

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDO
LACTOBÍONICO OBTENIDO POR VÍA
FERMENTATIVA A PARTIR DE
PERMEADOS DE SUERO LÁCTEO”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

JOHANNA RUESTRA ÁLVAREZ

JULIO, 2019



AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido, en menor o mayor medida, a que haya logrado llegar hasta aquí. Quisiera empezar haciendo mención tanto a Sara como a Manuel por su ayuda y motivación para lograr sacar este TFM adelante. Sin duda, las personas que más merecen mis agradecimientos son mis padres, por su continuo apoyo y confianza en mí para lograr lo que me proponga. No puede faltar la dedicatoria a Rubén y Paula, pues sin ellos quizá ahora no estaría aquí. Gracias por ser mis compañeros de carrera, de máster y, espero, de por vida. Me siento realmente afortunada por haberos conocido, porque una carrera resulta mucho más fácil y entretenida cuando se comparte con gente como vosotros. GRACIAS. También quiero dar las gracias a Gonzalo, por apoyarme y aguantarme en todo momento, incluso cuando ni yo lo hacía. Finalmente, quiero dar las gracias a mi familia y amigos, y a todos aquellos a los que no hago mención pero que me han aportado herramientas, a nivel académico o personal, para irme labrando un futuro.

Este trabajo es un poco de todos.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT.....	II
LISTADO DE FIGURAS	III
LISTADO DE TABLAS	IV
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Introducción	2
1.2. Objetivos.....	4
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS	6
2.1. Suero lácteo: problemática y aplicaciones habituales.....	6
2.2. Producción de ácido lactobiónico	7
2.2.1. Síntesis química.....	8
2.2.2. Síntesis enzimática	8
2.2.3. Síntesis biológica.....	10
2.3. Microorganismos productores de ácido lactobiónico	11
2.3.1. Las endotoxinas	12
2.4. Métodos de purificación de ácidos orgánicos.....	13
2.4.1. Cristalización	14
2.4.2. Precipitación	14
2.4.3. Destilación	14
2.4.4. Rotavaporación.....	15
2.4.5. Liofilización.....	16
2.5. Técnicas de análisis y control	17
2.5.1. Biorreactores.....	17
2.5.2. HPLC.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Microorganismo y condiciones de cultivo	21
3.1.1. Crecimiento de <i>Pseudomonas taetrolens</i> en suero lácteo	21
3.2. Fermentación en biorreactores	22
3.3. Detección y eliminación de la endotoxina bacteriana.....	25
3.4. Purificación de ácido lactobiónico.....	25
3.4.1. Evaporación y precipitación con etanol	25

3.4.2. Rotaevaporación.....	25
3.4.3. Precipitación con lactobionato cálcico.....	26
3.4.4. Liofilización.....	27
3.5. Métodos analíticos.....	27
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	29
4.1. Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas taetrolens</i> en suero lácteo.....	29
4.2. Preparación del sustrato de la fermentación empleando microfiltración tangencial.....	30
4.3. Seguimiento de la fermentación: producción de ácido lactobiónico por vía biológica.....	31
4.4. Detección de endotoxinas.....	31
4.5. Concentración del fermentado en ácido lactobiónico.....	32
4.6. Separación y purificación de ácido lactobiónico.....	33
4.6.1. Precipitación con etanol.....	33
4.6.2. Rotavaporación.....	35
4.6.3. Precipitación con lactobionato de calcio.....	35
4.6.4. Liofilización.....	36
5. ESQUEMA GLOBAL DEL PROCESO Y CÁLCULO DE RENDIMIENTOS ...	38
6. CONSIDERACIONES ECONÓMICAS.....	42
6.1. Costes de producción.....	42
6.1.1. Costes de servicios generales.....	42
6.1.2. Materiales.....	42
6.2. Costes de equipamiento.....	42
6.2.1. Equipos principales y auxiliares.....	42
6.2.2. Costes complementarios.....	43
6.3. Gastos generales.....	43
6.4. Coste del producto.....	43
6.5. Comparación y valoración.....	44
7. CONCLUSIONES.....	48
ABREVIATURAS.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50

RESUMEN

El continuo desarrollo de la industria alimentaria tiene como consecuencia la generación de una cantidad cada vez mayor de subproductos. Uno de los principales subproductos, siendo además uno de los más contaminantes, es el suero lácteo. Las opciones actuales para reducir su producción o disminuir su potencial de contaminación resultan limitadas y económicamente problemáticas. Es por ello que, en los últimos años, se han investigado posibles aprovechamientos de este residuo con el fin de resolver un importante problema medioambiental así como obtener productos de valor industrial.

Un compuesto de gran interés comercial es el ácido lactobiónico, cuya síntesis química resulta costosa además de dañina para el medio ambiente. Este ácido puede obtenerse empleando el suero lácteo como sustrato mediante la fermentación de la lactosa en él contenida por parte de la bacteria *Pseudomonas taetrolens*, la cual muestra una alta tasa de conversión.

Así pues, en este trabajo se ha perseguido producir ácido lactobiónico por vía biológica utilizando permeado de suero lácteo como sustrato y la bacteria *Pseudomonas taetrolens*. Para ello, se ha realizado un estudio de la adaptación del microorganismo a dicho sustrato y de la fermentación desarrollada en biorreactores. Además, se ha logrado separar la endotoxina microbiana del medio de cultivo y se han examinado diversos métodos para la extracción y purificación del ácido lactobiónico producido.

ABSTRACT

The continuous development of the food industry has as consequence the generation of an increasing quantity of by-products. One of the main by-products, being also one of the most polluting, is the sweet whey. Current options to reduce its production or decrease its contamination potential are limited and economically problematic. That is why, in recent years, potential applications of this waste have been investigated in order to solve an important environmental problem as well as to obtain products with industrial value.

A compound of great commercial interest is lactobionic acid, whose chemical synthesis is expensive and harmful to the environment. This acid can be obtained by using the sweet whey as substrate by fermenting the lactose contained therein by the bacterium *Pseudomonas taetrolens*, which shows a high conversion rate.

Therefore, in this work it has been pursued to produce lactobionic acid by biological way using permeate of sweet whey and the bacterium *Pseudomonas taetrolens*. For this, a study of the adaptation of the microorganism to the substrate and of the fermentation developed in bioreactors has been carried out. In addition, the microbial endotoxin has been separated from the fermentation medium and various methods for the extraction and purification of the produced lactobionic acid produced have been examined.

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.** Producción anual europea de suero lácteo. Fuente: EDA, 2017/18. (Pág. 6)
- Figura 2.** Oxidación de la lactosa a ácido lactobiónico. Fuente: Alonso *et al.*, 2011. (Pág. 8)
- Figura 3.** Esquema comparativo de la producción biológica (A) y enzimática (B) de LBA. Fuente: Alonso *et al.*, 2013. (Pág. 11)
- Figura 4.** Ejemplos de microorganismos empleados en la síntesis de ácido lactobiónico. (Pág. 12)
- Figura 5.** Estructura de los lipopolisacáridos. (Pág. 13)
- Figura 6.** Componentes de un rotavapor. (Pág. 16)
- Figura 7.** Componentes de un liofilizador. (Pág. 17)
- Figura 8.** Proceso de separación por cromatografía. (Pág. 18)
- Figura 9.** Tipos de cromatografía HPLC. (Pág. 19)
- Figura 10.** Esquema del cultivo de *P. taetrolens* para el estudio de la curva de crecimiento. (Pág. 22)
- Figura 11.** Equipo de microfiltración tangencial empleado. (Pág. 23)
- Figura 12.** Esquema del cultivo de *P. taetrolens* para la fermentación en biorreactores. (Pág. 23)
- Figura 13.** Biorreactores modelo BioFlo 110 empleados en la fermentación. (Pág. 24)
- Figura 14.** Liofilizador Telstar-Cryodos. (Pág. 27)
- Figura 15.** Curva de crecimiento de *P. taetrolens* en suero lácteo en función de la DO. (Pág. 29)
- Figura 16.** Curva de crecimiento de *P. taetrolens* en suero lácteo en función de UFC/mL. (Pág. 29)
- Figura 17.** Evolución del pH, la DO, la concentración de lactosa y ácido lactobiónico a lo largo de 72 horas de fermentación en el biorreactor. (Pág. 31)
- Figura 18.** Concentración de lactosa en función del método de precipitación con etanol empleado. (Pág. 34)
- Figura 19.** Concentración de ácido lactobiónico en función del método de precipitación con etanol empleado. (Pág. 34)
- Figura 20.** Muestras rotavaporadas. (Pág. 35)

Figura 21. Ácido lactobiónico obtenido por precipitación con lactobionato de calcio. (Pág. 36)

Figura 22. Aspecto del ácido lactobiónico obtenido por liofilización. (Pág. 36)

Figura 23. Esquema global del proceso. (Pág. 38)

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Composición del suero lácteo (Pág. 7)

Tabla 2. Ejemplos de producciones enzimáticas de LBA. Fuente: Alonso *et al.*, 2013. (Pág. 10)

Tabla 3. Variación de la concentración de lactosa del sustrato de la fermentación. (Pág. 30)

Tabla 4. Concentraciones finales tras 72 horas de fermentación. (Pág. 31)

Tabla 5. Variación de la lactosa y el lactobiónico presentes en el suero fermentado durante su procesamiento. (Pág. 33)

Tabla 6. Cálculo de rendimientos. (Pág. 39)

Tabla 7. Precios de servicios generales (Minetad, 2017; Díaz, 2012). (Pág. 42)

Tabla 8. Costes de materiales. (Pág. 42)

Tabla 9. Costes de equipos principales y auxiliares. Fuente: Gutiérrez, 2018. (Pág. 42)

Tabla 10. Costes complementarios. Fuente: Gutiérrez, 2018. (Pág. 43)

Tabla 11. Gastos generales. Fuente: Alfonso, 2017. (Pág. 43)

Tabla 12. Cálculo del coste de producción del ácido lactobiónico. (Pág. 43)

Tabla 13. Precio de venta del ácido lactobiónico de distintas casas comerciales. (Pág. 44)

Tabla 14. Precio de venta del lactobionato de calcio de distintas casas comerciales. (Pág. 45)

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

Los ácidos orgánicos representan un sector significativo del mercado mundial de los productos de fermentación, situándose la producción biológica como una importante alternativa económica a la síntesis química para muchos de ellos. Resulta necesario desarrollar nuevas estrategias que permitan alcanzar un alto nivel de producción para hacer frente a la creciente demanda que experimenta el mercado de ácidos orgánicos. Éstos presentan gran interés por su papel en la ecología natural y su potencial aplicación industrial como aditivos alimentarios, fármacos y excipientes cosméticos (Habe *et al.*, 2015). Además, son moléculas completamente degradables que pueden ser usadas como intermediarios químicos o como constituyentes para la producción de polímeros biodegradables.

Existe una gran variedad de ácidos orgánicos que se pueden obtener por vía fermentativa, como son el ácido láctico, el α -cetoglutárico, el cítrico, el fumárico, el glucónico y el málico, entre otros. En el caso del ácido α -cetoglutárico, éste se puede obtener a través de la fermentación de diferentes microorganismos (Finogenova *et al.*, 1968), como *Anthrobacter paraffineus* o *Bacillus natto*, consiguiendo alcanzar de $17\pm 2,0$ g/L a $185\pm 3,1$ g/L (Holz *et al.*, 2011). La fermentación microbiana es especialmente interesante para subsanar los problemas asociados a la producción química y economizar la producción de ácido glucónico, el cual se puede obtener a partir de la fermentación de un grupo variado de microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos. Algunas de las bacterias empleadas en la producción de este ácido son *Pseudomonas fluorescens*, *Acetobacter methanolicus* y *Gluconobacter oxydans* (Ramachandran *et al.*, 2006).

Actualmente, un ácido orgánico emergente que está adquiriendo gran importancia es el ácido lactobiónico, el cual es un derivado de la lactosa. Este compuesto presenta numerosas utilidades como prebiótico, antioxidante y potenciador del sabor, entre otras. Sin embargo, su síntesis por vía química o enzimática resulta costosa y dañina, lo cual limita su aplicación. Por esta razón, resulta necesario destinar esfuerzos a explorar la vía de producción biológica, en la cual se emplean microorganismos como biocatalizadores, siendo muchos los que se han descrito como productores de ácido lactobiónico. El más eficiente de los microorganismos estudiados es *Pseudomonas taetrolens*, ya que

presenta un 100% de selectividad para la oxidación de la lactosa a ácido lactobiónico. Sin embargo, se trata de una bacteria Gram negativa, por lo que contiene lipopolisacáridos en su membrana externa que resultan perjudiciales para los humanos. Otras estrategias indagadas de bioproducción de ácido lactobiónico se fundamentan en el empleo de sustratos sintéticos o células en condiciones de reposo, cepas patogénicas, mutantes o poco selectivas que generan subproductos en el proceso de oxidación de la lactosa (Kiryu *et al.*, 2012; Malvessi *et al.*, 2013; Murakami *et al.*, 2006).

Otro tema transcendental en la sociedad actual es la creciente producción de residuos a causa del continuo desarrollo tecnológico. Un subproducto fabricado en grandes cantidades y altamente contaminante es el suero lácteo dulce, representando un importante problema medioambiental. Debido a que su tratamiento resulta dificultoso a la par que costoso, se han ido investigando posibles aprovechamientos del mismo, ya que retiene gran parte de los nutrientes de la leche. Este subproducto presenta una alta concentración de lactosa, lo cual lo capacita como sustrato para fermentaciones de la misma.

Así pues, este trabajo tiene dos finalidades principales. Por un lado, se busca explorar una nueva vía de obtención de ácido lactobiónico que resulte rentable y asumible económicamente. Por otra parte, también se persigue revalorizar un residuo, el suero lácteo, dándole utilidad como medio de fermentación.

1.2. Objetivos

En este trabajo se llevará a cabo la producción de ácido lactobiónico utilizando la bacteria *Pseudomonas taetrolens* para oxidar la lactosa contenida en permeados de suero lácteo. Una vez sintetizado este producto, se procederá a su separación y purificación, y se evaluarán los rendimientos de los distintos métodos empleados. Finalmente, se hará una valoración económica para poner de manifiesto la posibilidad de implantación de la vía de síntesis descrita a nivel industrial.

Los objetivos específicos del presente proyecto son:

- ❖ Obtener ácido lactobiónico por vía fermentativa a través de la bioconversión de la lactosa presente en permeado de suero lácteo por *Pseudomonas taetrolens*.
- ❖ Analizar la presencia de endotoxinas en cultivos de *Pseudomonas taetrolens* y buscar métodos para su separación.
- ❖ Valorar distintas técnicas de purificación del ácido lactobiónico obtenido por vía fermentativa.
- ❖ Analizar el coste de producción de ácido lactobiónico por vía fermentativa, compararlo con el coste de producción de ácido lactobiónico comercial, obtenido por otras vías, y evaluar la viabilidad del proceso por vía biológica y los posibles beneficios económicos.

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1. Suero lácteo: problemática y aplicaciones habituales

El suero lácteo dulce constituye uno de los principales subproductos de la industria láctea (Prazeres *et al.*, 2012), obteniéndose de la producción de queso (85%) y caseinatos (15%). Europa es el mayor productor de queso en el mundo, por lo que también es el mayor productor de suero (Figura 1).

