UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de un sistema multienzimático inmovilizado para la producción de galacto-oligosacáridos a partir de lactosuero

Daniel Oliveros Pineda

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá, Colombia
2024

Evaluación de un sistema multienzimático inmovilizado para la producción de galacto-oligosacáridos a partir de lactosuero

Daniel Oliveros Pineda

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Química

Director:

Dr. Ing. Juan Carlos Serrato Bermúdez

Bioprocesos

Grupo de investigación en procesos químicos y bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá, Colombia

2024

A la memoria de Héctor, presente e influyente. A Nohemy, de quien he aprendido que una buena vida parte de la nobleza del corazón.

A Luz Stella, cuya motivación, ejemplo y cariño siempre han sido alicientes fundamentales. Y a Álvaro, por su naturalidad, afecto y firmeza de convicciones.

A María Cristina, oportuna consejera para buenas dosis de autoestima y vocación de servicio. A Jorge Iván y Alba Luz, con su mirada optimista y sentido de lo trascendental.

A Andrés Felipe, mi querido hermano, por nuestra mutuo apoyo y comprensión holística del ser humano.

A Salomón y Miguel. En este viaje de la vida, colmado de luces y sombras, les aguardan incontables maravillas por descubrir y retos por afrontar.

A todos ellos deseo plenitud y felicidad.

Lo poco que sé, se lo debo a mi ignorancia.
(Aristocles-Platón)

Agradecimientos

Agradezco al profesor Juan Carlos Serrato por su valioso acompañamiento, orientación y disponibilidad. Sus observaciones y aportes enriquecieron notablemente el curso de esta investigación, en tanto su calidad humana y su confianza fomentaron un trabajo motivado y fluido.

A mis compañeros de posgrado: Oscar, Isabella, Juan Carlos, Laura y Juan Sebastián. Con su apoyo el desarrollo de la etapa experimental fue muy amena, demostrando también que la construcción de conocimiento es mucho más fructífera al compartir con buenos colegas, estimulando la cooperación y la creatividad. Gracias también a Valentina y Ángel, quienes se acercaron al mundo de la investigación con este trabajo.

A la Universidad Nacional de Colombia, que permitió mi formación investigativa mediante una beca de posgrado y financió el proyecto mediante la *Convocatoria Nacional para el fortalecimiento de la formación a través del apoyo a proyectos de investigación, creación artística o innovación 2022-2024.* Este soporte ha sido esencial para fortalecer mi proyecto de vida.

Particularmente, agradezco al Departamento de Ingeniería Química y Ambiental y al personal del Laboratorio de Ingeniería Química, por su vocación de servicio y colaboración en la fase experimental.

Gracias a mi familia por su apoyo y afecto genuino, de quienes en buena medida soy el resultado. Y gracias a Dios, la Vida, que me permite seguir adquiriendo conocimientos y habilidades y posibilita ponerlos al servicio de la sociedad y del mundo.

Resumen

Evaluación de un sistema multienzimático inmovilizado para la producción de galacto-oligosacáridos a partir de lactosuero

El lactosuero es un subproducto de la industria láctea que, debido a su elevada carga orgánica, puede emplearse como materia prima para la obtención de sustancias de alto valor agregado. En este trabajo se aprovechó su contenido de lactosa para la síntesis enzimática de galacto-oligosacáridos (GOS), compuestos prebióticos destinados al mercado de alimentos funcionales.

La síntesis de los GOS se realizó con β-galactosidasas aisladas de *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*; ésta es de naturaleza reversible y se inhibe por la acumulación de glucosa en el medio. Para reducir dicha inhibición se evaluó la adición de glucosa oxidasa (GOx), logrando un menor contenido final de monosacáridos, la obtención de ácido glucónico y un rendimiento incrementado de prebióticos, que alcanzó los 128 g/L.

Considerando el alto costo que representan estos catalizadores respecto al lactosuero, también se estudiaron métodos de inmovilización mono y multienzimáticos con el fin de reutilizarlos en múltiples ciclos de reacción. Para esto, se evaluó el atrapamiento en esferas de alginato y la formación de agregados enzimáticos entrecruzados. La inmovilización individual de β-gal por entrecruzamiento redujo el rendimiento de GOS a 22.8% (91 g/L), pero permitió su uso por 20 veces sin una degradación considerable de las enzimas.

Por otra parte, los sistemas multienzimáticos co-inmovilizados aumentaron el rendimiento hasta en un 36%, consiguiendo 125 g_{GOS}/L en el primer uso. De igual forma, generaron concentraciones de prebióticos superiores a los sistemas monoenzimáticos hasta por 13 ciclos de reacción, aunque con menor estabilidad en usos posteriores.

Palabras clave: Galacto-oligosacáridos, beta-galactosidasa, glucosa oxidasa, agregados enzimáticos, ácido glucónico, inmovilización enzimática, lactosuero.

Abstract

Evaluation of an immobilized multienzyme system for the production of galacto-oligosaccharides (GOS) from whey.

Whey is a by-product of the dairy industry that, due to its high organic load, can be used as a raw material for obtaining high value-added substances. In this work, its lactose content was used for the enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides (GOS), prebiotic compounds targeted to the functional food market.

The synthesis of GOS was carried out with β-galactosidases isolated from *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*; this is a reversible process and is inhibited by the accumulation of glucose in the medium. To reduce such inhibition, the addition of glucose oxidase (Gox) was evaluated, achieving a lower final content of monosaccharides, obtaining gluconic acid and an increased yield of prebiotics, which reached 128 g/L.

Considering the high cost of these catalysts compared to whey, mono- and multi-enzymatic immobilization methods were also evaluated, in order to reuse them in multiple reaction cycles. For this purpose, the entrapment in alginate spheres and the formation of cross-linked enzyme aggregates were evaluated. Individual immobilization of β-gal by crosslinking reduced the yield of GOS to 22.8% (91 g/L), but allowed its use for 20 times without considerable enzyme degradation.

On the other hand, co-immobilized multienzyme systems (β-gal+Gox) increased the yield by up to 36%, achieving 125 gGOS/L on the first use. Furthermore, they generated higher concentrations of prebiotics compared to the mono-enzymatic systems for up to 13 reaction cycles, although with lower stability in subsequent uses.

Key words: Galacto-oligosaccharides, beta-galactosidase, glucose oxidase, enzyme aggregates, gluconic acid, enzyme immobilization, whey.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XIII**

Lista de tablas ..... **XV**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XVI**

Introducción **1**

1. Revisión bibliográfica **5**
1.1 Lactosuero como subproducto de la industria láctea 5
1.2 Mercado de prebióticos 8
1.3 Galacto-oligosacáridos 10
1.4 Beta-galactosidasas (β-gal) 11
1.4.1 Mecanismos de hidrólisis de lactosa y transgalactosilación 13
1.4.2 Restricciones y condiciones de reacción 15
1.5 Sistemas multienzimáticos y uso de glucosa oxidasa 16
1.6 Inmovilización enzimática 18
1.7 Co-inmovilización enzimática 24

2. Planteamiento del problema **29**
2.1 Problema de investigación 29
2.2 Objetivos 31

3. Materiales y métodos **33**
3.1 Reactivos 33
3.2 Técnicas analíticas 34
3.2.1 Contenido de humedad 34
3.2.2 Contenido de proteína 34
3.2.3 Contenido de azúcares 35
3.2.4 Contenido de ácido glucónico 35
3.2.5 Montaje de reacción 35
3.2.6 Actividad hidrolítica de β-galactosidasas. 36
3.2.7 Actividad transgalactosiladora e hidrolítica de β-gal 37
3.2.8 Actividad de glucosa oxidasa. 38
3.3 Inmovilización enzimática 38
3.3.1 Agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs). 40
3.3.2 Atrapamiento en esferas de alginato de calcio 40

3.4 Co-inmovilización 41
3.5 Reacciones enzimáticas 41
3.5.1 Síntesis de GOS con β-galactosidasas libres 41
3.5.2 Síntesis de GOS con β-galactosidasas inmovilizadas 42
3.6 Producción de ácido glucónico 43
3.7 Sistema multienzimático libre 43
3.8 Síntesis de GOS en sistemas co-inmovilizados 44
3.9 Sistemas inmovilizados y co-inmovilizados en ciclos repetidos de reacción. 45

4. Resultados y discusión 47
4.1 Caracterización del lactosuero 47
4.2 Actividad de β-galactosidasas 48
4.2.1 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad hidrolítica 48
4.2.2 Efecto del pH y la glucosa en la actividad transgalactosiladora 50
4.3 Síntesis de GOS con β-galactosidasas libres 53
4.3.1 Perfiles cinéticos de composición del medio 53
4.3.2 Indicadores para la síntesis de GOS 55
4.4 Inmovilización de β-galactosidasas 59
4.5 Síntesis de GOS con β-gal inmovilizadas 62
4.5.1 Perfiles cinéticos de composición del medio 64
4.5.2 Indicadores para la síntesis de GOS 65
4.6 Uso de β-gal inmovilizada en ciclos repetidos 69
4.7 Actividad de glucosa oxidasa 72
4.8 Inmovilización de glucosa oxidasa 74
4.9 Síntesis de GOS con sistemas multienzimáticos libres 76
4.9.1 Perfiles cinéticos de composición del medio 76
4.9.2 Indicadores para la síntesis de GOS 80
4.9.3 Efecto de la relación β-gal:GOx 82
4.10 Co-inmovilización de β-gal y GOx 83
4.11 Síntesis de GOS con sistema multienzimático co-inmovilizado 83
4.11.1 Perfiles cinéticos de composición del medio 84
4.11.2 Indicadores para la síntesis de GOS 87
4.11.3 Efecto de la variación de la relación β-gal:GOx 89
4.11.4 Comparación de combi-CLEAS con dos CLEAs independientes 90
4.12 Uso de sistemas co-inmovilizados en ciclos repetidos 90

5. Conclusiones y recomendaciones 97
5.1 Conclusiones 97
5.2 Recomendaciones 98

Anexos 101

Bibliografía 113

Lista de figuras

Figura 1-1. Evolución de la producción y acopio anual de leche en Colombia. 5
Figura 1-2. Cadena industrial de leche en Colombia. 6
Figura 1-3 Usos dados al lactosuero. 8
Figura 1-4. Mercado global de prebióticos en 2023. 9
Figura 1-5. Estructura de Galacto-oligosacáridos (GOS). 10
Figura 1-6. Hidrólisis de lactosa y transgalactosilación para formación de GOS. 14
Figura 1-7. Reacciones de hidrólisis y transgalactosilación. 14
Figura 1-8. Algunas técnicas de inmovilización enzimática. 19
Figura 3-1 Montaje de reacciones enzimáticas. 36
Figura 3-2 Reacción de degradación de o-NPG catalizada por enzima β-gal. 36
Figura 3-3. Protocolos de inmovilización enzimática. 39
Figura 3-4. Configuraciones de agregados enzimáticos inmovilizados mixtos β-gal-GOx. 45
Figura 4-1 Actividad hidrolítica relativa con o-NPG, en función del pH y temperatura. 48
Figura 4-2 Relación de actividad transgalactosiladora (IU-TG) e hidrolítica (IU-H), evaluada en lactosuero, en función del pH y fuente de β-gal. 51
Figura 4-3 Efecto de contenido de glucosa en la producción de GOS. 52
Figura 4-4. Perfiles de composición de carbohidratos, obtenidos con β-galactosidasa libre 54
Figura 4-5 Selectividad, rendimiento y distribución de GOS, con β-gal libre en LaS. 58
Figura 4-6. Efecto de la concentración de isopropanol en el rendimiento de la inmovilización de proteína CLEA-IPA β-gal. 61
Figura 4-7 Perfiles de carbohidratos en LaS 400 g_{lact}/L, al usar β-gal entrecruzadas. 63
Figura 4-8 Perfiles de carbohidratos en LaS 400 g_{lact}/L, con β-gal atrapadas en alginato. 64
Figura 4-9 Efecto de las técnicas de inmovilización sobre el rendimiento, la selectividad y la productividad de GOS. 66
Figura 4-10-A Selectividad y perfil de DP, en función de la conversión, pH y técnica de inmovilización con β-gal de *A. oryzae*. 68
Figura 4-11 Uso de β-gal inmovilizadas y producción acumulada de GOS, en ciclos repetidos de reacción. 70
Figura 4-12 Retención de actividad de agregados almacenados en refrigeración (4°C). . 72
Figura 4-13 Actividad relativa de glucosa oxidasa, en función de la temperatura y el pH. 73
Figura 4-14 Perfiles de producción de ácido glucónico con GOx libre. 73
Figura 4-15 Producción de ácido glucónico con GOx inmovilizadas. 75
Figura 4-16 Concentración promedio de ácido glucónico en sistemas mixtos libres. 77

Figura 4-17. Perfiles de composición de carbohidratos en LaS 400 g_{lact}/L, con sistema mixto libre de β-gal y GOx, en modo secuencial y simultáneo, a pH 6.0 y 4 vvm. 77
Figura 4-18 Selectividad y distribución de DP en sistemas mixtos β-gal GOx..... 81
Figura 4-19 Contenido de GOS en lactosuero, para sistemas mixtos libres con diferentes relaciones β-gal: GOx. 82
Figura 4-20. Perfiles de composición de carbohidratos en LaS 400 g_{lact}/L, con sistema mixto β-gal y GOx combi-CLEAS. pH 6.0 y aireación a 4 vvm. 85
Figura 4-21 Producción promedio de ácido glucónico en lactosuero con Combi-CLEAS. 86
Figura 4-22. Brechas de contenido de GOS entre sistemas monoenzimáticos y multienzimáticos libres e inmovilizados. Fracción del contenido total de carbohidratos. .. 86
Figura 4-23 Indicadores de seguimiento de reacción para sistemas co-inmovilizados. 88
Figura 4-24 Selectividad para sistemas co-inmovilizados en función de la conversión de lactosa; distribución de DP..... 89
Figura 4-25 Acumulación de GOS en lactosuero, para sistemas co-inmovilizados combi-CLEAS-IPA, con variación en la relación β-gal: GOx. 90
Figura 4-26 Concentración de GOS en ciclos repetidos de sistemas mixtos combi-CLEAs IPA de β-gal-GOx, en relación 1:1; LaS pH 6.0, 4 vvm. β-gal *A. oryzae* (a) y *A. niger* (b). 92
Figura 4-27 Rendimiento de GOS en ciclos repetidos de sistemas mixtos combi-CLEAs IPA β-gal *A. oryzae*- GOx, en relación 1:2. 92
Figura 4-28 Ganancia acumulada en el contenido de GOS con el sistema combi-CLEA-IPA (β-gal *A. oryzae* + GOx), en comparación con CLEA-IPA (β-gal *A. oryzae*) 93
Figura 4-29 Rendimiento de ácido glucónico en ciclos con GOx en CLEAs-IPA. 94
Figura 4-30 Producción másica acumulada de GOS en LaS, a escala de 20 mL..... 95

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1 Rendimiento y productividad de GOS con β-gal de *A. oryzae* inmovilizadas por técnicas de enlace covalente y entrecruzamiento. Adaptado de Vera et al. (2016). 22
Tabla 1-2 Criterios de comparación entre métodos de inmovilización enzimática. 24
Tabla 3-1 Diseño experimental para la producción de GOS en sistemas monoenzimáticos libres 41
Tabla 3-2 Diseño experimental para la producción de GOS en sistemas monoenzimáticos inmovilizados 42
Tabla 3-3 Diseño experimental para la producción ácido glucónico con GOx inmovilizada 43
Tabla 3-4. Diseño experimental para producción de GOS en sistema multienzimático libre 44
Tabla 3-5 Diseño experimental para la producción de GOS en sistemas multienzimáticos co-inmovilizados 44
Tabla 4-1. Caracterización del lactosuero en relación con los valores declarados en la ficha técnica. 47
Tabla 4-2 Actividad hidrolítica a 45°C, para degradación de o-NPG (µmol o-NP/min.g) e hidrólisis de lactosa en lactosuero (µmol glucosa/min.g) 49
Tabla 4-3 Indicadores de seguimiento de la síntesis de GOS con enzimas libres en LaS.56
Tabla 4-4. Rendimientos de inmovilización de β-galactosidasas 60
Tabla 4-5 . Rendimientos de inmovilización de Glucosa oxidasa 74
Tabla 4-6 Indicadores de seguimiento de la síntesis de GOS con el uso de sistemas mixtos libres β-gal GOx 80
Tabla 4-7 Rendimientos de co-inmovilización de β-gal y GOx 83

Lista de Símbolos y abreviaturas

a_{rel}	Actividad enzimática relativa.
CLEA	Agregado enzimático entrecruzado (crosslinked enzyme aggregate).
CLEA-IPA	CLEA pretratada con isopropanol.
CLEA-Sulfato	CLEA pretratada con sulfato de amonio.
D	Difusividad de sustancias en biocatalizadores.
DP	Grado de oligomerización (DP3: Trisacárido, DP4: Tetrasacárido)
gal	Galactosa
glco	Ácido glucónico
GOS	Galacto-oligosacáridos
GOx	Glucosa oxidasa
$\mathrm{IU_{Hglc}}$	Unidades de actividad hidrolítica calculadas con liberación de glucosa
$\mathrm{IU_{H\ oNPG}}$	Unidades de actividad hidrolítica calculadas con liberación de o-NP.
$\mathrm{IU_{TG}}$	Unidades de transgalactosilación.
$\mathrm{IU_{GOx}}$	Unidades de actividad de glucosa oxidasa (U/g)
lact	Lactosa.
LaS	Lactosuero.
o-NP	orto nitrofenol.
o-NPG	orto nitrofenil galactopiranósido.
[P]	Concentración másica de proteínas en solución.
$\mathrm{S_{GOS}}$	Selectividad global de transgalactosilación.
$\mathrm{S_{maxGOS}}$	Selectividad a transgalactosilación en punto de máxima concentración
${C_{O_2}}^{\mathrm{sat}}$	Concentración de saturación de oxígeno en el medio de reacción.
$\mathrm{Y_{GOS}}$	Rendimiento máximo de GOS.
$\mathrm{Y_a}$	Rendimiento de inmovilización en términos de actividad.
$\mathrm{Y_P}$	Rendimiento de inmovilización en términos de proteína.
β-gal	Beta-galactosidasa.
δ_{alg}	Diámetro promedio de esferas de alginato.
δ_{CLEA}	Diámetro promedio de partículas de agregados enzimáticos.
π_{GOS}	Productividad de GOS.
w_i	Fracción másica del compuesto i.
$w_{i\ o}$	Fracción másica inicial del compuesto i.

Introducción

Durante los últimos años el aumento en la demanda de alimentos funcionales, con impactos benéficos para la salud, responde a cambios en los patrones de consumo a nivel mundial (Fischer & Kleinschmidt, 2018b; Ospina-Corral et al., 2019). Por ello, la industria alimentaria debe asumir el reto de brindar productos que no se limiten a satisfacer propiedades organolépticas, sino que aporten además un alto valor nutricional. Entre los alimentos funcionales destaca el uso de moléculas prebióticas, sustancias que favorecen la regulación de la microbiota intestinal al no ser degradadas por las condiciones ácidas del proceso digestivo. Los oligosacáridos, por ejemplo, cumplen con dichas cualidades por lo que se añaden a formulaciones y suplementos dietarios, destinados a favorecer el balance adecuado de la flora, con un mercado global que en 2023 ascendió a 2.71 billones de dólares (Mordor Intelligence, 2023).

Entre este grupo de biomoléculas se encuentran los galacto-oligosacáridos (GOS), cadenas de galactosa que constan de entre 2 y 9 monómeros, unidos o no a una glucosa terminal (Tzortzis & Vulevic, 2009). Debido a la naturaleza de sus enlaces, estas moléculas alcanzan el colon con una mínima degradación y allí son metabolizadas por bacterias probióticas, principalmente de los géneros *Bifidobacterium y Lactobacillus*. Dichos microorganismos, a su vez contribuyen con la regulación del pH intestinal y la regeneración de las células epiteliales, por lo cual se ha recomendado su consumo como parte de la dieta alimenticia (Crittenden & Playne, 1996).

Como otros oligosacáridos, los GOS pueden ser sintetizados de dos formas: (1) por vía fermentativa, debido a la actividad de enzimas beta-galactosidasas (β-gal) presentes en las rutas metabólicas de algunos microorganismos, o (2) por vía enzimática, al utilizar dichos catalizadores, previamente aislados (Martínez-Villaluenga et al., 2008). Partiendo de lactosa como sustrato, las β-gal catalizan dos reacciones paralelas: Por una parte, la actividad hidrolítica conduce a la liberación de glucosa y galactosa libres, en tanto la

actividad de transgalactosilación, implica la unión progresiva y reversible de residuales de galactosa, generando los GOS (Frenzel et al., 2015).

La selectividad hacia una u otra reacción depende en buena medida del microorganismo del cual hayan sido obtenidas las β-gal, que típicamente provienen de hongos (género *Aspergillus*), levaduras (género *Kluyveromyces*) o bacterias (género *Bacillus* y *Biffidobacterium*), lo que genera prebióticos con diversidad estructural, es decir, con diferentes grados de oligomerización (Fischer & Kleinschmidt, 2018a). Dicha distribución de di-, tri-, tetrasacáridos y cadenas de orden superior ha sido correlacionada con la sensibilidad de la actividad catalítica a factores como la temperatura, pH, concentración de iones y del sustrato, por lo que el proceso de síntesis debe ocurrir en condiciones que idealmente promuevan mayores rendimientos y estabilidad de los oligómeros (Rico-Rodríguez et al., 2020).

De igual manera, la acumulación de monosacáridos en el medio genera inhibición catalítica conforme la reacción avanza y reduce el rendimiento transgalactosilador (Vera et al., 2016). Esto ha motivado la búsqueda de alternativas para reducir el contenido de glucosa generado en la etapa hidrolítica del proceso, entre ellas su conversión a ácido glucónico, usando sistemas multienzimáticos de β-gal y glucosa oxidasa. Así, no solo se incrementa la concentración de GOS sino que también se facilita el acceso al mercado de alimentos funcionales, destinados a personas diabéticas (Todea et al., 2021).

Puesto que la producción de GOS requiere de un medio con alto contenido de lactosa, en la presente investigación se propone el uso de lactosuero, un subproducto de la fabricación del queso, con una carga orgánica elevada asociada a la presencia de este carbohidrato y de proteínas (Carvalho et al., 2013). En Colombia, cerca del 70% de dicho efluente es vertido en cuerpos de agua, lo que representa un impacto medioambiental indeseable, al provocar incrementos en la demanda química de oxígeno y eutrofización (Torres et al., 2010). En este sentido, y dado su actual desaprovechamiento, alta disponibilidad y bajo costo, resulta pertinente buscar su valorización. Sin embargo, en relación con el sustrato, las enzimas representan un costo elevado, lo que reduce el atractivo del proceso. Por esta razón, se han evaluado técnicas de inmovilización enzimática que permitan la reutilización de los catalizadores durante varios ciclos de reacción, determinando la eficiencia y estabilidad del proceso, de acuerdo con la retención de la actividad enzimática en el tiempo.

Con base en lo anterior, el objetivo de esta tesis es determinar el comportamiento de un sistema mixto de enzimas inmovilizadas para la producción de galacto-oligosacáridos y ácido glucónico, sobre la retención de la actividad enzimática, los rendimientos y grado de oligomerización de GOS, al usar lactosuero como sustrato. Para ello, el sistema multienzimático propuesto considera la evaluación de dos beta-galactosidasas comerciales (aisladas de *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*) y una glucosa oxidasa (proveniente de *A. oryzae*). Así, se puede determinar la factibilidad de reutilización de dichos sistemas mixtos, evaluados en estudios previos, pero con enzimas en solución.

Con el fin de presentar los resultados de esta investigación, el presente documento ha sido dividido en 4 capítulos. En el capítulo 1 se realiza un abordaje conceptual de las enzimas, el lactosuero como subproducto y las reacciones asociadas a la producción de GOS. Luego se presenta una revisión bibliográfica referente a la producción de galacto-oligosacáridos y ácido glucónico, para sistemas mono y multienzimáticos. Posteriormente, se hace una revisión de técnicas de inmovilización y co-inmovilización, aplicadas particularmente a enzimas beta-galactosidasas y glucosa oxidasa.

En el capítulo 2 se discute la motivación y alcance del estudio, definiendo concretamente el problema de investigación y los objetivos trazados.

En el capítulo 3 se describen los reactivos, equipos y metodologías empleadas en el desarrollo de la investigación. Esto agrupa los protocolos de análisis instrumental, análisis químico, caracterización y seguimiento de reacciones, diseño experimental y análisis estadístico. Se presentan los factores considerados durante la evaluación de actividad hidrolítica, transgalactosiladora y oxidativa, además de las variables de respuesta usadas para hacer seguimiento al comportamiento del sistema reactivo.

En el cuarto capítulo se presentan los resultados obtenidos, su análisis y discusión en función de las variables de respuesta determinadas para cada etapa del proyecto. En primer lugar, se reportan los resultados de la caracterización del lactosuero y las enzimas, de acuerdo con los protocolos estándar para determinación de actividad enzimática. Posteriormente se discuten los resultados cinéticos para sistemas enzimáticos libres, mono y multienzimáticos. Seguidamente son abordados los métodos de inmovilización y su efecto en el rendimiento, productividad y selectividad de GOS y ácido glucónico. Así, discutidas las mejores condiciones de inmovilización y co-inmovilización enzimática, se reporta el comportamiento de los sistemas catalíticos en múltiples ciclos repetidos de reacción.

Finalmente, se dan a conocer las conclusiones de la investigación, dando respuesta a los objetivos planteados y las recomendaciones para futuras investigaciones en el tema.

Como complemento, en la sección de anexos se muestran fichas técnicas y datos adicionales, a los que el lector puede referirse para conocer con mayor detalle algunos aspectos de la investigación.

1. Revisión bibliográfica

1.1 Lactosuero como subproducto de la industria láctea

En Colombia, la actividad agropecuaria constituye alrededor del 6 al 8% del Producto Interno Bruto (PIB). Dentro de este sector, la cadena láctea contribuye con aproximadamente el 12%, alcanzando en 2022 una producción anual de 7.414 millones de litros de leche (FINAGRO, 2023; MINAGRICULTURA, 2022). Sin embargo, para este período solo se recolectó, transportó, y procesó industrialmente el 45% de dicho volumen (figura 1-1), supliendo un consumo anual per-cápita de 162 L de leche en el comercio formal (FEDEGAN, 2022).

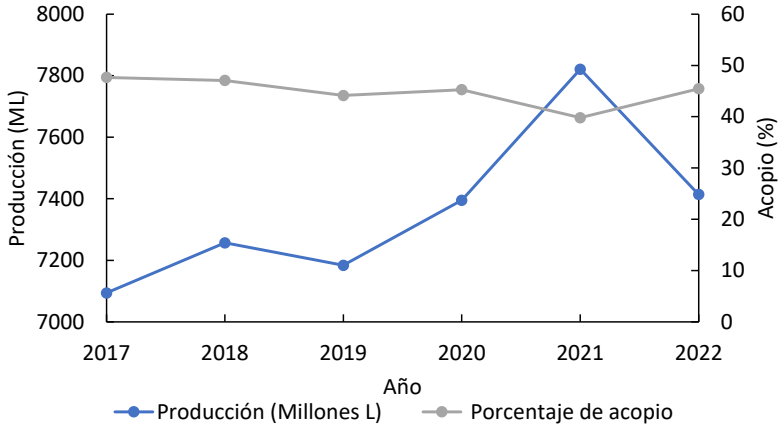


Figura 1-1. Evolución de la producción y acopio anual de leche en Colombia. Adaptado de Fedegan (2022).

La industria láctea se integra a partir de varias etapas de procesamiento de la leche cruda que generan: (1) productos utilizados como ingredientes dentro de la propia industria o destinados al consumo directo y (2) subproductos agroindustriales (Figura 1-2 (Superintendencia de Industria y comercio, 2020)). En esta cadena, destaca la producción de queso que en el país asciende aproximadamente a 50 mil toneladas anuales, distribuidas entre quesos frescos no ácidos (e.g. campesino, costeño, quesito antioqueño), quesos

frescos ácidos (e.g. crema, quesillo tolimense, pera) y quesos madurados (e.g. queso paipa) (Treid, 2022).

