

**Yanira Sánchez G. y Néstor Gutiérrez M.**Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas,  
Chihuahua, México.

## Resumen

---

Los hidratos de carbono representan un cinco por ciento de la composición de la leche. El azúcar mayoritario de la leche es la lactosa, disacárido formado por galactosa y glucosa. Al ser un azúcar exclusivo de la leche, los mamíferos (principalmente los neonatos) cuentan con la enzima  $\beta$ -galactosidasa, que es capaz de hidrolizar la lactosa para poder ser metabolizada. Sin embargo, con la edad se pueden observar deficiencias en la producción de  $\beta$ -galactosidasa. La intolerancia a la lactosa ha motivado el desarrollo de procesos para obtener productos deslactosados o aptos para personas intolerantes. Por otra parte, las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos no patógenos que presentan una alta eficiencia para metabolizar la lactosa. Las BAL se utilizan en la manufactura de productos lácteos fermentados como el yogurt, mantequilla y una amplia variedad de quesos. La lactosa y sus derivados se utilizan también como ingredientes en productos alimenticios y farmacéuticos. La principal fuente de recuperación de la lactosa es el lactosuero, el cual es un subproducto de la manufactura de queso y algunas leches fermentadas. El principal método de recuperación es por evaporación del agua del lactosuero para concentrar la lactosa y promover su cristalización. En este capítulo se abordan los principales conceptos de la lactosa, así como algunos aspectos tecnológicos.

### Palabras claves:

Lactosa, leche deslactosada, cristalización.

## 1. Introducción

---

La principal función de la leche es la de alimentar a los mamíferos neonatos. La composición de la leche varía de forma importante entre especies, principalmente porque los requerimientos nutricionales de los recién nacidos son diferentes en cada especie. La composición de la leche de bovino también puede variar, dependien-

do de factores como la raza del animal, su alimentación, edad, etc. La composición promedio de la leche de bovino es mayoritariamente agua (85,3-88,7%). El contenido de grasa y proteína representa solo de 2 a 5% de la composición (2,5-5,5% y 2,3-4,4% respectivamente). El caso de la lactosa es similar, ya que este azúcar se encuentra en una concentración de 3,8-5,3%. El contenido de minerales, aunque es importante desde el punto de vista de la nutrición, solo representa el

0,57-0,83% de la composición de la leche [1].

La lactosa es un azúcar exclusivo de la leche de mamíferos. En los productos fermentados como el yogurt y algunos quesos, la lactosa es convertida en ácido láctico por diversos tipos de bacterias. En las leches fermentadas la lactosa es fermentada casi en su totalidad. Sin embargo, en muchos quesos una fracción de lactosa no es fermentada y permanece soluble en el lactosuero, el cual es un subproducto de la manufactura de queso. De hecho, el lactosuero es una de las principales fuentes desde donde se recupera la lactosa, la misma que posteriormente se utiliza como ingrediente en la industria alimenticia y farmacéutica. El uso de la lactosa en la industria alimentaria es muy variado. Por ejemplo, se utiliza en el café instantáneo para mejorar su solubilidad. Se utiliza en la manufactura de fórmulas infantiles para igualar el contenido de lactosa de la leche de humano (7%). En alimentos horneados, la lactosa se utiliza para endulzar y generar cortezas doradas al promover la reacción de Maillard. En la industria farmacéutica la lactosa se usa como excipiente para tabletas e inhaladores de polvo seco [2].

Se estima que al año son producidos más de 80 millones de litros de lactosuero alrededor del mundo [2]. La mayoría de las pequeñas empresas lácteas disponen del lactosuero en aguas residuales municipales, ríos, lagos o utilizan este subproducto como fertilizante y alimento para animales [3,4]. La eliminación del suero de queso en cuerpos de agua y tierras produce graves problemas ambientales, por lo que se buscan alternativas para el uso de suero. Típicamente el suero contiene aproximadamente 4,6% de lactosa, 0,8% de proteína y 0,6% de grasa [5]. Sin embargo, la recuperación de lactosa del lactosuero es un proceso largo y costoso. El principal método de recuperación de la lactosa es promoviendo su cristalización, para posteriormente separarla por centrifugación. No obstante, este proceso aún no es completamente entendido y frecuentemente se obtienen cristales con una distribución de tamaño muy heterogénea, bajos rendimientos

de cristalización y cristales de baja pureza [6]. A lo largo de este capítulo se discute el conocimiento actual acerca de los carbohidratos presentes en la leche, principalmente de la lactosa, sus propiedades fisicoquímicas, la recuperación a partir de suero de queso, usos en la industria, así como la producción de la denominada leche deslactosada.