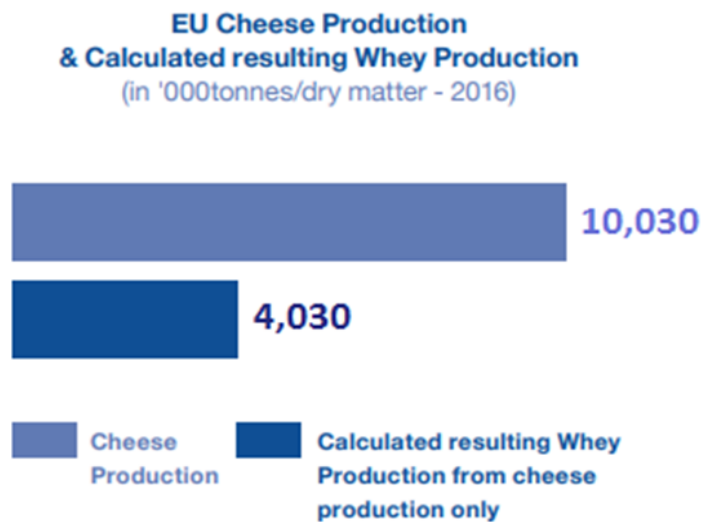


Figura 1. Producción anual europea de suero lácteo. Fuente: EDA, 2017/18.

Es considerado un efluente altamente contaminante por sus elevadas demandas química (DQO >60.000 ppm) y biológica (DBO >35.000 ppm) de oxígeno, debido principalmente a su contenido en lactosa (Patel and Murthy, 2011), representando un importante problema medioambiental. Su carga contaminante es 100-175 veces superior a la correspondiente para el mismo volumen de agua residual doméstica (Smithers, 2008). Además, su tratamiento resulta problemático al producirse grandes volúmenes (9 kg de suero por cada kg de queso elaborado) y, además, conlleva altos costes (Prazeres *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2013), por lo que se han destinado esfuerzos a reducir su acumulación y generación, lo que resulta limitado y costoso. No obstante, el suero presenta en su composición diferentes nutrientes (Tabla 1), ya que retiene alrededor del 55% de los compuestos de la leche (González, 1996) y el 20% de las proteínas (Walsh, 2014). Su composición depende del tipo de queso procesado así como del proceso tecnológico empleado.

Tabla 1. Composición del suero lácteo.

Composición del suero	
Componentes principales	Cantidad
Agua	93% del volumen total
Lactosa	70-72% del total de sólidos
Proteínas	8-10% del total de sólidos
Minerales	12-15% del total de sólidos

Estos nutrientes permiten su aprovechamiento por lo que, a lo largo del tiempo, se han ido empleando distintos tratamientos, tanto fisicoquímicos como biológicos, para reducir la carga contaminante del suero y obtener compuestos de interés (Prazeres *et al.*, 2012; Atamer *et al.*, 2013), ya sea a partir del suero dulce o de su permeado (desproteínizado por ultrafiltración).

Así pues, este subproducto ha sido utilizado como sustrato para la producción de biomasa, compuestos orgánicos (ej. ácido láctico, acético, diacetilo, etanol) (Veeravalli and Mathews, 2018; Nadal *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016), bacteriocinas (ej. nisina, pediocina, plantaricina) (Liu *et al.*, 2005; Enan *et al.*, 2006; Jozala *et al.*, 2011) y exopolisacáridos (Macedo *et al.*, 2002 a,b), entre otros productos de valor añadido. Uno de sus posibles usos es como sustrato para el desarrollo de fermentaciones, como la realizada por *Pseudomonas taetrolens* a partir de la lactosa contenida en dicho suero. Así pues, este microorganismo es capaz de convertir la lactosa en ácido lactobiónico, un producto de elevado valor comercial con múltiples aplicaciones.

2.2. Producción de ácido lactobiónico

El ácido lactobiónico es un polihidroxiácido, compuesto por una molécula de galactosa unida mediante un enlace anomérico a una molécula de ácido glucónico, que proviene de la oxidación del grupo aldehído de la glucosa que forma parte de la lactosa, a carboxilo (Figura 2). Se trata de un ácido débil con una masa molecular de 358,3 Da, sabor dulce y un valor energético de 2 kcal/g (Fox and McSweeney, 2009; Schaafsma, 2008). Sus aplicaciones son limitadas debido al elevado coste de producción por vía química, la cual implica el empleo de catalizadores dañinos en un proceso de alto consumo energético que genera subproductos indeseados (Chia *et al.*, 2008; Kuusisto *et al.*, 2007; Murzina *et al.*, 2008). Otra opción de síntesis disponible es la enzimática, por oxidación de lactosa, pero se trata de un proceso costoso que requiere mediadores redox

y regeneración de cofactores (Splechtna *et al.*, 2001; Ludwig *et al.*, 2004; Maischberger *et al.*, 2008; Van Hecke *et al.*, 2009). Por esta razón, la síntesis biológica se posiciona como una alternativa atractiva, siendo necesaria una producción mínima de 50 g/L para resultar rentable (Pollard and Woodley, 2007). Algunas de las aplicaciones del ácido lactobiónico son como reductor de acidez en alimentos, transportador de calcio, prebiótico (Belkacemi *et al.*, 2011), antioxidante (Hallamaa *et al.*, 2003), potenciador del sabor, componente de detergentes biodegradables y como anticorrosivo (Alves *et al.*, 2011). También presenta utilidades en medicina, así como en las industrias farmacéutica y cosmética, pudiendo emplearse en la conservación de órganos transplantados (Beden *et al.*, 1995), tratamiento de enfermedades dérmicas (Warowna *et al.*, 2018), y como exfoliante y humectante, así como potenciador de la producción de colágeno, para la preparación de cremas cosméticas (Warowna *et al.*, 2018).

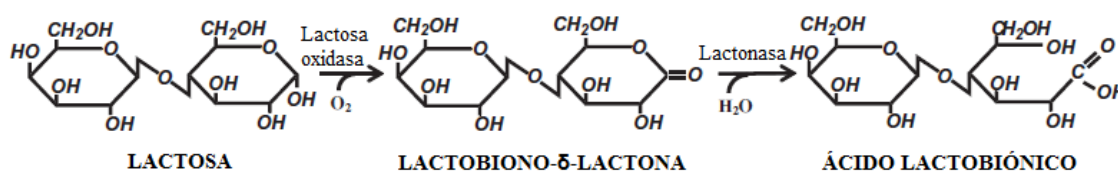


Figura 2. Oxidación de la lactosa a ácido lactobiónico. Fuente: Alonso *et al.*, 2011

2.2.1. Síntesis química

Se pueden obtener grandes cantidades de ácido lactobiónico (LBA) con un rendimiento del 98% mediante la oxidación electrolítica de la lactosa empleando como catalizadores electrodos de grafito, yodo o bromo y añadiendo una disolución alcalina para mantener el pH por encima de 5.2. (Magariello, 1956). Desde entonces, la investigación acerca de la síntesis de LBA por oxidación electroquímica ha resultado escasa y no se conocen aplicaciones industriales de esta vía de producción de LBA (Gutierrez *et al.*, 2012). También se puede producir LBA por oxidación catalítica heterogénea, pero se obtienen otros productos indeseados (lactulosa y ácido 2-ceto-lactobiónico) en función de la actividad y selectividad del catalizador y de las condiciones de operación. Para que se produzca LBA de un modo selectivo, la reacción debe transcurrir a presión atmosférica, en medio alcalino (pH entre 8.0 y 9.0) y a una temperatura de 50-70°C, empleando aire u oxígeno como agente oxidante. Los valores elevados de pH influyen notablemente en la selectividad, ya que favorecen la isomerización de la lactosa a lactulosa. En cambio, valores bajos de pH causan la desactivación del catalizador debido a la fuerte adsorción de los productos de la reacción que ocupan los centros activos de la superficie

catalizadora. La principal desventaja de estos catalizadores es su envenenamiento y desactivación por sobreoxidación durante la reacción, siendo muy importante controlar la concentración de oxígeno para evitar la desactivación. Se ha probado a burbujear aire y nitrógeno para separar el oxígeno disuelto y mantener la cinética de la reacción global. Otro problema asociado a los catalizadores es que aquellos que contienen bismuto no son apropiados para la producción de productos químicos para industrias alimentarias y farmacéuticas debido a que el bismuto es propenso a la lixiviación. Los catalizadores de oro resultan altamente estables frente a la sobreoxidación además de presentar una actividad y selectividad excepcional en la oxidación de los carbohidratos, pero, por contra, tienen un coste muy elevado para ser empleados a nivel industrial. Añadidos al alto coste, se encuentran los inconvenientes de su toxicidad, desactivación y recuperación (Gutiérrez *et al.*, 2012; Nath *et al.*, 2016).

2.2.2. Síntesis enzimática

Son numerosos los estudios que se han desarrollado en el campo de la producción enzimática de LBA (Tabla 2). En estos procesos, se oxida lactosa por medio de cascadas biocatalíticas específicas empleando enzimas como oxidoreductasas (Nordkvist *et al.*, 2007; Satory *et al.*, 1997; Van Hecke *et al.*, 2009). Sin embargo, resultan muy costosos, ya que generalmente dependen del mediador redox o de la regeneración del cofactor y suelen precisar operaciones complejas (Ludwig *et al.*, 2004; Maischberger *et al.*, 2008; Splechtna *et al.*, 2001; Van Hecke *et al.*, 2009a, 2009b). Tanto la producción de enzimas como las etapas de purificación previas al proceso de biocatálisis constituyen un inconveniente adicional, ya que son procesos costosos, lentos y laboriosos. No obstante, la vía enzimática presenta varias ventajas, como procesos posteriores simplificados e instalaciones más pequeñas que las requeridas en la vía fermentativa. A modo de comparación, la catálisis enzimática normalmente alcanza concentraciones de LBA, rendimientos y productividades mayores que los conseguidos por vía biológica. Sin embargo, este enfoque muestra ausencia de selectividad y estabilidad a largo plazo en medios complejos. Otra limitación es la pérdida de actividad enzimática en el transcurso del proceso de biocatálisis, lo que obstaculiza tanto la síntesis de LBA en tiempos de reacción posteriores como su implementación.

Tabla 2. Ejemplos de producciones enzimáticas de LBA. Fuente: Alonso *et al.*, 2013.

Enzimas	Sustrato	Concentración (g/L)	Productividad (g/Lh)	Rendimiento (%)	Referencia
Carbohidrato oxidasa (<i>M. nivale</i>) + catalasa	Permeado de suero	49	4	98	Hua <i>et al.</i> (2007)
Carbohidrato oxidasa (<i>M. nivale</i>) + catalasa	Lactosa	49	4,9	98	Nordkvist <i>et al.</i> (2007)
Celobiosa deshidrogenasa (<i>S. rolfsii</i>) + lacasa (<i>T. pubescens</i>)	Lactosa	72	7	100	Ludwig <i>et al.</i> (2004)
Celobiosa deshidrogenasa (<i>S. rolfsii</i>) + lacasa (<i>T. pubescens</i>)	Lactosa	37	3,1	97	Van Hecke <i>et al.</i> (2011)
Celobiosa deshidrogenasa (<i>S. rolfsii</i>) + lacasa (<i>T. pubescens</i>)	Lactosa, monosacáridos y galactooligosacáridos	40	16	96	Splechtna <i>et al.</i> (2001)
Glucosa-fructosa oxidorreductasa (<i>Z. mobilis</i>)	Lactosa	157	2,6	90	Satory <i>et al.</i> (1997)

2.2.3. Síntesis biológica

En este tipo de síntesis, se emplean microorganismos como biocatalizadores, siendo muchos los que han sido utilizados para producir LBA. En el transcurso de la reacción se forma un producto intermedio, conocido como lactobiono-delta-lactona, el cual es posteriormente hidrolizado a ácido lactobiónico (Figura 2). Así pues, la oxidación biológica de la lactosa contenida en el suero lácteo se presenta como una vía económicamente rentable, a pesar de la presencia de otros componentes en el suero como biomasa, proteínas, sales y otras impurezas que afectan al proceso de recuperación del ácido lactobiónico.

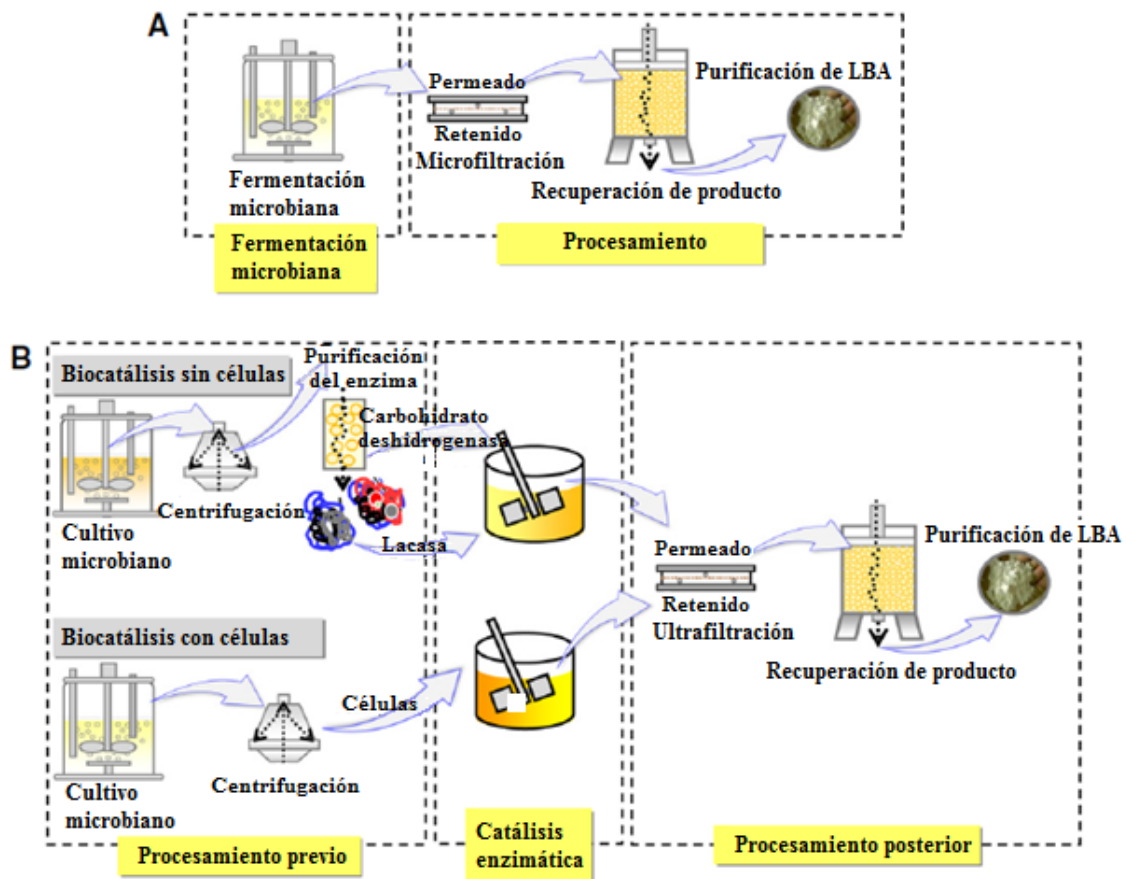


Figura 3. Esquema comparativo de la producción biológica (A) y enzimática (B) de LBA.
Fuente: Alonso *et al.*, 2013.