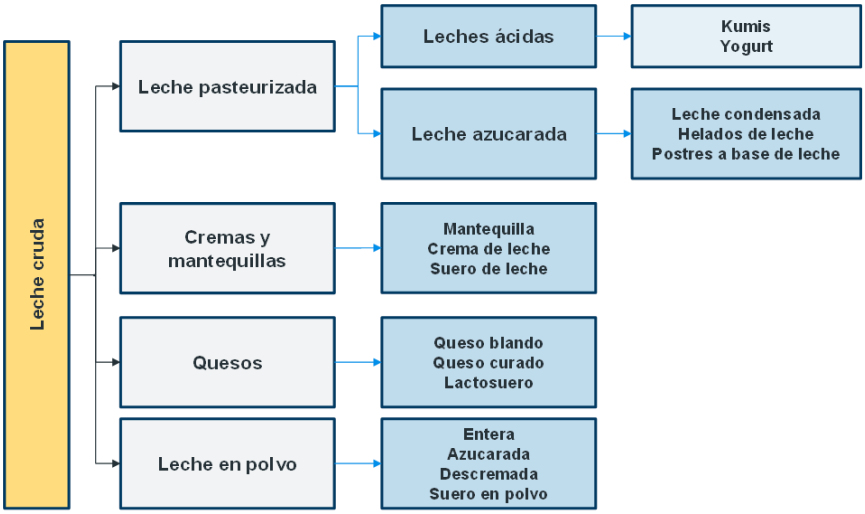


Figura 1-2. Cadena industrial de leche en Colombia.
Adaptado de SIC (2020)

El proceso de elaboración del queso se basa en la precipitación de la caseína presente en la leche, bien por vía enzimática (añadiendo quimosinas) o por la adición de ácido en la matriz líquida. Una vez separada la fracción sólida de proteínas, se obtiene un líquido amarillo denominado lactosuero, en una proporción típica de 9 kg por kg de queso fresco. Este efluente tiene un alto contenido de lactosa (40 g/L), proteínas remanentes (5 g/L) y minerales (300-380 mg/100g) (Varnam & Sutherland, 2001). Debido a esto, se requiere de tratamientos previos a su disposición final, que prevengan la eutrofización, el incremento de DBO en cuerpos de agua o desbalances de la macro y microbiota en tales ecosistemas (Carvalho et al., 2013). Sin embargo, el costo asociado al uso de técnicas convencionales como la floculación, oxidación o digestión, disminuye las utilidades de la industria láctea y estimula implícitamente su vertimiento, sin el tratamiento exigido por la normativa colombiana.

Sumado a lo anterior, a pesar de su alta disponibilidad y bajo costo (70 COP/L) (Rico-Rodríguez, 2018), la falta de un producto de alto valor agregado a partir del lactosuero desincentiva su aprovechamiento como insumo en otros procesos (Wang et al., 2020). Por ejemplo, en 2017 cerca del 70% del volumen de lactosuero generado se usó para

alimentación animal o se vertió como efluente líquido (Muset & Castells, 2017), mientras el 30% restante se deshidrató para utilizarse como aditivo alimentario con un precio de venta en torno a 2933 COP/kg (Rico-Rodríguez, 2018; Trademap, 2020). A nivel global, otras alternativas insertadas en la industria incluyen la recuperación de proteínas remanentes en esta matriz líquida, con lo que se consigue un producto de valor agregado, pero paralelamente se obtiene un permeado como nuevo subproducto, que conserva alto contenido de lactosa y minerales solubles (Chourasia et al., 2022; Hackenhaar et al., 2021).

Por otra parte, la legislación colombiana regula la adición de lactosuero como materia prima en alimentos, por ejemplo en algunos tipos de postres, helados, mantequillas y quesos (RES 2310 de 1986), delimita su empleo para abonos y ensilajes bovinos y porcinos, y controla su uso como adulterante de la leche fresca (Ministerio de Salud, 2007). Adicionalmente, su aprovechamiento como fuente de nutrientes en tierras de cultivo tiene un efecto positivo limitado, pues a largo plazo la salinidad del suelo se incrementa y se reduce el rendimiento para el productor (Chanfrau et al., 2017). Por esto, es necesario dar continuidad a la investigación en el aprovechamiento y valorización de los carbohidratos presentes en este subproducto, bajo la premisa de obtener moléculas de alto interés comercial, con mayor rentabilidad, que simultáneamente dinamicen la economía del sector lácteo y mitiguen su impacto ambiental.

Los usos convencionales previamente mencionados y algunas otras aplicaciones comerciales para el lactosuero se muestran en la figura 1-3, partiendo de la separación o conversión de lactosa, sales y proteínas (a-lactoalbúmina, b-lactoglobulina, glico-macropéptidos, albúmina sérica, inmunoglobulinas y lactoferrina). La investigación direccionada a otras alternativas se ha presentado desde diferentes enfoques, como la generación de ácido láctico, cítrico, propiónico, producción de hidrógeno, proteína unicelular, prebióticos o microorganismos con aplicabilidad en queserías o la misma industria láctea. Estas opciones, sin embargo, presentan diferentes grados de implementación, de acuerdo con los retos y limitaciones de su operación, los rendimientos conseguidos o el diseño de su escalado industrial (Chanfrau et al., 2017; Gómez Soto & Sánchez Toro, 2022).

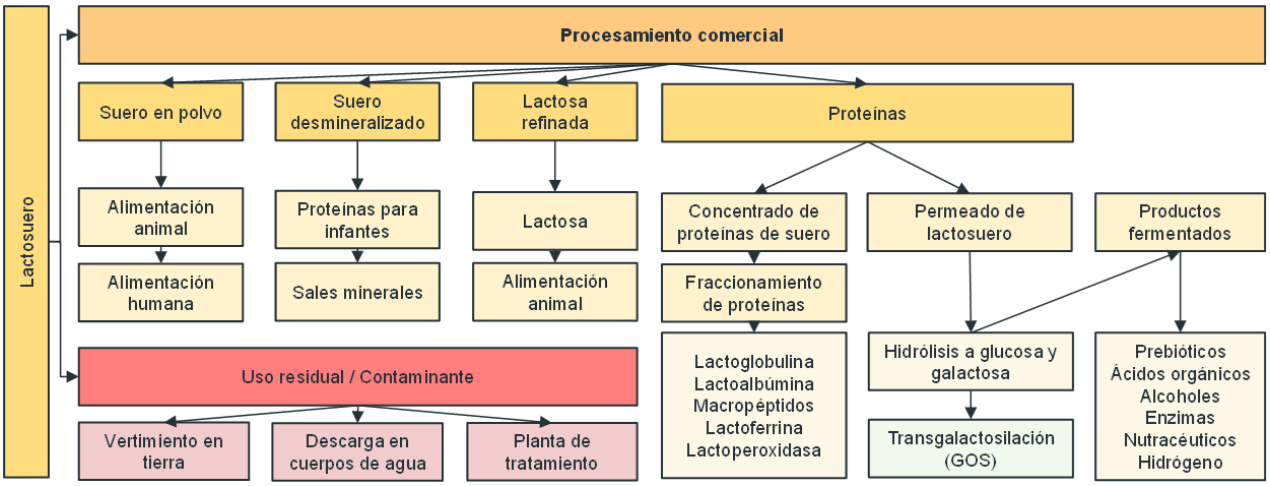


Figura 1-3 Usos dados al lactosuero.
Adaptado de (Chanfrau et al., 2017)

1.2 Mercado de prebióticos

La demanda actual por tecnologías verdes en la industria ha conducido a un creciente interés por la aplicación de los bioprocesos, incluyendo la aplicación de técnicas enzimáticas, como una alternativa para la producción de múltiples compuestos de interés en el sector alimentario, cosmético y farmacéutico (Bilal & Iqbal, 2019). Entre estos, el mercado de prebióticos consta de tres grupos principales de biomoléculas: polioles (lactulosa, xilitol, manitol, lactilol), oligosacáridos (XOS, FOS, GOS, inulina, entre otros), y fibras (celulosa, dextrinas, pectinas, beta-glucanos) (Farias et al., 2019). En particular, los oligosacáridos con carácter prebiótico pueden obtenerse a partir de diferentes sustratos, recurriendo a catalizadores como fructosiltransferasas, xilanasas y beta-galactosidasas (Terrasan et al., 2019).

Por definición, se clasifica como un oligosacárido a cualquier compuesto con una estructura conformada por entre 3 y 10 monosacáridos, aunque también se incluyen algunos dímeros como lactulosa (Rastall, 2010). De acuerdo con el monosacárido que se polimeriza, algunos oligosacáridos que representan interés en la industria son los fructo-, galacto- y oligosacáridos de glucano (FOS, GOS y GLOs, respectivamente) (Crittenden & Playne, 1996; Terrasan et al., 2019). Si bien estos se encuentran naturalmente en frutas, vegetales y leche, también se producen como aditivos alimentarios, edulcorantes y prebióticos (Roberfroid, 2007).

Al no ser digeribles y favorecer el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos benéficos para el tracto gastro-intestinal, los oligosacáridos impactan positivamente la absorción de nutrientes, el control del pH intestinal y la regeneración del tejido duodenal (Dekker, 2019; Ospina-Corral et al., 2019). Debido a tales propiedades biológicas, existe una tendencia en el mercado por su adición en suplementos y formulaciones alimenticias, dirigida a consumidores más conscientes del efecto de la alimentación en la calidad de vida y conservación de la buena salud. Así, el mercado global de prebióticos alimentarios ascendió a 2.71 billones de dólares para 2022 (figura 1-4), con un incremento del 29.5% respecto a 2017 y una proyección de crecimiento anual compuesto proyectada de 5.1%, hasta alcanzar 3.7 billones para 2029 (Mordor Intelligence, 2023).

En Colombia el uso de prebióticos se rige por la Resolución 288 de 2008, y en el mundo otras entidades gubernamentales vigilan y delimitan sus aplicaciones, entre ellas la European Food Safety Authority y la clasificación de Food Specific Health Uses (FOSHU), en Japón (Ospina-Corral et al., 2019).

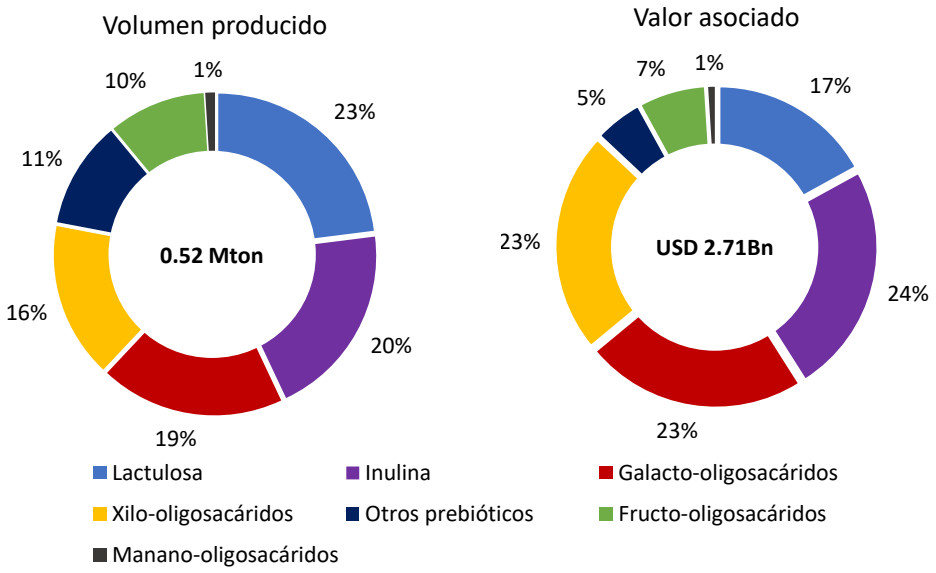


Figura 1-4. Mercado global de prebióticos en 2023.
(Mordor Intelligence, 2023).

1.3 Galacto-oligosacáridos

Los Galacto-oligosacáridos (GOS) son oligómeros basados en galactosa, que poseen una estructura general del tipo [D-galactosa]- [(D-galactosa) $_n$]-[D-glucosa] (figura 1-5) con predominancia de enlaces tipo $\beta(1 \rightarrow 4)$ y $\beta(1 \rightarrow 6)$, en donde *n* constituye el grado de oligomerización (Yang et al., 2010). No obstante, el origen microbiológico de estos prebióticos altera su diversidad estructural, ya que también se pueden encontrar enlaces $\beta(1 \rightarrow 2)$ y $\beta(1 \rightarrow 3)$ y variaciones en la longitud de las cadenas (Azcarate-Peril et al., 2017).

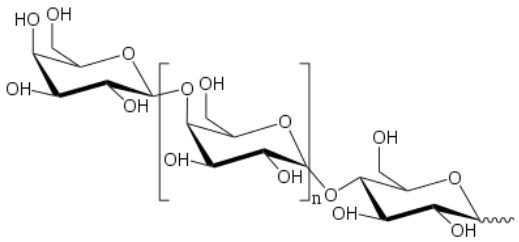


Figura 1-5. Estructura de Galacto-oligosacáridos (GOS).

Aunque pueden hallarse en pequeñas cantidades en el plátano, la soya y cebolla, su aplicación requiere sintetizarlos partiendo de otras fuentes, de forma que la industria alimentaria los use como aditivo de bajo poder edulcorante, agente viscosante, para evitar la cristalización de altas concentraciones de lactosa y retener la humedad de alimentos (Panesar et al., 2010). Sin embargo, el principal interés en este tipo de moléculas radica en sus aplicaciones nutracéuticas que incluyen propiedades anticancerígenas, mejoramiento del funcionamiento hepático y reducción de los niveles de colesterol (Movahedpour et al., 2021). Por otra parte, dado que el ser humano no puede hidrolizar sus enlaces glicosídicos, los GOS pueden sustituir la sacarosa, prevenir la caries dental y añadirse a alimentos destinados a personas diabéticas (Rastall, 2010), con un consumo seguro de hasta 2 g/kg de peso corporal (Jain et al., 2018).

Pese a ser estructuralmente menos complejos, los GOS tienen una función y estructura similar a los oligosacáridos de la leche materna humana, por lo que son añadidos a fórmulas infantiles debido a su efecto en la respuesta corporal a patógenos (Catenza & Donkor, 2021). Además, como se mencionó previamente, estos oligómeros tienen propiedades prebióticas puesto que son transportados sin cambios estructurales hasta el colon, donde favorecen selectivamente el crecimiento y actividad de microorganismos benéficos de la

flora intestinal (Charalampopoulos & Rastall, 2012; Füreder et al., 2020). De hecho, se ha reportado que bifidobacterias, *Lactobacillus y Streptococcus* proliferan en presencia de cadenas de oligosacáridos conformadas por 3 o más monómeros (Cardelle-Cobas et al., 2016). De esto deriva el atractivo de recurrir a sistemas enzimáticos que favorezcan la generación de GOS con tales grados de oligomerización (Fischer & Kleinschmidt, 2018a).

En el periodo 2014-2020, el crecimiento anual compuesto de la producción de GOS se estimó en 9.3%, y a 2025 se proyecta que el mercado global de galactooligosacáridos provea beneficios en torno a los 10.55 billones de dólares, lo que incentiva la continuidad de la investigación para optimizar su producción (Fischer & Kleinschmidt, 2018b; Lu et al., 2020). Esto es particularmente relevante, teniendo presente que se ha estimado que los ingresos por la venta de GOS pueden superar en dos órdenes de magnitud a los del lactosuero en polvo (Chanfrau et al., 2017).

Hasta ahora los GOS están entre los prebióticos más estables, que pueden ser añadidos en bebidas no alcohólicas, con formulaciones que no superen el 5% añadido en peso. En el mercado, estos prebióticos pueden encontrarse en las marcas comerciales como Promovita®, Vivinal ®, Bioligo® y AlphaGOS® (Ospina-Corral et al., 2019).

1.4 Beta-galactosidasas (β-gal)

Los GOS son producidos a partir de sustratos ricos en lactosa, mediante la acción enzimática de beta-galactosidasas (β-gal), que hidrolizan dicho disacárido en sus azúcares constituyentes (glucosa-galactosa) y oligomerizan las unidades de galactosa, debido a su actividad paralela de transgalactosilación (Gargova et al., 1995). Históricamente, estos catalizadores han sido usados para la producción de bebidas lácteas con bajo contenido de lactosa (Ospina-Corral et al., 2019), aunque también se ha reportado su utilización como pretratamiento del lactosuero, generando azúcares disponibles para el cultivo celular, en procesos de hidrólisis y co-fermentación con *Sacharomyces cerevisiae* (Parashar et al., 2016).

De acuerdo con su secuencia de aminoácidos, las beta galactosidasas de la familia de las hidrolasas glicosídicas se clasifican en cuatro grupos (GH , GH2, GH35 y GH42) (de Albuquerque et al., 2021), con estructuras que varían de acuerdo con el microorganismo de origen. En general, se trata de macromoléculas de 4 cadenas polipeptídicas idénticas de 1023 aminoácidos y 5 dominios, con un sitio activo de carácter ácido que se encuentra en

una cavidad del dominio central. Ésta interviene tanto en la reacción de hidrólisis de la lactosa, como la de transgalactosilación (Corral et al., 2006; de Albuquerque et al., 2021).

Se estima que anualmente son producidas 5.75 Mton de beta-galactosidasas (Movahedpour et al., 2021), obtenidas a partir de fuentes microbianas, bien de origen bacteriano (especies *Lactobacilus y Bifidobacterium)*, de levaduras (*Kluyveromyces fragilis, K. marxianius y K. lactis),* hongos filamentosos (*Aspergillus oryzae, A. niger y A. foetidus)* y vegetales (papaya, almendra, manzana, tomate) (Barile & Rastall, 2013; Saqib et al., 2017). Las β-gal son generalmente reconocidas como seguras (GRAS) por entes de control como la administración de medicamentos y alimentos de Estados Unidos (FDA).

De igual forma, el microorganismo de origen repercute en la facilidad de la recuperación de las enzimas y en su capacidad catalítica, por lo que se han aislado líneas celulares que exhiben mayor expresión génica y secreción del biocatalizador, recurriendo a técnicas de DNA recombinante (Ding et al., 2018; Movahedpour et al., 2021; Yin et al., 2018). Para su recuperación, las células son permeabilizadas con agentes surfactantes, emulsificantes y solventes (e.g. dodecil sulfato de sodio, tritónX-100 o acetona), o se utilizan cepas con la capacidad de secretar estos catalizadores (Xavier et al., 2018). Por ejemplo, con bacterias ácido-lácticas de importancia industrial en la producción de alimentos fermentados (e.g. *B. bifidum, B. infantis y L. bulgaricus)*, se ha reportado la obtención de beta galactosidasas, aisladas a partir de cultivos en lactosuero, suplementados con medio Man-Rogosa-Sharpe (MRS); éstas alcanzan rendimientos en torno al 42% para la producción de GOS, a pH 7.0 y 45°C (Saqib et al., 2017).

También se ha evaluado la respuesta de las β-gal a variaciones de pH y temperatura, en relación con el microorganismo del cual se obtienen. En el caso de lactasas aisladas de hongos y levaduras, se ha evidenciado un pH óptimo entre 6.8 y 7.0 a 35°C para β-gal de *K. lactis,* en tanto para β-gal de *A. oryzae* el intervalo de pH 2.5 a 5.4 suele ser más usado, aunque también se ha estudiado su capacidad catalítica en medios de pH de carácter cercano al neutro (pH 6.0-7.0; T_{opt}:37°C) (Movahedpour et al., 2021; Saqib et al., 2017; Xavier et al., 2018).

En cuanto a su respuesta a la temperatura, se ha evaluado la obtención de estas enzimas a partir de genes de *T. naphthophila (*un microorganismo termófilo) expresados en *E. coli,* en cuyo caso la actividad hidrolítica óptima se obtuvo a 90°C y pH 5.8, con lo que es posible

usar mayores concentraciones de lactosa, al aumentar su solubilidad. Análogamente, otras fuentes son activas a bajas temperaturas (*i.e*. 4°C), lo que resulta de interés en la industria láctea para hidrolizar la lactosa de la leche durante su almacenamiento en refrigeración (Xavier et al., 2018), pero también para posibles aplicaciones en la obtención de GOS en dichas condiciones (Pawlak-Szukalska et al., 2014).

La fuente de la β-gal incide en la selectividad de la reacción de hidrólisis respecto a la transgalactosilación, puesto que varían tanto el rendimiento como el grado de oligomerización de los prebióticos (Frenzel et al., 2015). Por ejemplo, mientras la enzima de *K. lactis* tiene mayor selectividad a la hidrólisis y dimerización, la de *A. oryzae* logra mayor cantidad de trímeros y tetrámeros de GOS (GOS-3 y GOS-4, respectivamente) (Fischer & Kleinschmidt, 2018a; Huerta et al., 2011; Rico-Rodríguez, 2018). Esto último se ha explicado por la estructura terciaria de la proteína y los residuales de aminoácidos expuestos que están en el sitio activo, lo que incide en la afinidad del catalizador a la formación del complejo enzima-sustrato (de Albuquerque et al., 2021; Pereira-Rodríguez et al., 2012).

Sumado a lo anterior, se ha acudido a técnicas de ingeniería enzimática para mejorar la eficiencia de la transgalactosilación, modificando la estructura y conformación de la enzima. Por ejemplo, al alterar la proporción de triptófano, se producen cambios en la afinidad por el donante y el aceptor del grupo galactosilo, en tanto la especificidad del producto y la estabilidad térmica varían al aumentar la cantidad de residuos de cisteína (Movahedpour et al., 2021).

1.4.1 Mecanismos de hidrólisis de lactosa y transgalactosilación

La actividad catalítica de la beta-galactosidasa procede a través de un mecanismo de reacción por etapas que, partiendo de lactosa (disacárido de glucosa-galactosa), genera la transferencia de una unidad de galactosa a un aceptor con grupo hidroxilo:

1) En primer lugar, la lactosa se ancla al sitio activo de la enzima, formando el complejo enzima-sustrato con mayor especificidad por la galactosa (Gosling et al., 2010), mediante la unión covalente entre el Carbono-1 y residuales de ácido glutámico del sitio activo (de Albuquerque et al., 2021).
2) Luego, se forma un enlace covalente con el grupo galactosilo y se libera glucosa al medio.

3) Finalmente, el grupo galactosilo se transfiere a un aceptor nucleofílico: Si este aceptor es una molécula de agua, se produce una hidrólisis, mientras si el grupo galactosilo es cedido a otro sacárido (glucosa, galactosa, lactosa o GOS), se habrá producido una transgalactosilación (Brás et al., 2008; Vera et al., 2020).

Estas reacciones ocurren paralelamente, de manera que la enzima forma cadenas de grado creciente de polimerización (de dímeros a hexámeros, principalmente), al tiempo que éstos son degradados a azúcares más simples. Este mecanismo de reacción se muestra esquemáticamente en la figura 1-6, en la que se evidencia la reversibilidad de todas las etapas involucradas. La figura 1-7, presenta las reacciones individuales involucradas en la actividad de β-gal.

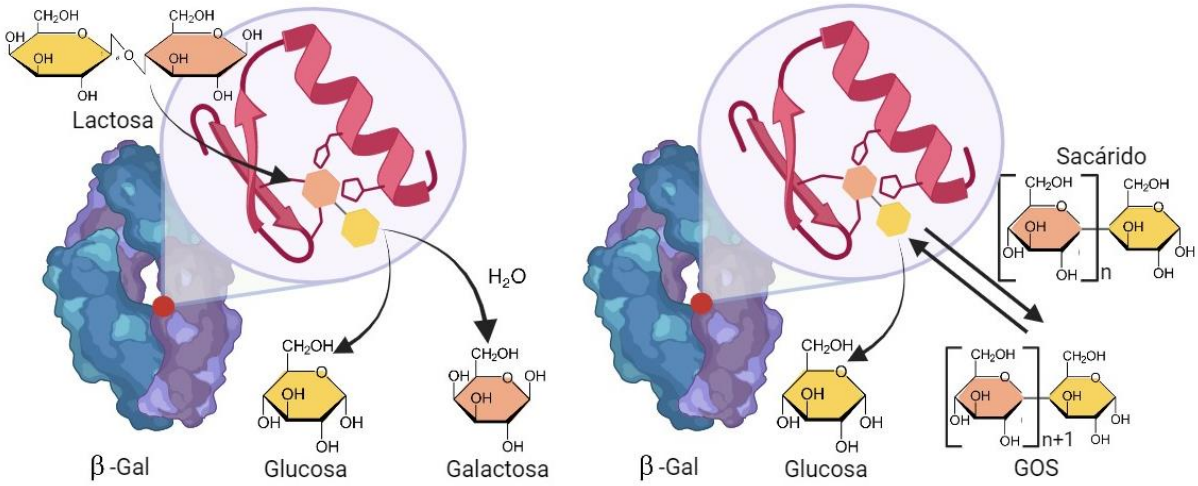


Figura 1-6. Hidrólisis de lactosa y transgalactosilación para formación de GOS. (Elaboración propia con BioRender)

$$\text{Gal-Glu} + \text{E} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons (\text{E-Lac}) \longrightarrow (\text{E-Gal}) + \text{Glu}$$

$$(\text{E-Gal}) \rightleftharpoons \text{E} + \text{Gal}$$

$$\text{Gal-Glu} + (\text{E-Gal}) \rightleftharpoons (\text{E-Gal}_2\text{-Glu}) \rightleftharpoons \text{E} + \text{Gal}_2\text{-Glu} + \text{H}_2\text{O}$$
$$\text{Gal}_2\text{-Glu} + (\text{E-Gal}) \rightleftharpoons (\text{E-Gal}_3\text{-Glu}) \rightleftharpoons \text{E} + \text{Gal}_3\text{-Glu} + \text{H}_2\text{O}$$
$$\text{Gal}_3\text{-Glu} + (\text{E-Gal}) \rightleftharpoons (\text{E-Gal}_4\text{-Glu}) \rightleftharpoons \text{E} + \text{Gal}_4\text{-Glu} + \text{H}_2\text{O}$$

$$\text{Gal} + (\text{E-Gal}) \rightleftharpoons (\text{E-GB}) \rightleftharpoons \text{E} + \text{GB} + \text{H}_2\text{O}$$
$$\text{Glu} + (\text{E-Gal}) \rightleftharpoons (\text{E-AL}) \rightleftharpoons \text{E} + \text{AL} + \text{H}_2\text{O}$$

Gal – Glu: lactosa. E: b-galactosidasa. Gal: galactosa. Glu: glucosa. GB: galactobiosa. AL: alolactosa. Gal_2 – Glu: trisacárido. Gal_3 – Glu: tetrasacárido. Gal_4 – Glu: pentasacárido

Figura 1-7. Reacciones de hidrólisis y transgalactosilación. (Guío, 2014)

Se ha observado que la transgalactosilación es una reacción cinéticamente controlada que compite con la hidrólisis. Por el balance de especies químicas presentes, esta última reacción es termodinámicamente más favorable (de Albuquerque et al., 2021), por lo que se requiere de un medio con un alto contenido de lactosa (20-40% (m/v)) que permita aumentar la selectividad a la transgalactosilación, debido al desplazamiento de los equilibrios (Torres et al., 2010). En este sentido, la galactosa actúa como sustrato limitante para la transgalactosilación, pero también como un inhibidor que compite por el sitio activo y afecta el desempeño de la β-gal al avanzar la reacción (de Albuquerque et al., 2021).

1.4.2 Restricciones y condiciones de reacción

De acuerdo con el mecanismo descrito, la transgalactosilación implica una serie de reacciones reversibles que, pese a generar GOS con grado creciente de oligomerización, ocurre paralelamente a su degradación por hidrólisis (Fischer & Kleinschmidt, 2015). Por ello, los perfiles de concentración de GOS suelen presentar un tiempo en el cual se logra un rendimiento máximo, a partir del cual la concentración de los oligómeros decae. Dicho parámetro puede determinarse a partir de mediciones experimentales o de modelos cinéticos que las describan. En este sentido, se ha encontrado un buen ajuste del comportamiento asumiendo que todas las etapas corresponden a reacciones de primer orden respecto a todos los compuestos involucrados (Rico-Rodríguez et al., 2021).

A su vez, el control de la temperatura y pH incide en la selectividad hacia una u otra reacción: Por ejemplo, para enzimas libres aislada de *K. lactis* y *A. oryzae*, la actividad hidrolítica es óptima a 50°C y 55°C. En estos casos, el uso de 50°C y pH 6.5 favorece la formación de disacáridos, mientras que el proceso a 40°C y pH 7.5 optimiza la producción de trisacáridos (de Albuquerque et al., 2021).