## 2. Hidratos de carbono presentes en la leche

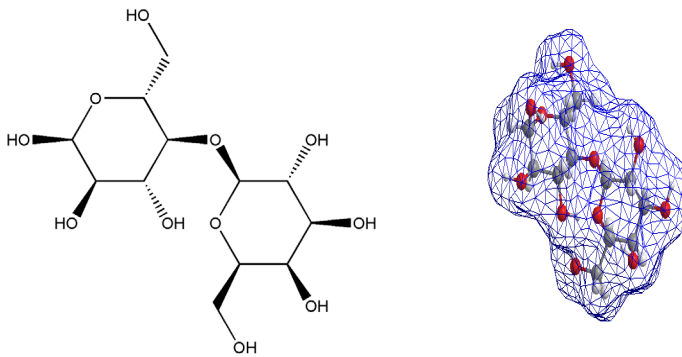
Los carbohidratos son los principales constituyentes de la leche, junto a las proteínas y lípidos, formando la mayoría de la materia seca [7]. Los monosacáridos libres en la leche están dominados por glucosa y galactosa, aunque se reconocen otros monosacáridos. La concentración de glucosa libre en la leche de vaca es insignificante en comparación con los oligosacáridos y normalmente se considera inferior a 1 mmol/L [7]. Otros carbohidratos menores como los oligosacáridos, glucopéptidos, glucoproteínas y azúcares de nucleótidos también se encuentran en la leche en cantidades muy pequeñas [8]. Entre los sacáridos de la leche, la lactosa es el componente principal [9].

### 2.1. Lactosa

La lactosa es el mayor carbohidrato de la leche y su concentración puede variar de 0 a 10% p/p [9]. Este azúcar es un disacárido que contiene una molécula de D-glucosa y una de D-galactosa, las cuales se encuentran unidas mediante un enlace glicosídico  $\beta$ -1,4 en el grupo aldehído de la galactosa [10]. Ambos monosacáridos se encuentran en la forma de anillo piranoso. La lactosa es un azúcar reductor debido a que el grupo aldehído del residuo de glucosa se encuentra libre, por lo que puede actuar como un donador de iones  $H^+$  (Figura 1) [11]. Este carbohidrato puede estar presente en cualquiera de sus dos estereoi-

sómeros:  $\alpha$  y  $\beta$  (**Tabla 1**) [10]. En solución, la lactosa se abre y vuelve a formar la estructura del anillo que intercambia isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  (mutarrota-ción). El equilibrio de mutarrota-ción de la lactosa a 20°C se alcanza cuando la relación de isómeros  $\beta / \alpha$  es de 1,70 (63:37), aunque esta proporción es altamente dependiente de la temperatura. En equilibrio, la forma  $\beta$  del isómero es más abundante y más soluble (500 g L<sup>-1</sup>) que el isómero  $\alpha$ -lactosa (70 g L<sup>-1</sup>) [9]. Por lo tanto, la  $\alpha$ -lactosa

suele cristalizar en algunos productos lácteos. Por lo tanto, el isómero  $\alpha$  cristalizará primero en una solución sobresaturada de lactosa, como un suero de queso concentrado. Estos cristales son rígidos, ligeramente higroscópicos, muy grandes y se disuelven lentamente [11]. Mientras que la  $\beta$ -lactosa forma cristales anhidros, por lo que el rendimiento de  $\alpha$ -lactosa es ~5% mayor que el de  $\beta$ -lactosa.