2.3. Microorganismos productores de ácido lactobiónico

La capacidad de sintetizar ácido lactobiónico por vía biológica fue descubierta en 1947 por Stodola y Lockwood en especies de *Pseudomonas*. Este género, especialmente la bacteria *Pseudomonas taetrolens*, resulta óptimo para llevar a cabo la producción de ácido lactobiónico por oxidación de la lactosa, ya que carece de los genes codificantes de la β -galactosidasa y de transportadores de lactosa. No obstante, se han descrito otros microorganismos productores de ácido lactobiónico, como los recogidos en la Figura 4.

Hongos filamentosos	<ul style="list-style-type: none"> • Rendimiento del 50 % • (Bucek <i>et al.</i>, 1956)
<i>Burkholderia cepacia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Presenta patogenicidad • (Murakami <i>et al.</i>, 2003)
Bacterias del ácido acético	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Acetobacter orientalis</i>, <i>Gluconobacter cerinus</i> • Oxidan otros monosacáridos y disacáridos además de la lactosa, lo que disminuye la producción de ácido lactobiónico. • (Kiryu <i>et al.</i>, 2012b; Oe <i>et al.</i>, 2008)
<i>Zymomonas mobilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere altas concentraciones de sustrato para alcanzar altas productividades • (Pedruzzi <i>et al.</i>, 2011)

Figura 4. Ejemplos de microorganismos empleados en la síntesis de ácido lactobiónico.

En muchos de estos estudios se alcanzó la producción mínima exigida para resultar económicamente rentable (50 g/L), pero no podrían implementarse industrialmente al haber alcanzado tales niveles de producción en ausencia de agitación, condición que no se da normalmente en fermentaciones industriales.

2.3.1. Las endotoxinas

Gran parte de los microorganismos que se emplean en estos tipos de fermentaciones son bacterias Gram negativas, las cuales presentan lipopolisacáridos (LPS) como componente principal de su membrana externa. Estos lipopolisacáridos son perjudiciales para los humanos, ya que son reconocidos por el sistema inmune como marcadores de invasión por bacterias patógenas (Rosenfeld and Shai, 2006). Estas moléculas se componen de un glicolípido conocido como lípido A, un heteropolisacárido denominado núcleo o *core* y una cadena sacarídica adicional llamada antígeno O formada por una secuencia repetitiva variable de glucanos (Figura 5). Al degradarse la pared celular bacteriana, el lípido A se libera y provoca efectos tóxicos en el cuerpo humano induciendo fiebre, disminución de la presión sanguínea, y activación de la reacción inflamatoria y de la coagulación, pudiendo llegar incluso a causar shock y finalmente defunción. Anteriormente, se creía que los LPS se liberaban exclusivamente al morir la bacteria pero, actualmente, se sabe que el microorganismo libera pequeñas cantidades de endotoxinas durante su metabolismo normal.

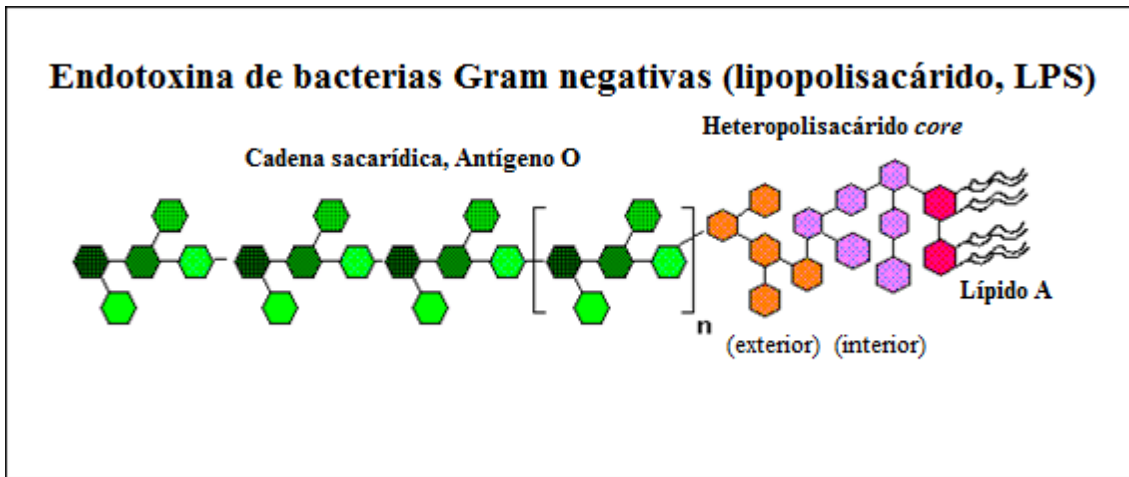


Figura 5. Estructura de los lipopolisacáridos.

Existen regulaciones en cuanto a los niveles de endotoxina permitidos en productos comerciales, tanto farmacéuticos como alimenticios. Es por ello que es común en las industrias la realización de pruebas de detección de endotoxinas, existiendo diversos métodos para analizar su presencia. Todos ellos se basan en las reacciones que se producen en el Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL) como consecuencia de un mecanismo de defensa del cangrejo herradura frente a las endotoxinas. Los tres métodos principales son los siguientes:

- Gelificación o Gel-Clot: se trata de un ensayo cualitativo, recomendado para un número limitado de muestras o para resultados que no necesitan ser cuantitativos. Este método es considerado como la prueba de referencia para la determinación de concentraciones de endotoxina. La técnica se basa en que la endotoxina desencadena una cascada de reacciones enzimáticas que conducen a la activación de una enzima coagulante, de modo que la gelificación resulta proporcional a la concentración de endotoxina en la muestra.
- Cinético turbidimétrico: es un método cuantitativo de LAL que puede medir con gran precisión la concentración de endotoxina de las muestras. Es el más sensible de los ensayos de LAL, pudiendo detectar concentraciones de hasta 0,001 UE/mL. Es el método más empleado cuando se tiene en cuenta el coste, la rapidez y la sensibilidad. En este ensayo, la proenzima en el LAL se activa al entrar en contacto con las endotoxinas, siendo la tasa de activación directamente proporcional a la concentración de endotoxina. El nivel de activación se

cuantifica de forma precisa mediante una reacción secundaria con un sustrato, midiéndose por espectrofotometría.

- Cromogénico: consiste en otro ensayo cinético cuantitativo en el que la muestra se mezcla con el reactivo LAL/sustrato y se deposita en un lector de placas con incubadora, registrando la aparición de un color amarillo con el tiempo. Este método es menos susceptible a sustancias y materiales inhibitorios que pueden interferir con los ensayos turbidimétricos y de Gel-Clot.

2.4. Métodos de purificación de ácidos orgánicos

En la industria no es suficiente con producir una sustancia en condiciones óptimas, sino que precisa de una separación, concentración y purificación posterior. Es por ello que se conducen muchos estudios para diseñar y controlar dichos procesos con el fin de conseguir una recuperación máxima del producto puro a un mínimo coste. Existen varias metodologías, como son las siguientes.

2.4.1. Cristalización

Se trata de un método simple y efectivo para separar y purificar sólidos. Se basa en que los compuestos orgánicos son más solubles en solventes calientes que fríos, por lo que el sólido se disuelve en un solvente caliente y, posteriormente, se va enfriando lentamente de modo que se recupera el sólido en forma de cristales. Idealmente, los cristales son puros químicamente, obtenidos con alto rendimiento, la forma deseada, uniformes y de un tamaño fijado. Para la formación de cristales orgánicos, se recomiendan solventes orgánicos como ácido acético, acetona, metanol o etanol. La cristalización se logra enfriando la solución, evaporando el solvente o una combinación de ambas. En algunas ocasiones, resulta más efectivo emplear una mezcla de dos o más solventes. Además, la adición de un segundo solvente se usa a veces para reducir la solubilidad del soluto (Seader, 2006).

2.4.2. Precipitación

Es un método clásico de recuperación de ácidos orgánicos de cultivos muy eficiente, lo que lo hace muy competitivo, especialmente en purificaciones preliminares. Algunos compuestos empleados en precipitación son el calcio y el amonio. Las principales ventajas de esta técnica son su elevada selectividad y que se alcanza alta pureza de

producto (Li *et al.*, 2016). Algunos de los ácidos orgánicos alimentarios que se pueden obtener con esta técnica son el ácido cítrico, en el que Heding and Gupta (1975) y Pazouki and Panda (1998) alcanzaron un rendimiento cercano al 100%, o el ácido láctico, en el que Min *et al.* (2011) consiguieron un rendimiento superior al 92%.

2.4.3. Destilación

Permite la separación de los componentes de una mezcla en función de su punto de ebullición, de modo que se evaporan a diferentes temperaturas y se condensan al pasar por un tubo refrigerado. De este modo, se puede separar un líquido de un sólido o un líquido disuelto que presente un punto de ebullición mayor (Atkins, 2006). Al igual que la cristalización, presenta varias modalidades siendo una de ellas la destilación al vacío, proceso en el que se basa el rotavapor. Esta técnica fue empleada por Kumar *et al.* (2006) para la recuperación del ácido láctico.

2.4.4. Rotavaporación

Se trata de un procedimiento para evaporar solventes orgánicos o acuosos. El aumento de la tasa de evaporación del solvente se consigue de tres formas: reduciendo la presión para disminuir el punto de ebullición del solvente, rotando la muestra para aumentar el área superficial efectiva y calentando la solución. El solvente se retira bajo vacío, se recoge con un condensador y se recolecta para ser reutilizado o eliminado fácilmente (Chem Ucalgary, 17/06/19).

Los componentes principales del rotavapor se muestran en la Figura 6.

- Unidad motora: rota el matraz de evaporación con la muestra.
- Conducto: por el que se extrae el vapor de la muestra, que actúa como eje para la rotación de la muestra y que está a prueba de vacío.
- Sistema de vacío: para reducir la presión dentro del sistema de evaporación.
- Baño termostático: normalmente de agua, para calentar la muestra. Evita que el solvente se congele durante el proceso de evaporación.
- Condensador: con una espiral por la que circula el refrigerante, como hielo seco y acetona.
- Matraz colector: al final del condensador, para recoger el solvente destilado una vez recondensado.
- Brazo mecánico: para sacar rápidamente el matraz de evaporación del baño.



Figura 6. Componentes de un rotavapor.

2.4.5. Liofilización

Consiste en un proceso en el cual el agua se retira de un producto, tras haber sido congelado y sometido a vacío, cambiando de estado sólido a gas directamente, sin pasar por fase líquida. Consta de tres procesos interdependientes: congelación; secado primario (sublimación), donde se retira el hielo; y secado secundario (desorción), donde se eliminan las moléculas de agua adheridas (FDA, 12/06/19; SP Scientific, 12/06/19).

Este proceso presenta numerosas ventajas, entre ellas:

- Un incremento de la estabilidad del producto.
- La eliminación de agua sin someter el producto a un calor excesivo.
- La fácil reconstitución del producto obtenido de forma rápida y sencilla.

Los principales componentes de un equipo de liofilización se exponen en la Figura 7.

- Sistema de refrigeración: enfría el condensador y, en ocasiones, la cámara de producto.
- Sistema de vacío: consiste en una bomba de vacío conectada a un condensador hermético y a la cámara de producto adjunta.
- Sistema de control: puede ser más o menos complejo, pero normalmente solo controla temperatura y presión.
- Colector o cámara de producto: suele consistir en un colector con matraces adjuntos o en una cámara más grande con estantes en los que colocar el producto.
- Condensador: recoge los gases que se producen en la sublimación del producto, los cuales condensan y pasan a forma sólida.

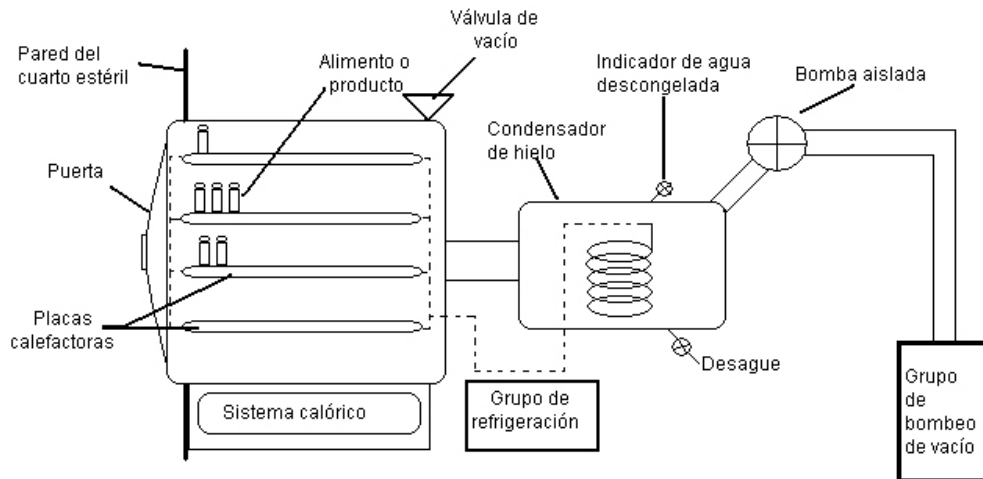


Figura 7. Componentes de un liofilizador.

2.5. Técnicas de análisis y control

2.5.1. Biorreactores

Los biorreactores son la principal unidad operacional en la transformación bioquímica industrial, la cual ocurre por la acción de células vivas o componentes celulares como enzimas (Pandey *et al.*, 2008). Estos reactores son tanques comúnmente cilíndricos, con volúmenes desde 1 L hasta varios metros cúbicos, que difieren en el diseño y el modo de operación. Están diseñados para proporcionar el ambiente propicio para la formación del producto de interés. En algunos casos, los biorreactores se emplean para producir biomasa (*single cell protein*, levaduras, células animales, microalgas), metabolitos (ácidos orgánicos, etanol, antibióticos, compuestos aromáticos, pigmentos) o moléculas celulares activas (enzimas). Un biorreactor consta de un complejo sistema de tuberías, accesorios, cables y sensores, además de sistemas de monitoreo y diagnóstico que permiten detectar fallos operacionales (Cinar *et al.*, 2003). Los distintos modos operacionales son: discontinuo, semicontinuo y continuo.

Los procesos discontinuos han aumentado significativamente en la actualidad y se usan ampliamente para producir biomoléculas con aplicaciones químicas, biotecnológicas y farmacéuticas. La producción de estos bioproductos de alto valor añadido contribuye a una parte significativa y creciente de los ingresos y ganancias de las industrias de bioprocesos (Cinar *et al.*, 2003). Los procesos discontinuos consisten en un sistema parcialmente cerrado en el que la mayoría de materiales requeridos son cargados en el biorreactor de forma aséptica y retirados al final del proceso, siendo los únicos

materiales añadidos/retirados durante el transcurso de la operación el aire/gas, antiespumante y soluciones para controlar el pH. La mayoría de los bioprocesos modernos incorporan ajustes en el medio para controlar las condiciones y suministrar nutrientes y compuestos que promueven la biosíntesis del producto de interés (Cinar *et al.*, 2003).