De igual forma, el contenido de agua en el medio aumenta la selectividad hacia las reacciones de hidrólisis (de lactosa y oligómeros), favoreciendo la inhibición previamente descrita (Neri et al., 2009). Por esto, algunos estudios han recurrido al uso de solventes orgánicos (butanodiol, pentanodiol, TEP), CO_2 supercrítico (Srisimarat & Pongsawasdi, 2008) o sistemas acuosos de dos fases como medio de reacción (Benavides & Palomares, 2017). En este último caso, se ha evaluado el sistema citrato-polietilenglicol, con el que se buscó la migración de los monómeros de glucosa hacia la fase macromolecular; sin embargo, dicha partición se acompañó de la migración de galactosa y la reducción en la solubilidad de la lactosa, lo que redujo drásticamente el rendimiento de GOS (Castro, 2020).

Por otra parte, hoy se tiene una comprensión amplia del efecto de iones disueltos, que alteran la actividad catalítica dependiendo del origen de la enzima (Fischer & Kleinschmidt, 2018b). Para *K. lactis,* se ha reportado que el sodio inhibe la hidrólisis a bajas concentraciones, aumentando el rendimiento de GOS, pero favorece su rompimiento a alta concentración (Rico-Rodríguez, 2018). Por el contrario, el potasio aumenta la actividad hidrolítica, mientras el calcio inhibe completamente al catalizador de *K. lactis*, pero no incide en la transgalactosilación de *A. oryzae*. (Fischer & Kleinschmidt, 2019). A su vez, el manganeso (0.2 mM) y magnesio (2.5 mM) actúan como agentes protectores frente a la desactivación térmica, mientras la presencia de Zn^{2+} y Cu^{2+} desactivan la enzima por completo (de Albuquerque et al., 2021; Saqib et al., 2017).

Para β-gal comerciales, la temperatura de operación varía entre 30 y 50 °C, lo que restringe la solubilidad de la lactosa a 35-40% m/v y limita el contacto enzima-sustrato. Por esto, recurrir a métodos que aumenten la termoestabilidad del catalizador, podría mejorar la eficiencia global para la obtención de GOS, previniendo cambios conformacionales indeseables en la proteína, y mejorando la difusión efectiva de los carbohidratos al sitio activo de la enzima (Torres et al., 2010).

1.5 Sistemas multienzimáticos y uso de glucosa oxidasa

Debido a la diferencia en el rendimiento, selectividad y grado de oligomerización de GOS observado para β-gal de diferentes orígenes, se ha estudiado el efecto de su uso en conjunto para sistemas enzimáticos mixtos. Fischer & Kleinschmidt (2018b) reportan la catálisis simultánea de dos enzimas beta galactosidasas (*A. oryzae y K. lactis)*, que genera una producción equivalente a la obtenida por cada enzima en forma individual, pero incrementa la proporción de trisacáridos y tetrasacáridos (Rico-Rodríguez et al., 2020). En este orden de ideas, propiciar mayores grados de polimerización puede impactar positivamente en la etapa de purificación posterior; de hecho que se ha evidenciado que durante la remoción de glucosa y galactosa libres en el medio como remanentes por hidrólisis en la etapa catalítica, se presenta una pérdida parcial de disacáridos, pero no de oligómeros de mayor peso molecular (Fischer & Kleinschmidt, 2018a).

De igual manera, se ha evaluado la utilización de dos β-gal en forma secuencial, hallando mejores rendimientos al iniciar con enzimas afines al agua como aceptor final del grupo galactosilo (mayor carácter hidrolítico), previo a la adición de catalizadores que sean

selectivos a la formación de cadenas de oligosacáridos de mayor grado de polimerización (Botvynko et al., 2019; Frenzel et al., 2015; Guerrero et al., 2015).

Por otra parte, como se ha mencionado, las condiciones y composición del medio y la naturaleza reversible de las reacciones, afectan los rendimientos de la transgalactosilación. Se ha descrito que los monosacáridos producidos en la fase de hidrólisis generan una inhibición competitiva (debida a la galactosa) y no competitiva (por la glucosa libre), que reducen la velocidad de reacción y la afinidad de la enzima a los carbohidratos del sistema reactivo (Vera et al., 2016). Estos azúcares simples podrían usarse finalizada la etapa de producción de GOS, principalmente como fuente de carbono para el cultivo de microorganismos y producción de otras sustancias que contribuyan a aumentar el valor agregado de la materia prima.

Un enfoque alternativo, consiste en el aprovechamiento *in situ* de la glucosa con el fin de disminuir su concentración conforme las β-gal consumen la lactosa, reduciendo los efectos inhibitorios al transformar paralelamente el monosacárido en otras moléculas de mayor valor. En este sentido, existen reportes de la adición de glucosa oxidasa y glucosa isomerasa en sistemas mixtos, para la obtención de ácido glucónico y fructosa, respectivamente, que estabilizan el producto final y alteran su capacidad edulcorante (Fischer & Kleinschmidt, 2019; Lorenzen et al., 2013; Rico-Rodríguez et al., 2020)

La glucosa oxidasa (GOx) es una enzima óxido-reductasa de alta especificidad y estabilidad que, en presencia de oxígeno, cataliza la oxidación del primer carbono de β-D-glucosa, liberando ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, en un mecanismo Ping-pong Bi-Bi (Segel, 1993). Dicha conversión puede ser completa en las condiciones óptimas de pH (mayor o igual a 5.0), temperatura (37 °C), agitación y aireación en exceso (Mano, 2019)

Esta enzima, consta de dos subunidades unidas por puentes disulfuro y asociadas a dos grupos prostéticos FAD (Bauer et al., 2022). A nivel industrial, es obtenida de hongos de los géneros *Aspergillus y Penicillum*, principalmente *de A. niger* y *P. amagasakiense.*

Una vez formado el ácido glucónico, el peróxido de hidrógeno se degrada en agua y se libera oxígeno, como indican las siguientes expresiones:

$$C_6H_{12}O_6 + O_2 \rightarrow C_6H_{10}O_6 + H_2O_2 \qquad \text{Ecuación 1-1}$$

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2 \qquad \text{Ecuación 1-2}$$

Si bien algunas enzimas pueden ser susceptibles a la presencia de agentes oxidantes como el peróxido, se ha reportado resistencia de la β-gal a dicho compuesto (Ladero et al., 2002), en tanto el ácido glucónico producido se considera un aditivo alimentario seguro, identificado con el código E-757. Este compuesto actúa como agente conservante y regulador de pH en cárnicos y derivados lácteos, además de ser un ácido leudante en productos horneados, que mejora su textura y luminosidad (Dubey et al., 2017).

Aunque el uso conjunto de GOx y β-gal reduce la inhibición de la transgalactosilación, la productividad global depende del microorganismo del cual se han aislado. (Fischer & Kleinschmidt, 2019) generaron un sistema basado en la precipitación de gluconato de calcio al usar lactasa de *A. oryzae*; sin embargo, con la enzima de *K. lactis,* el calcio inhibió la conversión de galactosa, reduciendo el rendimiento de 23 a 15%. De acuerdo con dichos autores, esto implica restricciones en la selección de la enzima, dado que la presencia de glucosa-oxidasa mejora los rendimientos y grados de polimerización de los GOS, principalmente con β-gal más selectivas a la actividad galactosil-transferasa, pero la presencia de calcio afecta en forma generalizada la capacidad catalítica de estas enzimas.

1.6 Inmovilización enzimática

La inmovilización de enzimas es entendida como el confinamiento físico del catalizador o su localización en una región definida del espacio, con retención de la actividad para su uso repetido y continuo (Dunnill, 1979). En general, las técnicas de inmovilización pueden clasificarse como se describe a continuación:

- Reversibles: En estos casos, las enzimas interactúan físicamente sobre la superficie de un soporte, bien por adsorción o interacciones electrostáticas, restringiendo su movilidad en forma temporal.
- Irreversibles: Por el confinamiento del catalizador en geles o membranas (atrapamiento y encapsulación), la formación de enlaces covalentes entre la enzima y una superficie químicamente activada (inmovilización por unión covalente), o la formación de agregados insolubles de varias enzimas, unidas por moléculas bifuncionales, como dialdehídos (inmovilización por entrecruzamiento) (Damin et al., 2021).

Estas técnicas, representadas esquemáticamente en la figura 1-8, permiten obtener catalizadores en una fase diferente al medio de reacción, lo que posibilita la recuperación y

reutilización de los biocatalizadores en múltiples ciclos y configuraciones de catálisis heterogénea. Sumado a esto, las inmovilizaciones suelen mejorar la estabilidad térmica de las enzimas y modificar los rangos de pH en los que se expresa mayor actividad (Grosová et al., 2008).

Figura 1-8. Algunas técnicas de inmovilización enzimática.
Elaboración propia, con BioRender.

Sin embargo, la inmovilización enzimática se asocia a variaciones en los parámetros cinéticos, restricciones difusionales y cambios estructurales durante los tratamientos físicos o químicos requeridos (Guerrero et al., 2017). Adicionalmente, el microambiente que rodea la enzima puede verse alterado por las interacciones entre el soporte, la enzima, sustratos y productos, lo que modifica el desempeño del catalizador. Por ejemplo, un soporte cargado positivamente provoca la repulsión de protones, haciendo que el pH óptimo sea más básico; por el contrario, el pH óptimo desciende en matrices de carga negativa (Xavier et al., 2018). Tales cambios son dependientes de la carga de enzimas en los soportes o barreras físicas e inciden en los rendimientos de inmovilización, el posicionamiento de la enzima, la accesibilidad del sustrato al sitio activo, restricciones estéricas y alteraciones de la estructura (Hackenhaar et al., 2021; Urrutia et al., 2013).

El método de adsorción se basa en el uso de materiales sobre los cuales la enzima se une mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno (e.g. resinas de intercambio iónico, carbón activado, fibras). Sin embargo, en relación con otros

métodos de inmovilización, la estabilidad lograda es baja; esto restringe su uso prolongado y genera pérdidas de catalizador en el medio, pero permite la regeneración del sólido adsorbente (Terrasan et al., 2019). Siguiendo esta técnica, se ha inmovilizado beta-galactosidasa proveniente de *Lactobacilus bulgaricus* en celulosa microcristalina; con un rendimiento de GOS del 49%, productividad de 156 g_{GOS}/L.h y preservación de la actividad catalítica del 85%, hasta por 20 ciclos repetidos (Lu et al., 2012).

De igual manera, Serey et al. (2021) han usado soportes de agarosa funcionalizada con amonio cuaternario, que permite la adsorción de β-gal de *A. oryzae* con una eficiencia del 76% y una carga óptima de 100 mg enzima/g soporte. En este escenario, variaciones en el pH permiten la desorción de la enzima a voluntad y con ello la recuperación y reutilización del soporte. Sin embargo, bajo las condiciones del estudio, solo se consiguieron rendimientos del orden de 10% para la obtención de GOS, por hasta 20 ciclos repetidos. También se ha recurrido a fibra de algodón tratada con polietilenimina como soporte, logrando un rendimiento de GOS de 32% y su reutilización hasta por cinco ciclos (Wang et al., 2021). En este caso, sin embargo, no se reporta la productividad observada.

En contraste a la adsorción física de las enzimas, los métodos de unión covalente usan grupos químicos presentes en soportes que reaccionan irreversiblemente con los aminoácidos hidrofílicos de la enzima (i.e. NH_2 de lisinas, SH de cisteínas, OH de tirosinas y serinas), generando enlaces amida, tio-éster y éter (Brena et al., 2013; Panesar et al., 2010; Trobo, 2018). Otras formas de activación de los soportes permiten la unión multipunto con otros residuales, lo que aumenta la estabilidad de la inmovilización (Guisán, 1988).

Cardelle-Cobas et al. (2016) han reportado el uso de β-galactosidasa de *A. oryzae* inmovilizada en glutaraldehído-agarosa para la síntesis de oligosacáridos derivados de lactulosa. En este caso, se obtuvieron rendimientos de hasta 50% por 10 ciclos, con síntesis preferente de trisacáridos a 50 °C con pH 6.5, y de disacáridos a 60°C, con pH 4.5. De igual forma, Huerta et al. (2011) inmovilizaron esta enzima en tres tipos de soporte: amino-epoxi, quitosano y glioxil agarosa, para medios concentrados de lactosa (54% m/v). Con este último Trobo (2018) indica que a pH alcalino se consiguen enlaces covalentes entre los residuos amino no ionizados de lisina y los grupos aldehído del soporte, logrando altos rendimientos en la inmovilización (42%) y síntesis de GOS (46%, equivalente al observado con la enzima soluble). Además, se observó la preservación del 80% de la actividad enzimática, hasta por 60 horas a 50 °C (en medios no reactivos) y se mantuvo una

conversión de 56% de la lactosa (28% en GOS) hasta por 10 ciclos de 150 minutos (0.9 $g_{GOS}/g_{biocat}h$). Para los valores obtenidos en dichos estudios, los autores estiman que el costo total de la enzima representaría un 1% de los ingresos generados, en los 10 ciclos de reacción.

Un comportamiento análogo ha sido publicado al inmovilizar lactasa proveniente de *Bacillus circulans* en el mismo soporte de glioxil-agarosa (1.3 mg de proteína por gramo de soporte), en cuyo caso tras 10 lotes repetidos solo se reduce la actividad inicial en un 8% (rendimiento GOS de 39%) (Urrutia et al., 2013). Modificando este material, se han explorado soportes heterofuncionales (i.e. con dos grupos reactivos diferentes) como amino-, carboxi- y quelato-glioxil agarosa. Así, dada la aparición conjunta de fenómenos de adsorción y unión covalente, la adición de grupos heterofuncionales altera la estabilidad térmica y el rendimiento de inmovilización por los cambios de orientación de la enzima (Guerrero et al., 2018). En el caso de la enzima aislada de *B. circulans*, los grupos carboxilo desfavorecen la adsorción inicial de la enzima, dado que a pH neutro ésta cuenta con una carga neta negativa. Por otra parte, los quelatos consiguen retener el 15% de la actividad tras estrés térmico a 60°C por 200 minutos. Además, el uso de glioxil agarosa y amino-glioxil agarosa consiguió rendimientos similares de inmovilización (38%), aunque la relación entre la vida media de la enzima inmovilizada y sin inmovilizar (factor de estabilidad) decae de 73.4 a 37.5 al usar cada tipo de soporte, respectivamente (Urrutia et al., 2013).

Al realizar la inmovilización de la enzima proveniente de *A. oryzae*, en estos mismos soportes heterofuncionales, Guerrero et al. (2018) no reportaron cambios significativos en el rendimiento de GOS, respecto a la enzima soluble (29%). No obstante, se evidenció una reducción en la productividad, explicada por la resistencia difusional debido a la carga de enzima en los soportes (30 mg enzima/g soporte). Esto mismo causó que la constante de afinidad aparente de Michaelis (K_M) se incrementara seis veces, para la inmovilización en glioxil agarosa y amino glioxil agarosa, respecto a la enzima libre.

Para contrarrestar estas limitaciones por reducción en la productividad y estabilidad, algunas mejoras en los tiempos y rendimientos de inmovilización se basan en la adición de nanopartículas magnéticas a soportes de quitosano (Alnadari et al., 2021). De hecho, estas han sido usadas para inmovilizar galactosidasas y glucosidasas provenientes de otros microorganismos (Nguyen et al., 2019).

Otros soportes que se han reportado se basan en quitosano activado con glutaraldehído. Para la enzima de *B. circulans*, esta técnica permite 10 ciclos de reutilización, conservando el 74% de actividad inicial y presentando un factor de estabilidad térmica 2.9 veces mayor al de la enzima libre (Hackenhaar et al., 2021). En el caso de *Kluyveromyces lactis*, Bernal et al. (2013) reportan la preservación del 82% de la actividad de la enzima en soportes de glioxil-sefarosa. Sumado a esto, estos autores señalan que dichos soportes hacen más rígida la estructura cuaternaria y confieren mayor estabilidad frente a variaciones de pH, en el rango de 5.0 a 9.0.

De igual manera, otras técnicas de inmovilización por enlace covalente han empleado compuestos bifuncionales (e.g. glutaraldehído, toluendisocianato) para entrecruzar varias unidades de enzima. Un protocolo general para la precipitación y entrecruzamiento es reportado por Roy et al. (2017) aunque existen variaciones, dependiendo de la enzima a inmovilizar. Entre las ventajas de esta técnica se encuentran su facilidad, al no requerirse un soporte inerte, la retención de la actividad (inversa al grado de entrecruzamiento), la estabilidad térmica, mecánica y tolerancia a solventes orgánicos lograda (Guerrero et al., 2018; Urrutia et al., 2013). Al aplicar la inmovilización de beta-galactosidasas por entrecruzamiento con glutaraldehído, se ha reportado la conservación del rendimiento GOS/lactosa respecto a una enzima libre (0.29 g GOS/g lactosa inicial), pese a que se reduce la productividad (4-15 g GOS/g enzima-h) (Guerrero et al., 2018). Sin embargo, en este caso la afinidad por el sustrato es 3 veces menor que en los sistemas con soporte heterofuncional de glioxil-agarosa.

Tabla 1-1 Rendimiento y productividad de GOS con β-gal de *A. oryzae* inmovilizadas por técnicas de enlace covalente y entrecruzamiento. Adaptado de Vera et al. (2016).

Método	**Soporte**	**T(°C)**	**pH**	$Y_{max}GOS$ **(%)**	π **(gGOS/Lh)**	**Tiempo (h)**
Enlace covalente	Quitosano	40	4.0	25.5	4.3	4 ciclos
Enlace covalente	Perlas amino-epóxicas	50	4.5	20.2	40.4	15
Enlace covalente	Quitosano	50	4.5	19	34.5	15
Enlace covalente	Glioxil-agarosa	50	4.5	22.3	33.5	15
Enlace covalente	PVA magnético	50	4.5	26	130	15
Entrecruzamiento	Autosoportado	40	4.0	4.6	4.6	4 ciclos

La tabla 1-1, presenta los rendimientos y productividades para la enzima de *A. oryzae*, cuando se recurre a algunas técnicas de inmovilización mencionadas.

También se han estudiado técnicas de atrapamiento, basadas en la retención de las enzimas en cavidades de matrices porosas, entre ellos agar, alginato, o poliacrilamida. El alginato es un biopolímero derivado del ácido algínico, que se encuentra en la pared celular de diferentes especies de algas pardas (*Phaeophyta*) y representa cerca del 40% del peso seco de estos microorganismos. Éste se compone de dos tipos de unidades monoméricas: ácidos β-D-manurónico (M) y alfa-L-gulurónico (G) unidas por enlaces glucosídicos 1-4 y con un carácter aniónico, conferido por sus grupos carboxilo. El alginato es soluble en presencia de iones monovalentes, mientras que en presencia de iones polivalentes se forman geles por interconexiones iónicas, cuya estabilidad es altamente dependiente de la proporción de unidades M y G, y la concentración de iones (Garcia-Cruz et al., 2008).

Dentro de esta categoría, el uso de alginato de calcio para la encapsulación de β-galactosidasas provenientes de *K. lactis* condujo a una reducción en el rendimiento de GOS, pasando de un 24.5% con el catalizador libre, a 4.1% luego del atrapamiento (Guío, 2014). En ese mismo estudio, se evaluó la inmovilización covalente en sílica gel activada con TRIS y glutaraldehído, en cuyo caso se presentaron menores restricciones difusionales y se alcanzó rendimiento del 13%, usando lactosuero como sustrato.

Aun así, otros estudios basados en el uso de hidrogeles reportan la liberación progresiva de las enzimas al medio, limitando el uso prolongado de dichos catalizadores (Zhang et al., 2015). El desempeño de estos sistemas puede mejorarse modificando el grado de reticulación de la barrera física o modificando los iones entrecruzantes presentes en dicha matriz, con lo cual algunos autores han logrado el uso hasta en 50 ciclos y la preservación de 60% de la actividad luego de tres meses de conservación en refrigeración (Gennari et al., 2018; Wolf et al., 2018).

Si bien, son múltiples las técnicas evaluadas para inmovilizar beta-galactosidasas, su presencia en el mercado aun es limitada. En forma comercial, la firma Centrale del latte de Milán (Italia) dispone de β-galactosidasa de *K. lactis* inmovilizada en fibras de triacetato de celulosa. Por otra parte, en Japón la compañía Sumimoto Chemical ofrece β-gal inmovilizadas en una resina de intercambio iónico de un polímero fenol-formaldehído (Panesar et al., 2010; Xavier et al., 2018).

En concordancia con las descripciones anteriores, en forma general, la tabla 1-2 presenta cualitativamente algunos criterios de comparación entre diferentes técnicas de inmovilización enzimática. Idealmente, los reactivos y soportes involucrados deberían ser disponibles y económicos, con una elevada retención de la actividad catalítica y estabilidad en el tiempo, de manera que los costos iniciales asociados a la enzima misma y a la etapa de inmovilización sean compensados por un tiempo de uso prolongado del catalizador.

Tabla 1-2 Criterios de comparación entre métodos de inmovilización enzimática. Adaptado de Ölçücü et al. (2023)

Método de inmovilización	**Ventajas**	**Desventajas**
Enlace covalente	Poca a nula liberación de enzimas. Simple.	Baja actividad. No es posible regenerar el soporte o las enzimas. Baja carga enzimática.
Adsorción	Simple y de bajo costo. Regeneración de enzimas y soporte.	Elevada liberación de enzimas. Baja especificidad de los sitios de adsorción.
Atrapamiento	Mínima alteración química de la enzima	Elevada liberación de enzima. Limitaciones de transferencia de masa.
Entrecruzamiento	Poca liberación de enzima. No requiere soporte.	Pérdida variable de actividad, según condiciones de entrecruzamiento

1.7 Co-inmovilización enzimática

Como una adaptación de los métodos previamente descritos, se han generado avances en sistemas enzimáticos co-inmovilizados que recurren a reacciones en cascada, para mejorar la síntesis de un producto de interés, la estabilidad en el tiempo y actividad de bio-catalizadores complementarios (Ren et al., 2019). Idealmente, una co-inmovilización busca reacciones enzimáticas simultáneas en un mismo soporte para mejorar el rendimiento, cinética, costos y facilidad de operación del proceso, reduciendo efectos inhibitorios. Entonces, con esta metodología es importante considerar el balance de los componentes

inmovilizados y, de ser posible, la determinación experimental de la co-localización de los catalizadores en el soporte, para lo cual se puede recurrir a técnicas de microscopía de fluorescencia (Trobo, 2018).

Entre las aplicaciones de las co-inmovilizaciones se encuentran, la adición de enzimas líticas que previenen la degradación de los demás catalizadores por la acción de agentes microbianos, el consumo de productos intermedios indeseables que reducen la capacidad catalítica del sistema o la producción de moléculas y cofactores que benefician a otra enzima de interés (Hernandez et al., 2012; Rodrigues et al., 2013; Rodriguez et al., 2012).

No obstante, las técnicas de co-inmovilización también implican algunos retos como:

- Una eficiencia dispar de las enzimas para una misma técnica de inmovilización o soporte, debido a diferentes velocidades de inmovilización o tamaños disímiles entre las proteínas, lo cual reduce la recuperación de actividad de una o varias de ellas (Chmura et al., 2013).
- Diferentes condiciones óptimas entre las enzimas, o producción de sustancias inhibidoras de otras reacciones del sistema co-inmovilizado, con lo que se debe favorecer la actividad de unas y sacrificar la de otras (Ren et al., 2019).
- La pérdida de actividad progresiva de una enzima a una mayor velocidad que otra, inutilizando la enzima aun activa por regenerar la inactiva. Esto puede requerir de dos tipos de inmovilización para remover y regenerar selectivamente la enzima con menor tiempo de vida útil (Peirce et al., 2016).
- La necesidad de separar espacial o temporalmente las enzimas para mejorar la coordinación del sistema en reacciones en cascada, particularmente si simulan rutas metabólicas (Arana-Peña et al., 2021).
- Limitaciones de área superficial en el soporte, distribución heterogénea de las enzimas o requerimientos de inmovilización multicapa, que aumentan las restricciones difusionales, según el tamaño relativo de las diferentes enzimas (Deng et al., 2010).

En este caso, el entrecruzamiento con glutaraldehído ha sido probado con éxito en sistemas multienzimáticos para la generación de agregados combinados (combi-CLEA) (Hetrick et al., 2014; Roy et al., 2017). Otros estudios, han logrado la co-inmovilización de glucosa-oxidasa con fructofuranosidasa, obteniendo mayor tolerancia a pH ácidos (menores a 6.5) y temperaturas superiores a 40°C (Long et al., 2020). De igual forma, la co-inmovilización

de beta-galactosidasas con ferroceno constituye una técnica para la construcción de biosensores (Liu et al., 1998) y se ha reportado el diseño de agregados de entrecruzamiento combinados de β-galactosidasa y glucosa isomerasa para la producción de jarabes de fructosa a partir de lactosa (Araya et al., 2019). En este último caso, posterior a una aminación de la glucosa isomerasa, se obtuvieron rendimientos de inmovilización, en términos de actividad, en torno a 38-48% (actividad hidrolítica de β-galactosidasa) y 45-66% (glucosa isomerasa), con una proporción óptima de 1.67 g_{glut}/g_{prot}.

Así mismo, la co-inmovilización de beta-galactosidasas en sistemas binarios con glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, peroxidasa, galactosa deshidrogenasa, o glucosa isomerasa ha sido explorada para la construcción de biosensores amperométricos o colorimétricos de lactosa (Araya et al., 2019). En el caso de la co-inmovilización con glucosa oxidasa, se ha inmovilizado una proporción de enzimas 2:1 (β-gal:GOx), atrapándolas en geles previamente tratados con glutaraldehído, sobre un electrodo de platino que detecta la degradación redox del peróxido de hidrógeno (Loğoğlu et al., 2006). Con este mismo par de enzimas se han evaluado otros biosensores que recurren a la co-inmovilización covalente sobre albúmina de suero bovino, carbono vítreo dopado con mercurio, y deposición electroforética (Ammam & Fransaer, 2010; Göktuğ et al., 2005; Jasti et al., 2014).

Todea et al. (2021) reportaron la producción de GOS y ácido glucónico en una etapa de reacción simultánea, usando inmovilización covalente de β-galactosidasa de *A. oryzae* en partículas magnéticas-aminadas de $Ni_{0.4}Co_{0.2}Zn_{0.4}Fe_2O_4$ y glucosa oxidasa de *A. niger* en soportes epoxi-metacrilato. En este caso, pese a que se evaluó el comportamiento de la enzima proveniente de *K. lactis,* los autores descartaron su uso, al presentar un comportamiento inferior frente a las partículas magnéticas. Con el uso de cada enzima en el soporte respectivo, se determinó un rendimiento de inmovilización (en términos de proteína Y_P) superior al 95%, preservando el 95% de la actividad hidrolítica a 50°C y logrando estabilidad de la glucosa oxidasa en el rango de pH 5.5-9.0. De igual manera, la presencia de peróxido de hidrógeno (100mM) redujo la actividad de la β-galactosidasa en un 5% para la enzima inmovilizada y en un 18% para el catalizador libre, lo que permitió operar por 5 ciclos conservando el 90% de la actividad inicial de ambas enzimas, y por 10 ciclos con una preservación del 84%.

En relación con estos antecedentes, a la fecha no se tiene conocimiento de otros reportes que se orienten al aprovechamiento de una técnica de co-inmovilización, con el propósito de mejorar los rendimientos de transgalactosilación usando β-galactosidasas de *A. niger y A. oryzae,* en conjunto con glucosa oxidasa. El reporte de Todea et al. (2021) sirve como referente para evaluar el uso de un solo soporte (co-inmovilización) o soportes individuales para cada tipo de enzima, considerando otros materiales o métodos de entrecruzamiento.

2. Planteamiento del problema

2.1 Problema de investigación

Como se ha expuesto previamente, el lactosuero es un residuo con alta disponibilidad y bajo costo, actualmente desaprovechado por la industria láctea. Lograr su valorización, usándolo para obtener compuestos de alto valor comercial, puede beneficiar la dinamización económica del sector lácteo y contribuir a la mitigación de su impacto ambiental. En este sentido, la producción de GOS prebióticos a partir del lactosuero representa una estrategia para la generación de valor agregado de este efluente, considerando sus propiedades funcionales como aditivo alimentario.