**Figura 1.** Estructura bidimensional y tridimensional de la alfa-lactosa.

Cristalina	Monohidratada	$\alpha$ -Lactosa
	Anhidra	$\alpha$ -Lactosa inestable
		$\alpha$ -Lactosa estable
		$\beta$ -Lactosa
Amorfa		Mezcla de $\beta$ -Lactosa y $\alpha$ -Lactosa

**Tabla 1.** Formas conocidas de lactosa [10].

## 2.2. Cristalización de la lactosa

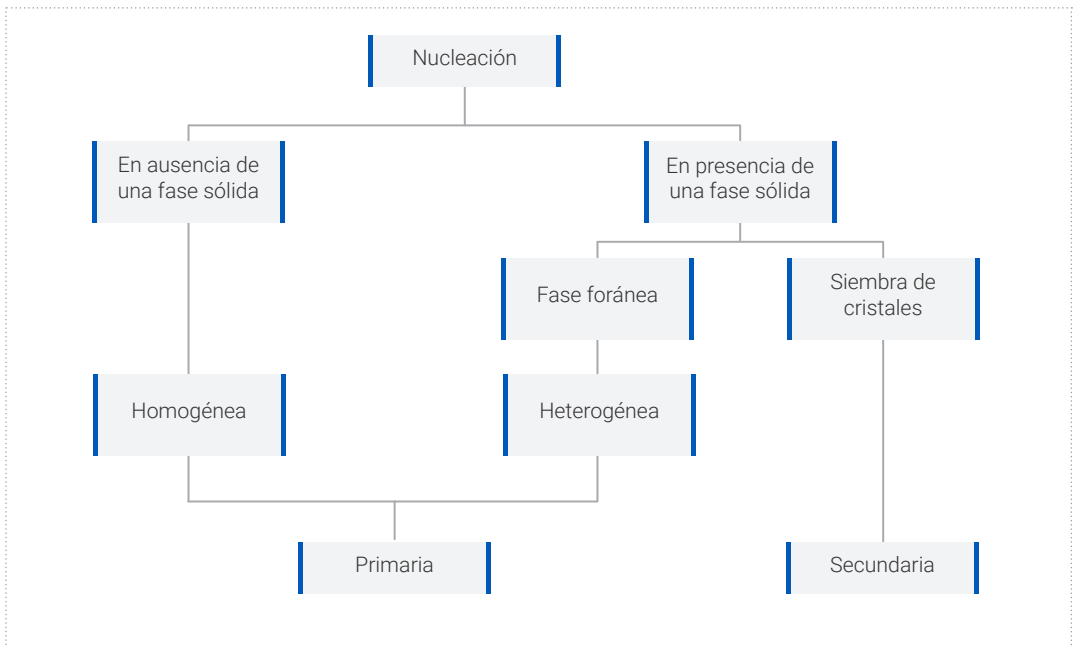
La cristalización de la lactosa es un proceso industrial importante y paso final de una serie de operaciones a partir de suero de queso. Consiste en tres fases: la sobresaturación, la nucleación (aparición de los cristales) y por último, el crecimiento de los cristales [12]. La lactosa puede existir en varias formas cristalinas y no crista-

linas (**Tabla 1**). Estas formas afectan el comportamiento de la lactosa, principalmente en el procesamiento y almacenamiento de productos derivados de dicho disacárido [9].

La sobresaturación de soluciones de lactosa es el primer paso en el proceso de cristalización ya que se requiere una condición de no equilibrio para la generación espontánea de núcleos de lactosa [13]. A cualquier temperatura dada, se

puede disolver una cantidad máxima de soluto en un solvente. Cuando una solución se satura con un soluto, se considera que está en equilibrio termodinámico. Cualquier incremento adicional en la concentración por encima del punto de saturación (solubilidad) perturba el equilibrio e induce un estado de pseudoequilibrio o supersaturación. La nucleación y, por lo tanto, la cristalización no se producirá en un punto fuera de la supersaturación (al menos no espontáneamente) ya que la energía disponible es insuficiente para inducir la formación del núcleo. Sin embargo, más allá del estado de pseudo-equilibrio (zona lábil), la nucleación tiene lugar espontáneamente. La región entre la solubilidad y la súper solubilidad (supersaturación) se conoce como la zona metaestable (MZ). El ancho de esta región (MZW) se obtiene representando la solubilidad y la súper-solubilidad del soluto en función de la temperatura. A partir de estas curvas es posible establecer la temperatura y la concentración de solutos requeridas en un proceso de cristalización [4,14]. El proceso convencional de cristalización de lactosa tiene un amplio MZW, lo que significa que es necesaria una sobresaturación muy alta para inducir la nucleación [15,16].