2.5.2. HPLC

Se trata de un tipo de cromatografía en columna en el que la muestra es arrastrada por la fase móvil a través de una columna cromatográfica, la cual contiene la fase estacionaria, a un flujo especificado. La separación de los distintos analitos se debe a las diferencias de interacción con las fases móvil y estacionaria, presentando distintos tiempos de retención (Figura 8). El grado de interacción depende de interacciones hidrofóbicas, polares e iónicas, pudiendo contribuir también la selectividad estérica y la forma de la molécula. En la Figura 9 se muestran los distintos tipos de HPLC.

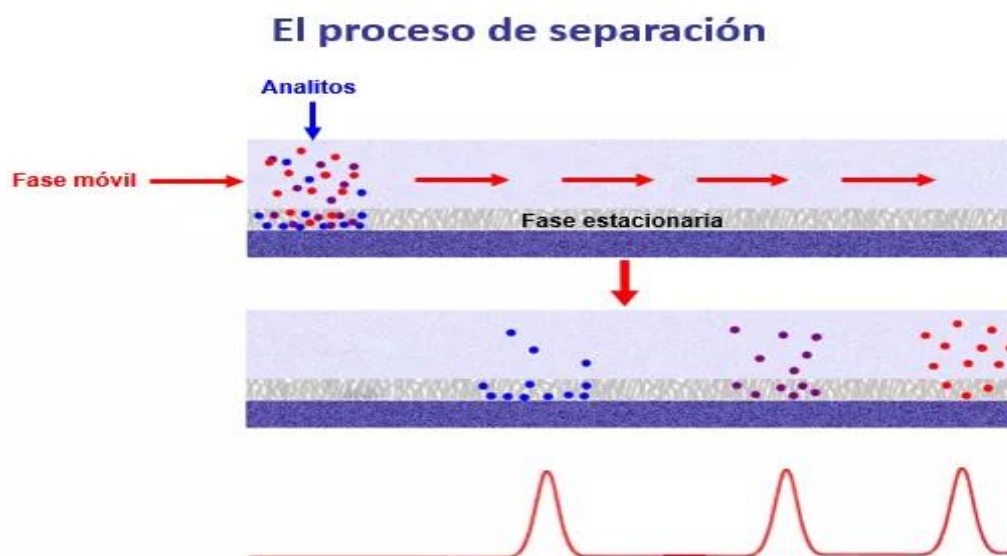


Figura 8. Proceso de separación por cromatografía.

Esta técnica permite obtener información tanto cualitativa como cuantitativa. De un modo cualitativo, podemos identificar un analito en base al tiempo de retención mientras que, de un modo cuantitativo, podemos conocer la concentración de analito en la muestra en función del área encerrada bajo el pico de elución, habiendo realizado previamente un calibrado para dicho analito por medio de patrones de concentración conocida.

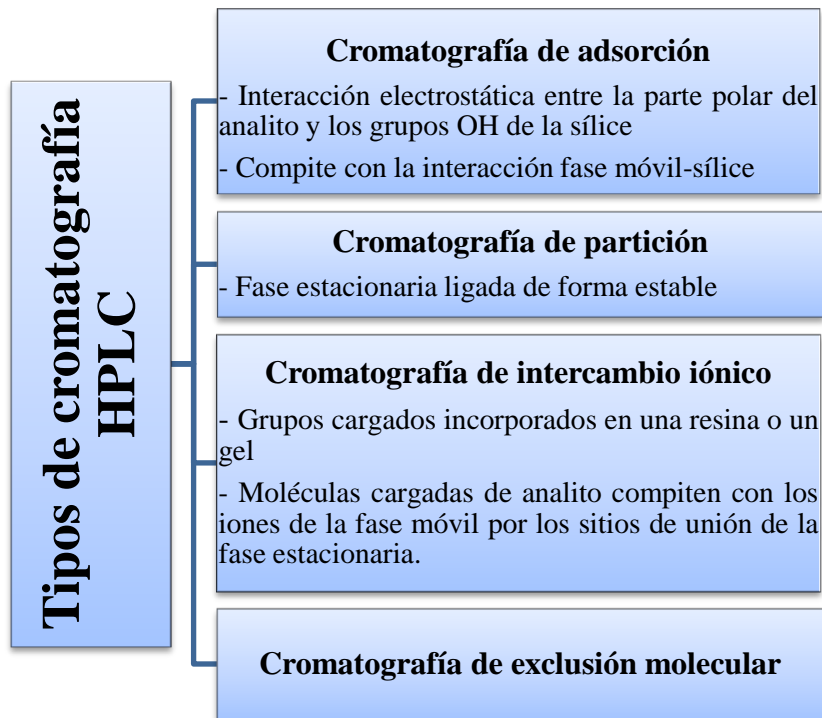


Figura 9. Tipos de cromatografía HPLC.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismo y condiciones de cultivo

Como microorganismo productor se utilizó la cepa *Pseudomonas taetrolens* LMG 2336 (Colección Coordinada Belga de Microorganismos, Gante, Bélgica). Se trata de una bacteria aerobia estricta, Gram negativa, que es capaz de oxidar la lactosa con un 100% de selectividad para el ácido lactobiónico y que presenta elevados rendimientos de conversión. Se cultivó en medio *nutrient broth* (NB), compuesto de: extracto de carne 1 g/L (PanReac AppliChem, EEUU), extracto de levadura 2 g/L (Sigma-Aldrich, EEUU), peptona 5 g/L (Sigma-Aldrich), cloruro de sodio 5 g/L (Fluka Analytical, Alemania) y agar 20 g/L (VWR Chemicals, EEUU), para el medio sólido. Las condiciones de incubación empleadas fueron 30°C y una agitación de 250 rpm.

3.1.1. Crecimiento de *Pseudomonas taetrolens* en suero lácteo

El permeado de suero lácteo es un medio de cultivo bastante pobre en nutrientes, ya que está compuesto prácticamente de manera exclusiva por lactosa, por lo que es necesario hacer diferentes etapas y preinóculos para que *P. taetrolens* se pueda adaptar al nuevo sustrato (Figura 10). Inicialmente, se inoculó *P. taetrolens*, crecida en placa de NB a 30°C durante 48 horas, en dos matraces de 500 mL conteniendo 100 mL de NB líquido (proporción volumen de trabajo:aire de 1:4). Dichos matraces se mantuvieron durante 10 horas en un incubador orbital a 30°C y 250 rpm con el fin de favorecer el crecimiento del microorganismo. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugaron 10 mL de este cultivo, a 10000 rpm durante 10 min, para inocular el permeado de suero lácteo al 10% (v/v). Esta etapa de preinóculo permite promover la adaptación de *P. taetrolens* al nuevo sustrato. Transcurridas 12 horas de incubación, en las condiciones anteriormente descritas, se centrifugaron nuevamente 10 mL de cada matraz y los pellets obtenidos se resuspendieron en dos nuevos matraces de 500 mL conteniendo 100 mL de suero, tratándose del medio final en el que se estudió el crecimiento. Este mismo procedimiento se realizó con otros dos matraces de NB, con un desfase de 12 horas, para poder cubrir más horas de estudio de la curva de crecimiento.

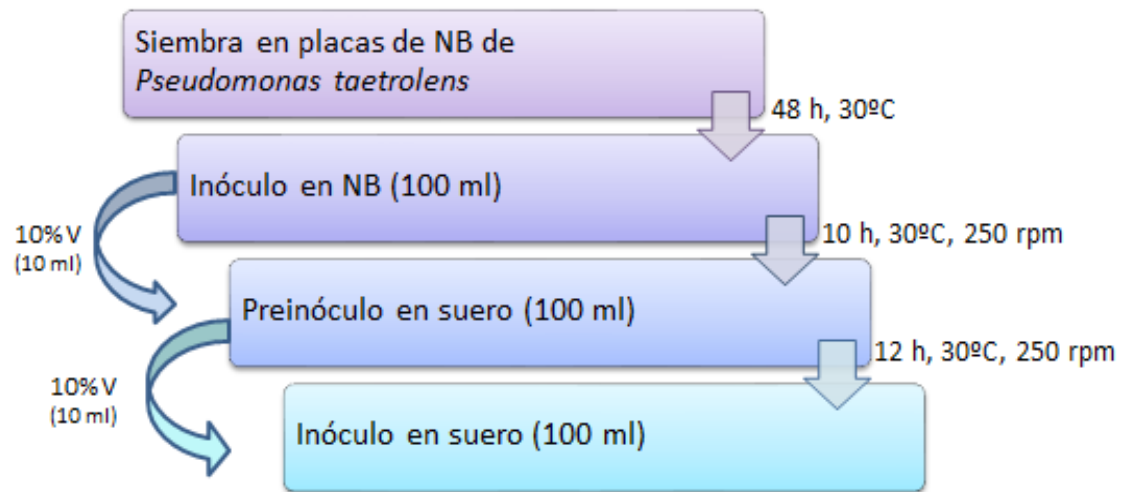


Figura 10. Esquema del cultivo de *P. taetrolens* para el estudio de la curva de crecimiento.

El seguimiento del crecimiento se llevó a cabo mediante la toma de medidas de la DO (Densidad Óptica), a 600 nm en un espectrofotómetro Helios Gamma (ThermoFisher Scientific, EEUU), y del recuento de UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias) en placas de NB, realizando diluciones seriadas 1:10. Todas las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas.

3.2. Fermentación en biorreactores

Se empleó permeado de suero lácteo dulce obtenido por ultrafiltración suministrado por Industrias Lácteas Asturianas S.A. (Navia, Asturias, España), con una concentración inicial de lactosa de, aproximadamente, 260 g/L. El permeado de suero lácteo dulce fue diluido con agua destilada para lograr una concentración de lactosa de 40 g/L, se ajustó su pH a 6,5 con NaOH 3M y se microfiltró para esterilizarlo.

La microfiltración tangencial se realizó en un dispositivo equipado con un cassette de membranas de PVDF con un tamaño de poro de 0,22 μm (Millipore, California, Estados Unidos), haciendo circular el suero mediante el empleo de una bomba peristáltica, con una presión de entrada no superior a 2 bares (Figura 11). La corriente de retenido se recirculó para obtener la mayor cantidad de suero lácteo posible a partir de la alimentación inicial.



Figura 11. Equipo de microfiltración tangencial empleado.

El suero inoculado con *P. taetrolens*, en el cual se desarrolló la fermentación en el biorreactor, se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1.1, con la diferencia de que en lugar de utilizar un volumen final de suero de 100 mL se empleó 1L (Figura 12). El suero fue introducido en el biorreactor, en condiciones de esterilidad, mediante el empleo de una bomba peristáltica.

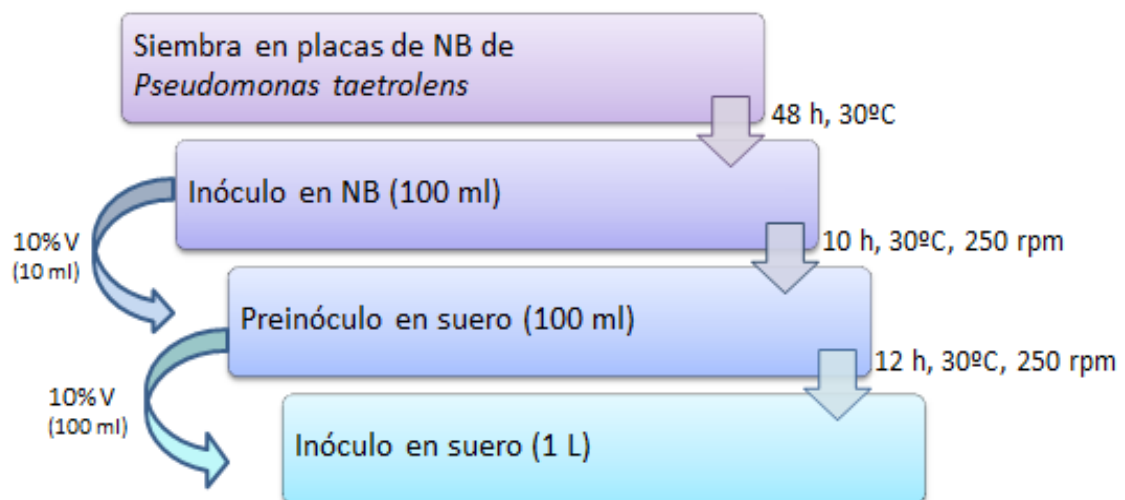


Figura 12. Esquema del cultivo de *P. taetrolens* para la fermentación en biorreactores.

La fermentación se desarrolló en dos biorreactores (modelo BioFlo 110, New Brunswick Scientific Co. Inc.) (Figura 13). Para ello, se utilizaron los siguientes reactivos y condiciones:

- Antiespumante Y30 (Sigma-Aldrich), diluido al 10% con agua destilada, conectado al equipo por medio de una bomba peristáltica. Esta mezcla evita la formación de espumas en el medio de cultivo durante la fermentación. El controlador del nivel de espuma se colocó a la distancia aproximada de un dedo de la superficie del suero.
- Control de pH, iniciado a las 12 horas del comienzo de la fermentación en el biorreactor. El pH se mantuvo en un valor constante de 6,5 mediante la adición de NaOH (Sigma-Aldrich) 4M. El pH se comenzó a controlar tras 12 horas de incubación ya que inicialmente se produce un aumento del pH hasta llegar a 7, por la degradación de proteínas del suero, pero posteriormente, debido a la síntesis de ácido lactobiónico, tiene lugar un descenso del pH que, de no ser controlado, causa la propia inhibición de *P. taetrolens*. Así pues, ajustando el pH a 6,5 se impide la inhibición ácida de *P. taetrolens*, consiguiendo un aumento en la producción de ácido lactobiónico.
- Temperatura de 30°C y agitación de 350 rpm.

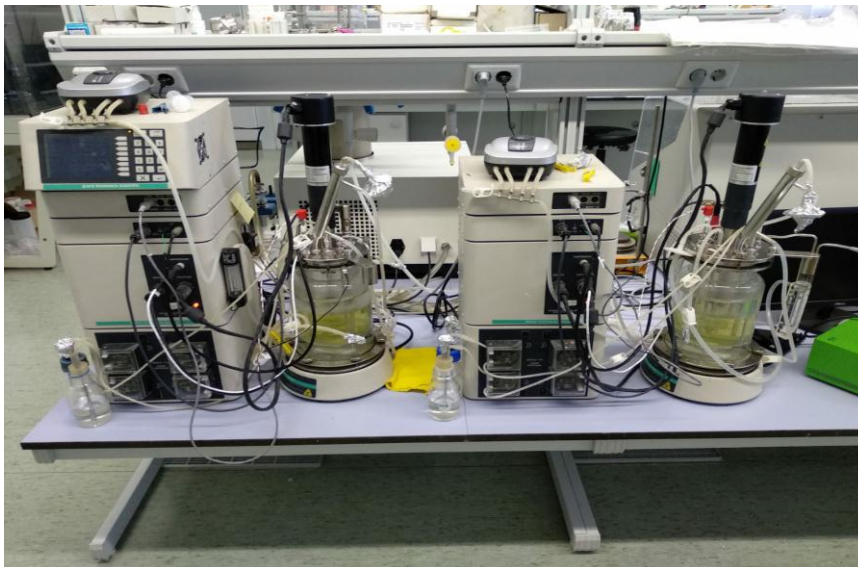


Figura 13. Biorreactores modelo BioFlo 110 empleados en la fermentación.