Sin embargo, la producción enzimática de GOS impone restricciones debido al carácter paralelo de las reacciones de oligomerización e hidrólisis involucradas, lo cual limita los rendimientos para la obtención de estos prebióticos. Sumado a lo anterior, el uso de enzimas libres en la solución de lactosuero dificulta su recuperación, por lo que la actividad catalítica se restringe a un solo ciclo de operación y debe añadirse nueva enzima para nuevos lotes de producción.

Típicamente, esta configuración es utilizada en la producción de leche deslactosada. En este caso, la enzima puede actuar previo a la etapa de pasteurización, hasta alcanzar concentraciones finales de lactosa del orden del 0.1% (BIOCON, 2021). Sin embargo, cuando se desea favorecer la transgalactosilación, la reacción debe detenerse en el momento de mayor concentración de GOS, para evitar su hidrólisis. Al contar con enzimas inmovilizadas, el protocolo de detención consiste en la separación del bio-catalizador del medio de reacción en condiciones no desnaturalizantes, con lo que éste queda disponible para reutilizarse.

Dicho enfoque resulta de interés en tanto puede reducir la inversión requerida en enzimas, que de otra forma tienen un corto tiempo de vida útil. Por lo tanto, es necesario evaluar

configuraciones que busquen altos rendimientos, estabilidad del biocatalizador, preservación de su actividad para su uso en tiempos prolongados y facilidad para su recuperación.

Sumado a lo anterior, la evaluación de sistemas mixtos de enzimas, con la adición de glucosa oxidasa (GOx), es una estrategia plausible para reducir la concentración de la glucosa inhibidora, aumentar el valor agregado del producto, por la producción paralela de ácido glucónico y obtener mayores concentraciones de prebióticos en el medio de reacción.

Así mismo, con el conocimiento actual de la selectividad a la hidrólisis o transgalactosilación para β-galactosidasas de diferente origen microbiológico (Botvynko et al., 2019; Fischer & Kleinschmidt, 2018a; Frenzel et al., 2015; Guerrero et al., 2015), el valor prebiótico para GOS con diferentes grados de polimerización (Catenza & Donkor, 2021; Farias et al., 2019) y el efecto sinérgico del consumo de glucosa por su oxidación a ácido glucónico (Fischer & Kleinschmidt, 2019; Rico-Rodríguez, 2018), la intensificación del proceso mediante un sistema multi-enzimático que involucre β-galactosidasa (β-gal) de dos diferentes orígenes (*A. oryzae y A. niger*) y glucosa oxidasa (Gox) resulta en un foco interesante para evaluar su comportamiento en sistemas libres, inmovilizados y co-inmovilizados.

Adicionalmente, contemplados diferentes alternativas de inmovilización, los métodos de atrapamiento y entrecruzamiento no requieren de costosos soportes funcionalizados, por lo que resultan propuestas atractivas para evaluar el comportamiento de los sistemas mono y multienzimáticos para la producción de galacto-oligosacáridos (GOS) usando lactosuero como sustrato.

Frente al problema planteado, la presente investigación busca dar respuesta la siguiente pregunta: ¿Cómo afecta la inmovilización y co-inmovilización de un sistema multienzimático de beta-galactosidasa y glucosa oxidasa a la retención de la actividad enzimática, los rendimientos y grado de polimerización obtenidos, para la síntesis de GOS a partir de lactosuero en múltiples ciclos repetidos?

2.2 Objetivos

General:

- Evaluar el impacto de un sistema mixto de enzimas inmovilizadas para la producción de galacto-oligosacáridos, sobre la retención de la actividad enzimática, los rendimientos y grado de polimerización obtenidos, al usar lactosuero como sustrato.

Específicos:

- Evaluar el efecto de diferentes sistemas de inmovilización sobre la producción de los galacto-oligosacáridos, para enzimas individuales.
- Evaluar el efecto de un sistema de co-inmovilización sobre la producción de los galacto-oligosacáridos, para un sistema mixto de enzimas.
- Determinar la mejor forma de uso de las enzimas inmovilizadas (secuencial o simultánea) sobre la producción de GOS.
- Evaluar la estabilidad del sistema inmovilizado para su uso en múltiples ciclos repetidos.

3. Materiales y métodos

3.1 Reactivos

Las beta-galactosidasas de *Aspergillus oryzae y Aspergillus niger* fueron generosamente donadas por Enzyme Development Corporation (ENZECO®) y Megazyme® (EBGLAN), respectivamente. La enzima glucosa oxidasa Gluzyme mono-10000BG, aislada de *A. oryzae* fue adquirida de Novozymes,

El lactosuero en polvo se obtuvo de la marca Mlekovita (ficha técnica Anexo A). El alginato de sodio fue suministrado por Carlo Erba. El ácido fosfórico, hidróxido de sodio, cloruro de calcio, fosfato monobásico y diácido de sodio, sulfato de amonio, isopropanol, carbonato de sodio, glucosa, lactosa, galactosa y rafinosa, fueron adquiridos de PanReac.

El ácido glucónico grado reactivo (50%), se obtuvo de J.T. Beaker. los patrones grado HPLC de ketosa, nistosa y fructofuranosil-nistosa, se adquirieron de WAKO, en tanto los patrones de maltotriosa, maltotetraosa, maltopentosa y maltohexosa fueron provistos por Supelco.

El patrón de albúmina de suero bovino (BSA 99%), glutaraldehído (50%m/m), orto-nitrofenol (o-NP) (99%) y orto-nitrofenilgalactopiranósido (o-NPG) (99%) fueron suministrados por Sigma Aldrich.

Para el análisis de proteínas el reactivo de Bradford, fue provisto por Sigma Aldrich, el reactivo de Folin-Ciocalteu, por Merck, el sulfato de cobre y tartrato de sodio-potasio, por Panreac.

3.2 Técnicas analíticas

3.2.1 Contenido de humedad

El contenido de humedad del lactosuero se determinó de acuerdo con el protocolo AOAC 990.19 (AOAC, 2002) Se pesaron dos gramos del lactosuero en polvo y se secaron a 100°C por 4 horas. Luego, la muestra se enfrió en un desecador y se calculó el porcentaje de humedad, de acuerdo con la diferencia de peso:

$$\%\ \text{Humedad} = \frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso húmedo}} \times 100 \qquad \text{Ecuación 3-1}$$

3.2.2 Contenido de proteína

La cuantificación de proteínas en medios de reacción, soluciones de enzima, y sobrenadantes de inmovilización con presencia de alginato de calcio e isopropanol se efectuó con un protocolo modificado del método de Lowry (Zamora, 2008). Inicialmente, se prepararon 4 soluciones:

- Solución A: Na_2CO_3 (10 g/L) y NaOH (1 N).
- Solución B: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (5 g/L) y tartrato de sodio-potasio (10 g/L)
- Solución C: 50 mL de solución A y 1 mL de solución B.
- Solución D: Dilución de reactivo Folin-Ciocalteu al 50% (1.2 N).

A 400 µL de muestra se añadieron 800 µL de solución C, dejando en reposo por 15 minutos. Posteriormente se añadieron 80 µL de solución D y se mezcló vigorosamente. Pasados 10 minutos de reacción, se midió la absorbancia de la muestra a 578 nm. Las alícuotas fueron diluidas de tal forma que la absorbancia obtenida estuviera en el rango de una curva de calibración preparada con albúmina de suero bovino (BSA), usada como patrón de proteína en el rango de 0 a 0.8 g/L.

La presencia de sulfato de amonio interfiere con este método (Bensadoun & Weinstein, 1976), por lo que las alícuotas que contenían dicha sal se evaluaron siguiendo el método de Bradford. Para esto, 100µL de alícuota diluida se añadieron a 1mL de reactivo Bradford, y se determinó la absorbancia de la muestra a 595nm, calculando el contenido proteico según una curva de calibración realizada con BSA (Bradford, 1976).

3.2.3 Contenido de azúcares

El contenido de glucosa, galactosa, lactosa y GOS en la matriz de reacción enzimática se determinó por HPLC-IR con un cromatógrafo UltiMate® 3000 (ThermoScientific, USA) acoplado a un detector de índice de refracción Shodex RI-101 (Showa Denko K.K., Japan). Se usó una columna BP 17000-0 BP-100Na^+ (300mmx7.8mm-Benson Polymeric Inc. Estados Unidos), operando con agua desionizada como fase móvil, flujo de 0.5 mL/min y temperatura de 80°C. Para la cuantificación de los carbohidratos presentes, se elaboró una curva de calibración para cada azúcar. En el caso de los GOS, se usaron malto-oligosacáridos (DP3 a DP6), rafinosa y fructo-oligosacáridos (ketosa, nistosa y frucofuranosil-nistosa), como sustancias patrón.

3.2.4 Contenido de ácido glucónico

Para los medios de reacción con glucosa grado reactivo, la evolución de la concentración de ácido glucónico se cuantificó mediante HPLC-UV, usando una columna Shodex KC-811, operada con fase móvil de ácido fosfórico 0.1%m/v, a 0.5mL/min y 40°C. Se obtuvo una curva de calibración con ácido glucónico midiendo la absorbancia a longitud de onda de 215nm.

En medios de reacción de lactosuero, el contenido de ácido glucónico se correlacionó con el consumo de una solución 1.25 M de NaOH, requerido para neutralizar el medio a las condiciones del ensayo (pH 5.0 o 6.0). Esta medición por consumo ácido-base fue necesaria puesto que el lactosuero utilizado contiene un excipiente que exhibe el mismo tiempo de elución del ácido glucónico y una elevada absorbancia en las longitudes de onda con las que el analito de interés puede cuantificarse, imposibilitando una medición directa por cromatografía.

3.2.5 Montaje de reacción

Todos los ensayos se llevaron a cabo en tubos plásticos de fondo cónico tipo Falcon de 50 mL, sumergidos en un baño termostático con un volumen efectivo de 20 mL de solución de sustrato (lactosuero o glucosa). Para homogeneizar el medio y suministrar el oxígeno requerido en la oxidación de glucosa con GOx, cada Falcon contaba con una línea de aire acoplada a un compresor de acuario, una válvula para regular el flujo y un difusor poroso,

para reducir el tamaño de las burbujas y mejorar la transferencia del oxígeno a la fase líquida (Figura 3-1).

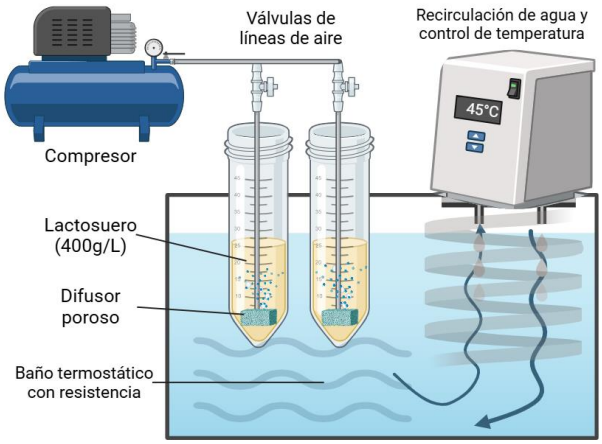


Figura 3-1 Montaje de reacciones enzimáticas.
Baño termostático con recirculación de agua, calefacción eléctrica y aireación
(Elaboración propia con BioRender).

3.2.6 Actividad hidrolítica de β-galactosidasas.

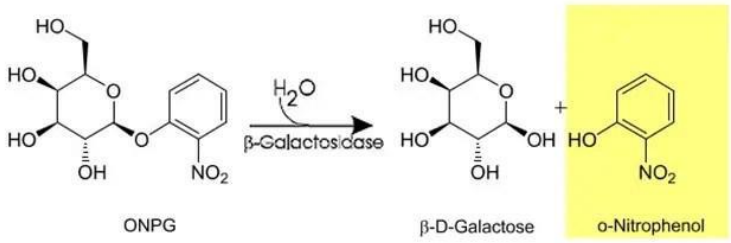


Figura 3-2 Reacción de degradación de o-NPG catalizada por enzima β-gal.
(Tankeshwar, 2023)

Inicialmente se cuantificó la actividad hidrolítica de las enzimas usando como sustrato o-nitrofenil-β-D-galactopiranósido (o-NPG) que se hidroliza a o-nitrofenol (O-NP), un compuesto de color amarillo (figura 3-2). Siguiendo el método estandarizado para la medición de la actividad hidrolítica (FAO, 2006), el sustrato se diluyó en buffer fosfato o acetato. A 2.5 mL de o-NPG disuelto a 3.7 mg/mL, se añadieron 0.5 mL de solución enzimática, calculando las unidades ($IU_{H_{oNPG}}$) por gramo de enzima, de acuerdo al

número de micromoles de o-NP liberados por tiempo y gramo de catalizador, de acuerdo con la expresión de la ecuación 3-2.

$$\mathrm{IU}_{\mathrm{H_{oNPG}}} = \frac{\mu\mathrm{mol_{oNP}} - \mu\mathrm{mol_{oNPinicial}}}{\mathrm{g_{Enzima}t[min]}} \qquad \text{Ecuación 3-2}$$

Pasado el tiempo de reacción (15 min), ésta se detuvo mediante la adición al medio de carbonato de calcio 10% m/v. La producción de o-NP se midió espectrofotométricamente a 420nm, a partir de una curva de calibración, realizada previamente con patrón de este compuesto.

Este protocolo se siguió para cinco valores de pH en el rango de 4.5 a 6.5, y dos temperaturas (40 y 45°C), evaluando el comportamiento de la actividad relativa por triplicado ($a_{rel} = a/a_{max}$) para cada β-galactosidasa (*A. oryzae y A. niger*). En este caso, para el análisis estadístico se consideró un diseño experimental trifactorial (fuente de enzima, temperatura y pH), efectuando el respectivo análisis de varianza con el software Minitab 20.3.

3.2.7 Actividad transgalactosiladora e hidrolítica de β-gal

La actividad de transgalactosilación de cada una de las β-gal fue evaluada en 20 mL de lactosuero, con una concentración equivalente de 40% m/v de lactosa. Fijando la temperatura en 45°C, se determinó la velocidad inicial de producción de GOS para dos niveles de pH (5.0 y 6.0). En este caso, una unidad de actividad transgalactosiladora ($\mathrm{IU_{TG}}$) es definida como el número de micromoles de GOS sintetizados por unidad de tiempo y masa de enzima (Ecuación 3-3).

$$\mathrm{IU_{TG}} = \frac{\mu\mathrm{mol_{GOS}} - \mu\mathrm{mol_{GOS\ inicial}}}{\mathrm{g_{Enzima}t[min]}} \qquad \text{Ecuación 3-3}$$

Por otra parte, se cuantificó la actividad hidrolítica en lactosuero ($\mathrm{IU_{H_{glc}}}$), definida en términos de glucosa liberada por unidad de tiempo y gramo de enzima, como se muestra:

$$\mathrm{IU_{H_{glc}}} = \frac{\mu\mathrm{mol}_{glucosa} - \mu\mathrm{mol_{glucosa\ inicial}}}{\mathrm{g_{Enzima}t[min]}} \qquad \text{Ecuación 3-4}$$

A partir del cálculo de estas dos actividades por duplicado, para cada enzima se determinó el efecto del pH en la relación de transgalactosilación a hidrólisis ($\mathrm{IU_T/IU_{Hglc}}$), con el fin de

determinar la tendencia de la enzima a degradar azúcares o producir oligómeros, en cada escenario. Para dicha comparación estadística se empleó la prueba de Tukey.

Posteriormente, se determinó el efecto inhibitorio de la glucosa sobre el rendimiento de prebióticos. Para esto, se evaluó la fracción másica de GOS obtenida en 80 minutos de reacción, variando el contenido inicial de glucosa entre 0 y 100 g/L en medio de lactosa a 40% m/v, al añadir 50 U/mL de β-gal. Luego, se determinó el cambio en la selectividad de la enzima a la síntesis de GOS, evaluando en cada caso la cantidad de lactosa consumida y la concentración de prebióticos alcanzada, de acuerdo a la expresión:

$$S = \frac{w_{GOS\ final} - w_{GOS\ 0}}{w_{lactosa\ 0} - w_{lactosa\ final}} \qquad \text{Ecuación 3-5}$$

3.2.8 Actividad de glucosa oxidasa.

Se evaluó la capacidad oxidativa de la GOx mediante el seguimiento de la producción de ácido glucónico en un medio de glucosa 50 g/L en buffer fosfato, suministrando aire a una tasa de 4 vvm. Para este catalizador, una unidad enzimática (IU_{GOx}) se define como la cantidad de enzima que produce un µmol de ácido glucónico (*glco*) por minuto de enzima, según la ecuación 3-6 (Chen & Weng, 1986).

$$IU_{GOx} = \frac{\mu mol_{glco} - \mu mol_{glcoinicial}}{g_{Enzima}\, t[min]} \qquad \text{Ecuación 3-6}$$

Dicha actividad se evaluó en 5 niveles de pH (4.5 a 6.5) y dos temperaturas (40 y 45°C) y luego se estableció el comportamiento de la actividad relativa, definida como la relación entre la actividad medida y la actividad máxima observada, a una temperatura dada. En este caso, los valores obtenidos por duplicado se evaluaron con un ANOVA discriminado para un diseño bifactorial.

3.3 Inmovilización enzimática

Las enzimas beta-galactosidasa y glucosa oxidasa fueron inmovilizadas en forma independiente, empleando tres métodos: la formación de dos tipos de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) y el atrapamiento físico en perlas de alginato de calcio, como se muestra esquemáticamente en la figura 3-3. En cada caso, el rendimiento de inmovilización se calculó de dos formas:

- Rendimiento de inmovilización de proteína: Se cuantificó midiendo el contenido de proteína ([P]) remanente en el sobrenadante de la inmovilización, respecto a la concentración inicial, como se indica a continuación:

$$Y_P = \frac{[P]_{inmovilizada}}{[P]_{libre}} = \frac{[P]_{libre} - [P]_{sobrenadante}}{[P]_{libre}} \qquad \text{Ecuación 3-7}$$

- Rendimiento de recuperación de actividad: Se evaluó midiendo la actividad recuperada en la enzima inmovilizada, respecto al número de unidades iniciales en solución, basado en el método propuesto por (Huerta et al., 2011), como muestra la siguiente ecuación:

$$Y_a = \frac{a_{inmovilizada}}{a_{libre}} = \frac{a_{inmovilizada}}{a_{inmovilizada} + a_{sobrenadante} + a_{perdida}} \qquad \text{Ecuación 3-8}$$

La respuesta de los rendimientos de inmovilización se analizó estadísticamente considerando un ANOVA para diseño bifactorial (método de inmovilización y fuente de enzima).

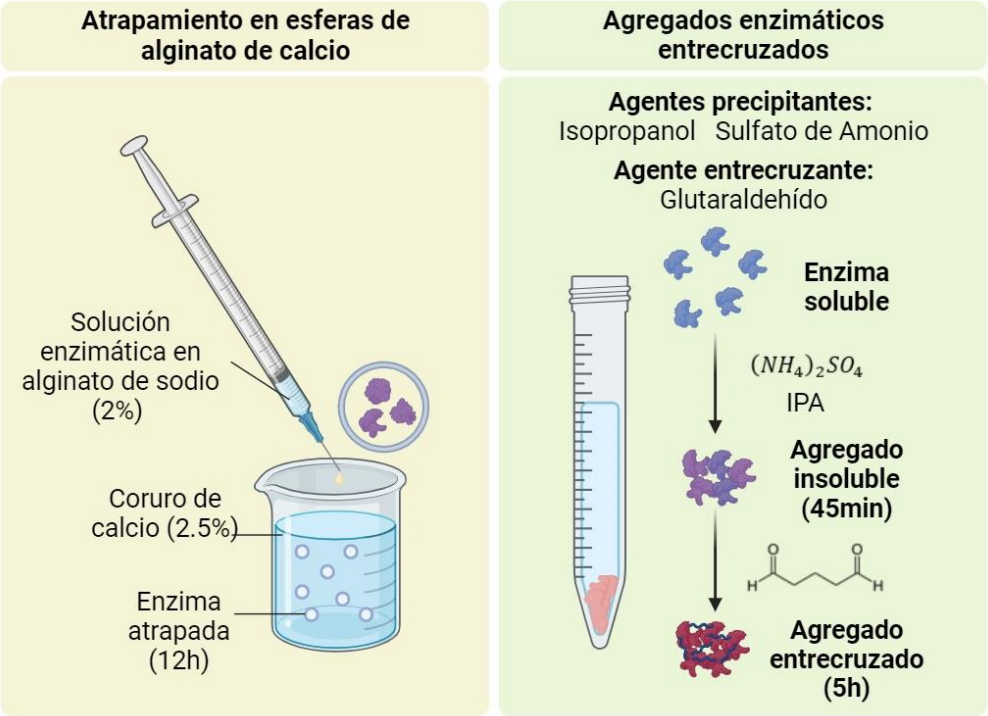


Figura 3-3. Protocolos de inmovilización enzimática.
(Diagrama de elaboración propia).

3.3.1 Agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs).

De acuerdo con el protocolo propuesto por Guerrero et al. (2020), se preparó una solución de cada enzima diluida a un equivalente de 50 g/L de proteína. A una alícuota que contuviera el número de unidades requeridas para cada ensayo se añadió un agente precipitante: (1) solución de isopropanol o (2) solución de sulfato de amonio 5 M, en proporción volumétrica de 2.8 mL, por mL de solución de enzima. Pasados 45 min de incubación a 30°C, se añadió glutaraldehído en una proporción másica de 5.5 g/g de enzima, procediendo con la fase de entrecruzamiento durante 5 horas. Por último, los agregados insolubles se recuperaron por centrifugación (4000 rpm, 1 min) y se lavaron con agua destilada.

Con el fin de corroborar la recuperación de proteína inmovilizada, para cada β-gal se estudió el efecto de variar la concentración de IPA entre 60 y 80% m/v, comparando la respuesta con una prueba de Tukey.

El tamaño promedio de las partículas de los agregados se determinó añadiéndolos a un medio buffer y agitándolos por cinco horas con aireación, con el fin de disgregarlos en condiciones equivalentes a las de un ciclo de reacción. Posteriormente, se tomaron alícuotas y se observaron al microscopio, midiendo el diámetro promedio de los agregados en 15 muestras, de acuerdo con patrones de calibración de 0.07 a 1.5 mm.

En el presente estudio, la metodología de formación de CLEAs fue idéntica para la glucosa oxidasa, debido a que posteriormente se procedió con su co-inmovilización con β-gal, para lo cual ambos catalizadores debían ser sometidos a las mismas condiciones.

3.3.2 Atrapamiento en esferas de alginato de calcio

Para las enzimas inmovilizadas por atrapamiento, las unidades requeridas de cada catalizador se disolvieron en una solución 2% m/v de alginato de sodio. Luego esta mezcla se goteó con una jeringa de 1 mL sobre una solución de $CaCl_2$ (2.5%m/v), previamente refrigerada a 4°C (Guío, 2014). Pasadas 12 horas de gelificación en refrigeración (4°C) las esferas de alginato de calcio se lavaron con agua destilada, obteniendo un diámetro medio (δ) de 3mm.

3.4 Co-inmovilización

La co-inmovilización de β-gal y GOx se evaluó para agregados enzimáticos (CLEAs-IPA y CLEAs-Sulfato). Se prepararon soluciones de cada enzima, a un equivalente de 50g/L de proteína, se tomó el volumen de cada solución que contuviera el número de unidades catalíticas requeridas y se mezclaron en una única solución que contuviera β-gal y GOx. Partiendo de esta mezcla, los pasos posteriores fueron equivalentes a los presentados en la sección 3.3.1.

3.5 Reacciones enzimáticas

3.5.1 Síntesis de GOS con β-galactosidasas libres

En esta fase, la síntesis de GOS se realizó en lactosuero con 400 g/L de lactosa inicial, evaluando los perfiles de composición del medio según el efecto del pH, el origen enzimático y la relación másica enzima sustrato (E/S).

$$(E/S)[\%] = \frac{g_{Enzima}}{100 g_{lactosa}} \qquad \text{Ecuación 3-9}$$

De acuerdo con reportes previos, las relaciones de 0.25% y 0.39% han mostrado mejores rendimientos hacia la formación de prebióticos (Castro, 2020), por lo que se seleccionaron estos niveles, de acuerdo con el diseño experimental presentado en la tabla 3-1

Tabla 3-1 Diseño experimental para la producción de GOS en sistemas monoenzimáticos libres

Factor	Niveles
Relación E/S	0.25% 0.39%
pH	5.0 6.0
Origen enzimático (β-gal)	*A. oryzae* *A. niger*

Para monitorear el cambio porcentual en la composición de carbohidratos, se tomaron muestras en el tiempo durante 5 horas, deteniendo la reacción en cada punto mediante inactivación térmica de la enzima. Para esto, cada muestra se sumergió en agua en ebullición durante 10 minutos y posteriormente se transfirió a un baño con hielo.

A partir de las cinéticas obtenidas, se evaluaron el rendimiento (Y_{GOS}) y la selectividad en el punto de máxima concentración de oligosacáridos (S_{max}), en tanto la productividad se calculó pasados 100 minutos de reacción (π_{100GOS}). Además, al final del ciclo de reacción, se determinaron la selectividad global de GOS (S) y la conversión final de lactosa (X_{lac}) en función de la fracción másica (w) y la concentración másica (c) de los compuestos, según las siguientes definiciones:

$$Y_{GOS} = \frac{w_{GOS\ max}}{w_{lactosa\ 0}} \qquad \text{Ecuación 3-10}$$

$$S_{max} = \frac{w_{GOS\ max} - w_{GOS\ 0}}{w_{lactosa\ 0} - w_{lactosaGOSmax}} \qquad \text{Ecuación 3-11}$$

$$X_{lact} = \frac{w_{lactosa\ 0} - w_{lactosa\ final}}{w_{lactosa\ 0}} \qquad \text{Ecuación 3-12}$$

$$S = \frac{w_{GOS\ final} - w_{GOS\ 0}}{w_{lactosa\ 0} - w_{lactosa\ final}} \qquad \text{Ecuación 3-13}$$

$$\pi_{GOS_{100}} = \frac{[C_{GOS100min} - C_{GOS0}]}{t\ (100\ min)} \qquad \text{Ecuación 3-14}$$

La evaluación estadística de estos indicadores en función de los factores de la tabla 3-1 se realizó mediante el análisis de varianza correspondiente a un diseño experimental 2^3.

3.5.2 Síntesis de GOS con β-galactosidasas inmovilizadas

Análogamente al sistema monoenzimático libre, se hizo seguimiento de la composición de carbohidratos en el medio por cinco horas de reacción, para cada técnica de inmovilización, en relación con la enzima libre. La tabla 3-2 presenta los factores y niveles considerados en esta fase

Tabla 3-2 Diseño experimental para la producción de GOS en sistemas monoenzimáticos inmovilizados

Factor	Nivel
Técnica de inmovilización	CLEA-IPA CLEA-Sulfato Atrapamiento en alginato
pH	5.0 6.0
Origen de Enzima	*β-gal A. oryzae* *β-gal A. niger*

El análisis estadístico de los perfiles se efectuó en un diseño factorial con parcelas subdivididas, asignando una parcela a cada punto en el tiempo, en tanto los parámetros de reacción (rendimiento, productividad y selectividad), se evaluaron considerando un diseño trifactorial convencional.

3.6 Producción de ácido glucónico

Usando glucosa oxidasa libre, en una solución de glucosa 50g/L disuelta en buffer fosfato, se determinó el efecto en la producción de ácido glucónico al variar la tasa de aireación (1, 2 y 4 vvm) y pH (5.0 y 6.0), en un diseño bifactorial.