El proceso de cristalización consta de dos fases: la primera es la formación de soluciones sobresaturadas, debido a que la aparición de una nueva fase se da cuando el sistema no está en equilibrio. La segunda fase consta de la agregación de las moléculas disueltas en la solución, lo que provoca la consecuente nucleación, la cual es la base de la cristalización [13]. La nucleación es, por lo tanto, la creación de conjuntos de nuevas moléculas [17] y, a su vez, la velocidad de nucleación puede definirse como el cambio en el número de partículas en el tiempo [18]. Existen dos tipos de nucleación: nucleación primaria y nucleación secundaria (**Figura 2**). La primera ocurre cuando un cristal es nucleado en una solución sin cristales pre-existentes, si la nucleación se realiza en una solución sin fases sólidas es denominada nucleación homogénea. En cambio, si en la creación de los cristales está involucrada una fase sólida diferente a la de la solución, se trata de una nucleación heterogénea. Finalmente, la nucleación secundaria es la inducción de la cristalización a partir de un cristal pre-existente, actuando como bases para la creación de nuevos cristales [19].



El crecimiento de cristales de lactosa está controlado por varios factores, pero la variable clave que determina la tasa de nucleación es la sobresaturación [17]. Si la nucleación es rápida, muchos cristales se forman simultáneamente y crecerán hasta tamaños aproximadamente idénticos. Por el contrario, si la nucleación es lenta y se cristalizan menos cristales a la vez, la sobresaturación en la solución disminuye lentamente, la nucleación de nuevos cristales continúa y la solución presenta una distribución de tamaños de cristal más amplia (CSD) [20]. Otras variables que afectan el crecimiento del cristal son la temperatura, la viscosidad, el pH, la presencia de sales y las proteínas de suero, que modifican los niveles de sobresaturación y, en consecuencia, la nucleación y el crecimiento del cristal [21-23].

### 2.3. Recuperación de la lactosa a partir de suero de queso

La lactosa puede ser recuperada a partir del suero de queso. El suero de queso es el principal subproducto de la industria láctea y se crea como resultado del procesamiento del queso tras la coagulación de las proteínas [24]. El proceso de recuperación de lactosa es largo y costoso, que consta de varias etapas. El suero de queso, que comienza con un porcentaje de sólidos de aproximadamente 6%, es centrifugado para la remoción de grasa [25]. Luego, se procede a la desproteínización por medio de ultrafiltración o precipitación ácida (siendo esta última la más fácil y barata), en la cual permanece un remanente de proteína de 0,1 a 0,2% [21,26]. Se ha reportado que incluso esta concentración de proteína puede reducir la pureza de los cristales de lactosa [27]. Finalmente, si el suero desproteínizado no se evapora inmediatamente, se debe pasteurizar para evitar la fermentación de la lactosa por parte de microorganismos [2].

El suero clarificado, desgrasado y desproteínizado se traslada a los evaporadores para su concentración. La evaporación se realiza bajo presión reducida en evaporadores de película

descendente (efecto simple y múltiple), lo que permite la concentración de sólidos totales en el suero en casi diez veces (factor de concentración  $Q = 9,5$ ). A través del índice de refracción " $n$ " se puede monitorear el contenido de materia seca en el suero durante todo el proceso de evaporación. Es necesario un porcentaje de sólidos muy alto, que va del 40 al 65% de la materia seca, debido a que para comenzar el proceso de cristalización de lactosa es necesario que se encuentre en un punto de sobresaturación. La temperatura del concentrado final es de  $\sim 60^\circ\text{C}$ , y el contenido de lactosa varía de 39 a 56%, pero la lactosa no cristalizará debido a que la temperatura aún es muy alta [3,26,28,29].