3.3. Detección y eliminación de la endotoxina bacteriana

Tras la fermentación, se analizó la presencia de endotoxinas en los cultivos de *P. taetrolens* en NB y en permeado de suero lácteo, ya que resultan tóxicas para el cuerpo humano por lo que, en el caso de estar presentes, deben ser eliminadas. Las endotoxinas tienden a formar glóbulos de mayor tamaño de modo que para eliminar las endotoxinas se empleó la técnica de microfiltración tangencial, quedando las endotoxinas en la corriente del retenido. Las condiciones de microfiltración tangencial empleadas fueron las mismas que las empleadas en el apartado 3.2.

Para detectar la presencia de la endotoxina, antes y después de la microfiltración, se empleó el kit ToxinSensor™ Gel Clot (GenScript, EEUU), siguiendo el protocolo de detección semicuantitativa. Se realizó un control positivo, con endotoxina liofilizada suministrada por el kit, y un control negativo, usando el reactivo “LAL Reagent Water” también aportado por el kit. La concentración aproximada de endotoxina en la muestra se dedujo por comparación con dichos controles, ya que el control positivo tiene una concentración igual o mayor a 0,25 UE/mL mientras que la concentración del control negativo es menor de 0,25 UE/mL.

3.4. Purificación de ácido lactobiónico

3.4.1. Evaporación y precipitación con etanol

El medio obtenido de la fermentación fue evaporado con el fin de concentrarlo en ácido lactobiónico, hasta alcanzar una concentración mínima de 200 g/L, para poder realizar la precipitación con etanol. Una vez evaporado, se siguieron dos protocolos diferentes.

El primero de ellos fue adaptado de Murakami *et al.* (2003). Sobre el fermentado se añadieron diferentes concentraciones de etanol 96% (Alcoholes Montplet, Barcelona, España) (200, 300, 400 y 500% (v/v)). Las mezclas se mantuvieron a 4°C durante 1 hora. Tras este tiempo, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó de nuevo con la misma concentración de etanol que se añadió en la primera etapa. Finalmente, el precipitado obtenido fue resuspendido en 2 mL de agua destilada y se analizó su concentración tal y como se describe en el apartado 3.5.

El segundo protocolo realizado fue adaptado de Delagustin *et al.* (2019). Al fermentado concentrado en agitación, a 900 rpm y 45°C, se le añadieron 5 mL de etanol por minuto

hasta alcanzar una concentración del 137,5% (v/v). 45,75 mL de esta mezcla se mantuvieron a 4°C durante 24 horas, mientras que los otros 45,75 mL se almacenaron en el congelador durante 24 horas. Tras este tiempo, ambos tubos se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue retirado mientras que el precipitado se conservó resuspendiéndolo en 2 mL de agua destilada.

3.4.2. Rotaevaporación

Los precipitados resuspendidos en agua destilada obtenidos en el proceso de precipitación con etanol fueron rotaevaporados con el objetivo de eliminar tanto el agua como el etanol residual. Para ello, las muestras fueron introducidas en matraces esmerilados de 50 mL de capacidad aptos para el rotavapor, los cuales fueron lavados con acetona para arrastrar la mayoría de compuestos incluyendo el agua, que resulta problemática para el rotavapor. Previamente, las muestras se sonicaron y sometieron al vórtex para homogeneizarlas. Se empleó un rotavapor IKA (VWR), configurando inicialmente una presión aproximada de 130 mBar, para retirar el etanol que se evapora en torno a 150 mBar, la cual se fue disminuyendo progresivamente hasta alcanzar 1-2 mBar, presión a la que se elimina el agua, evitando la formación de burbujas por exceso de vacío. La temperatura del baño se estableció en 30°C y el serpentín de refrigeración, provisto de anticongelante, a -10°C.

3.4.3. Precipitación con lactobionato cálcico

Uno de los precipitados obtenidos en el ensayo del etanol fue tratado siguiendo otro procedimiento que consistió en precipitar el ácido lactobiónico con lactobionato de calcio comercial (Fluka), ya que adicionando una pequeña cantidad sobre una mezcla saturada en lactobionato de calcio se espera que el lactobionato de calcio de la muestra se vaya depositando a su alrededor mediante un proceso de nucleación. Así pues, se transfirió la muestra a un vaso de precipitados pequeño, se añadió lactobionato de calcio al 0,6% p/v y se mantuvo a 4°C. Al cabo de una semana, se centrifugó el contenido del vaso durante 15 min a 10000 rpm, se retiró el sobrenadante (extrayendo muestras para HPLC) y el precipitado resultante se metió en una estufa a 43°C durante 1 día para eliminar los restos de agua.

3.4.4. Liofilización

La liofilización es un método de secado que se basa en sublimar el hielo de una muestra o producto previamente congelado. El agua pasa, por tanto, directamente de estado sólido a vapor sin pasar por el estado líquido. Para llevar a cabo la liofilización, se empleó un liofilizador Telstar-Cryodos (Terrasa, España) (Figura 14) a 0,1 mBar y -70°C. Las muestras fueron previamente congeladas a -80°C durante 12 horas.

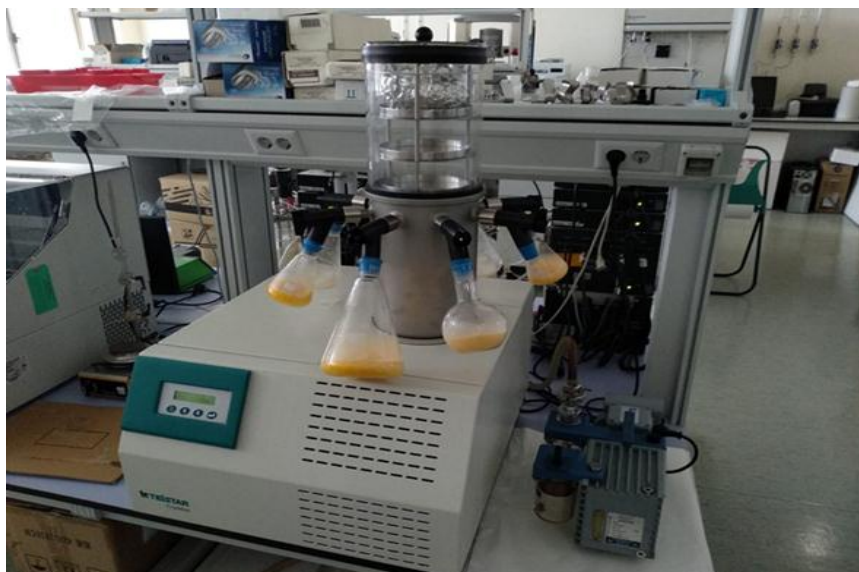


Figura 14. Liofilizador Telstar-Cryodos.

3.5. Métodos analíticos

Para el análisis de lactosa y ácido lactobiónico se usó un cromatógrafo de alta eficacia (HPLC, Agilent, modelo serie 1200). Se utilizó una columna Coregel ION 300 (Teknokroma, Barcelona, España) y un detector RID. Se empleó una fase móvil isocrática de ácido sulfúrico al 96% (Panreac, Barcelona, España) 0,450 mM a pH 3,1, previamente desgasificada y filtrada con un filtro de tamaño de poro de 0,45 μ m (Whatmann, GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido), con un flujo de 0,3 mL/min. La obtención y tratamiento de datos se llevó a cabo con el software ChemStation (Agilent).

Para conocer la concentración de analito presente en la muestra a partir del área del pico correspondiente del cromatograma, se realizaron las rectas de calibrado para la lactosa y el ácido lactobiónico (ambos de Sigma-Aldrich), con un rango de concentraciones de 10 a 4000 ppm.

RESULTADOS

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1. Curva de crecimiento de *Pseudomonas taetrolens* en suero lácteo

Se evaluó el crecimiento de *P. taetrolens* en el permeado de suero lácteo con el fin de analizar su comportamiento en dicho medio. El seguimiento se realizó a través de medidas de la DO y por recuento de UFC/mL, tomando un total de 20 muestras repartidas en 38 horas de estudio sin control de pH, obteniéndose los resultados de las Figuras 15 y 16.

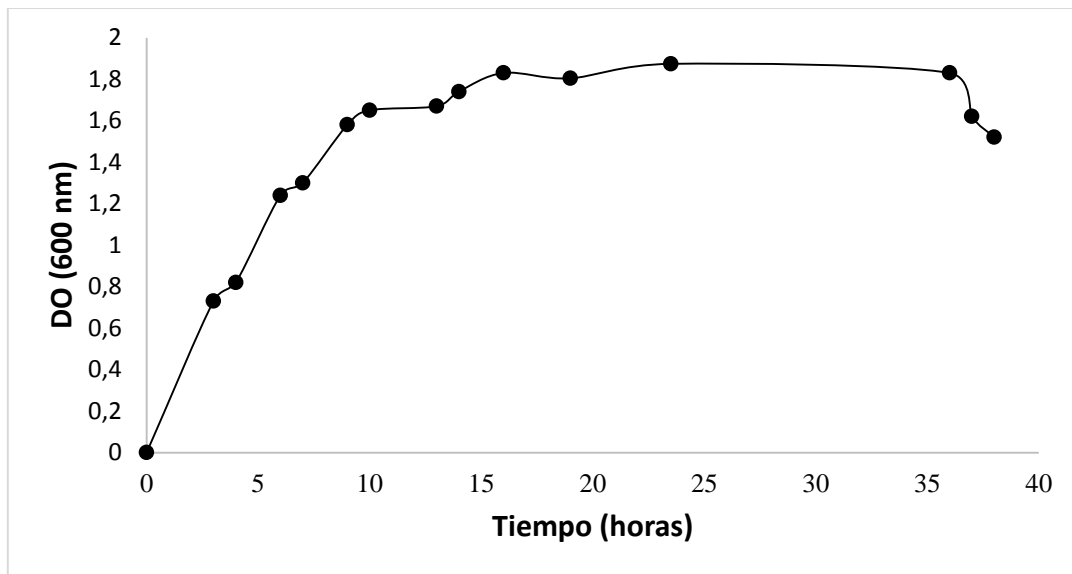


Figura 15. Curva de crecimiento de *P. taetrolens* en suero lácteo en función de la DO.

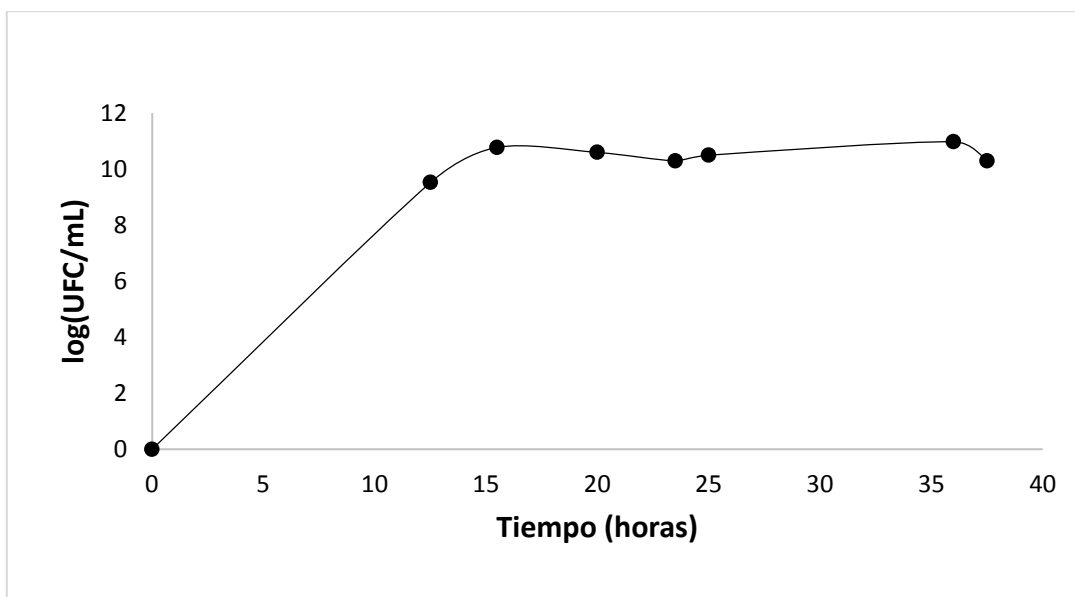


Figura 16. Curva de crecimiento de *P. taetrolens* en suero lácteo en función de UFC/mL.

En ambas gráficas se puede observar el patrón típico de crecimiento microbiano. La fase de latencia es muy breve (menor de 5 horas), debido a que el microorganismo ya se encuentra adaptado al permeado de suero lácteo al haber realizado una etapa previa de preinóculo. *P. taetrolens* sigue un crecimiento exponencial hasta las 10 horas, momento en el que inicia la etapa de crecimiento estacionario, en el cual el microorganismo comienza la actividad de su metabolismo secundario, produciendo el ácido lactobiónico. Una vez que se comienzan a agotar los nutrientes del medio, a partir de unas 35 horas de incubación, comenzaría la fase de muerte.

4.2. Preparación del sustrato de la fermentación empleando microfiltración tangencial

El lactosuero de partida suele presentar una concentración aproximada de 200 g/L de lactosa. Sin embargo, para su empleo como medio de fermentación precisa contener en torno a 40 g/L para que no haya inhibición del crecimiento microbiano por exceso de concentración de sustrato. Por ello, el suero fue inicialmente diluido hasta alcanzar dicha concentración y, posteriormente, microfiltrado para ser esterilizado. En cada uno de estos pasos se tomaron muestras para HPLC con el fin de evaluar la cantidad real de lactosa.

Tabla 3. Variación de la concentración de lactosa del sustrato de la fermentación.

Etapa	Inicial	Diluido	
		Antes de filtrar	Después de filtrar
Lactosa (g/L)	161,877 ± 39,703	55,351 ± 4,236	41,040 ± 3,28

En base a los datos obtenidos, se deduce que la membrana provoca una pérdida aproximada de lactosa del 25,85%. Esta pérdida se debe a que la membrana se ensucia con los usos y parte del sustrato queda retenido en su interior.

4.3. Seguimiento de la fermentación: producción de ácido lactobiónico por vía biológica

Se llevaron a cabo cuatro fermentaciones diferentes, en las cuales se midió por HPLC tanto la producción de ácido lactobiónico como el consumo de lactosa, recogándose en la Tabla 4 los resultados finales.

Tabla 4. Concentraciones finales tras 72 horas de fermentación.