Para estos flujos de aire, se cuantificó el coeficiente de transferencia de oxígeno, con ayuda de un sensor de oxígeno disuelto JBP-70A. Se hizo burbujear nitrógeno a 20 mL del medio hasta tener una lectura de cero y luego se procedió con la aireación. Haciendo seguimiento de la concentración de oxígeno disuelto en el medio ($C_{O_2}\mathrm{mg/L}$), se estimó el coeficiente linealizando los datos, de acuerdo a la metodología señalada por Erazo & Cárdenas (2001):

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a\left(C_{O_2}^{sat} - C_{O_2}\right) \rightarrow k_L at = -\log\left(1 - \frac{C_{O_2}}{C_{O_2}^{sat}}\right) \qquad \text{Ecuación 3-15}$$

Posteriormente, con la GOx inmovilizada, se determinó el efecto de tres técnicas de inmovilización y dos niveles de pH en la capacidad de la enzima para producir ácido glucónico. La aireación se fijó en 4 vvm y se usó un medio de glucosa 50g/L, disuelta en buffer fosfato (0.2M). El diseño factorial correspondiente se presenta en la tabla 3-3

Tabla 3-3 Diseño experimental para la producción ácido glucónico con GOx inmovilizada

Factor	Nivel
Técnica de inmovilización	CLEA-IPA CLEA-Sulfato Atrapamiento en alginato
pH	5.0 6.0

3.7 Sistema multienzimático libre

En esta fase se evaluó el efecto de la actividad de la glucosa oxidasa (GOx) en paralelo a las reacciones de hidrólisis y transgalactosilación de las beta-galactosidasas, para enzimas

en solución. Dicho sistema mixto fue estudiado a pH 6.0, para cada beta-galactosidasa (*A. oryzae y A. niger*), manteniendo una relación E/S de β-gal de 0.25%, una razón 1:1 de unidades de β-gal a GOx y una aireación de 4 vvm. Adicionalmente se comparó el comportamiento del perfil de carbohidratos, el rendimiento y selectividad al añadir la GOx desde el inicio de la reacción (uso simultáneo), o pasada una hora desde la adición de la beta-galactosidasa (uso secuencial). Lo anterior corresponde a un diseño 2^2, como se indica en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4. Diseño experimental para producción de GOS en sistema multienzimático libre

Factor	Niveles
Origen de Enzima	*β-gal A. oryzae* *β-gal A. niger*
Uso de GOx	Secuencial Simultáneo

Posteriormente, se determinó el efecto de la relación de unidades β-gal:GOx (1:1 y 1:2), sobre los perfiles de fracción másica de GOS en el tiempo, mediante un ANOVA para un diseño completamente aleatorio en parcelas divididas.

3.8 Síntesis de GOS en sistemas co-inmovilizados

Se evaluó el entrecruzamiento de los sistemas mixtos β-gal-GOx, haciendo seguimiento al perfil de carbohidratos al usar lactosuero como medio de reacción (a 400 g/L de lactosa), con aireación de 4 vvm y una proporción fija de unidades β-gal:GOx de 1:1. La variación de rendimiento de GOS y selectividad del sistema se efectuó con un diseño experimental 2^3, de acuerdo con lo factores y niveles que se presentan en la tabla 3-5.

Tabla 3-5 Diseño experimental para la producción de GOS en sistemas multienzimáticos co-inmovilizados

Factor	Nivel
Técnica de inmovilización	combiCLEA-IPA combiCLEA-Sulfato
Uso	Secuencial Simultáneo
Origen de Enzima	β-gal *A. oryzae* y GOx β-gal *A. niger* y GOx

Luego, se evaluó el efecto sobre las cinéticas de producción y degradación de GOS, al cambiar la relación de β-gal:Gox, de 1:1 a 1:2 en agregados enzimáticos pretratados con isopropanol, mediante un diseño completamente aleatorio en parcelas divididas, asignadas a cada tiempo de la reacción.

A continuación, se evaluó el efecto de la configuración enzimática en la inmovilización mixta, como indica la figura 3-4. Para esto, se compararon los perfiles de composición de carbohidratos, en dos escenarios: (1) la co-inmovilización *in situ* de ambas enzimas, partiendo de una solución mixta de β-gal y GOx, para la obtención de combi-CLEAs; y (2) inmovilización independiente de β-gal y GOx, para su posterior mezcla en el medio de reacción.

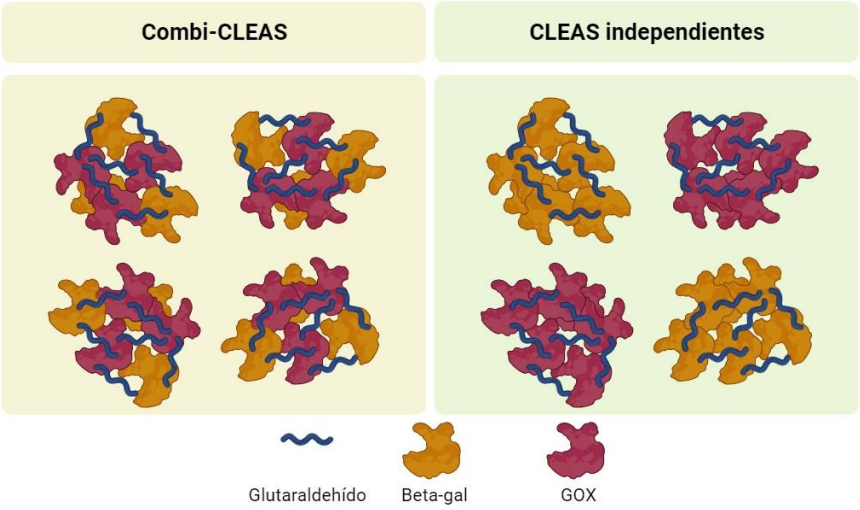


Figura 3-4. Configuraciones de agregados enzimáticos inmovilizados mixtos β-gal-GOx. (Elaboración propia con BioRender)

3.9 Sistemas inmovilizados y co-inmovilizados en ciclos repetidos de reacción.

Para los sistemas inmovilizados de β-gal y β-gal-GOx, se evaluó el rendimiento de GOS pasadas 5 horas de reacción por hasta 20 ciclos repetidos, para las mejores condiciones y técnicas de inmovilización observadas. Para esto, finalizado cada ciclo de reacción de 5 horas, se tomó una alícuota y se detuvo la reacción en la muestra por calentamiento en agua en ebullición, durante 10 minutos.

Paralelamente, el medio se sometió a centrifugación (4000 rpm por 15 segundos) para recuperar los agregados enzimáticos que precipitan con facilidad, sin separar la fase proteica del lactosuero. Las enzimas atrapadas en esferas de alginato se recuperaron permitiendo su precipitación y separándolas de la fase líquida.

El sobrenadante producto de la reacción se reservó, mientras que los agregados y esferas fueron añadidos a lactosuero fresco, iniciando de este modo un nuevo ciclo de uso de las enzimas inmovilizadas.

Finalizados los 20 ciclos de reacción, se determinó la producción acumulada de GOS para cada escenario, comparando sistemas mono y multienzimáticos. Además, se registró la retención de actividad de los agregados monoenzimáticos, almacenados por 4 meses a 4°C en buffer fosfato pH 6.0.

En el caso del uso de Glucosa oxidasa en ciclos repetidos, se siguió el mismo protocolo previamente descrito, usando como sustrato una solución de glucosa 50g/L y recuperando igualmente los agregados y esferas de alginato, con las mismas condiciones.

4. Resultados y discusión

4.1 Caracterización del lactosuero

Tabla 4-1. Caracterización del lactosuero en relación con los valores declarados en la ficha técnica.

Componente	Valor obtenido	Reporte de ficha técnica
Lactosa	68.7 ± 1.5%	mín. 68%
Glucosa	2.1 ± 1.3%	No reportado
Proteína	4.3 ± 0.7%	máx. 5%
Humedad	7.4 ± 0.3%	máx. 4%
Cenizas	9.6 ± 0.4%	8.5-10%

En la tabla 4-1 se presenta la caracterización obtenida para el lactosuero. El contenido de humedad excede los valores especificados, lo cual puede deberse a las condiciones de almacenamiento del lactosuero en polvo que, al ser usado por tiempo prolongado, se expone progresivamente a la humedad ambiental. A su vez, el contenido de lactosa se encuentra en el rango típico (65-75%) pero es inferior al esperado para lactosueros desproteinizados, que usualmente alcanzan del orden de 80%. Esto se acompaña de una mayor presencia de cenizas en relación con el valor declarado en la ficha técnica (ANEXO A) que, no obstante, se sopesa con el bajo contenido de proteína, en comparación con sueros no desproteinizados. Tal reducción repercutió positivamente en el comportamiento reológico del medio de reacción, obteniendo un sustrato de menor viscosidad y mayor homogeneidad, lo cual es deseable para disminuir los gradientes de temperatura y concentración, asociados a los fenómenos de transporte de masa y calor.

4.2 Actividad de β-galactosidasas

4.2.1 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad hidrolítica

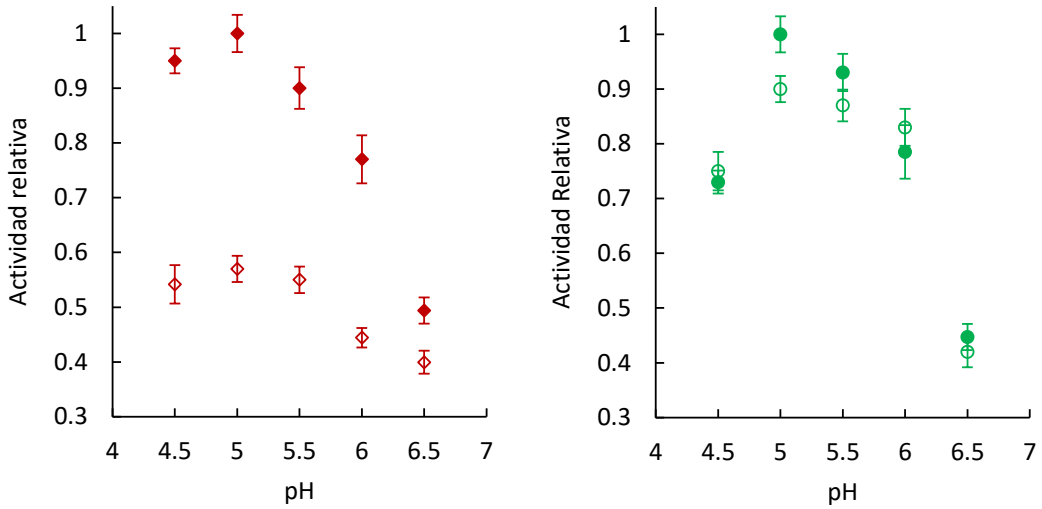


Figura 4-1 Actividad hidrolítica relativa con o-NPG, en función del pH y temperatura. β-gal de *A. oryzae* (♦, ◊) y *A. niger* (●, ○); a 40 °C (sin relleno) y 45 °C (marcador relleno).

La figura 4-1 presenta la caracterización de la actividad hidrolítica de β-gal de *A. oryzae* y *A. niger* asociada a la degradación de o-NPG en función del pH, a dos temperaturas. Para dicha ventana operacional, las mejores condiciones de hidrólisis se observaron en torno a pH 5.0 y 45°C, con una actividad de 88700 y 34500 U/g para las enzimas de *A. oryzae y A. niger* respectivamente. Como se muestra en la tabla 4-2, el catalizador aislado de *A. oryzae* exhibe una actividad específica mayor, un comportamiento que previamente se ha observado y ha generado mayor interés en su implementación industrial (Castro, 2020; Lu et al., 2020). Debido al tiempo previo de almacenamiento de ambos catalizadores, dicha actividad fue inferior a la especificación de las fichas técnicas, por lo que la adición de masa neta de catalizador fue mayor en las fases posteriores para garantizar la concentración apropiada de unidades catalíticas (ANEXO B). Adicionalmente, la ficha técnica de β-gal de *A. niger*, reporta la actividad en términos de p-NPG como sustrato, lo que puede generar diferencias en la medición.

Adicionalmente, debido a que el medio de reacción usado en este estudio fue lactosuero, se determinó el desempeño hidrolítico de las enzimas en dicho sustrato, en términos de liberación de glucosa, comparada con la tasa de degradación de o-NPG (Tabla 4-2). Pese a que para la degradación de o-NPG y lactosa el valor de actividad es un indicador de la velocidad de ruptura de enlaces glucosídicos, se apreció una disparidad significativa en los datos obtenidos entre sustratos. Tal fenómeno se ha justificado por diferencias de hidrolizabilidad correlacionadas con el tamaño molecular del sustrato, su distribución electrónica y afinidad al sitio activo (Nakano et al., 1987).

Tabla 4-2 Actividad hidrolítica a 45°C, para degradación de o-NPG (µmol o-NP/min.g) e hidrólisis de lactosa en lactosuero (µmol glucosa/min.g)

			o-NPG		**Lactosuero**	
Origen	**Proteína (%m/m)**	**pH**	**Actividad[1] (Act. relativa)**	**Actividad específica[2]**	**Actividad[1]**	**Actividad específica[2]**
A. oryzae	40.5 ± 1.3	5.0	88700 ± 5322 (100%)	227436 ± 13646	19768 ± 1383	50687 ± 3548
		6.0	68299 ± 4781 (77%)	175126 ± 12259	16536 ± 661	42399 ± 1695
A. niger	25.8 ±0.8	5.0	34500 ± 4140 (100%)	153333 ± 18426	6519 ± 586	28971 ± 2607
		6.0	27083 ± 3250 (78%)	120367 ± 14449	5037 ± 302	22387 ± 1343

[1] Dada por gramo total de enzima (U/g). [2] Dada por gramo de proteína en la enzima (U/g).

El comportamiento en función del pH del medio es consistente con reportes previos en los que el óptimo se ha establecido en el rango de 4.5 a 5.0, para enzimas aisladas del género *Aspergillus* (Castro, 2020; Dekker, 2019; Vera et al., 2011). En este caso, para ambas β-gal, la mayor actividad se expresó a pH 5.0; además, el cambio a pH 6.0 implicó una pérdida de 20 a 25% en la actividad relativa, en tanto a pH 6.5, el decremento fue superior al 50%. Dicha tendencia puede estar asociada a la configuración estructural de los aminoácidos residuales en el sitio activo (e.g. ácido glutámico), cuya afinidad por el sustrato aumenta a pH más bajos en enzimas fúngicas, en comparación con las enzimas de levaduras y bacterias (Gao et al., 2019).

El origen de la enzima también influyó en la respuesta al cambio de temperatura pues, pese a que el aumento de 40 a 45 °C alteró en menor proporción la capacidad hidrolítica

de la enzima de *A. niger*, paralelamente condujo a un aumento del 45% en la actividad máxima para *A. oryzae* (figura 4-1). Resultados análogos fueron obtenidos por Dekker (2019), quien reporta un aumento del 30% en la actividad hidrolítica del catalizador de *A. oryzae*, frente al incremento de 5 °C. En contraste, la caracterización de β-gal de *A. niger* en la ficha técnica comercial, indica un aumento del 10% de actividad para este cambio de temperatura, coincidiendo con la tendencia registrada en la figura 4-1 (Megazyme, 2023). Lo anterior indica que, si bien la estructura de ambas β-gal es similar debido a la cercanía filogenética de los microorganismos de los cuales se obtuvieron, diferencias estructurales pueden conducir a variaciones en su respuesta a las condiciones de operación.

Respecto al efecto de la temperatura, se ha reportado que el valor óptimo para estas β-gal está en el rango de 55-60 °C (Castro, 2020; Fischer & Kleinschmidt, 2015), con lo cual la actividad obtenida podría incrementarse si la temperatura se aumentara. No obstante, los límites fijados en el presente trabajo se basaron en la selección de un rango en el que posteriormente fuera posible obtener actividad de glucosa oxidasa y viable evaluar un sistema mixto de β-gal y GOx. Al respecto, Gouda et al. (2003) demostraron pérdidas de actividad de glucosa oxidasa al operar a 50 °C, con un 20% de actividad relativa expresada a 60 °C. Por esto, el límite superior de la evaluación de todas las enzimas se fijó en 45 °C.

Para ambos sustratos, las dos β-gal incrementaron su actividad hidrolítica en un 20±3% al operar en pH 5.0, con respecto a pH 6.0. Con este comportamiento, en principio, un medio de lactosuero más ácido sería apropiado para liberar con rapidez unidades de glucosa y galactosa, aprovechando de mejor manera la enzima (más unidades por masa añadida). A su vez, se acumularían las especies para desplazar los equilibrios de las reacciones de transgalactosilación hacia los prebióticos deseados, como se indicó previamente en la figura 1-7.

4.2.2 Efecto del pH y la glucosa en la actividad transgalactosiladora

En diferentes reportes del uso de β-gal, se ha señalado una correlación entre la actividad hidrolítica y la capacidad transgalactosiladora inicial de estas enzimas, tanto de origen fúngico, como provenientes de levaduras. Sin embargo, en forma paralela se ha indicado que no necesariamente las condiciones que acompañan un mejor desempeño hidrolítico,

se asocian con mejoras en la transgalactosilación (Rico-Rodríguez, 2018; Wang et al., 2020).

En la figura 4-2 se observa que la relación entre las actividades transgalactosiladora e hidrolítica de ambas β-gal no es constante, frente a los cambios de pH. A pH 6.0, la velocidad inicial de transgalactosilación correspondió al 60% de la de hidrólisis, mientras a pH 5.0, aunque la actividad hidrolítica es máxima (Figura 4-1), la proporción de formación de GOS es menor (40%). Esto indica que, a pH 5.0 ambas enzimas reducen su capacidad para producir oligómeros, por lo cual una mayor proporción de la lactosa consumida se transforma en glucosa y galactosa. Un comportamiento análogo ha sido reportado por Vera et al. (2012), quienes a pH 4.5 observaron una actividad transgalactosiladora equivalente al 30% de la hidrolítica.

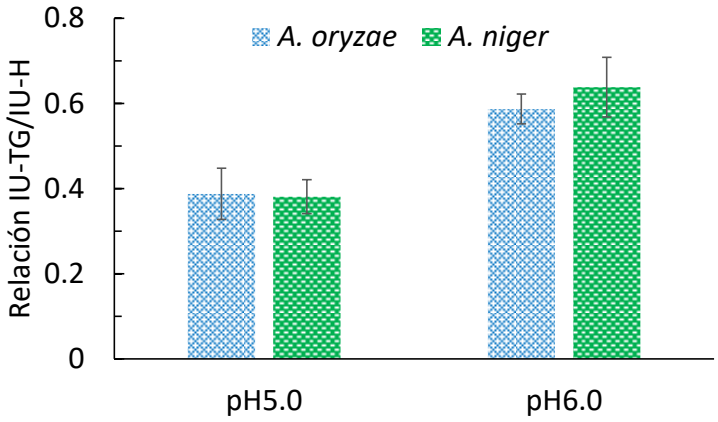


Figura 4-2 Relación de actividad transgalactosiladora (IU-TG) e hidrolítica (IU-H), evaluada en lactosuero, en función del pH y fuente de β-gal.

En relación con este comportamiento, debe tenerse presente que el mecanismo de reacción involucra intermedios inestables de transición en los que la glucosa y galactosa libres actúan como inhibidores, haciendo que las condiciones de reacción que favorecen la acumulación de monosacáridos dificulten la progresión en el crecimiento de oligómeros (Yañez-Ñeco et al., 2021).

Para ilustrar esta restricción del sistema enzimático, en la figura 4-3 se presenta el comportamiento del perfil de contenido de GOS en lactosuero a pH 6.0 (lactosa a 400 g/L), usando β-gal de *A. oryzae* y una composición variable de glucosa inicial (0 a 100 g/L). Así, la reducción en la velocidad de producción neta de GOS al avanzar la reacción y el

decrecimiento del rendimiento final (de 0.3 equivalente a 120g/L, a 0.23 correspondiente a 92g/L), está relacionado con la proporcionalidad inversa entre la selectividad a GOS y el contenido de glucosa inicial (figura 4-3 b) lo que confirma un efecto negativo sobre la capacidad transgalactosiladora de la β-gal.

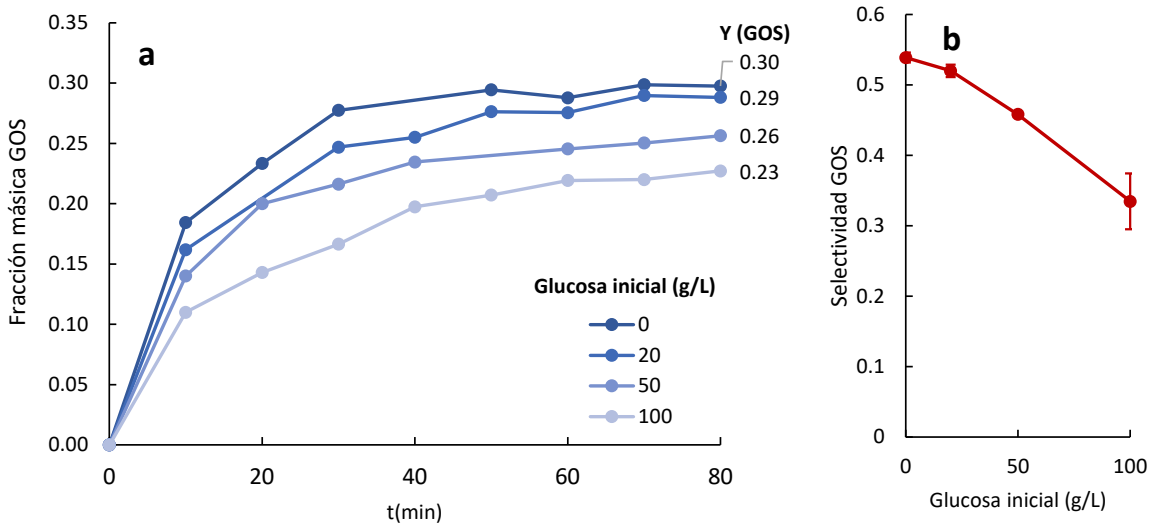


Figura 4-3 Efecto de contenido de glucosa en la producción de GOS.
(a) Perfil de contenido de GOS en lactosuero (400 g/L lactosa) a pH 6.0, como fracción másica del total de carbohidratos. (b) Selectividad a GOS en función del contenido inicial de glucosa

Comportamientos como los mostrados en la figura 4-3, han sido reportados para β-gal de diferentes orígenes microbiológicos, aunque el grado de sensibilidad depende de este factor. Así, por ejemplo, los estudios para reducir este tipo de inhibiciones suelen evaluar escenarios con lactasas aisladas de especies de géneros *Kluyveromyces* o *Bacillus*, cuyos perfiles de GOS se componen principalmente de dímeros fácilmente hidrolizables, lo que aumenta la probabilidad de acumulación de monosacáridos en el medio (Fischer & Kleinschmidt, 2019; Pereira-Rodríguez et al., 2012; Rico-Rodríguez et al., 2021).

De acuerdo con lo anterior, las condiciones de operación seleccionadas deberían favorecer una mayor actividad transgalactosiladora y reducir en cuanto sea posible la acumulación de glucosa, para no prolongar los tiempos de reacción y aprovechar el mayor contenido de lactosa posible en la formación de prebióticos. Por esto, si bien se busca una actividad enzimática elevada, en las etapas posteriores de este estudio se consideró el consumo

selectivo de lactosa hacia GOS como criterio prioritario para evaluar el desempeño de los catalizadores.

4.3 Síntesis de GOS con β-galactosidasas libres

En diversos reportes se ha establecido que, sumado al pH y la temperatura del medio, la relación enzima/sustrato condiciona la acumulación de oligosacáridos en el medio. Pese a que autores como Vera et al. (2012) evaluaron el rendimiento máximo de GOS al variar esta relación entre 0 y 300 U/g sin observar cambios estadísticamente significativos, otros aducen que sobrepasar un relación de 50 U/g conduce a una disminución en la concentración de prebióticos alcanzada (Wang et al., 2021). No obstante, en estudios previos de optimización de la actividad transgalactosiladora en función de este factor, puede encontrarse que el máximo rendimiento se ha encontrado al usar relaciones másicas de 0.25% y 0.39%, para enzimas libres del género *Kluyveromyces y Aspergillus*, respectivamente (Castro, 2020; Rico-Rodríguez, 2018) .

Según la definición dada de la relación E/S y los valores de actividad hallados, estas dos relaciones equivalen a 220 y 340 U por gramo de lactosa. Entonces, considerando estos dos niveles de concentración enzimática, se evaluó conjuntamente el efecto de la relación E/S, la fuente de β-gal y el pH, sobre los perfiles de composición de carbohidratos (figura 4-4) y los indicadores de reacción.

4.3.1 Perfiles cinéticos de composición del medio

Tal como ocurrió con las pruebas iniciales de actividad (Tabla 4-2), el pH afectó significativamente el comportamiento de la cinética de ambas enzimas ($p<0.05$). A pH 5.0, los dos biocatalizadores mostraron una mayor tendencia hidrolítica, alcanzando un máximo en la concentración de prebióticos pasados 50 minutos de reacción. Esta fase precedió a una degradación continua de hasta el 30% del contenido de GOS, en la quinta hora del proceso. Por el contrario, a pH 6.0, la fracción másica de GOS fue más estable en el tiempo (degradación del 9% de GOS), con lo que simultáneamente se redujo el contenido final de monosacáridos a una fracción másica de carbohidratos de 38±3% (152 g/L), respecto a un contenido de 55±4% (220 g/L), observado a pH 5.0.

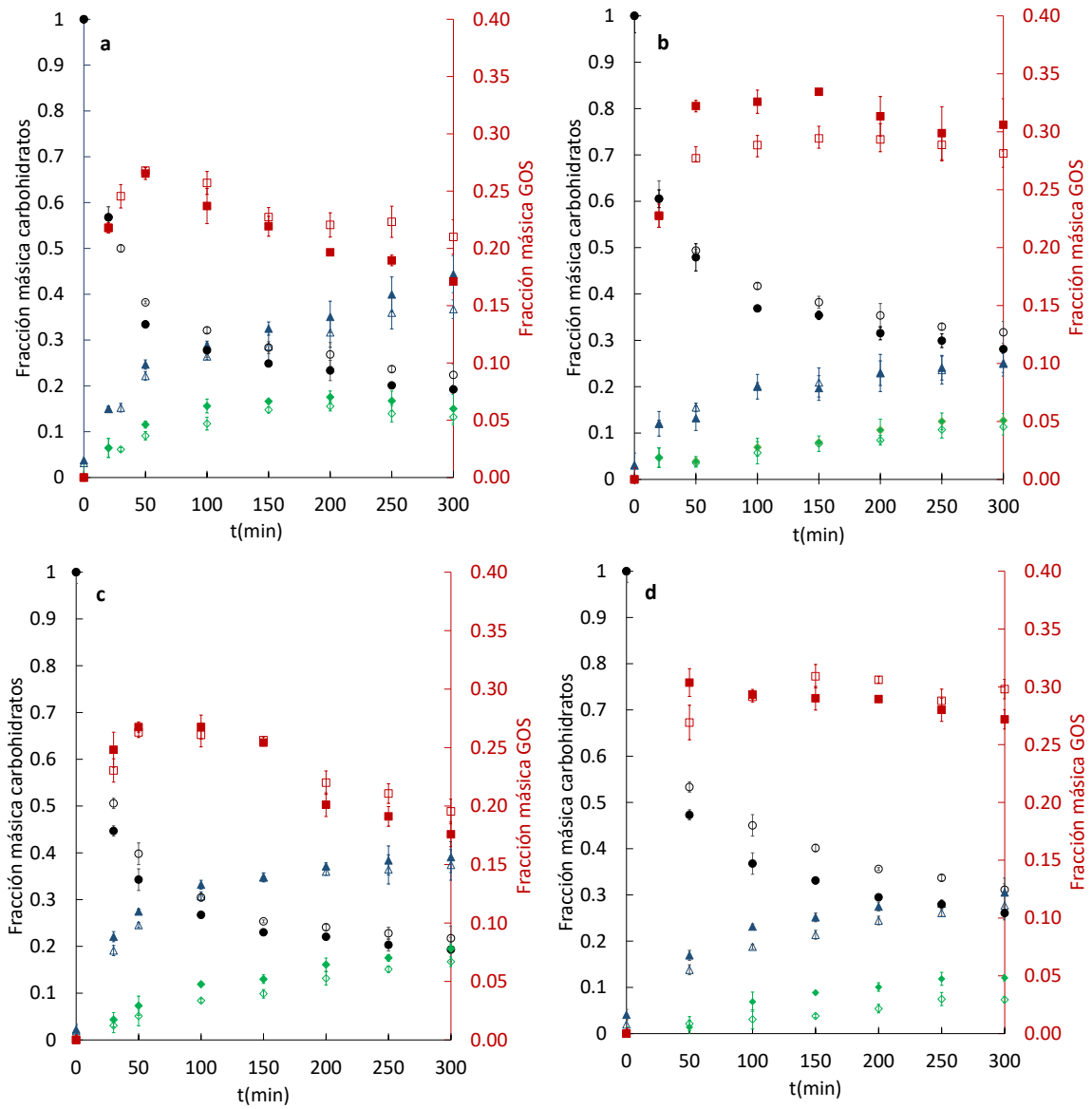


Figura 4-4. Perfiles de composición de carbohidratos, obtenidos con β-galactosidasa libre LaS inicial a 400 g_{lact}/L, con β-gal de *A. oryzae* (a, b) y *A. niger* (c, d) a 45°C. Relación enzima-lactosa 220 U/g_{lact} (marcadores sin relleno) y 340 U/g_{lact} (marcadores con relleno); pH 5.0 (a, c) y 6.0 (b, d). (●, ○) Lactosa; (▲, Δ) Glucosa; (◆, ◊) Galactosa; (■, □) Galacto-oligosacáridos (GOS).