El concentrado de suero (aún caliente) se transfiere a un gran tanque agitado donde se enfría lo suficientemente rápido como para inducir la cristalización de la lactosa. Una vez en el cristizador, el suero primero se enfría rápidamente de 60 a  $30^\circ\text{C}$  y luego lentamente de 30 a  $20\text{-}25^\circ\text{C}$  ( $1\text{-}3^\circ\text{C h}^{-1}$ ) [14,23,29]. La fase de cristalización de lactosa provee de una lactosa de muy baja calidad y los rendimientos de cristalización son escasos. Uno de los métodos más antiguos utilizados para mejorar el proceso de cristalización es la siembra de lactosa. Este enfoque consiste en la adición de pequeños cristales de lactosa en el suero concentrado (siembra de núcleos) justo antes de la segunda etapa de enfriamiento. La adición de cristales de lactosa puede inducir una nucleación secundaria que acelera el proceso de cristalización y reduce la CSD [4]. Sin embargo, este método tiene baja reproducibilidad porque su éxito depende de la adición de cristales en el momento adecuado [19].

Asimismo, se ha estudiado la adición de anti-solvente para la modificación del proceso de cristalización de lactosa. La adición de compuestos no disolventes en el suero concentrado (cristalización con anti-solvente) disminuye la solubilidad de la lactosa, estrecha la zona metaestable y reduce los tiempos de inducción de la nucleación [27]. Los principales inconvenientes de la cristalización con anti-solvente son las grandes

cantidades de disolvente utilizado y los costosos pasos de separación y purificación requeridos para eliminar estos compuestos del producto. En general, la cristalización con anti-solventes mejora el rendimiento de la cristalización y reduce el tamaño de los cristales de lactosa [4,30-32].

Más recientemente se han explorado métodos alternativos tales como la adición de carragenina o sonocristalización para modificar la cristalización de la lactosa [27]. En cuanto a la adición de carragenina, se ha reportado que presenta un impacto favorable para la mejora de la cristalización de la lactosa. Acelera la velocidad de cristalización de 0,19 to 1,61 cristales mL h<sup>-1</sup>, aumenta el rendimiento del proceso y disminuye la formación de lactosa amorfa [27]. Por otro lado, la cristalización de la lactosa asistida por ultrasonido (sonocristalización) se ha utilizado con éxito para reducir la distribución del tamaño de los cristales de lactosa y aumentar el rendimiento de la cristalización [33]. También se ha establecido que el ultrasonido favorece la formación de sobresaturación, reduce la zona metaestable de la lactosa y tiene un impacto positivo en la mejora de la nucleación [34]. Sin embargo, el efecto de la aplicación de ultrasonido sobre el proceso de cristalización de lactosa aún no se encuentra bien establecido.

#### 2.4. Usos de la lactosa

La lactosa cristalizada es producida en grandes cantidades y puede ser utilizada por la industria alimenticia como materia prima para la producción de derivados químicos o enzimáticos como lactitol, lactulosa y oligosacáridos [11]. Este carbohidrato también puede usarse como fuente de carbono para la producción de bacterias ácido lácticas (LAB) o la producción de ácido láctico [9]. En la industria farmacéutica, la lactosa se utiliza como excipiente de medicamentos [35]. La lactosa posee la ventaja de tener una superficie lisa y un mejor flujo, por lo que mejora la administración de los fármacos a las vías respiratorias inferiores a partir de inhaladores de

polvo seco. Este tipo de sistema de administración de fármacos necesita excipientes con una distribución de tamaño de partícula estrecho con una forma regular y una alta pureza de los cristales [35].

### 3. Leche deslactosada

La mala absorción de lactosa es una condición muy común caracterizada por la deficiencia de la lactasa, una enzima que se encuentra en la membrana del borde en cepillo de la mucosa intestinal que hidroliza la lactosa a sus componentes galactosa y glucosa [36]. Una estrategia para tratar la intolerancia a la lactosa es restringir productos lácteos que contienen lactosa, sin embargo, el consumo de calcio se ve afectado. Por esta razón, se han desarrollado productos comerciales que incluyen productos y suplementos de lactasa tomados en el momento de la ingestión de leche, que reducen la lactosa [37]. La prevalencia de intolerancia primaria a la lactosa en los Estados Unidos de América es del 95% al 100% de los indoamericanos, del 80% al 90% de los afroamericanos, asiáticos, mediterráneos y judíos; y 50% de las personas de ascendencia del norte y centro de Europa [38]. A continuación, se describen algunas técnicas utilizadas en la industria láctea para la formulación de productos reducidos en lactosa, así como alternativas de producción que han sido recientemente probadas.