Concentración (g/L)		
Lactosa	Ácido lactobiónico	DO ^{600nm}
10,10 ± 6,17	55,84 ± 9,26	1,42 ± 0,08

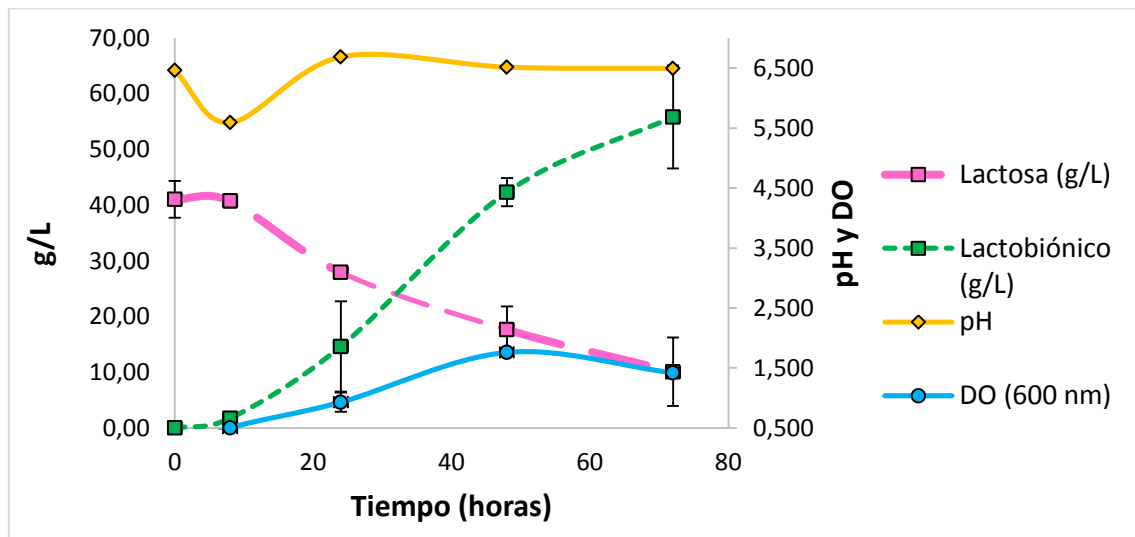


Figura 17. Evolución del pH, la DO, la concentración de lactosa y ácido lactobiónico a lo largo de 72 horas de fermentación en el biorreactor.

Así pues, al cabo de 72 horas se obtuvieron $55,84 \pm 9,26$ g/L de ácido lactobiónico tras la conversión del 75,39% de la lactosa inicial, superándose el límite mínimo de producción (50 g/L) estipulado para resultar rentable. No se observó en ningún cromatograma pico de elución de ácido láctico, lo que indica que el suero usado en la fermentación no se contaminó con ninguna bacteria láctica que provocase una disminución de la producción de ácido lactobiónico. En la Figura 17 se puede ver como en las primeras horas el pH disminuye debido a la ausencia de control de pH. Hay que tener en cuenta que no se tomaron datos en el periodo de 0 a 8 horas, en el cual se manifestaría una subida de pH hasta alcanzar un valor neutro, debido a la degradación de las proteínas presentes en el suero. Una vez se programó el control de pH en 6,5 como valor de consigna, el pH se estabilizó en torno a ese valor. En la representación de

la DO^{600nm} , se puede observar una curva característica de crecimiento microbiano en la que la fase estacionaria se alcanza en torno a las 25 horas de incubación, momento en el que la producción de ácido lactobiónico es máxima, lo que se debe a que el ácido lactobiónico es un metabolito secundario.

4.4. Detección de endotoxinas

La prueba realizada con el kit de detección de endotoxinas sobre el cultivo puro de *P. taetrolens* en NB y en el permeado de suero lácteo dio resultado positivo, indicando en ambos la presencia de lipopolisacáridos. Para intentar eliminar la endotoxina, se microfiltró tangencialmente el fermentado tras haber sido centrifugado previamente. Se realizó nuevamente la prueba tras la microfiltración y se obtuvo un resultado negativo, es decir, se obtuvo un medio enriquecido en ácido lactobiónico con una concentración de endotoxinas inferior a 0,25 UE/mL. Esto se debe a que las endotoxinas tienden a formar glóbulos en presencia de diferentes iones, como el calcio (el cual está presente en el permeado de suero), con tamaños superiores a 0,1 μm , quedando la gran mayoría en la corriente del retenido (Li, 1999). La concentración obtenida se encuentra muy por debajo del límite de referencia en la industria farmacéutica y alimentaria (10 UE/mL) (Burguet, 2012), por lo que el producto obtenido se puede considerar inocuo.

4.5. Concentración del fermentado en ácido lactobiónico

El fermentado obtenido en los biorreactores presentó una concentración de ácido lactobiónico de $55,84 \pm 9,26$ g/L. Para poder llevar a cabo la precipitación de ácido lactobiónico, con un buen rendimiento empleando etanol, es necesario que éste se encuentre en una concentración mínima de 200 g/L. Por ello el fermentado, una vez centrifugado y microfiltrado para eliminar *P. taetrolens* y las endotoxinas producidas por este microorganismo, fue concentrado por evaporación.

Tabla 5. Variación de la lactosa y el lactobiónico presentes en el suero fermentado durante su procesamiento.

Muestra	Antes de filtrar	Después de filtrar	Evaporado (200 mL)	Evaporado (80 mL)
Concentración de lactobiónico (g/L)	55,84 ± 9,26	64,20 ± 7,34	224,47 ± 2,31	394,68 ± 12,26
Concentración de lactosa (g/L)	10,10 ± 6,17	11,62 ± 7,01	28,30 ± 0,30	71,44 ± 5,94

Mediante la evaporación se logró concentrar el ácido lactobiónico un 614,77%.

4.6. Separación y purificación de ácido lactobiónico

4.6.1. Precipitación con etanol

En cuanto al protocolo descrito por Murakami *et al.* (Añadir 20-50 mL de etanol), se observó cómo al incrementar la cantidad de etanol adicionada aumentó la cantidad de lactosa y ácido lactobiónico obtenido en la precipitación. Sin embargo, a partir de los 40 mL de etanol la precipitación permaneció estancada, es decir, no se produjo un aumento del rendimiento. En relación con el protocolo adaptado de Delagustin *et al.*, se obtuvieron eficacias de precipitación menores que las conseguidas siguiendo el protocolo de Murakami *et al.*, especialmente al congelar la mezcla suero-etanol. En todos los casos la mayor parte del ácido lactobiónico y de la lactosa se mantuvo en el precipitado, perdiéndose una mínima parte en los sobrenadantes. Así pues, el mejor método para la extracción de ácido lactobiónico por precipitación con etanol resultó ser la adición de 40 mL de etanol/10 mL fermentado, ya que es el procedimiento que permitió recuperar una mayor cantidad de ácido lactobiónico (770,6 g/L).

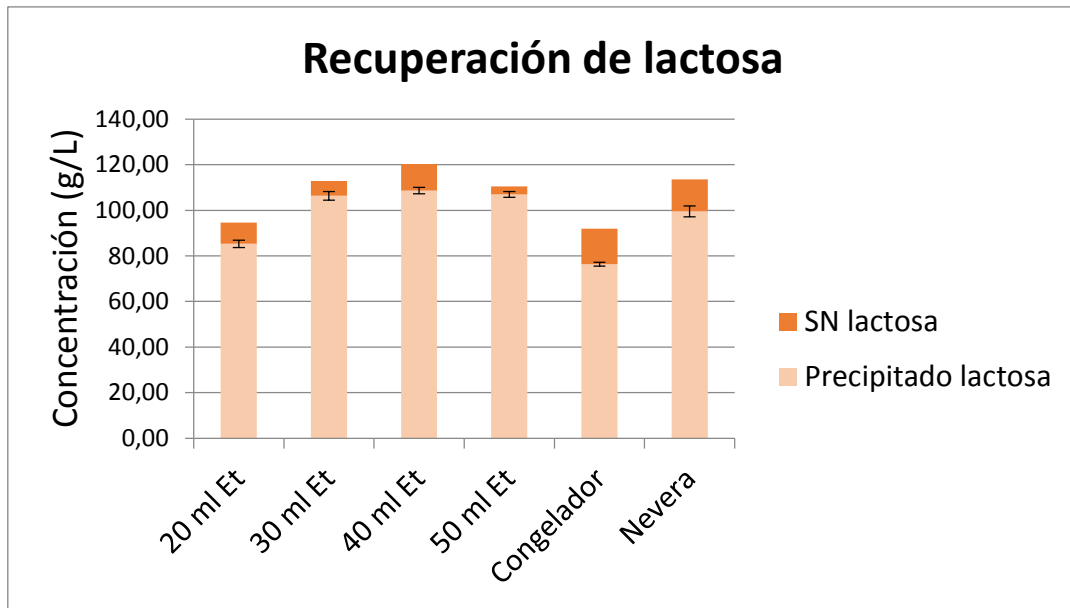


Figura 18. Concentración de lactosa en función del método de precipitación con etanol empleado. Hay que tener en cuenta que en el protocolo de Delagustin *et al.* partimos de 20 mL en lugar de 10 mL, por lo que hay el doble de gramos iniciales de lactobiónico.

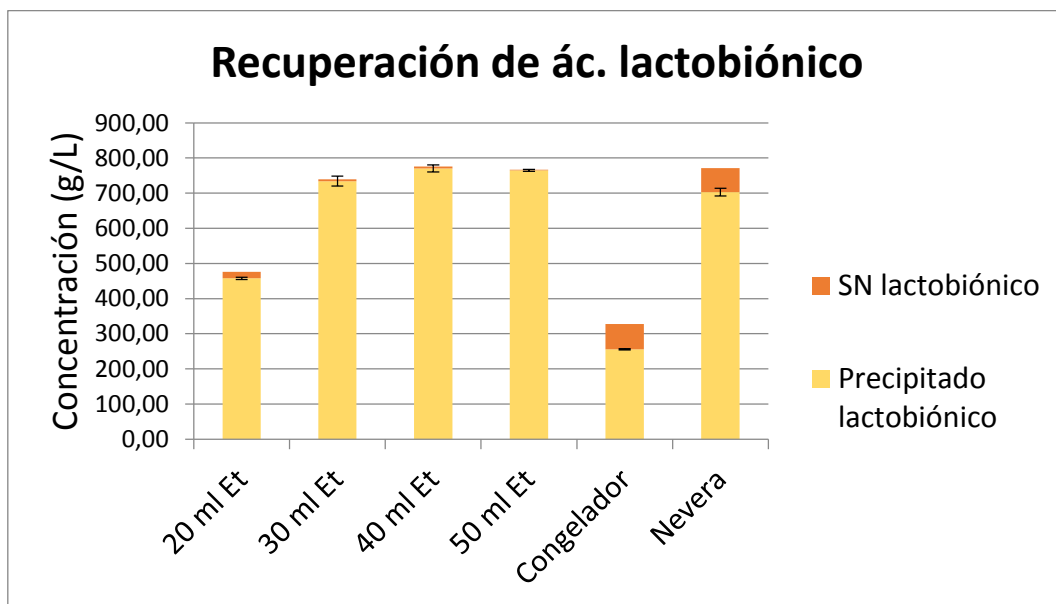


Figura 19. Concentración de ácido lactobiónico en función del método de precipitación con etanol empleado. Hay que tener en cuenta que en el protocolo de Delagustin *et al.* partimos de 20 mL en lugar de 10 mL, por lo que hay el doble de gramos iniciales de lactobiónico.

En comparación con resultados previos, Murakami *et al.* lograron recuperar el 98% del ácido lactobiónico, producido por *Burkholderia cepacia* por fermentación de lactosa, mediante la precipitación con etanol mientras que, en este ensayo, adicionando 40 mL de etanol, se consiguió recoger el 99,28%.

4.6.2. Rotavaporación

Tras rotavaporar las muestras del protocolo de Murakami *et al.* (a las que se habían adicionado de 20 a 50 mL de etanol) y la muestra del congelador, se obtuvieron una especie de siropes de consistencia proporcional a la concentración de ácido lactobiónico (Figura 20). La muestra de 50 mL de etanol, a pesar de tener una concentración menor de ácido lactobiónico, presenta una consistencia superior a la muestra de 40 mL debido a que de la muestra de 40 mL se obtuvieron 2 tubos al precisar añadir más agua para poder resuspender el precipitado y poder rotavaporar la muestra.



Figura 20. Muestras rotavaporadas, ordenadas de izquierda a derecha de menor a mayor cantidad de etanol, estando la muestra del congelador a la izquierda del todo. Nótese que hay 2 tubos de 40 mL de etanol.

4.6.3. Precipitación con lactobionato de calcio

En cuanto a la muestra sometida a 24 horas en nevera, se siguió un tratamiento distinto que consistió en la adición de lactobionato cálcico para intentar precipitar el lactobionato de calcio presente en la muestra por nucleación. Tras estar 1 día en la estufa a 43°C secando, se obtuvieron 0,08g de un sólido de aspecto escamoso y tonalidad grisácea, el cual se trituró (Figura 21).



Figura 21. Ácido lactobiónico obtenido por precipitación con lactobionato de calcio.

4.6.4. Liofilización

A partir de 300 mL de fermentado, repartido en dos matraces, se logró recuperar 13,09g, siendo lo esperado 22,746g, de los cuales 19,26g serían de ácido lactobiónico (pureza esperada del 84,67%). El sólido obtenido presentó aspecto escamoso/cristalino y tonalidad marronzuca (Figura 22).



Figura 22. Aspecto del ácido lactobiónico obtenido por liofilización.

ESQUEMA GLOBAL Y CÁLCULO DE RENDIMIENTOS

Con el fin de tener una visión general del proceso y facilitar su comprensión, así como el tratamiento de los datos, se presenta a continuación un esquema detallado de los múltiples pasos seguidos, incluyendo los resultados obtenidos. También se muestra una tabla donde se recogen los rendimientos, necesarios para valorar la eficacia de los distintos procedimientos.