Otros autores han reportado el tiempo de máxima concentración de prebióticos con β-gal de *K. lactis,* en torno a la primera hora de reacción, luego de la cual hasta 50% de los GOS son hidrolizados hasta finalizar el proceso. En cuanto a las enzimas fúngicas, éstas suelen

degradar cerca del 20% del máximo de oligosacáridos producidos, al tiempo que producen medios con un 25 a 30% de monosacáridos (Fischer & Kleinschmidt, 2018a; Frenzel et al., 2015; Rico-Rodríguez et al., 2021).

Para los escenarios evaluados, el incremento en la degradación de los GOS y el mayor contenido de monosacáridos, respecto a los reportes previos, podría estar asociado a la mayor concentración de enzima empleada en este estudio. De hecho, Vera et al. (2012), determinaron un 60% de GOS hidrolizados al usar 100 U/g de β-gal *A. oryzae.*

En cuanto a la fuente de la β-gal, el análisis estadístico permitió inferir que este factor, *per se* no fue relevante en el comportamiento de los catalizadores libres. En cambio, la relación E/S y la interacción de los dos factores (Fuente-E/S) resultaron significativos ($p<0.05$). Esto pudo observarse al usar β-gal de *A. oryzae*, con cambios de hasta 16% en la concentración de GOS en el tiempo, al variar el contenido de enzimas, frente a los escenarios con el catalizador de *A. niger*, en cuyo caso el contenido de prebióticos en el tiempo varió un 4%, frente al cambio de E/S.

Sumado a lo anterior, debe notarse que mientras a pH 5.0 la menor relación E/S fue conveniente al presentar una hidrólisis menos pronunciada de GOS (y por tanto una concentración mayor de éstos), a pH 6.0 el contenido máximo de prebióticos aumentó un 16% con la mayor concentración de enzima. Así, a partir de dicha dependencia del sistema de β-gal libres, se corrobora que la interacción de estos tres factores (Fuente enzimática-pH-E/S) es también significativa ($p<0.05$) en la respuesta del sistema catalítico.

4.3.2 Indicadores para la síntesis de GOS

En la tabla 4-3 se presentan los indicadores de la reacción para cada escenario evaluado en esta fase de la investigación. Como revela el análisis de varianza presentado en el Anexo D-1, el 89.7% de la variación observada en el rendimiento de GOS es explicada por los factores e interacciones de factores previamente señalados (pH, E/S, Fuente-E/S, Fuente-E/S-pH). Por el contrario, la selectividad en el momento de máxima concentración de GOS dependió exclusivamente del pH del medio, indicando que la similitud filogenética de las dos enzimas conlleva a un aprovechamiento similar de la lactosa hacia oligómeros y monosacáridos, cuando estas están en solución.

En general, el rendimiento aumentó para ambas enzimas al pasar de pH 5.0 a 6.0. Dicho incremento osciló entre 7 y 22% según la relación E/S y la fuente del catalizador (interacción doble y triple de factores), generando hasta 26 g/L de GOS adicionales. Así mismo, la selectividad aumentó en promedio un 28±3% a pH 6.0, aunque a costa de una menor conversión media de la lactosa, pasadas 5 horas de reacción (70.7±3.0%).

Tabla 4-3 Indicadores de seguimiento de la síntesis de GOS con enzimas libres en LaS.

β-gal	pH	E/S (U/g_{lact})	Y (%)[a]	S_{max} (%)[b]	S (%)[b]	X_{lac} (%)[c]	$\pi_{GOS100min}$ (g/L.h)[d]
A. oryzae	5.0	220	26.8	43.4	27.1	77.6	61.7
		340	27.0	39.9	21.2	80.8	56.9
	6.0	220	29.4	54.7	41.2	68.3	69.2
		340	33.4	51.6	42.6	71.9	78.2
A. niger	5.0	220	26.3	43.7	25.0	78.3	62.6
		340	26.8	40.7	21.8	80.7	57.0
	6.0	220	30.9	57.7	43.3	68.9	69.9
		340	30.4	57.6	36.8	73.9	72.9

Desviación estándar: [a](±1%); [b](±4%); [c](±3%); [d](±4 g/L.h);

La relación E/S solo tuvo un efecto significativo en el rendimiento de β-gal de *A. oryzae*, a pH 6.0. No obstante, para este caso, incrementar el contenido de GOS en 15% requirió de un 54% de enzima adicional, un consumo de catalizador que no sería justificable a nivel práctico con enzimas libres. Estas altas concentraciones, sin embargo, se usaron previendo la pérdida de actividad enzimática en las fases posteriores de inmovilización. En este sentido, el comportamiento observado guarda similitudes con los de Vera et al. (2012) y contradice la pérdida de rendimiento acompañada con el aumento de concentración de enzima señalada por Wang et al. (2021).

En comparación con los rendimientos mostrados en la tabla 4-3, se han reportado resultados análogos para β-gal de diferentes fuentes. En particular, para enzimas provenientes del género *Aspergillus* usadas en condiciones de 40 a 55 °C, pH 4.5 a 5.0 y relaciones E/S de 20 a 100 U/g lactosa, predominan valores de selectividad máxima de 40 a 50% y rendimientos de 22 a 32% (Botvynko et al., 2019; Fischer & Kleinschmidt, 2018b). Por su parte, Fischer & Kleinschmidt (2021) indicaron rendimientos que apenas superan el

19% al utilizar permeado de suero con 173 g_{lact}/L, lo que refuerza la necesidad de altas concentraciones iniciales de sustrato, como se ha efectuado en el presente trabajo. Sólo autores como Gao et al. (2019) reportan mejores efectos (Y=37,5%), para los cuales se ha requerido de la mutación de cepas para alterar el funcionamiento de la enzima producida por *A. oryzae*.

Otro aspecto relevante del sistema evaluado es la selectividad con la que la lactosa es utilizada en el tiempo, respecto a las reacciones paralelas que se presentan. Si bien a nivel económico el interés central es el aprovechamiento máximo de la lactosa disponible en el lactosuero, para las condiciones evaluadas es inevitable que progresivamente la conversión de sustrato sea cada vez menos selectiva a GOS (figura 4-5), lo que implica un enriquecimiento indeseable en monosacáridos. Esto se explica por el desplazamiento del equilibrio termodinámico conforme hay menos lactosa en el medio y por los efectos inhibitorios previamente expuestos, lo cual es particularmente problemático para productos nutracéuticos, que preferiblemente deberían representar un bajo aporte calórico al consumidor.

Entre los efectos del cambio de pH es notable que, en el medio más ácido a partir del punto de máxima concentración de GOS, el contenido total de prebióticos se reduce pero simultáneamente aumenta la proporción de oligómeros de mayor peso molecular (Figura 4-5). Este comportamiento se acompañó por una menor productividad y selectividad global. En contraste, a pH 6.0 tanto el contenido como la distribución de oligómeros permanece esencialmente constante durante las cinco horas de reacción con β-gal de *A. oryzae*, en comparación con el enriquecimiento en cadenas más largas producido con la enzima de *A. niger*.

Tales variaciones en los perfiles de oligomerización podrían explicarse con un posible cambio de afinidad del sitio activo a los carbohidratos, en función de su peso molecular y el pH del medio. En medios más ácidos, pese a una actividad transgalactosiladora inhibida por la mayor presencia de glucosa y galactosa libres, los trisacáridos y tetrasacáridos parecen acceder con igual facilidad al sitio activo, donde es más probable que sean hidrolizados o, en menor proporción, adquieren nuevos grupos galactosilo (Yin et al., 2017). Contrariamente, con β-gal de *A. oryzae* a pH 6.0, los oligómeros parecen ser menos afines a la enzima, con tasas de hidrólisis de GOS y de oligomerización equivalentes, lo cual dificulta simultáneamente tanto su degradación, como el crecimiento de las cadenas,

debido a la inhibición progresiva de la actividad transgalactosiladora. A dicho pH, la enzima de *A. niger,* presenta menor inhibición transgalactosiladora y aparecen mayor proporción de tetra y penta-sacáridos, conservando el rendimiento global de los prebióticos.

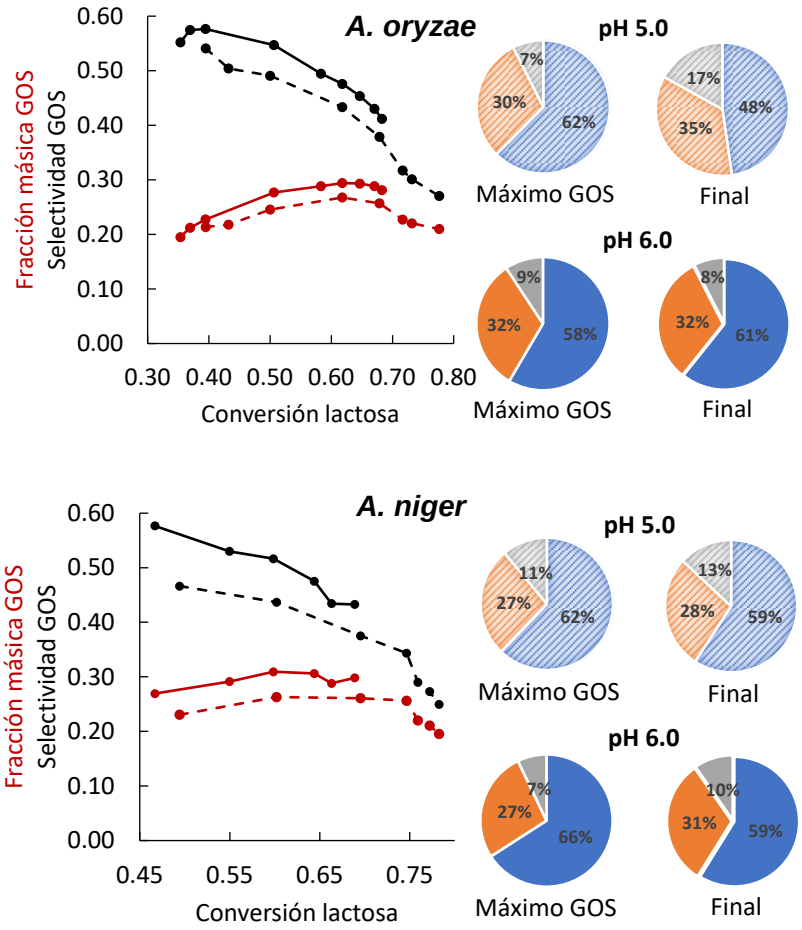


Figura 4-5 Selectividad, rendimiento y distribución de GOS, con β-gal libre en LaS. (a) Selectividad (negro) y contenido de GOS (rojo), a pH 5.0 (línea punteada) y 6.0 (línea continua), en función de la conversión de lactosa. Arriba (β-gal de *A. oryzae*). Abajo (β-gal de *A. niger*) (b) Perfil de oligómeros en punto de concentración máxima y final. DP3(■), DP4(■), DP5(■).

En la literatura se señala que, en relación con otras β-gal, las del género *Aspergillus* generan productos ricos en tri- y tetrasacáridos (DP3 y DP4), con una concentración máxima de prebióticos cuando se ha consumido un 56-60% de la lactosa disponible (Botvynko et al., 2019; Fischer & Kleinschmidt, 2018b). A su vez, en múltiples reportes la velocidad de consumo de lactosa decae al llegar a concentraciones del sustrato de 25 al

30% del total de carbohidratos, lo que se apreció en los perfiles de la figura 4-4 y puede indicar que se trata de una composición donde la restricción cinética dificulta su degradación. Esto explica además que, al igual que en la presente investigación, las conversiones logradas de lactosa sean del 70 a 80%, incluso en tiempos de reacción prolongados (Füreder et al., 2020; Rico-Rodríguez, 2018).

En otros reportes, la distribución de los grados de oligomerización de ambas enzimas promedia la composición DP2 (5%), DP3 (71%), DP4 (20%) y DP5 (5%) (Fischer & Kleinschmidt, 2019, 2021; Rico-Rodríguez et al., 2021), y se ha señalado que la presencia de dímeros es probable solo a altas concentraciones de glucosa y galactosa, con concentraciones del 1 a 2% de alolactosa y galactobiosa (Yin et al., 2017). Comparativamente, las condiciones evaluadas en este estudio favorecieron mayores grados de oligomerización; esto resulta de alto interés por haberse demostrado mejores efectos de los tetra y pentasacáridos sobre la morfología intestinal y la flora bacteriana, en estudios *in vivo* (Wang et al., 2021). No obstante, dado que instrumentalmente no se logró la separación de prebióticos DP2 de la lactosa del medio, es posible que los rendimientos sean ligeramente mayores a los de este reporte.

De acuerdo con lo anterior, para el uso de β-libres, si el perfil de GOS buscado corresponde a una distribución rica en trisacáridos, es apropiada la operación a pH 6.0 por 50 minutos consiguiendo el máximo rendimiento, el aprovechamiento del 60% de la lactosa disponible, un consumo preferente a la síntesis de oligómeros (selectividad mayor al 50%) y un menor contenido de glucosa y galactosa. Por el contrario, el enriquecimiento en tetra- y penta-sacáridos no fue posible sin sacrificar el rendimiento total de GOS con β-gal de *A. oryzae*, en tanto el catalizador de *A. niger* logró ambos propósitos simultáneamente.

4.4 Inmovilización de β-galactosidasas

La tabla 4-4 presenta los rendimientos de inmovilización de las enzimas en términos de la proteína residual cuantificada en la fase acuosa (Y_P) y de la actividad expresada en los agregados enzimáticos y las esferas de alginato de calcio (Y_a). Es decir, comparando la actividad de las enzimas inmovilizadas, respecto al total de la actividad inicial de las enzimas libres. En todos los casos, el rendimiento en términos de actividad fue menor al calculado en términos de proteína, lo que puede deberse a restricciones difusionales asociadas al confinamiento del catalizador en las perlas de alginato, que limitan el

transporte de sustratos y productos a la enzima (Blandino et al., 2001), la naturaleza estructural de cada enzima (plegamientos, secuencias de aminoácidos) (Pereira-Rodríguez et al., 2012) y los efectos de los tratamientos de precipitación y entrecruzamiento que repercuten en pérdidas de actividad (Guerrero et al., 2018).

Tabla 4-4. Rendimientos de inmovilización de β-galactosidasas

	Proteína recuperada (%)*			**Actividad recuperada (%)****		
Enzima	**CLEA IPA**	**CLEA Sulfato**	**Alginato**	**CLEA IPA**	**CLEA Sulfato**	**Alginato**
A. oryzae	84.5	85.3	79.6	74.6	41.1	22.3
A. niger	80.5	84.4	81.2	68.4	52.1	21.7

*Incertidumbre: 2.0%. **Incertidumbre: 2.5%

Finalizados los entrecruzamientos, los CLEAS obtenidos fueron lavados tres veces con solución buffer fosfato y durante las pruebas subsecuentes con los agregados, la presencia de glutaraldehído residual no fue detectada mediante cromatografía en la fase líquida de los medios de reacción (límite de detección de 160 ppm).

El contacto de la enzima con isopropanol o sulfato de amonio en la etapa de precipitación de los agregados implica un cambio configuracional que puede modificar la afinidad de la enzima a las especies del sistema reactivo, por lo que las condiciones del proceso de inmovilización (tiempos, concentraciones y temperatura), son susceptibles de una optimización. En el presente estudio las condiciones se basaron en reportes previos con β-gal (Guerrero et al., 2018). De igual forma, el entrecruzamiento con moléculas bifuncionales como el glutaraldehído y la orientación aleatoria de las enzimas en los agregados, hace posible la alteración del sitio catalítico de estas proteínas por el entrecruzamiento de grupos funcionales cercanos a este (Ölçücü et al., 2023). Por tanto, el efecto conjunto de estos fenómenos reduce la velocidad de reacción observada y explica la diferencia entre los rendimientos de la tabla 4-4.

Para la formación de agregados entrecruzados pretratados con isopropanol (CLEAS- IPA) se evaluó el efecto de variar la concentración del alcohol entre 60 y 80% v/v. Como se muestra en la figura 4-6, para β-gal de *A. oryzae* esto no incidió significativamente en el porcentaje de proteína inmovilizada (es decir, la cantidad de proteína inicialmente en solución que se removió de la fase líquida tras la inmovilización), con una media de

83±1.7%. Sin embargo, para la enzima de *A. niger,* usar IPA al 60% redujo la recuperación de proteína a 75.0±1.5%. Este rendimiento aumentó a 80.0±1.5% al incrementar la concentración del alcohol a 70%m/v y no varió al usar isopropanol a 80% m/v. Por esto, los valores reportados en la tabla 4-4 corresponden a los rendimientos de inmovilización observados con IPA al 70%.

Al pretratar β-gal de *A. oryzae* con IPA a 70 y 80% v/v, luego del entrecruzamiento Guerrero et al. (2020) lograron una recuperación del 75 y 60% de la actividad, respectivamente. El primer valor coincide con el rendimiento obtenido en este estudio para el catalizador de *A. oryzae*, aunque para la lactasa de *A. niger,* la recuperación de proteína más baja (80.5%) condujo también a un menor rendimiento en términos de actividad.

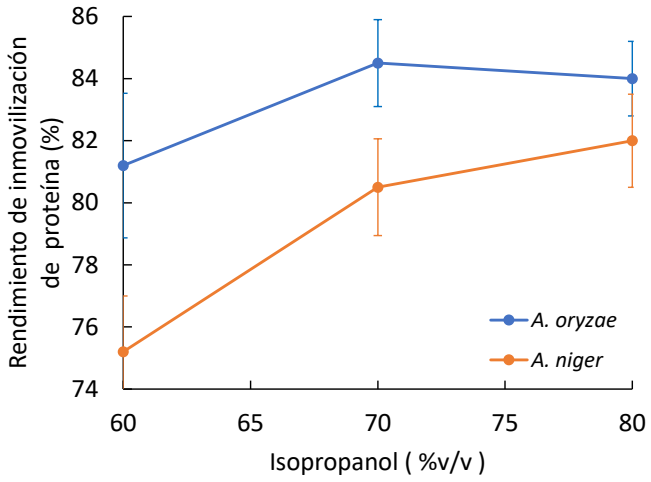


Figura 4-6. Efecto de la concentración de isopropanol en el rendimiento de la inmovilización de proteína CLEA-IPA β-gal

En el caso de las CLEAS pretratadas con sulfato de amonio 5M, si bien la recuperación de proteína es estadísticamente equivalente a la obtenida con isopropanol, el rendimiento en términos de actividad final expresada es significativamente menor para ambas enzimas (41 y 52%), en comparación con el pretratamiento de alcohol. Adicionalmente, se debe señalar que la respuesta de la actividad recuperada fue inversa entre las dos β-gal, según el agente precipitante usado: se observó una mejor retención de actividad con isopropanol para la lactasa de *A. oryzae,* y con sulfato de amonio para la de *A. niger.* Dicha disimilitud podría estar correlacionada con diferencias, previamente reportadas, en los grados de hidrofobicidad de ambas macromoléculas y su capacidad de reconocimiento de sustratos estructuralmente diferentes (Rico-Díaz et al., 2017). Además, la desolvatación requerida

para precipitar las enzimas podría alterar la facilidad de ingreso y acople molecular a los residuales del sitio activo (Gao et al., 2019).

En cuanto a la formación de CLEAS-Sulfato, Guerrero et al. (2015) reportan un rendimiento de 35% en términos de actividad para β-gal de *A. oryzae;* esto es, la actividad expresada por β-gal agregadas, respecto a las unidades libres inmovilizadas inicialmente. En relación con el protocolo de tales autores, en el presente estudio la inmovilización se hizo en condiciones de agitación reciprocante a 120 rpm, lo que pudo incidir en el mayor rendimiento obtenido en este caso (41 y 52%).

Por otra parte, luego del atrapamiento en esferas de alginato, la expresión de actividad fue significativamente menor a la observada con las otras técnicas de entrecruzamiento, exhibiendo un 22% de rendimiento de inmovilización. Este efecto fue estadísticamente semejante para ambas β-gal, lo que tiene sentido puesto que, en este caso, son fenómenos físicos de difusión los que constituyen la etapa limitante del proceso y restringen la velocidad de reacción, predominando sobre posibles modificaciones químicas del biocatalizador.

Un rendimiento similar fue observado por Guío (2014) quien al usar el mismo protocolo de este estudio con esferas de 3 mm y β-gal de *K. lactis,* retuvo un 18% de actividad. Comparativamente, Argenta et al. (2021) lograron conservar el 79% de actividad en alginato, pese a que inmovilizaron un porcentaje de proteína equivalente al de este estudio. Esto puede deberse a que usaron una formulación diferente del gel y menor tiempo de endurecimiento en la solución de cloruro de calcio, reteniendo efectivamente el catalizador, facilitando el movimiento de los azúcares y disminuyendo el tiempo de contacto de la enzima con los iones Ca^{2+}.

4.5 Síntesis de GOS con β-gal inmovilizadas

En esta etapa se evaluó el uso de los agregados y esferas de alginato, obtenidos con cada enzima, para la síntesis de GOS en lactosuero a pH 5.0 y 6.0. Los perfiles de composición de azúcares para los sistemas de β-gal entrecruzadas (CLEAS) se muestran en la figura 4-7. La figura 4-8 presenta el comportamiento correspondiente, usando enzimas atrapadas en alginato de calcio.

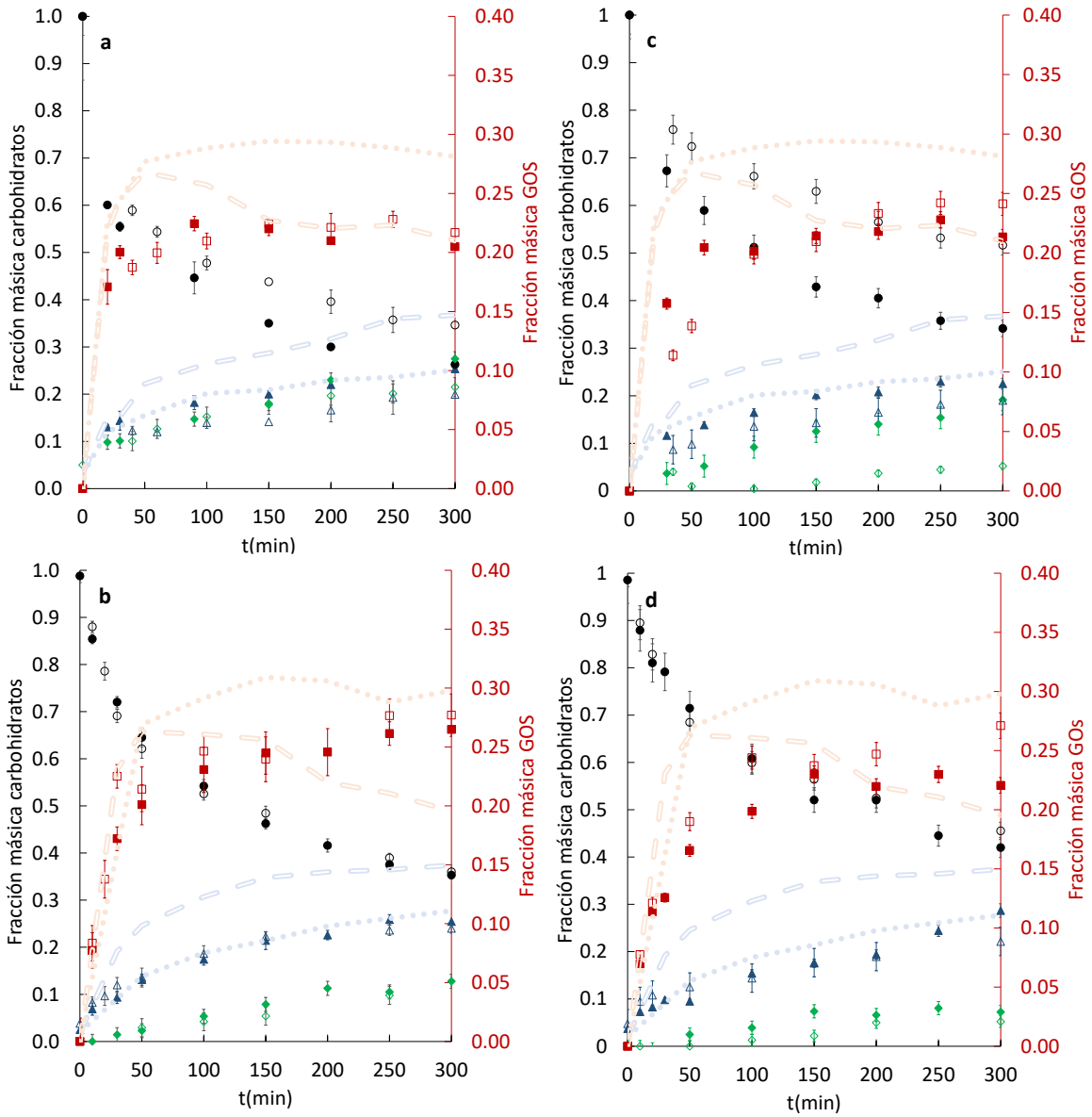


Figura 4-7 Perfiles de carbohidratos en LaS 400 g_{lact}/L, al usar β-gal entrecruzadas. *A. oryzae* (a, b) y *A. niger* (c, d). CLEA-IPA (a, c), CLEA-Sulfato (b, d), a 45°C, pH 6.0 (marcadores sin relleno) y pH 5.0 (marcadores con relleno). (●, ○) Lactosa; (▲, Δ) Glucosa; (◆, ◊) Galactosa; (■, □) GOS; (═) glucosa con β-gal libre a pH 5.0; (┈┈) glucosa con β-gal libre a pH 6.0; (═) GOS con β-gal libre a pH 5.0; (┈┈) GOS con β-gal libre a pH 6.0.

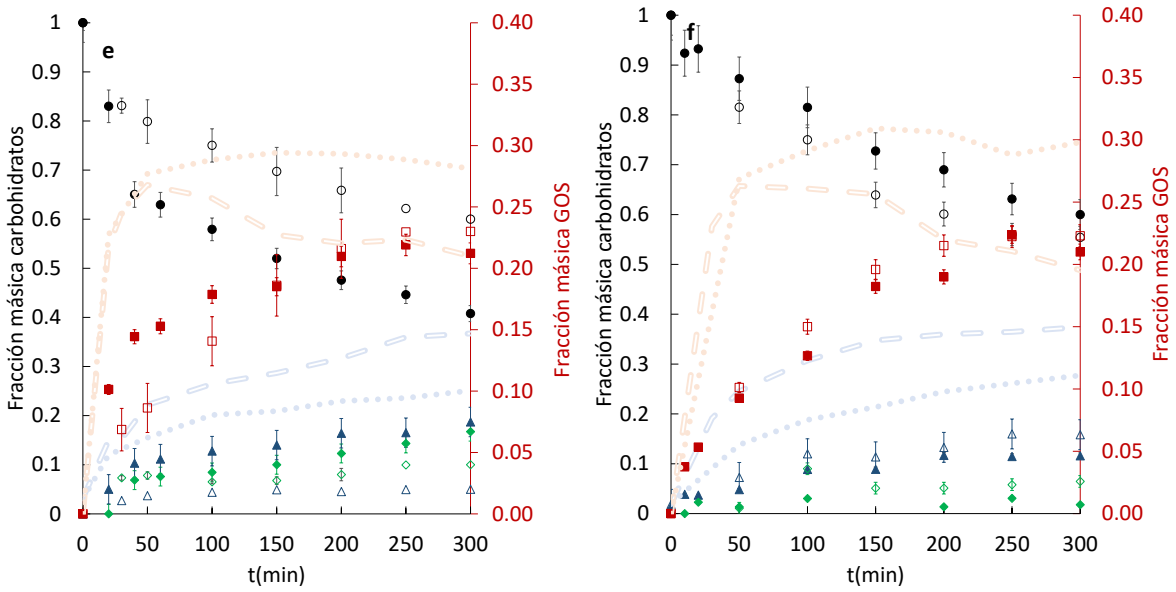


Figura 4-8 Perfiles de carbohidratos en LaS 400 g_{lact}/L, con β-gal atrapadas en alginato. *A. oryzae* (e) y *A. niger* (f) a 45°C, pH 6.0 (marcadores sin relleno) y pH 5.0 (marcadores con relleno). (●, ○) Lactosa; (▲, Δ) Glucosa; (◆, ◊) Galactosa; (■, □) GOS; (═) glucosa con β-gal libre a pH 5.0; (┈) glucosa con β-gal libre a pH 6.0; (═) GOS con β-gal libre a pH 5.0; (┈) GOS con β-gal libre a pH 6.0.