#### 3.1. Hidrólisis de la lactosa con enzimas solubles.

La industria láctea es uno de los mercados más grandes para la aplicación comercial de enzimas y una de las más utilizadas es la denominada  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ G) [39]. También conocida como lactasa ( $\beta$ -D-galactosidasa;  $\beta$ -D-galactósido galactohidrolasa, E.C. 3.2.1.23) es una enzima que está ampliamente distribuida en la naturaleza y puede aislarse de diferentes

fuentes como plantas (almendras, duraznos, albaricoques, manzanas), órganos animales, levaduras, bacterias y hongos [40]. Sin embargo, las  $\beta$ G microbianas son las más utilizadas debido a que son tecnológicamente relevantes, y pueden producirse a bajo costo en una operación intensiva de fermentación con alto rendimiento y productividad [41].

El tratamiento de la leche y productos derivados de ésta con la  $\beta$ G reduce el contenido de lactosa, por lo que pueden ser utilizados sin problema por personas que son intolerantes a la lactosa [42]. Varios autores han estudiado el mecanismo de hidrólisis enzimática de la lactosa por la  $\beta$ -galactosidasa aplicada a diferentes sustratos (soluciones de lactosa, suero y leche descremada) en diferentes condiciones experimentales [41,43].

### 3.2 Hidrólisis ácida de la lactosa

El uso de la técnica de hidrólisis de lactosa es viable solo en materia prima libre de proteínas como el filtrado de leche o suero de ultrafiltración (UF) [44]. Por su parte, el ajuste del pH puede realizarse mediante la adición directa de ácido o mediante el tratamiento de permeado con una resina de intercambio iónico. Por lo general, el pH se ajusta a 1,2 y la temperatura a 150°C durante un período corto. El producto hidrolizado es marrón y requiere neutralización, desmineralización y decoloración antes de su uso. La corrosividad de las condiciones es un importante desafío de diseño de ingeniería en este proceso [44]. Es un proceso que representa un costo menor al tratamiento por medio de  $\beta$ -galactosidasas [45].

### 3.3 Sistemas con $\beta$ -galactosidasa inmovilizada

Como se mencionó previamente, el uso de  $\beta$ -galactosidasas de origen microbiano es una de las aplicaciones biotecnológicas más prometedoras en la industria láctea para la producción de alimentos bajos en lactosa y la hidrólisis de

suero [41]. Sin embargo, las aplicaciones industriales de los procesos para la hidrólisis enzimática de la lactosa están restringidas porque la enzima es intracelular, lo que hace que genere pasos extras de extracción lo que provoca que esta sea una técnica difícil y costosa. Por lo tanto, el uso de células permeabilizadas es una alternativa interesante que merece una mayor exploración [38]. Al respecto, se ha reportado que tras la hidrólisis de la lactosa, la enzima es inhibida por sus productos de reacción glucosa y galactosa promoviendo una inhibición competitiva en el caso de la galactosa y una no competitiva en el caso de la glucosa. Recientemente se ha demostrado que la inmovilización de la lactasa de *Thermus sp.* la cepa T2 promueve algunas alteraciones de la estructura de la enzima que reducen la inhibición competitiva, al afectar la adsorción del inhibidor más que la adsorción del sustrato [46]. Por lo tanto, comprobaron que la utilización de enzimas inmovilizadas no solo mejora la estabilidad enzimática, sino que también mejora el rendimiento del biocatalizador en la reacción al alterar los parámetros cinéticos de la enzima. Por su parte, Mateo y cols. 2004, probaron distintos métodos de inmovilización, encontrando que esta técnica es más adecuada para inhibir la inhibición alostérica que se da tradicionalmente [47].

La permeabilización e inmovilización de células microbianas que contienen  $\beta$ -galactosidasa es un enfoque interesante para reducir los costos de purificación de la enzima y, por lo tanto, proporcionar una fuente de enzima más económica. Esta área fue estudiada por Panesar y cols. 2006, las células permeabilizadas aumentan la difusión de la lactosa en las células y, por lo tanto, mejorarán la eficiencia de las células inmovilizadas [38]. El uso de células inmovilizadas puede ayudar a superar los problemas/costos asociados con la extracción y purificación de enzimas de las células de levadura y puede resultar en el desarrollo de una tecnología de bajo costo para la hidrólisis de lactosa [38].