5. ESQUEMA GLOBAL DEL PROCESO Y CÁLCULO DE RENDIMIENTOS

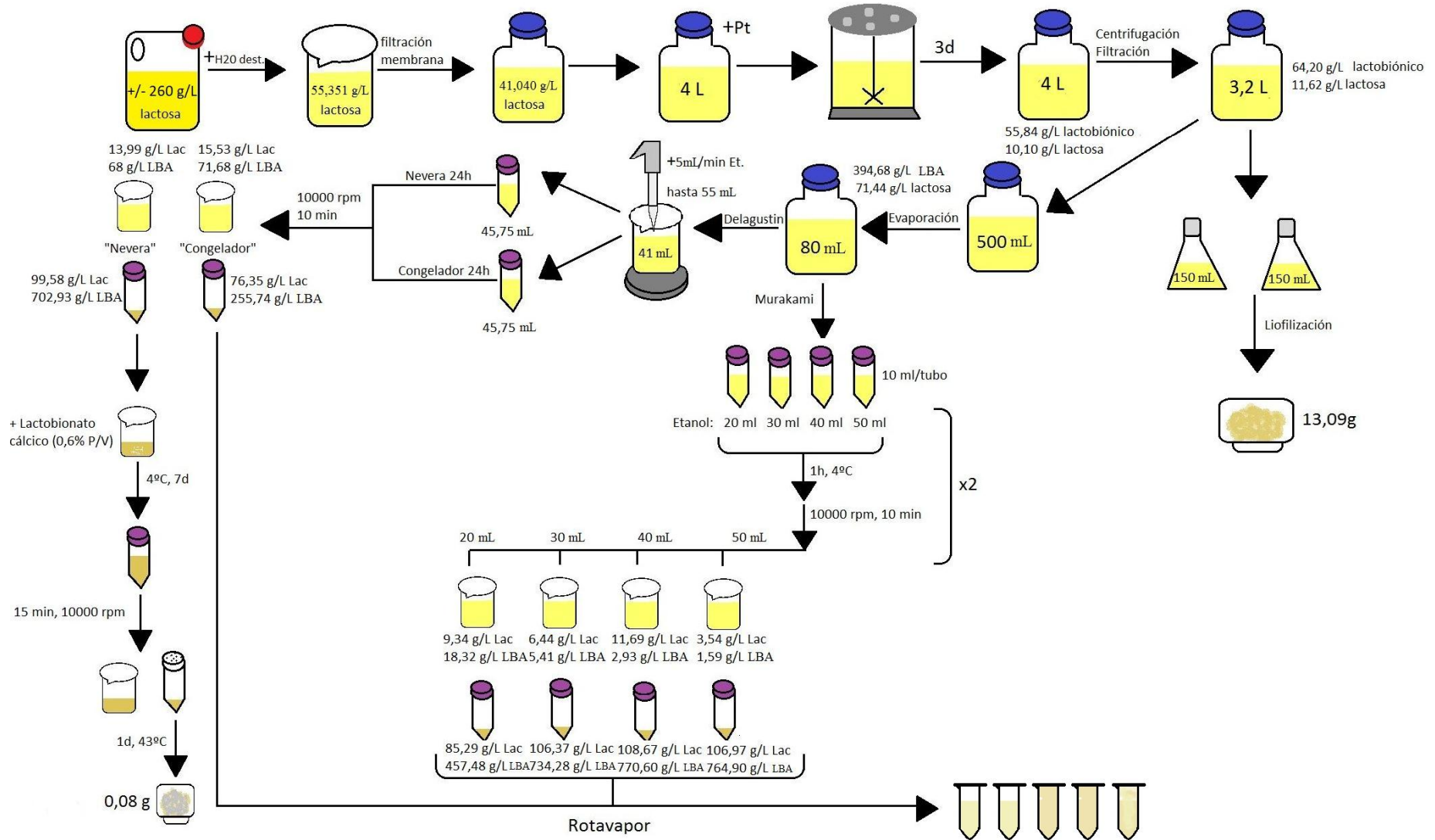


Figura 23. Esquema global del proceso.

Tabla 6. Cálculo de rendimientos.

FERMENTACIÓN BIORREACTORES		
Antes de centrifugar/filtrar (4L) 55,84 g/L	Después de centrifugar/filtrar (3,2L) 64,20 g/L	RENDIMIENTO 91,98%
LIOFILIZACIÓN		
Antes de liofilizar (300 mL) 64,20 g/L	Después de liofilizar 13,09 g	RENDIMIENTO 67,96%
EVAPORACIÓN		
Antes de evaporar (500 mL) 64,20 g/L	Después de evaporar (80 mL) 394,68 g/L	RENDIMIENTO 98,36%
PRECIPITACIÓN CON ETANOL		
Antes de añadir 20 mL de etanol (10 mL) 394,68 g/L	Después de añadir 20 mL de etanol 457,48 g/L	RENDIMIENTO 23,18%
Antes de añadir 30 mL de etanol (10 mL) 394,68 g/L	Después de añadir 30 mL de etanol 734,28 g/L	RENDIMIENTO 37,21%
Antes de añadir 40 mL de etanol (10 mL) 394,68 g/L	Después de añadir 40 mL de etanol 770,60 g/L	RENDIMIENTO 39,05%
Antes de añadir 50 mL de etanol (10 mL) 394,68 g/L	Después de añadir 50 mL de etanol 764,90 g/L	RENDIMIENTO 38,76%
Antes de añadir etanol (Nevera) (20 mL) 394,68 g/L	Después de añadir etanol (Nevera) 702,93 g/L	RENDIMIENTO 17,81%
Antes del procedimiento con lactobionato de calcio (2 mL) 702,93 g/L	Después del procedimiento con lactobionato de calcio 0,08 g	RENDIMIENTO 5,69%
Antes de añadir etanol (Congelador) (20 mL) 394,68 g/L	Después de añadir etanol (Congelador) 255,74 g/L	RENDIMIENTO 6,48%

El proceso de purificación de ácido lactobiónico que consiguió alcanzar un mayor rendimiento (67,96%) fue la liofilización (Tabla 6). Sin embargo, este proceso resulta muy costoso ya que congelar supone costes elevados a nivel industrial. Por ello, otra alternativa a considerar es la precipitación con etanol siguiendo el protocolo descrito por Murakami *et al.*, empleando 40 mL de etanol preferentemente, ya que se logran rendimientos aceptables de en torno al 40%. Sin embargo, con este mismo método de purificación pero siguiendo el procedimiento descrito por Delagustin *et al.*, se obtuvieron rendimientos bajos (6,48% y 17,81%), especialmente en el caso del congelador (6,48%), por lo que no interesaría seguir perfeccionando su aplicación. Otra técnica empleada que no proporcionó buenos resultados fue la nucleación con lactobionato de calcio, ya que únicamente se logró un rendimiento del 5,69%.

Así pues, considerando conjuntamente criterios económicos y de rentabilidad, la opción más favorable sería la precipitación con 40 mL de etanol, según Murakami *et al.*, por lo que sería interesante estudiar el efecto de introducir variaciones en dicho protocolo con el fin de buscar alcanzar un rendimiento mayor. Hay que tener en cuenta que los precipitados obtenidos por este procedimiento han sido rotavaporados para eliminar el agua y el etanol residuales, lo cual resulta también un proceso costoso. Por ello, se precisaría llevar a cabo futuras investigaciones en las que se persiguiesen los siguientes objetivos:

- ❖ Perfeccionar la precipitación con etanol con el fin de lograr mayores rendimientos.
- ❖ Buscar nuevas formas, más económicas, de separar el agua y el etanol del producto.
- ❖ Considerar otros métodos de purificación del ácido lactobiónico.
- ❖ Estudiar su pureza, así como su estructura cristalina en el caso de obtenerse cristales.

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

6. CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

Finalmente, se incluye una evaluación económica aproximada de los costes de producción así como una comparación con el precio de venta del ácido lactobiónico comercial, con el fin de valorar los beneficios de producción por vía fermentativa.

6.1. Costes de producción

Estimación de costes por kg de producto final.

6.1.1. Costes de servicios generales

Tabla 7. Precios de servicios generales (Minetad, 2017; Díaz, 2012).

SERVICIOS GENERALES	PRECIO
Agua disolución	2 €/1000 kg
Agua refrigeración	0,1 €/1000 kg
Vapor de agua	0,05 €/kg
Electricidad	0,084 €/kWh // 822 €

6.1.2. Materiales

Tabla 8. Costes de materiales.

MATERIALES	PRECIO
Microorganismos + Medios	0,2 €/kg
Suero	0,1 €/kg

6.2. Costes de equipamiento

6.2.1. Equipos principales y auxiliares

Tabla 9. Costes de equipos principales y auxiliares. Fuente: Gutiérrez, 2018.

EQUIPOS	PRECIO (€)
Reactor de 18 m ³	186.663
Cambiador de calor de 8,5 m ²	8.297
Membrana de microfiltración de 17 m ²	5.642
Bomba peristáltica	829
TOTAL	201.431

6.2.2. Costes complementarios

Tabla 10. Costes complementarios. Fuente: Gutiérrez, 2018.

COSTE	PRECIO (€)
Instrumentación y control	242.253
Tuberías (instaladas)	403.755
Sistemas eléctricos (instalados)	88.826
Edificios (servicios incluidos)	201.878
Mejoras	88.826
Instalaciones de servicios (instalados)	484.506
TOTAL	1.510.044

6.3. Gastos generales

Tabla 11. Gastos generales. Fuente: Alfonso, 2017.

GASTOS GENERALES	PRECIO (€)
Costes administrativos	44.038
Distribución, marketing	153.042
Costes en I+D	153.042
TOTAL	350.123

6.4. Coste del producto

Suponiendo una producción anual de 200.000 kg/año de ácido lactobiónico y una amortización del 10%, el coste de producción del ácido lactobiónico sería:

Tabla 12. Cálculo del coste de producción del ácido lactobiónico.

CONCEPTO	PRECIO (€/año)	PRECIO (€/kg)
Agua disolución	-	0,002
Agua refrigeración	-	0,0001
Vapor de agua	-	0,05
Electricidad	822	0,004
Microorganismos + Medios	-	0,2
Suero	-	0,1
Equipos (10% anual)	20.000	0,1
Costes complementarios (10% anual)	151.004,4	0,76
Gastos generales	350.123	1,75
TOTAL	-	2,97

Hay que tener en cuenta que no se están considerando todos los gastos, impuestos y pasos posteriores de purificación, lo que aumentaría el precio del ácido lactobiónico. Otros autores sitúan el precio de producción del ácido lactobiónico por vía fermentativa en 4€/kg (Alonso, 2013).

6.5. Comparación y valoración

A continuación, se presentan ejemplos de precios del ácido lactobiónico de distintas casas comerciales con el fin de evaluar las diferencias económicas. El precio de venta del ácido lactobiónico está fijado en función de su pureza. Hay que hacer distinción entre el ácido lactobiónico de alta pureza para uso en laboratorio (Tabla 13) , fabricado en pequeñas cantidades, del ácido lactobiónico de menor pureza empleado como aditivo (Tabla 14), producido en cantidades mayores.

Tabla 13. Precio de venta del ácido lactobiónico de distintas casas comerciales.

Casa comercial	Descripción producto	Envase (g)	Precio (€)	Precio (€/kg)	Actualización
Alfa Aesar	Ác. Lactobiónico, 97%	25	71,50	2860	06/07/2019
Alfa Aesar	Ác. Lactobiónico, 97%	100	208	2080	06/07/2019
Alfa Aesar	Ác. Lactobiónico, 97%	250	494	1976	06/07/2019
Fisher Scientific	Ác. Lactobiónico, 97%	25	66,03	2641,2	06/07/2019
Fisher Scientific	Ác. Lactobiónico, 97%	100	208,1	2081	06/07/2019
Carbosynth	Ác. Lactobiónico	100	40	400	06/07/2019
Carbosynth	Ác. Lactobiónico	250	67,50	270	06/07/2019
Carbosynth	Ác. Lactobiónico	500	110	220	06/07/2019
Carbosynth	Ác. Lactobiónico	1000	204,7	204,7	06/07/2019
Carbosynth	Ác. Lactobiónico	2000	373,8	186,9	06/07/2019
Sigma-Aldrich	Ác. Lactobiónico, 97%	25	72,20	2888	06/07/2019
Sigma-Aldrich	Ác. Lactobiónico, 97%	100	277	2770	06/07/2019

Tabla 14. Precio de venta del lactobionato de calcio de distintas casas comerciales.

Casa comercial	Descripción producto	Envase (g)	Precio (€)	Precio (€/kg)	Actualización
Sigma-Aldrich	Lactobionato de calcio monohidrato (98-102%)	100	87,10	871	10/07/2019
Sigma-Aldrich	Lactobionato de calcio monohidrato ($\geq 98\%$)	500	172	344	10/07/2019
Carbosynth	Lactobionato de calcio	250	85	340	10/07/2019
Carbosynth	Lactobionato de calcio	500	155	310	10/07/2019
Carbosynth	Lactobionato de calcio	1000	262,55	262,55	10/07/2019
Carbosynth	Lactobionato de calcio	2000	489,50	244,75	10/07/2019
Carbosynth	Lactobionato de calcio	5000	1001,25	200,25	10/07/2019
SCBT	Lactobionato de calcio monohidrato ($\geq 97\%$)	100	45	450	10/07/2019

Se puede apreciar que el margen comercial de este tipo de productos es muy alto. Sin embargo, debemos compararlo con el precio de ácidos orgánicos usados como aditivos en alimentación, por ejemplo el ácido láctico que se encuentra en torno a 5 €/kg con concentraciones del 60%. Si se estima un margen comercial al ácido lactobiónico en torno al 25%, similar al del ácido láctico, respecto a un coste medio de 3,49 €/kg saldría un precio de venta de 4,36 €/kg. Teniendo en cuenta que el ácido lactobiónico es un producto mucho más especializado que el ácido láctico y que puede alcanzar un valor comercial como aditivo entre 6-8 €/kg, los márgenes que se pueden conseguir estarían sobre el 50%, por lo que el precio de venta del producto obtenido rondaría los 5,24 €/kg.

La dificultad en la comercialización del ácido lactobiónico en Europa estriba en la falta de autorización por parte de la EFSA (*European Food Safety Authority*), ya que ninguna empresa ha solicitado dictamen para su aprobación y uso. Sin embargo, en USA el lactobionato cálcico está comercializado y autorizado por la USDA (*United States Department of Agriculture*) desde 2011 (Alonso *et al.*, 2013), y en Japón existen productos comerciales con lactobionato.

Si se solventan en Europa los temas legales, el producto tiene grandes posibilidades de desarrollo por su facilidad de producción y concentración a costes asumibles y por sus buenas propiedades de uso.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- ❖ Mediante la fermentación de permeado de suero lácteo por *Pseudomonas taetrolens* se logró producir una media de $55,842 \pm 9,266$ g/L de ácido lactobiónico, lo que supera el mínimo establecido para resultar rentable (50 g/L).
- ❖ El empleo del kit ToxinSensor™ Gel Clot permitió detectar la presencia de endotoxinas en cultivos de *Pseudomonas taetrolens*, tanto en NB como en permeado de suero lácteo. Mediante microfiltración tangencial se consiguió separar dichas endotoxinas alcanzándose una concentración inferior a 0,25 UE/mL, mucho menor que el límite de referencia (10 UE/mL).
- ❖ Se utilizaron varios métodos de purificación de ácido lactobiónico, obteniendo los mejores resultados con las técnicas de liofilización y precipitación con etanol. La liofilización permitió recuperar en un único paso el ácido lactobiónico, mientras que en el caso de la precipitación con etanol fueron necesarios procesamientos posteriores (rotavaporación y precipitación con lactobionato de calcio). Finalmente, se lograron alcanzar rendimientos entre el 6,48% y el 67,96%, resultando ser el método más rentable la liofilización.
- ❖ La producción de ácido lactobiónico por la vía biológica descrita resulta rentable económicamente, estimándose un precio de venta del mismo de 5,24 €/kg frente a los 6-8 €/kg en los que se sitúa el ácido lactobiónico comercial como aditivo. Así pues, de este modo se puede obtener ácido lactobiónico a costes asumibles de un modo sencillo y respetuoso con el medio ambiente.

ABREVIATURAS

- **DBO:** Demanda Biológica de Oxígeno
- **DO:** Densidad Óptica
- **DQO:** Demanda Química de Oxígeno
- **HPLC:** *High Performance Liquid Chromatography*
- **Lac:** Lactosa
- **LAL:** Lisado de amebocitos de *Limulus*
- **LBA:** Ácido lactobiónico
- **LPS:** Lipopolisacáridos
- **NB:** *Nutrient Broth*
- **p/v:** peso/volumen
- **UE:** Unidades enzimáticas
- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonias
- **v/v:** volumen/volumen

BIBLIOGRAFÍA

Alfonso, M. (2017). *Diseño de la etapa de concentración de ácido lactobiónico obtenido a partir de lactosuero* (Trabajo Fin de Grado). Universidad de Oviedo, Oviedo.