4.5.1 Perfiles cinéticos de composición del medio

Para la catálisis con enzimas atrapadas y entrecruzadas, las pérdidas de actividad observadas en la tabla 4-4, se reflejaron en los perfiles de composición de carbohidratos. En relación con la catálisis libre, el uso de β-gal inmovilizadas condujo a velocidades reducidas en el consumo de lactosa, de producción de azúcares y GOS. Con una significancia del 95%, dichos cambios fueron dependientes tanto del método de inmovilización, el pH y la fuente de la β-gal.

En general, respecto a los sistemas con β-gal libre, los agregados pretratados con isopropanol consumieron un 18% menos de lactosa pasadas cinco horas de reacción, el contenido de GOS disminuyó en un 10 a 20% y los monosacáridos libres pasaron de una fracción másica media de 0.51 a 0.37 (equivalentes a 204 y 148 g/L, respectivamente). De modo análogo, para CLEAS pretratadas con sulfato, la producción de prebióticos y consumo de lactosa fueron significativamente más lentos. Aun así, las concentraciones finales conseguidas se asemejaron a los sistemas de CLEAS-IPA, excepto en la concentración de galactosa libre que, según la enzima y el pH, estuvo entre un 30 y 50%

por debajo de los perfiles asociados al pretratamiento con alcohol. Por lo tanto, pese a una mayor pérdida de actividad debido al contacto de los catalizadores con el sulfato de amonio (ver tabla 4-4), está técnica derivó en el consumo más selectivo de sustrato, para la obtención de prebióticos. En este mismo sentido, debe notarse que el uso más eficiente de lactosa para la producción de prebióticos se presentó con el atrapamiento de cada β-gal en esferas de alginato, puesto que en dichos casos se alcanzó un contenido de prebióticos estadísticamente equivalente al observado con los agregados, con un consumo de lactosa 33% menor al de los sistemas con CLEAS y una concentración final de glucosa y galactosa reducida.

En cuanto a los efectos de la variación del pH, los perfiles permiten observar que, en comparación con los sistemas libres, la cinética de producción de GOS fue menos dependiente de este factor al usar CLEAS. En el caso de las esferas de alginato, el incremento de la concentración de hidrogeniones aumentó la velocidad de consumo del sustrato y la liberación de monosacáridos. Sumado a esto, la conversión de lactosa y la liberación de glucosa y galactosa, variaron según la interacción de los tres factores (fuente enzimática, método de inmovilización y pH). Así, la fuente de la enzima condujo a respuestas diferentes para los sistemas inmovilizados, puesto que los CLEAS y esferas de alginato con β-gal de *A. oryzae* fueron más sensibles a cambios de pH, comparadas con las inmovilizaciones de *A. niger.*

4.5.2 Indicadores para la síntesis de GOS

Los indicadores calculados para el seguimiento de la reacción, a partir de los perfiles de composición de carbohidratos se resumen en la figura 4-9. Como lo indica el análisis estadístico presentado en el ANEXO D-2, el 91% de la variación observada en el rendimiento y selectividad global de las enzimas inmovilizadas puede atribuirse a efectos significativos del pH, método de inmovilización y fuente de la enzima, junto a las interacciones dobles y triple entre dichos factores ($p<0.05$).

Tras cinco horas de reacción, con β-gal inmovilizada de *A. oryzae*, el rendimiento de GOS no se vio afectado por el pH del lactosuero y fue equivalente para las tres técnicas de inmovilización (22±2%; *i.e.* 91 g/L). No obstante, a pH 6.0 para CLEAS-Sulfato el consumo de lactosa fue más lento y selectivo a la formación de prebióticos (S=49%). Solo en el caso de CLEAS-IPA, la selectividad fue menor respecto al sistema libre (33 contra 41%),

alcanzando una concentración de monosacáridos similar al del medio con la enzima en solución (*w*=40±2%; 160 g/L de glucosa y galactosa). En contraste, los agregados de *A. niger*, preservaron un mayor rendimiento (27±1%; 108 g/L), su selectividad fue más estable frente a cambios de pH (41±4%) y la productividad a pH 6.0 fue mayor que las CLEAS de *A. oryzae*. Para esta enzima, por lo tanto, los dos métodos de agregación generan resultados equivalentes si se condiciona la operación a dicho pH.

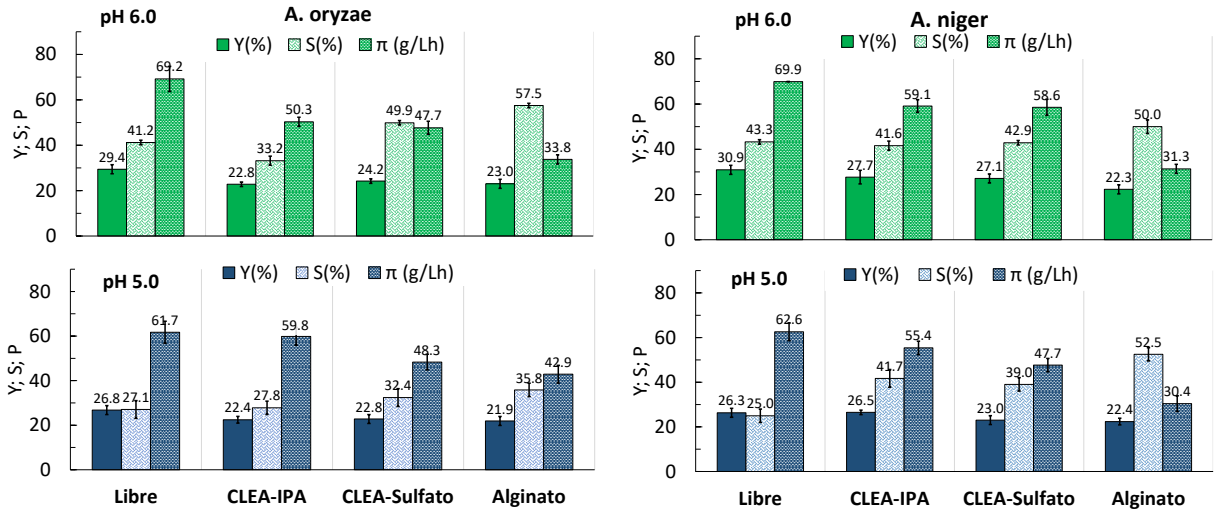


Figura 4-9 Efecto de las técnicas de inmovilización sobre el rendimiento, la selectividad y la productividad de GOS.
β-gal *A. oryzae* (izquierda) y *A. niger* (derecha). 45°C, pH 6.0 (tramas verdes) y 5.0 (tramas azules)

Una sensibilidad similar se evidenció con las esferas de alginato, que simultáneamente presentaron la mayor selectividad y menor productividad de los tres métodos de inmovilización evaluados. Dadas las limitaciones de transporte de masa al interior del gel, la concentración local de hidrogeniones percibida por la β-gal puede diferir de las del seno del fluido, lo que podría explicar el efecto más pronunciado de la variación del pH, de 6.0 a 5.0, en los perfiles de la figura 4-8, la selectividad (57.5 contra 35.8%) y en la productividad (33.8 contra 42.9 g_{GOS}/L.h).

La respuesta al pH, por otra parte, también depende la naturaleza química del gel, pues Katrolia et al. (2019) reportan cambios de actividad inferiores al 10% con β-gal de *A. niger* y *A. oryzae,* atrapados en esferas de alginato de bario, lo que contrasta con el alginato de

calcio usado en este trabajo. En comparación, los agregados enzimáticos catalizan a unas condiciones similares a las del seno de fluido, debido a su menor tamaño. De hecho, el diámetro promedio, observado para estas partículas amorfas e insolubles se ubicó en el intervalo de confianza de 0.2 a 0.6 mm ($\alpha = 0.05$), con lo que se hace menos probable la aparición de gradientes de concentración, como se esperaría en catalizadores heterogéneos de mayor tamaño, como las esferas de alginato (δ_{alg}=3 mm). La difusividad de las moléculas en el alginato es más restringida respecto a los agregados enzimáticos ($D_{alg} < D_{CLEA}$), mientras el radio de las esferas supera en un orden de magnitud el de los CLEAS ($\delta_{alg} > \delta_{CLEA}$), por lo que este sistema puede afrontar fenómenos difusivos con mayor intensidad.

Cotejando estos resultados respecto a otros reportes, Guerrero et al. (2018) señalaron un descenso del rendimiento de GOS del 29 a 26% al usar β-gal de *A. oryzae* libre y entrecruzada con sulfato, respectivamente. En relación con otros métodos de inmovilización, Huerta et al. (2011) señala un rendimiento de hasta 46% al usar soportes heterofuncionales de amino-glioxil agarosa. En este sentido, sería necesario un análisis económico para definir la viabilidad de estas opciones, teniendo presente el ahorro del soporte que implican los enfoques de entrecruzamiento o atrapamiento.

Por otra parte, para estos sistemas inmovilizados, en las figuras 4-10 A y 4-10B se presenta el comportamiento de la selectividad, conversión de lactosa y distribución del grado de polimerización de GOS, obtenido al avanzar el ciclo de reacción con cada enzima y técnica de inmovilización. En relación con el comportamiento para el sistema libre, la selectividad de las β-gal inmovilizadas al avanzar la reacción dependió del pH y la fuente de la enzima ($p<0.05$).

Para β-gal de *A. oryzae* la inmovilización con sulfato a pH 6.0 redujo el aprovechamiento final de la lactosa al 50%, mientras la conversión lograda con IPA fue cercana a la del sistema libre, para un mismo rendimiento de GOS. Con todos los métodos de inmovilización usados para esta enzima la variación en el tiempo del contenido de tetra y pentasacáridos no fue superior al 5% a pH 6.0. Aun así, los agregados pretratados con IPA produjeron cadenas más largas.

Al igual que con las enzimas libres, a pH 5.0 la selectividad fue menor y decreció rápidamente, pero la proporción de cadenas superiores de GOS se incrementó, hasta un

15% de pentasacáridos y 25% de tetrasacáridos. Esto va en línea con la observación efectuada por Guerrero et al. (2018), quienes obruvieron un 10% de pentasacáridos y una conversión de lactosa de 75%, en un ciclo de 7 horas.

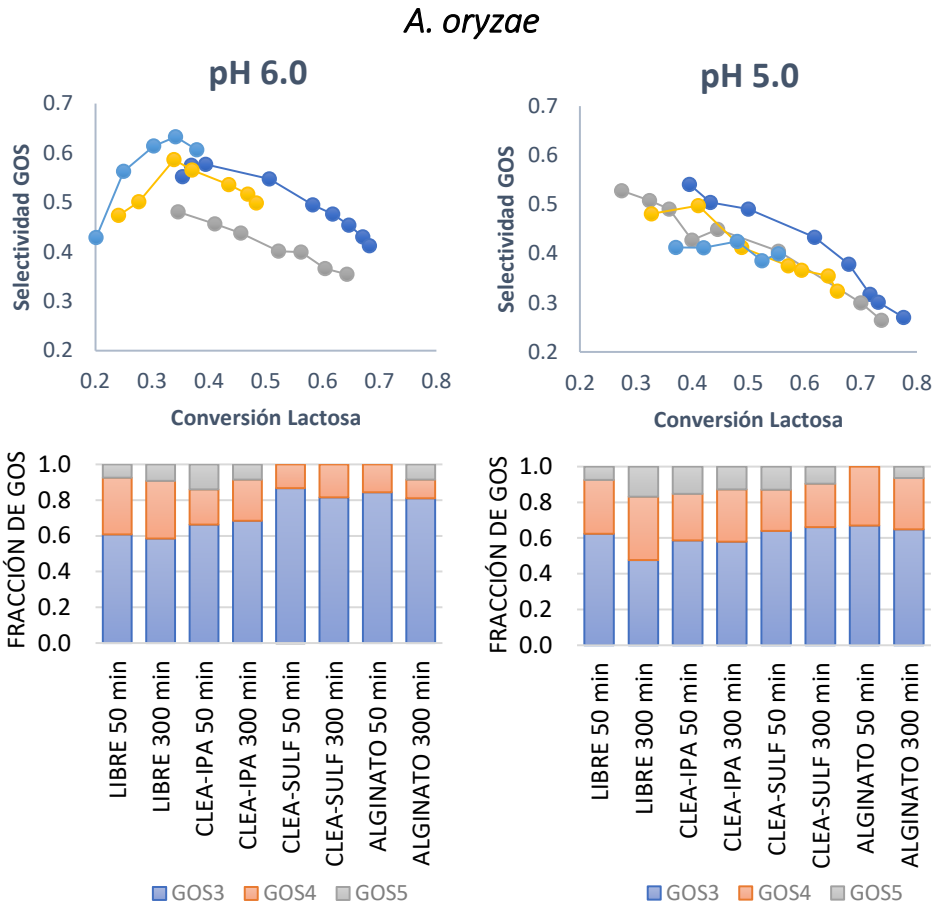


Figura 4-10-A Selectividad y perfil de DP, en función de la conversión, pH y técnica de inmovilización con β-gal de *A. oryzae.*
● Enzima libre; ●CLE-IPA; ●CLEA-Sulfato; ●Alginato.

Por el contrario, al usar β-gal de *A. niger* a pH 6.0 la diversidad estructural de los GOS fue independiente de la técnica de entrecruzamiento. Con ambos agregados el perfil de GOS fue estadísticamente equivalente y, finalizada la reacción, el contenido de tetra- y pentasacaridos fue similar con ambas técnicas (25% y 15%, respectivamente). Esto se asemeja al comportamiento observado con β-gal de *A. oryzae*. No obstante, al comparar el perfil de GOS en el tiempo, la lactasa de *A. niger* tiende a incrementar los grados de oligomerización, independientemente de la técnica de inmovilización usada (aunque el

atrapamiento en alginato no presentó pentasacáridos). En cambio, a pH 5.0 sólo el uso de CLEAS-IPA permitió obtener pentasacáridos, mientras que las CLEAS Sulfato y el alginato, aumentaron el contenido de trisacáridos, sin la presencia de GOS DP5.

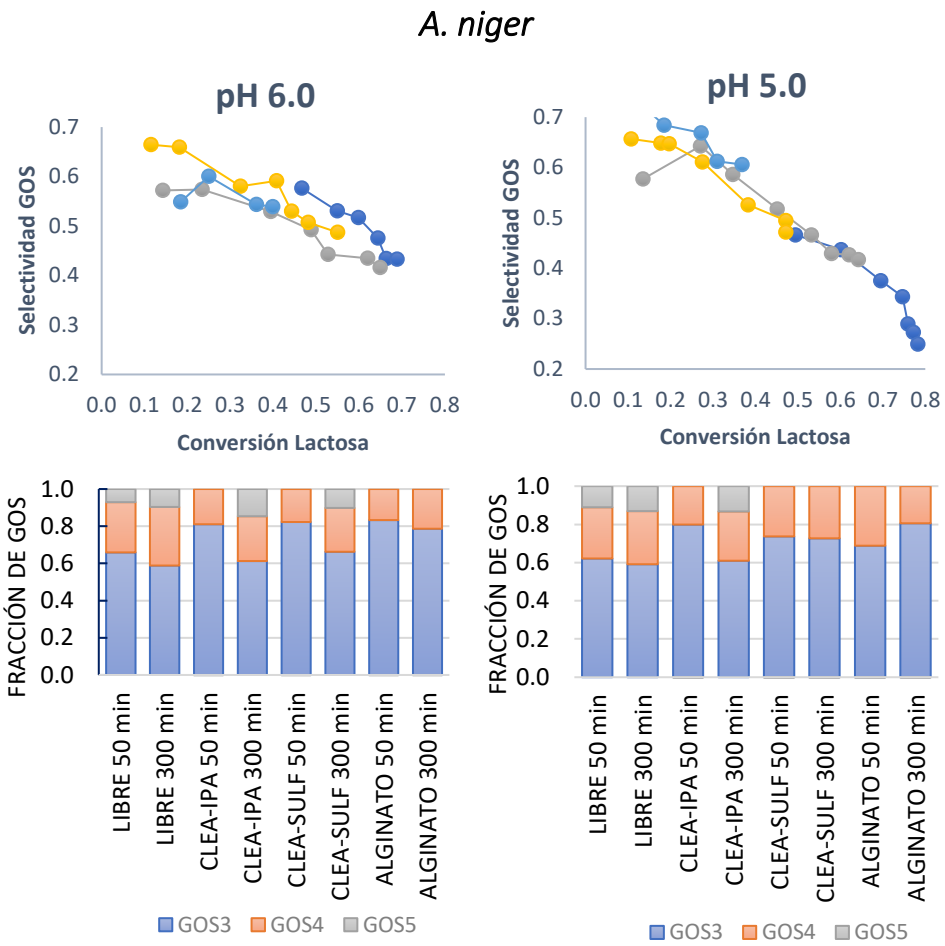


Figura 4-10-B Selectividad y perfil de DP, en función de la conversión, pH y técnica de inmovilización de β-gal A. niger. ● Enzima libre; ●CLE-IPA; ●CLEA-Sulfato; ●Alginato

4.6 Uso de β-gal inmovilizada en ciclos repetidos

En la figura 4-11 se observa el comportamiento de la producción de GOS para las diferentes enzimas y técnicas de inmovilización evaluadas, pasados hasta 20 ciclos de reacción de cinco horas. Al medir la actividad de los sobrenadantes, se confirmó la estabilidad de los agregados entrecruzados, con una liberación media de 0.30±0.09% de las unidades inmovilizadas, en cada ciclo de reacción.

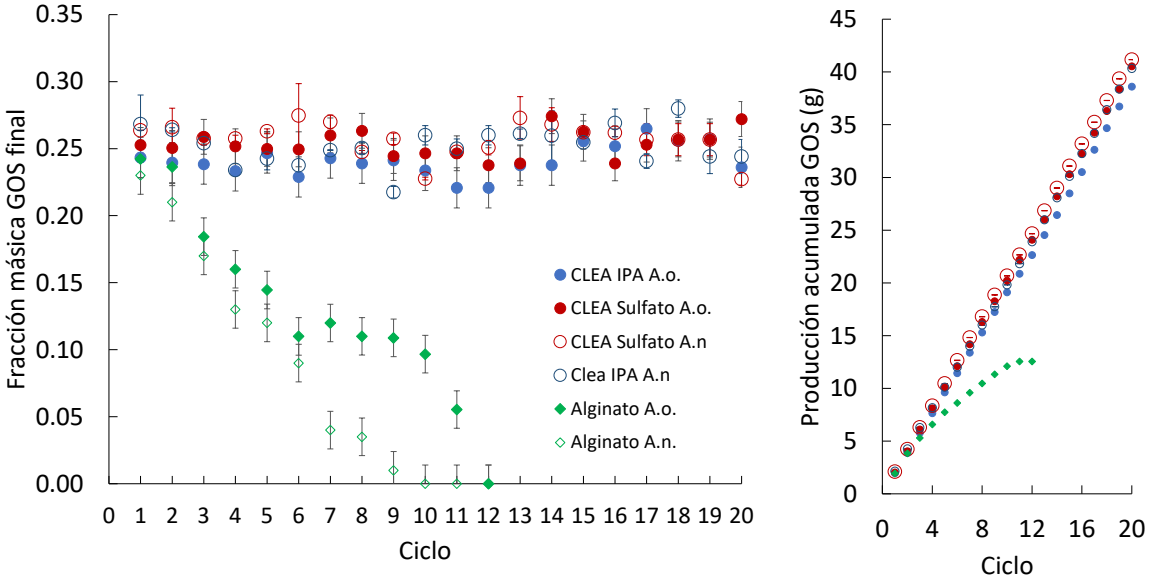


Figura 4-11 Uso de β-gal inmovilizadas y producción acumulada de GOS, en ciclos repetidos de reacción.
Fracción másica de GOS respecto al contenido final de carbohidratos en cada ciclo (izquierda) y producción acumulada de GOS (derecha), a una escala de 20mL por ciclo de reacción. A.o (*A. oryzae*); A.n (*A. niger*)

Comparado con reportes previos que usan CLEAS, Guerrero et al. (2020) demostraron que el uso de otros alcoholes como agentes precipitantes, tales como propanol y etanol, mejoran la retención de actividad al inmovilizar β-gal, con rendimientos de inmovilización de 46% y 90%, respectivamente. Al simular el comportamiento de dichos agregados, estos autores aducen que las β-gal pueden usarse por 20 ciclos, con 80% de pérdida de actividad y una productividad reducida al 60% en el 10 ciclo de uso, para ciclos reactivos de 7 horas (Guerrero et al., 2020). Con los resultados presentados en la figura 4-11 se muestra que el uso de isopropanol conduce a agregados más estables en el tiempo, pese a tener una menor actividad retenida inicialmente (Tabla 4-4). De modo análogo, los agregados entrecruzados pretratados con sulfato de amonio no presentaron una reducción significativa en la producción lograda de GOS, pasados 20 ciclos.

Una tendencia diferente se obtuvo con las esferas de alginato de calcio que se degradaron, limitando su reutilización a 11 ciclos de reacción. Esto contrasta con el 85% de actividad hidrolítica retenida por 15 ciclos que reportan Argenta et al. (2021), al usar β-gal de *K. lactis* en lactosuero a 6% m/v de lactosa. Al respecto, la inestabilidad de las esferas observadas en el presente estudio puede atribuirse a varios factores:

(1) Se usó lactosuero a una concentración elevada (40% m/v), lo que incrementa la presencia de iones en el medio y puede acelerar los procesos de intercambio del calcio en el gel con iones monovalentes (principalmente sodio y potasio) en la fase líquida. Así, se desestabiliza la estructura del alginato, como se ha reportado previamente (Shahriari et al., 2016).

Para un lactosuero en polvo, Rico-Rodríguez (2018) obtuvo un análisis proximal determinando el contenido de sodio (818 mg/100g), potasio (748 mg/100g), calcio (1311 mg/100g) y magnesio (62 mg/100g), por lo que es posible que en efecto, los iones monovalentes del medio de reacción superen en concentración a los divalentes.

(2) La difusión de la enzima hacia el medio, liberándose progresivamente. Este fenómeno ha sido previamente evidenciado para técnicas de atrapamiento de β-gal, con pérdidas de actividad del 60% durante los primeros ciclos de reutilización (Katrolia et al., 2019).

De acuerdo con estos valores y teniendo presente que el objetivo principal de la inmovilización es aumentar la producción de GOS para una cantidad fija de enzima, la figura 4-11 también presenta la producción másica de GOS acumulada tras los ciclos de reacción, considerando la escala de 20 mL en los ensayos realizados. En el ciclo 12, la producción de prebióticos alcanzada con los agregados superó en un 76% a la obtenida con alginato. A su vez, considerando los 20 ciclos completos se alcanzó una producción 3 veces mayor respecto a las esferas y una acumulación estadísticamente equivalente para todos los métodos de inmovilización en agregados enzimáticos. Así, la alta estabilidad de la actividad de la enzima y la posibilidad de utilizarla en los 20 ciclos múltiples hace que el uso de estos agregados enzimáticos resulte de un gran atractivo, en cuanto la síntesis de prebióticos se podría efectuar de manera más costo-efectiva, al no perder enzima en solución luego de la etapa reactiva.

Finalizado el ciclo 20, los agregados fueron almacenados en buffer fosfato pH 6.0 a 4°C durante 120 días, haciendo seguimiento del rendimiento de GOS obtenido en lactosuero luego de este tiempo, respecto al rendimiento observado en el ciclo 20 (figura 4-11). Como se observa en la figura 4-12, solo los agregados de *A. oryzae* conservaron una actividad superior al 90% luego de cuatro meses, en contraste con los de *A. niger*, que a lo sumo preservaron el 40% de actividad pasado este tiempo.

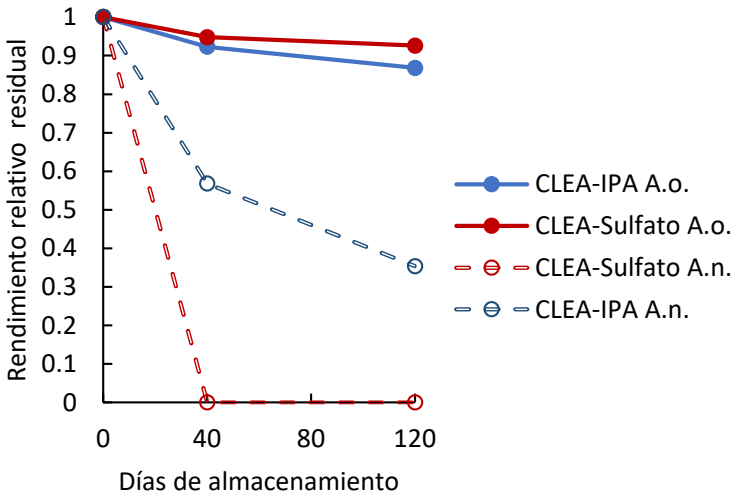


Figura 4-12 Retención de actividad de agregados almacenados en refrigeración (4°C). A.o (β-gal de *A. oryzae*); A.n (β-gal de *A. niger*)

4.7 Actividad de glucosa oxidasa

Como se mencionó previamente, una de las estrategias seguidas para reducir el contenido de glucosa acumulada en el medio debido a la actividad hidrolítica de las β-gal se basa en su conversión parcial en ácido glucónico, por medio de la glucosa oxidasa (GOx). Inicialmente, se determinó la actividad de una GOx comercial (Gluzyme Mono10000BG®), aislada de *A. oryzae,* en función de la temperatura y el pH. Al cuantificar la velocidad de producción inicial de ácido glucónico, el pH incidió significativamente en la variación de actividad ($p<0.05$), con una pérdida de 50% de la capacidad catalítica al pasar de pH 6.0 a 5.0. Por el contrario, el cambio de 40 a 45°C no representó un efecto significativo en el desempeño oxidativo esta enzima, obteniéndose una actividad máxima de 10.063 ± 372 U/g, a pH 6.0 y 45 °C (Figura 4-13).

De acuerdo con reportes previos con GOx aisladas de *Aspergillus,* estas enzimas operan mejor a pH cercanos a 6.0 y varían su actividad en 5% al incrementar la temperatura de 40 a 45 °C (Gouda et al., 2003). Dicho cambio es similar al observado en este trabajo, para el nivel de incertidumbre de los datos obtenidos.

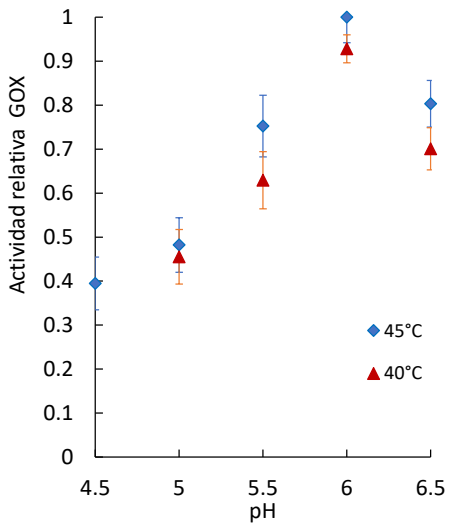


Figura 4-13 Actividad relativa de glucosa oxidasa, en función de la temperatura y el pH

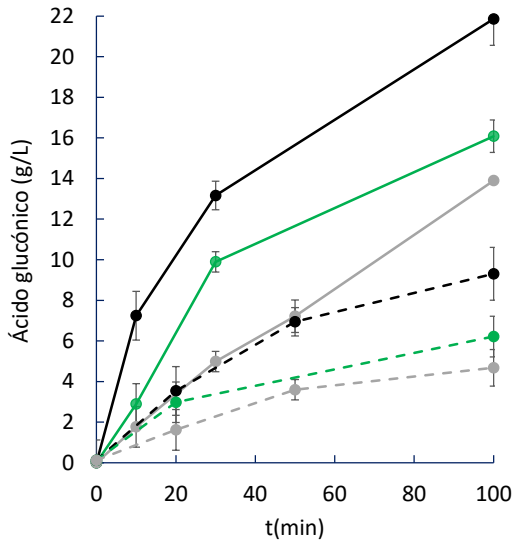


Figura 4-14 Perfiles de producción de ácido glucónico con GOx libre.
Efecto de pH y tasa de aireación en la producción de ácido glucónico en glucosa 5% m/v, a pH 5.0 (líneas discontinuas) y 6.0 (líneas continuas). (●) 4vvm; (●) 2vvm; (●) 1vvm.