## 4. Conclusión

La lactosa es un compuesto importante desde el punto de vista de nutrición, pero también como ingrediente en la industria farmacéutica. Sin embargo, aún existen muchos aspectos tecnológicos y de las propiedades químicas de la lactosa que no se conocen por completo. Por otro lado, debido a la creciente necesidad y demanda de la población por el uso de productos lácteos deslactosados o bajos en lactosa, las implementaciones de técnicas para la hidrólisis de lactosa han sido estudiadas. La inhibición que se presenta por la glucosa sobre la  $\beta$ -galactosidasa es un problema importante en la hidrólisis completa de la lactosa contenida en los productos lácteos. Es por esto que se han estudiado alternativas a este procesamiento como la hidrólisis ácida y los sistemas con  $\beta$ G inmovilizada. A pesar de esto, es un proceso que aún no se ha aplicado completamente y es necesaria más investigación en el campo.

## Referencias

- Walstra, P.W., y cols. Dairy Science and Technology Second ed, ed. C. Press. 2006.
- Sánchez-García, y cols. Sonocrystallization of lactose from whey, in Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing, INTECH, Editor. 2018. p. 51-71.
- Patel, S.R. y Z.V.P. Murthy, Lactose Recovery Processes from Whey: A Comparative Study Based on Sonocrystallization. Separation & Purification Reviews. 2012;41:251-66.
- Zamanipoor, M.H. y and R.L. Mancera, The emerging application of ultrasound in lactose crystallization. Trends in Food Science & Technology 2014;38:47-59.
- Silva, A.N.d., y cols. Integrated production of whey protein concentrate and lactose derivatives: What is the best combination? Food Research International, 2015;73:62-74.
- Sánchez-García, Y.I., y cols. Sonocrystallization of lactose from whey, in Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing, N. Koca, Editor. 2018, IntechOpen: London. p. 51-69.
- Larsen, T., Fluorometric determination of free glucose and glucose 6-phosphate in cows' milk and other opaque matrices. Food Chem. 2015;166:283-6.
- Nagaraj, V. y cols. Advances in Fractionation and Analysis of Milk Carbohydrates. 2018.
- McSweeney, P.L.H., Fox, P. F., Lactose, Water, Salts, and Minor Constitutens., in Advanced Dairy Chemistry Springer, Editor. 2009: New York, E.U.A.
- Listiohadi, Y.D. y cols. Proprieties of Lactose and its caking behaviour. Australian Journal of Dairy Technology. 2005; 60: 33-52.
- Walstra, P. y cols. Dairy Science and Technology. Second ed. 2006, Boca Raton FL: CRC press.
- Zisu, B. y cols. Sonocrystallisation of lactose in concentrated whey. Ultrasonics Sonochemistry, 2014;21:2117-21.
- Erdemir, D. y cols. Nucleation of Crystals from Solution: Classical and Two-Step Models. Accounts of Chemical Research. 2009;42:621-29.
- Wong, S.Y. y R.W. Hartel. Crystallization in lactose refining-a review. J. Food Sci. 2014;79:R257-72.
- Dhumal, R.S. y cols. Ultrasound Assisted Engineering of Lactose Crystals. Pharmaceutical Research. 2008;25:2835-44.
- Raghavan, S.L. y cols. Morphology of Crystals of  $\alpha$ -Lactose Hydrate Grown from Aqueous Solution. The Journal of Physical Chemistry. 2000;104:12256-62.
- McLeod, J. y cols. Primary nucleation of alpha-lactose monohydrate: The effect of supersaturation and temperature. International Dairy Journal. 2011;21:455-61.
- Dincer, T.D. y cols. Crystal growth mechanisms of the (0 1 0) face of  $\alpha$ -lactose monohydrate crystals. Journal of Crystal Growth. 2009;311:2427-32.
- de Castro, M.D. y F. Priego-Capote. Ultrasound-assisted crystallization (sonocrystallization). Ultrasonics Sonochemistry. 2007;14:717-724.
- Vekilov, P.G. Nucleation. Crystal Growth & Design. 2010;10:5007-19.
- Bhargava, A., Jelen, P., Lactose Solubility and Crystal Growth as Affected by Mineral Impurities. Journal of Food Science. 1996;61:180-84.
- Huppertz, T. y I. Gazi, Lactose in dairy ingredients: Effect on processing and storage stability. Journal of Dairy Science. 2015;98:1-10.
- Pisponen, A. y cols. Effect of cooling rates and low crystallization temperatures on morphology of lactose crystals obtained from Ricotta cheese whey. Agronomy Research. 2014;12:787-92.
- Das, B. y cols. Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: A step towards green waste management. Process Safety and Environmental Protection. 2015.
- McSweeney, P.L. Cheese problems solved. 2007: Elsevier.
- Bund, R.K. y A.B. Pandit, Sonocrystallization: effect on lactose recovery and crystal habit. Ultrason Sonochem. 2007;14:143-52.