Alonso, S., Rendueles, M., & Díaz, M. (2011). Efficient lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH-shift conditions. *Bioresource technology*, 102(20), 9730-9736.

Alonso, S. (2013). *Obtención de ácidos orgánicos por fermentación de subproductos lácteos* (Doctoral dissertation, Universidad de Oviedo).

Alonso, S., Rendueles, M., & Díaz, M. (2013). Bio-production of lactobionic acid: current status, applications and future prospects. *Biotechnology advances*, 31(8), 1275-1291.

Atamer, Z., Samtlebe, M., Neve, H., Heller, K. J., & Hinrichs, J. (2013). elimination of bacteriophages in whey and whey products. *Frontiers in microbiology*, 4, 191.

Bucek, W., Connors, W. M., Cort, W. M., & Roberts, H. R. (1956). Evidence for the formation and utilization of lactobionic acid by *Penicillium chrysogenum*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 63(2), 477.

Burguet, N., & Brito, L. C. (2012). Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica. *VacciMonitor*, 21(3), 32-36.

Carvalho, F., Prazeres, A. R., & Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Science of the total environment*, 445, 385-396.

Chia, Y. N., Latusek, M. P., & Holles, J. H. (2008). Catalytic wet oxidation of lactose. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(12), 4049-4055.

Cinar, A., Parulekar, S. J., Undey, C., & Birol, G. (2003). Batch fermentation: modeling: monitoring, and control. CRC press.

Delagustin, M. G., Gonçalves, E., Carra, S., Barcellos, T., Bassani, V. L., Silveira, M. M., & Malvessi, E. (2017). Bioproduction and characterization of sodium, potassium, and calcium lactobionates. *Química Nova*, 40(9), 1003-1008.

Díaz, M., (2012). *Ingeniería de bioprocesos*. 1ª edición. Madrid, España: Editorial Paraninfo.

Druliolle, H., Kokoh, K. B., & Beden, B. (1995). Selective oxidation of lactose to lactobionic acid on lead-adatoms modified platinum electrodes in Na₂CO₃+ NaHCO₃ buffered medium. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 385(1), 77-83.

Enan, G., & Amri, A. A. A. (2006). Novel plantaricin UG1 production by *Lactobacillus plantarum* UG1 in enriched whey permeate in batch fermentation processes. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 4(2), 85.

European Dairy Association. (2017/18). Economic Report 2017/18.

<http://eda.euromilk.org/about-eda/economic-report.html>

Finogenova, T. V., Lozinov, A. B., Belikov, V. M., Ermakova, I. T., Muntian, L. N., & Safonova, E. N. (1968). Keto-acid production by paraffin-oxidizing yeasts. *Mikrobiologiya*, 37(1), 38.

Fox, P.F. & McSweeney P.L.H. (2009) *Advanced dairy chemistry: lactose, water, salts and minor constituents*. Springer, New York, pp 166–167

González, S. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 57(1), 1-11.

Gutiérrez, L. F., Hamoudi, S., & Belkacemi, K. (2011). Selective production of lactobionic acid by aerobic oxidation of lactose over gold crystallites supported on mesoporous silica. *Applied Catalysis A: General*, 402(1-2), 94-103.

Gutiérrez, L. F., Hamoudi, S., & Belkacemi, K. (2012). Lactobionic acid: a high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. *International Dairy Journal*, 26(2), 103-111.

Gutiérrez, Y. (2018). *Aprovechamiento del lactosuero: producción de ácido lactobiónico vía enzimática* (Trabajo Fin de Grado). Universidad de Oviedo, Oviedo.

Habe, H., Sato, S., Morita, T., Fukuoka, T., Kirimura, K., & Kitamoto, D. (2015). Bacterial production of short-chain organic acids and trehalose from levulinic acid: a

potential cellulose-derived building block as a feedstock for microbial production. *Bioresource technology*, 177, 381-386.

Heding, L. G., & Gupta, J. K. (1975). Improvement of conditions for precipitation of citric acid from fermentation mash. *Biotechnology and Bioengineering*, 17(9), 1363-1364.

Holz, M., Otto, C., Kretschmar, A., Yovkova, V., Aurich, A., Pötter, M., Marx, A., & Barth, G. (2011). Overexpression of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica* and its effect on production of organic acids. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5), 1519-1526.

Hua, L., Nordkvist, M., Nielsen, P. M., & Villadsen, J. (2007). Scale-up of enzymatic production of lactobionic acid using the rotary jet head system. *Biotechnology and bioengineering*, 97(4), 842-849.

Jozala, A. F., Silva, D. P., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., Júnior, A. P., & Penna, T. C. (2011). Processing of byproducts to improve nisin production by *Lactococcus lactis*. *African Journal of Biotechnology*, 10(66), 14920-14925.

Júnior, J. B. S., Pinto, J. C., Ferraz, H. C., & Alves, T. L. (2011). Analysis of experimental errors in bioprocesses. 1. Production of lactobionic acid and sorbitol using the GFOR (glucose-fructose oxidoreductase) enzyme from permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(9), 1575-1585.

Kiryu, T., Yamauchi, K., Masuyama, A., Ooe, K., Kimura, T., Kiso, T., Nakano, H., & Murakami, H. (2012). Optimization of lactobionic acid production by *Acetobacter orientalis* isolated from Caucasian fermented milk, "Caspian Sea yogurt". *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1112272769-1112272769.

Kumar, R., Nanavati, H., Noronha, S. B., & Mahajani, S. M. (2006). A continuous process for the recovery of lactic acid by reactive distillation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(11), 1767-1777.

Kuusisto, J., Tokarev, A. V., Murzina, E. V., Roslund, M. U., Mikkola, J. P., Murzin, D. Y., & Salmi, T. (2007). From renewable raw materials to high value-added fine

chemicals—catalytic hydrogenation and oxidation of D-lactose. *Catalysis Today*, 121(1-2), 92-99.

Lara, A. (2018). *Separación del ácido lactobiónico obtenido por vía enzimática a partir de lactosuero* (Trabajo Fin de Grado). Universidad de Oviedo, Oviedo.

Li, L., & Luo, R. G. (1999). Quantitative determination of Ca²⁺ effects on endotoxin removal and protein yield in a two-stage ultrafiltration process. *Separation science and technology*, 34(9), 1729-1741.

Li, Q. Z., Jiang, X. L., Feng, X. J., Wang, J. M., Sun, C., Zhang, H. B., Xian, M. & Liu, H. Z. (2016). Recovery processes of organic acids from fermentation broths in the biomass-based industry. *J Microbiol Biotechnol*, 26(1), 1-8.

Liu, X., Chung, Y. K., Yang, S. T., & Yousef, A. E. (2005). Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochemistry*, 40(1), 13-24.

Liu, J., Dantoft, S. H., Würtz, A., Jensen, P. R., & Solem, C. (2016). A novel cell factory for efficient production of ethanol from dairy waste. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 33.

Ludwig, R., Ozga, M., Zámocky, M., Peterbauer, C., Kulbe, K. D., & Haltrich, D. (2004). Continuous enzymatic regeneration of electron acceptors used by flavoenzymes: cellobiose dehydrogenase-catalyzed production of lactobionic acid as an example. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22(2), 97-104.

Macedo, M. G., Lacroix, C., & Champagne, C. P. (2002a). Combined Effects of Temperature and Medium Composition on Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in a Whey Permeate Based Medium. *Biotechnology progress*, 18(2), 167-173.

Macedo, M. G., Lacroix, C., Gardner, N. J., & Champagne, C. P. (2002b). Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal*, 12(5), 419-426.

Magariello, E. R. (1956). U.S. Patent No. 2,746,916. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- Maischberger, T., Nguyen, T. H., Sukyai, P., Kittl, R., Riva, S., Ludwig, R., & Haltrich, D. (2008). Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. *Carbohydrate research*, 343(12), 2140-2147.
- Malvessi, E., Carra, S., Pasquali, F. C., Kern, D. B., Da Silveira, M. M., & Ayub, M. A. Z. (2013). Production of organic acids by periplasmic enzymes present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 40(1), 1-10.
- Min, D. J., Choi, K. H., Chang, Y. K., & Kim, J. H. (2011). Effect of operating parameters on precipitation for recovery of lactic acid from calcium lactate fermentation broth. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28(10), 1969-1974.
- Murakami, H., Seko, A., Azumi, M., Ueshima, N., Yoshizumi, H., Nakano, H., & Kitahata, S. (2003). Fermentative production of lactobionic acid by *Burkholderia cepacia*. *Journal of Applied Glycoscience*, 50(2), 117-120.
- Murakami, H., Seko, A., Azumi, M., Kiso T., Kiryu, T., Kitahata, S., Shimada, Y., Nakano, H. (2006). Microbial conversion of lactose to lactobionic acid by resting cells of *Burkholderia cepacia*. *Journal of Applied Glycoscience*, 53, 7-11.
- Murzina, E. V., Tokarev, A. V., Kordás, K., Karhu, H., Mikkola, J. P., & Murzin, D. Y. (2008). D-lactose oxidation over gold catalysts. *Catalysis Today*, 131(1-4), 385-392.
- Nadal, I., Rico, J., Pérez-Martínez, G., Yebra, M. J., & Monedero, V. (2009). Diacetyl and acetoin production from whey permeate using engineered *Lactobacillus casei*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(9), 1233-1237.
- Nath, A., Verasztó, B., Basak, S., Koris, A., Kovács, Z., & Vatai, G. (2016). Synthesis of lactose-derived nutraceuticals from dairy waste whey—a review. *Food and bioprocess technology*, 9(1), 16-48.
- Nordkvist, M., Nielsen, P. M., & Villadsen, J. (2007). Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. *Biotechnology and bioengineering*, 97(4), 694-707.

- Oe, K., Nishikawa, Y., Kimura, T., Kiryu, K., Kiso, T., Murakami, H., & Nakano, H. (2008). Oxidation of lactose to lactobionic acid by acetic acid bacteria. In *Presentation at the 2nd International Conference on Acetic Acid Bacteria*.
- Pandey, A., Larroche, C., Soccol, CR., Dussap, CG. (2008). Advances in Fermentation Technology. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc. Chapter 7. Bioreactors: Functions in fermentation processes, p. 172-201.
- Patel, S. R., & Murthy, Z. P. (2011). Waste valorization: Recovery of lactose from partially deproteinated whey by using acetone as anti-solvent. *Dairy science & technology*, 91(1), 53-63.
- Pazouki, M., & Panda, T. (1998). Recovery of citric acid—a review. *Bioprocess Engineering*, 19(6), 435-439.
- Pedruzzi, I., da Silva, E. A. B., & Rodrigues, A. E. (2011). Production of lactobionic acid and sorbitol from lactose/fructose substrate using GFOR/GL enzymes from *Zymomonas mobilis* cells: a kinetic study. *Enzyme and microbial technology*, 49(2), 183-191.
- Pollard, D. J., & Woodley, J. M. (2007). Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *TRENDS in Biotechnology*, 25(2), 66-73.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48-68.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., & Larroche, C. (2006). Gluconic acid: Properties, applications and microbial production. *Food Technology & Biotechnology*, 44(2).
- Rosenfeld, Y., & Shai, Y. (2006). Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1513-1522.
- Saarela, M., Hallamaa, K., Mattila-Sandholm, T., & Mättö, J. (2003). The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *International Dairy Journal*, 13(4), 291-302.

Satory, M., Furlinger, M., Haltrich, D., Kulbe, K. D., Pittner, F., & Nidetzky, B. (1997). Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnology Letters*, 19(12), 1205-1208.

Schaafsma, G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18(5), 458-465.

Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—from ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal*, 18(7), 695-704.

Splechna, B., Petzelbauer, I., Baminger, U., Haltrich, D., Kulbe, K. D., & Nidetzky, B. (2001). Production of a lactose-free galacto-oligosaccharide mixture by using selective enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(6-7), 434-440.

Van Hecke, W., Bhagwat, A., Ludwig, R., Dewulf, J., Haltrich, D., & Van Langenhove, H. (2009a). Kinetic modeling of a bi-enzymatic system for efficient conversion of lactose to lactobionic acid. *Biotechnology and bioengineering*, 102(5), 1475-1482.

Van Hecke, W., Ludwig, R., Dewulf, J., Auly, M., Messiaen, T., Haltrich, D., & Van Langenhove, H. (2009b). Bubble-free oxygenation of a bi-enzymatic system: effect on biocatalyst stability. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), 122-131.

Van Hecke, W., Haltrich, D., Frahm, B., Brod, H., Dewulf, J., Van Langenhove, H., & Ludwig, R. (2011). A biocatalytic cascade reaction sensitive to the gas-liquid interface: Modeling and upscaling in a dynamic membrane aeration reactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(2), 154-161.

Veeravalli, S. S., & Mathews, A. P. (2018). Exploitation of acid-tolerant microbial species for the utilization of low-cost whey in the production of acetic acid and propylene glycol. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(18), 8023-8033.

Walsh, G. (2014) *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*, 2nd edn. Wiley & Sons, London

Warowna, M., Kręcisz, B., Sobolewska-Samorek, A., Hordyjewska, A. (2018) The role and action of lactobionic acid in the course of selected skin

diseases. Kosmetologia Estetyczna 6:651–666

<https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-guides/lyophilization-parenteral-793> (12/06/19)

<https://www.spscientific.com/freeze-drying-lyophilization-basics/> (12/06/19)

<https://phenomenex.blog/2017/12/18/que-es-la-hplc/> (12/06/19)

<https://www.quiminet.com/articulos/el-uso-de-los-rotavapores-en-los-laboratorios-2648877.htm> (17/06/19)

<http://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/laboratory/rotavap.pdf> (17/06/19)

<http://www.chem.ucla.edu/~bacher/Specialtopics/rotavap.html> (17/06/19)

<http://www.mclmicro.com/es/servicios/prueba-de-deteccion-de-endotoxina-bacteriana-lal-bet/> (18/06/19)

<https://www.wakopyrostar.com/blog-es/post/donde-y-por-que-se-realiza-la-prueba-lal/> (18/06/19)

<https://www.alfa.com/es/catalog/J66368/> (06/07/19)

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=Lactobionic+acid&interface=Product%20Name&N=0+&mode=mode%20matchpartialmax&lang=es®ion=ES&focus=productN=0%20220003048%20219853286%20219853112> (06/07/19)

<https://www.fishersci.se/shop/products/lactobionic-acid-97-acros-organics-2/p-152971> (06/07/19)

[https://www.carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/\(w-productdisplay\)/E250D101E9450AAD80256DF8005B3722](https://www.carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/(w-productdisplay)/E250D101E9450AAD80256DF8005B3722) (06/07/19)

[https://www.carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/\(w-productdisplay\)/CA7505C7D270D77180257A3D003AE8F3](https://www.carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/(w-productdisplay)/CA7505C7D270D77180257A3D003AE8F3) (10/07/19)

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/I3375?lang=es®ion=ES> (10/07/19)

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/21190?lang=es®ion=ES>

(10/07/19)

<https://www.scbt.com/scbt/product/calcium-lactobionate-monohydrate-110638-68-1>

(10/07/19)