 37, 9–15.

Guimarães, P.M.R.; Teixeira, J.A.; Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey, *Biotechnology Advances* 28(3), 375–384.

Heinzerling, P.; Schrader, F.; Schanze, S. (2012). Measurement of enzyme kinetics by use of a blood glucometer: Hydrolysis of sucrose and lactose, *Journal of Chemical Education* 89, 1582–1586.

Kamal, M.; Klein, P. (2011). Determination of sugars in honey by Liquid Chromatography, *Saudi Journal of Biological Sciences* 18, 17–21.

López Ríos, C.A.; Zuluaga Meneses, A.; Herrena Penagos, S.N.; Medina de Pérez, V.I. (2006). Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de suero de leche, *Dyna* 73(150), 39–57.

McCall, K.M. (2019). NOLA® FIT: para asegurar el auténtico sabor de los productos deslactosados y/o con bajo contenido de azúcar, *La Alimentación Latinoamericana*, XXIII(106), 6–10.

Nieto, I.; Pirola, M.B. (2007). Método alternativo para medida de hidrólisis de lactosa, 6° Jornada de Desarrollo e Innovación Tecnológica, INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial), 1–2, Rafaela, Argentina.

Santos, A.; Ladero, M.; García-Ochoa, F. (1998). Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, *Enzyme and Microbial Technology* 22, 558–567.

erner, N.; Kocapar, D.; Demirhan, E.; Ozbek, B. (2008). Milk lactose hydrolysis in a batch reactor: Optimisation of process parameters, kinetics of hydrolysis and enzyme inactivation, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 22(2), 185–193.

Vujicic, I.F.; Lin, A.Y.; Nickerson, T.A. (1976). Changes during acid hydrolysis of lactose, *J. Dairy Sci.* 60(1), 29–33.