27. Sanchez-Garcia, Y.I. y cols., Ultrasound-assisted crystallization of lactose in the presence of whey proteins and kappa-carrageenan. *Ultrason Sonochem.* 2018;42:714-22.
28. Walstra, P. *Dairy technology: principles of milk properties and processes.* 1999: CRC Press.
29. Wong, S.Y. y cols. Designing a lactose crystallization process based on dynamic metastable limit. *Journal of Food Engineering.* 2012;111:642-54.
30. Patel, S. and Z. Murthy, Anti-solvent sonocrystallisation of lactose. *Chemical and Process Engineering.* 2011;32.
31. Patel, S.R. y Z.V.P. Murthy. Ultrasound assisted crystallization for the recovery of lactose in an anti-solvent acetone. *Crystal Research and Technology.* 2009;44:889-96.
32. Kougoulos, E. y cols. Lactose particle engineering: Influence of ultrasound and anti-solvent on crystal habit and particle size. *Journal of Crystal Growth.* 2010;312:3509-20.
33. Zisu, B., y cols. Sonocrystallisation of lactose in concentrated whey. *Ultrason Sonochem.* 2014;21:2117-21.
34. Dincer, T.D. y cols. Sonocrystallisation of lactose in an aqueous system. *International Dairy Journal.* 2014;35:43-8.
35. Patel, S.R. y Z.V.P. Murthy. Effect of process parameters on crystal size and morphology of lactose in ultrasound-assisted crystallization. *Crystal Research and Technology.* 2011.46:243-48.
36. Montalto, M. y cols. Management and treatment of lactose malabsorption. *World journal of gastroenterology: WJG.* 2006. 12:187-91.
37. Shaukat, A. y cols. Systematic review: effective management strategies for lactose intolerance. *Annals of Internal Medicine.* 2010;152:797-803.
38. Panesar, R. y cols. Hydrolysis of milk lactose in a packed bed reactor system using immobilized yeast cells. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* 2011;86:42-6.
39. Zolnere, K. y I. Ciprova, The comparison of commercially available  $\beta$ -galactosidases for dairy industry: review. 2017:215-22.
40. Richmond, M.L. y cols. Beta-galactosidase: review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. *Journal of Dairy Science.* 1981;64:1759-71.
41. Vera, C. y cols. Conventional and non-conventional applications of beta-galactosidases. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2020;1868:140271.
42. Furlan, S.A. y cols. Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of  $\beta$ -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters.* 2000;22:589-93.
43. Jurado, E. y cols. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a Beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology.* 2002;31:300-9.
44. Harju, M. y cols., Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal.* 2012;22:104-9.
45. Coté, A. y cols. Hydrolysis of lactose in whey permeate for subsequent fermentation to ethanol. *Journal of Dairy Science.* 2004;87:1608-20.
46. Pessela, B.C.C. y cols. The immobilization of a thermophilic  $\beta$ -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition. *Enzyme and Microbial Technology.* 2003;33:199-205.
47. Mateo, C. y cols. Immobilization of Lactase from *Kluyveromyces lactis* Greatly Reduces the Inhibition Promoted by Glucose. Full Hydrolysis of Lactose in Milk. *Biotechnology progress.* 2004;20:1259-62.