Otro factor a considerar para la producción enzimática del ácido glucónico es la concentración de oxígeno disuelto, necesario para la reacción. En este sentido, la figura 4-14 muestra que la concentración de ácido en el tiempo dependió significativamente del pH y flujo de aire ($p<0.05$), con un mejor desempeño de la enzima a pH 6.0 y la mayor

aireación. Esto, por una parte, indica que el oxígeno actúa como un sustrato limitante del proceso y, por otra, que la ventana operacional de temperatura y pH de esta enzima hace que el uso de GOx sea compatible con las β-gal de *A. niger* y *A. oryzae,* que previamente se evaluaron en sistemas a 45°C, pH 5.0 y 6.0.

Adicionalmente, como se indica en el ANEXO E, el uso de un difusor en el montaje de aireación, para reducir el tamaño de las burbujas y aumentar el área de transferencia de masa de la fase gaseosa a la matriz líquida de reacción, favoreció la producción de ácido glucónico, en tanto los valores de k_La en medio de glucosa oscilaron entre 2.1 y 16.9 h^{-1} para 1 y 4 vvm, respectivamente. Con base en estos resultados, para las fases posteriores de este trabajo se determinó fijar el suministro de aire en 4vvm, con el fin de no limitar la actividad de GOx por una menor disponibilidad de oxígeno en el medio.

4.8 Inmovilización de glucosa oxidasa

Una vez caracterizada la actividad de la GOx, se procedió a evaluar el rendimiento de inmovilización al usar los tres métodos previamente considerados con β-gal. Para esto, se determinó la recuperación de enzima y de la actividad expresada en los agregados enzimáticos y esferas de alginato, con relación a la actividad de la enzima libre. Los valores obtenidos se reportan en la tabla 4-5.

Tabla 4-5 . Rendimientos de inmovilización de Glucosa oxidasa

	Proteína recuperada (%)*			**Actividad recuperada (%)****		
Enzima	**CLEA IPA**	**CLEA Sulfato**	**Alginato**	**CLEA IPA**	**CLEA Sulfato**	**Alginato**
GOx	85.2	81.5	73.5	54.5	27.3	n.d.

*Incertidumbre 2.0%. **Incertidumbre 2.5% n.d. No determinada

Se logró recuperar un porcentaje similar de proteína en los agregados insolubles por los métodos CLEAS-IPA y CLEAS-Sulfato, que coincidieron a su vez con los rendimientos observados para los entrecruzamientos efectuados para ambas β-gal. No obstante, la retención de actividad de los agregados fue inferior respecto a la determinada para las lactasas. Esto indica que, para ambos tipos de agregación, la estructura de la GOx fue más sensible a alteraciones químicas de precipitación y entrecruzamiento.

Particularmente, el tratamiento con sulfato fue más agresivo con esa enzima, como también se observó con las β-gal, generando una pérdida de la actividad superior al 70%.

Para esta misma enzima, inmovilizada en CLEAS, Ayhan & Ispirli, (2011) determinaron rendimientos de inmovilización en términos de actividad, entre 54 y 89%, al variar la concentración de glutaraldehído, temperatura y agente precipitante, lo cual indica que el protocolo seguido en este estudio, optimizado por Guerrero et al. (2018) para la recuperación de actividad de β-gal, no tiene el mismo desempeño con la GOx.

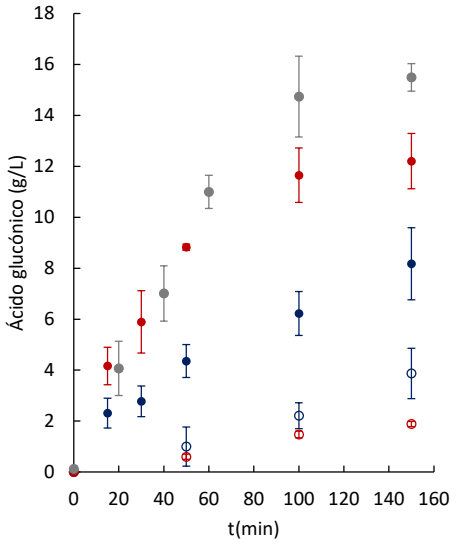


Figura 4-15 Producción de ácido glucónico con GOx inmovilizadas.
Marcador con relleno (pH 6.0), marcador sin relleno (pH 5.0).
(●) Alginato; (●) CLEA-IPA; (●) CLEA-Sulfato.

Por otra parte, en la figura 4-15 se muestra la producción lograda de ácido glucónico con cada método de inmovilización, a partir de lo cual se cuantificó un rendimiento de ácido 50% superior para CLEAS-IPA respecto a CLEAS-Sulfato. A su vez, puede apreciarse que el descenso del pH de 6.0 a 5.0, incidió significativamente en la capacidad oxidativa de la GOx, con una producción de ácido 83 y 50% más baja en el menor pH, para CLEAS IPA y CLEAS-Sulfato, respectivamente. Esta tendencia coincide con la de las enzimas libres y difiere con la mayor estabilidad de la actividad enzimática frente a cambios de pH, conseguida con el entrecruzamiento de β-galactosidasas (figura 4-7).

Seguidamente, la evaluación del atrapamiento de GOx en alginato de calcio no resultó en una inmovilización estable pues, aunque inicialmente el 73.5% de la proteína fue retenida, al introducir las esferas en medio con glucosa y oxígeno, la producción de ácido glucónico degradó progresivamente el gel, impidiendo diferenciar la actividad libre de la inmovilizada. Este fenómeno ha sido discutido previamente por autores como Marilho (2016), quien identificó la hidrólisis de uniones de unidades maluronato-guluronato de este biopolímero en condiciones ácidas. Así, conforme avanzó el tiempo de reacción, las esferas redujeron su tamaño y las enzimas fueron liberadas a la fase líquida. Por esto, en la figura 4-15 el perfil de producción de ácido asociado a este método es resultado de la acción catalítica conjunta de enzima inmovilizada y la gradualmente liberada a la solución. No obstante, este resultado difiere del comportamiento observado por Blandino et al. (2001), quien para la misma inmovilización no reportó degradación de alginato de calcio en un medio de glucosa. Esto puede deberse a mayores concentraciones de cloruro de calcio usados por este autor en la formación de las esferas, pues en este mismo estudio, se halló una proporcionalidad inversa entre dicha concentración y la liberación difusiva de la enzima.

4.9 Síntesis de GOS con sistemas multienzimáticos libres

4.9.1 Perfiles cinéticos de composición del medio

De acuerdo con el comportamiento de las β-gal y la GOx, la evaluación del uso secuencial y simultáneo de la segunda se efectuó a pH 6.0, debido a dos fenómenos observados a pH 5.0: (1) La tendencia de las β-gal a degradar los GOS en tiempos prolongados de reacción, y (2) la pérdida del 50% de actividad para la GOx con el descenso de pH. Así mismo, dado que a los 50 minutos de reacción los perfiles de GOS con β-gal mostraron su concentración máxima, la aireación en los sistemas secuenciales se inició en dicho momento.

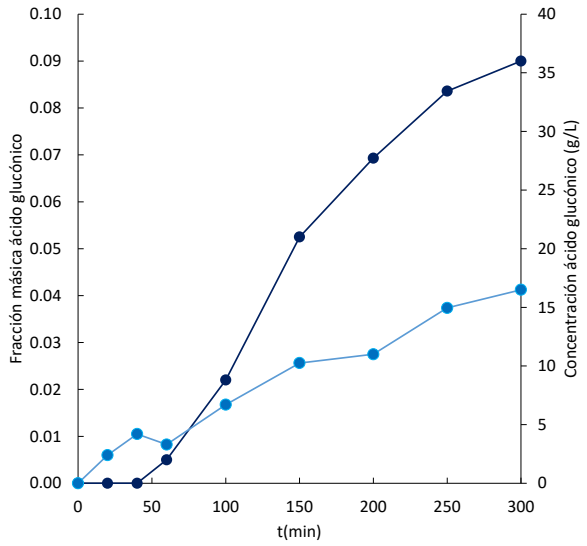


Figura 4-16 Concentración promedio de ácido glucónico en sistemas mixtos libres. LaS 400 g_{lact}/L pH 6.0 y 4 vvm Uso de GOx, (●) secuencial y (●) simultáneo a β-gal.

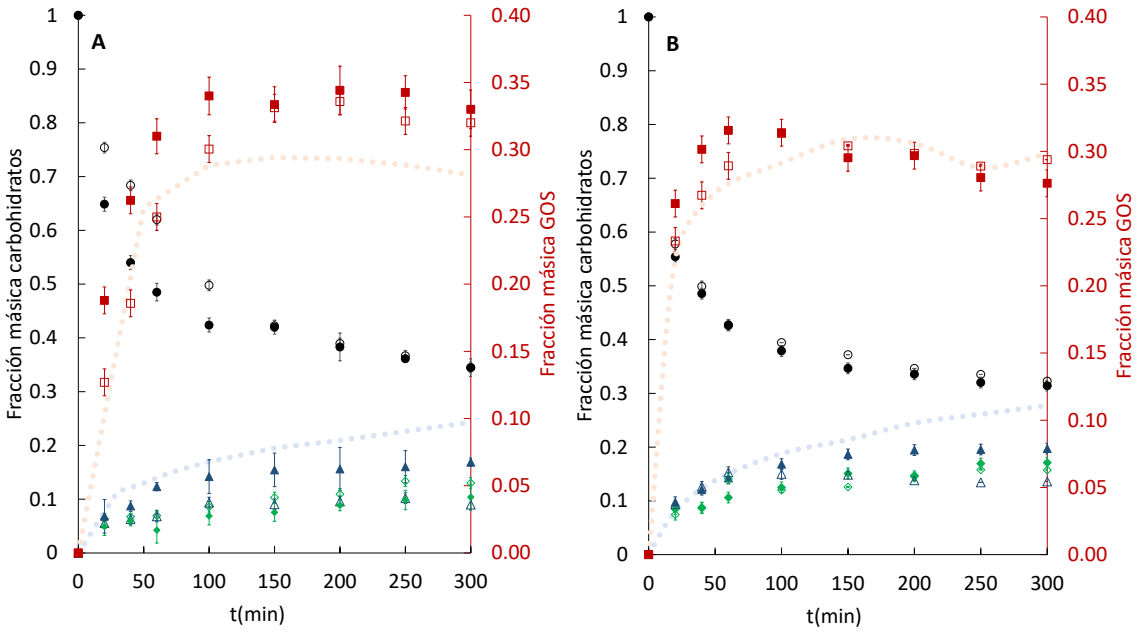


Figura 4-17. Perfiles de composición de carbohidratos en LaS 400 g_{lact}/L, con sistema mixto libre de β-gal y GOx, en modo secuencial y simultáneo, a pH 6.0 y 4 vvm.

Uso secuencial (marcadores sin relleno), y simultáneo (marcadores con relleno). β-gal *A. oryzae y* GOx (A); β-gal *A. niger* y GOx (B); (●, ○) Lactosa; (▲, Δ) Glucosa; (◆, ◊) Galactosa; (■, □) GOS; (⋯) Glucosa con β-gal monoenzimático libre; (⋯) GOS con β-gal monoenzimático libre.

Con las condiciones previamente mencionadas, en la figura 4-16 se muestra la concentración de ácido glucónico para los sistemas mixtos en medio de lactosuero como sustrato. Al usar una solución de NaOH 1.25M para medir la producción de ácido glucónico, el comportamiento promedio cuantificado para ambos sistemas bi-enzimáticos fue equivalente, además puede observarse que el uso secuencial de GOx condujo a mayores conversiones de glucosa, logrando una concentración de ácido hasta 2.25 veces mayor, respecto al uso simultáneo, en cuyo caso la oxidación procedió a menor velocidad. Rico-Rodríguez (2018), reportó un comportamiento análogo para el sistema mixto β-gal de *K. lactis* y la misma fuente de GOx, logrando un 2% de contenido final de ácido con la configuración simultánea y un 11% con la secuencial, tras cinco horas de reacción.

Como se aprecia en la figura 4-16, la diferencia en la velocidad de producción de ácido glucónico (y por tanto, de degradación de glucosa) por el uso secuencial o simultáneo de GOx, incidió en el comportamiento cinético de los sistemas mixtos en la etapa inicial de la reacción. Así, debido a la baja velocidad de oxidación de la configuración simultánea, durante los primeros minutos de reacción, la cinética de la glucosa no exhibió diferencias estadísticas entre los sistemas mono y bi-enzimáticos. Pasados los 50 minutos de reacción el consumo de este monosacárido se incrementó, en tanto la tasa de degradación de lactosa se redujo, por lo cual la concentración de glucosa descendió, llegando a fracciones másicas respecto al total de carbohidratos de 17% (68 g/L) y 9% (36 g/L), con el uso simultáneo y secuencial de GOx, respecto al 24% (96 g/L) observado para el sistema monoenzimático.

Al utilizar la β-gal de *A. oryzae*, el uso simultáneo de GOx aumentó la velocidad de consumo de lactosa, en relación con el uso secuencial. No obstante, pasados 150 minutos, la concentración del sustrato fue independiente del tiempo de adición de la GOx, con un aprovechamiento equivalente al del sistema monoenzimático (76%). Por otra parte, el contenido de galactosa fue independiente de la presencia de GOx en el medio (11±2%).

Paralelamente, la actividad de la GOx afectó la velocidad de producción de GOS. En los primeros 50 minutos del sistema secuencial, se presentó un comportamiento equivalente al uso individual de β-gal, mientras que, con la configuración simultánea, se incrementó la tasa de producción inicial de prebióticos. Aun así, al igual que para la conversión final de lactosa, el contenido de oligómeros pasadas cinco horas de reacción fue independiente

del momento de adición de la oxidasa, alcanzando una fracción másica de GOS 14% mayor en los sistemas mixtos respecto al sistema monoenzimático. Esto se traduce en 128 g_{GOS}/L (Y=0.32), comparado con 112 g_{GOS}/L (Y=0.28) al usar solo β-gal.

Comparativamente, Fischer & Kleinschmidt (2019) consiguieron incrementar el rendimiento de prebióticos en 8% para un sistema β-gal (*A. oryzae*) - GOx (*P. chrysogenum*) operado en forma simultánea a 25°C, pH 4.5 y una relación β-gal:GOx de 1:3.8. En dicho reporte, a pesar de la mayor concentración de GOx, su diferente origen microbiológico, el uso de un pH que favorece la hidrólisis y la operación a una temperatura muy inferior a la óptima reportada para la β-gal (55°C), puede asociarse a que la mejora del sistema bi-enzimático en el estudio mencionado fuera más discreta, respecto a los escenarios de la presente investigación.

Un resultado diferente también fue reportado por Rico-Rodríguez (2018), quien si halló diferencias en la acumulación de GOS al usar secuencial o simultáneamente GOx de *A. oryzae* en presencia de β-gal de *K. lactis*. Para dichas enzimas, sólo el uso secuencial detuvo la degradación de los prebióticos al avanzar la reacción. Esto implica que el comportamiento del sistema mixto depende del origen del catalizador, su respuesta frente a la oxidación de glucosa y su tendencia a formar oligosacáridos de cadenas largas (tri, tetrámeros) o hidrolizarlos en tiempos prolongados de reacción.

En este mismo sentido apuntan las curvas cinéticas de la figura 4-17, pues los efectos de la GOx fueron más pronunciados al usar β-gal de *A. oryzae*, en comparación con la de *A. niger*, indicando nuevamente que, pese a la cercanía biológica de ambas fuentes, su desempeño no es equivalente. Para el sistema mixto β-gal (*A. niger*)- GOX, los cambios respecto al uso individual de la lactasa son menos significativos en los perfiles de producción de GOS. Al igual que con la enzima de *A. oryzae*, la adición secuencial de la oxidasa hace que en la primera hora de la reacción los perfiles sean estadísticamente equivalentes a los del sistema monoenzimático. Aun así, debe resaltarse que, con el uso simultáneo de la oxidasa, el rendimiento máximo de prebióticos (31%, *i.e.* 124 g_{GOS}/L) no varió significativamente, al compararlo con el medio sin GOx, pero se obtuvo en menor tiempo (50 minutos comparados con 150 minutos).

De acuerdo con lo anterior, el uso simultáneo de GOx sería apropiado para reducir el tiempo de operación con β-gal de *A. niger.* No obstante, entre las desventajas de esta forma de uso se encuentran:

- La tendencia a la hidrólisis de GOS para tiempos prolongados de reacción.
- La menor velocidad de la oxidasa y, por lo tanto, la obtención de un medio más enriquecido en glucosa respecto al sistema secuencial: 20% (80 g/L) y 14% (56 g/L) de carbohidratos, respectivamente.
- Más galactosa libre respecto al sistema monoenzimático: 16% (64 g/L) presente respecto al 10% (40 g/L) con el uso individual de esta β-gal.

Entonces, dado que el efecto colateral que se consigue con el uso secuencial de la GOx es la reducción parcial del aporte calórico del producto debido a la oxidación de glucosa, se determinó que para ambas lactasas el uso más apropiado de la oxidasa era el secuencial.

4.9.2 Indicadores para la síntesis de GOS

A partir de los perfiles de composición de carbohidratos, se determinaron los indicadores de reacción que se resumen en la tabla 4-6, comparando los sistemas mono y bi-enzimáticos previamente descritos para las enzimas libres. Como se dedujo de los comportamientos cinéticos, solo para la β-gal de *A. oryzae* la adición de GOx permitió obtener más prebióticos y aumentar la selectividad del proceso hacia la transgalactosilación. Por el contrario, la selectividad máxima decreció en los sistemas mixtos con *A. niger*

Tabla 4-6 Indicadores de seguimiento de la síntesis de GOS con el uso de sistemas mixtos libres β-gal GOx.

β-gal	β-gal:GOx	Y^a (%)	S_{max}^b (%)	S^b (%)	X_{lac}^c (%)	$\pi_{GOS100min}^d$ (g/Lh)
A. oryzae	Mono-enzimático	29.4	54.7	41.2	68.3	69.2
	1:1 (Sec)	33.6	59.8	48.9	65.5	72.11
	1:1 (Sim)	34.4	59.0	52.3	65.6	81.6
A. niger	Monoenzimático	30.9	57.7	43.3	68.9	69.9
	1:1 (Sec)	31.3	50.4	43.4	67.7	71.3
	1:1 (Sim)	31.6	55.1	40.3	68.6	75.2

Desviación estándar: [a](±1%); [b](±4%); [c](±3%); [d](±4g/Lh);

Adicionalmente, al comparar entre sí el uso secuencial o simultáneo de la oxidasa, se evidencia que el modo afectó significativamente la velocidad de producción de GOS, pero no el rendimiento ni la conversión final de lactosa. Aun así, teniendo presente que se busca reducir el contenido final de glucosa, para ambas β-gal es preferible el sistema secuencial sobre el simultáneo, y éste a su vez sobre el monoenzimático.

Esta misma diferencia entre las respuestas de las β-gal según su origen microbiológico, se vio reflejada en la evolución de la selectividad conforme se convertía la lactosa del medio. Para β-gal de *A. oryzae*, la actividad de GOx permitió conservar un valor de selectividad superior al 50% en todo el proceso, en tanto la de *A. niger* no varió significativamente con o sin la presencia de la oxidasa (Figura 4-18). De igual forma, la GOx generó que junto a mayores rendimientos de GOS también se dieran cambios en su distribución estructural, pues en relación con los sistemas monoenzimáticos, aumentó la proporción de tri- y penta-sacáridos, reduciéndose el de tetrasacáridos.

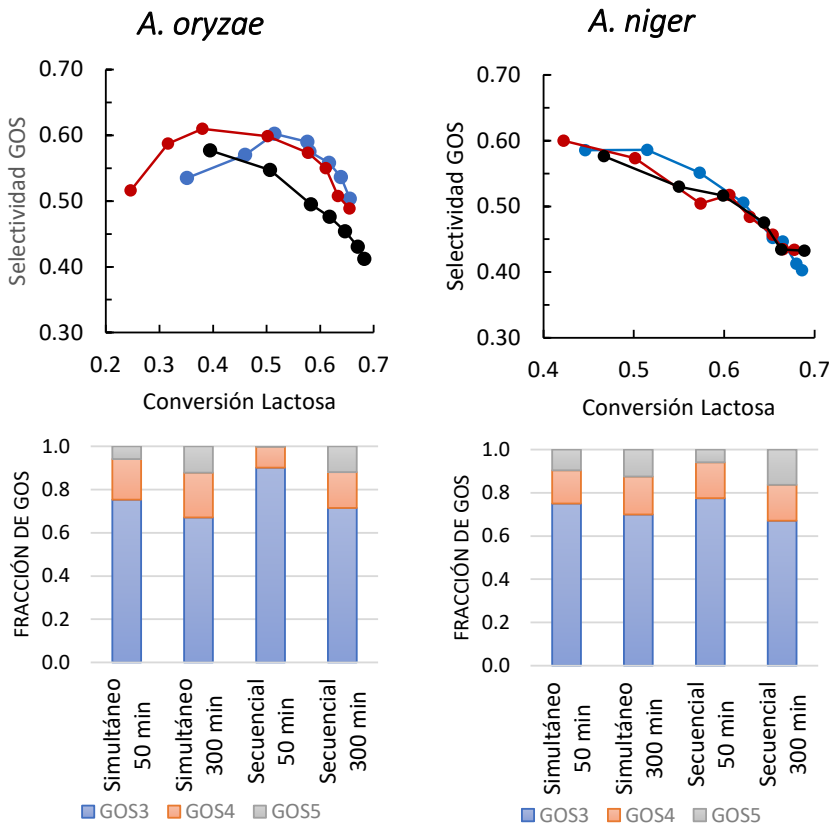


Figura 4-18 Selectividad y distribución de DP en sistemas mixtos β-gal GOx
(●) Monoenzimático (β-gal); (●) Bi-enzimático secuencial; (●) Bi-enzimático simultáneo

4.9.3 Efecto de la relación β-gal:GOx

Con el fin de determinar si un aumento en la concentración de la GOx permitía obtener mejores rendimientos de prebióticos, se evaluó duplicar la relación de unidades de GOx, para las dos fuentes de β-gal. Al respecto, la figura 4-19 muestra la evolución de la fracción másica de GOS en los carbohidratos del lactosuero (40% m/v), con sistemas bi-enzimáticos libres a pH 6.0 y para relaciones β-gal:GOx 1:1 y 1:2.

Pese a que los sistemas multienzimáticos β-gal-GOx aumentaron el rendimiento de GOS respecto a los monoenzimáticos, tanto para la β-gal de *A. oryzae* como de *A. niger*, la implementación de un sistema en proporción 1:2 no representó un incremento del rendimiento de GOS estadísticamente significativo, respecto al escenario 1:1. En el caso de β-gal de *A. oryzae,* dicho rendimiento fue incluso menor (32% contra 34%) y, en ambos casos, generó una degradación más pronunciada de los GOS al avanzar la reacción. No obstante, para el sistema con β-gal de *A. niger* la velocidad inicial de producción de prebióticos se incrementó en un 12%.

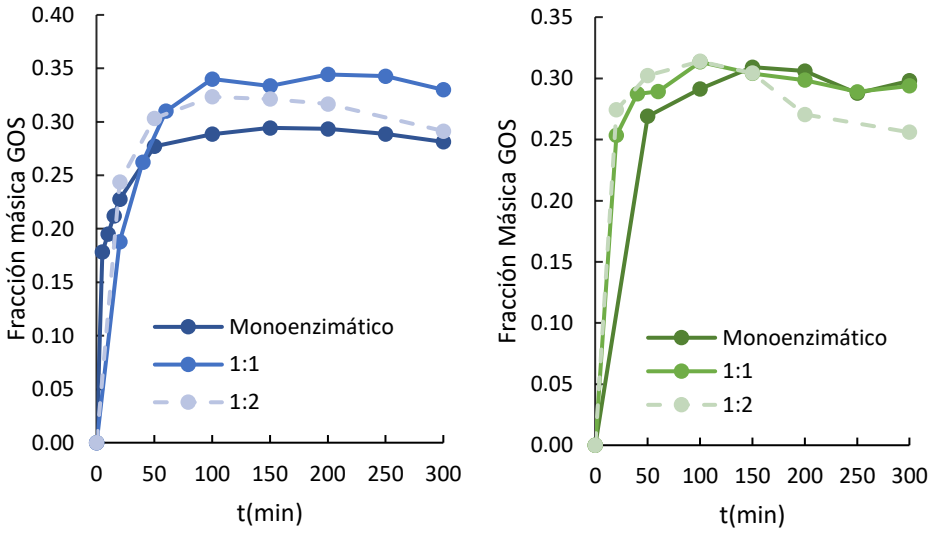


Figura 4-19 Contenido de GOS en lactosuero, para sistemas mixtos libres con diferentes relaciones β-gal: GOx.
Izquierda (azul): β-gal *A. oryzae*- GOx. Derecha (verde): β-gal de *A. niger*- GOx

A partir de estos resultados puede señalarse que, para ambos sistemas mixtos, el uso secuencial de β-gal y GOx en una relación 1:1 y pH 6.0 generó las condiciones más adecuadas para aumentar el rendimiento y la estabilidad de galacto-oligosacáridos y, adicionalmente, reducir la concentración de glucosa libre en el lactosuero, por el aumento de la selectividad de las β-gal y la oxidación del monosacárido a ácido glucónico.

4.10 Co-inmovilización de β-gal y GOx

Para esta fase de la investigación el atrapamiento en alginato no fue evaluado debido a la pérdida de actividad progresiva, evidenciada en los ciclos repetidos monoenzimáticos con β-gal, y a su incompatibilidad con las concentraciones alcanzadas de ácido glucónico, al inmovilizar glucosa oxidasa (figura 4-15). La tabla 4-7 presenta las eficiencias de inmovilización en términos de recuperación de proteína y de actividad, para los sistemas mixtos, formando combi-CLEAs. Para los dos tipos de agregados, la recuperación de proteína fue estadísticamente equivalente, respecto a las inmovilizaciones individuales de GOx y β-gal. Los rendimientos en términos de actividad, sin embargo, fueron del 3 al 7% más bajos, respecto a los determinados para las enzimas individuales.

Tabla 4-7 Rendimientos de co-inmovilización de β-gal y GOx

	Proteína recuperada (%)*		**Actividad recuperada (%)****	
Enzima	**Combi-CLEA IPA**	**Combi-CLEA Sulfato**	**Combi-CLEA IPA**	**Combi-CLEA Sulfato**
β-gal A. oryzae	83.7	81.7	72.4	40.3
GOx			50.8	26.2
β-gal A. niger	83.1	81.2	65.7	50.3
GOx			52.3	26.9

*Incertidumbre 2.0%. **Incertidumbre 2.5%

4.11 Síntesis de GOS con sistema multienzimático co-inmovilizado

Al confirmar la viabilidad de obtener los agregados enzimáticos mixtos (combi-CLEAs), se prosiguió con la evaluación de su implementación en lactosuero para la síntesis de GOS. Al igual que con el sistema enzimático mixto de enzimas libres, para el sistema co-

inmovilizado se determinó el efecto del uso secuencial y simultáneo de la glucosa oxidasa. En este caso, puesto que el entrecruzamiento de ambas enzimas en conjunto implica que la GOx está presente en el medio desde el inicio de la reacción, la implementación secuencial se consiguió retrasando el suministro de la aireación hasta pasada una hora desde la adición de los agregados al medio. En contraparte, para el uso simultáneo de ambas enzimas, se burbujeó aire al medio desde el inicio.

4.11.1 Perfiles cinéticos de composición del medio

En la figura 4-20 se muestra la evolución de la composición de carbohidratos para los sistemas combi-CLEAs con β-gal de *A. oryzae y A. niger.*

Para los sistemas combi-CLEA IPA de β-gal (*A. oryzae*) y GOx, la conversión de lactosa conseguida tras 5 horas de reacción fue del 65%, un valor similar al consumo determinado en las inmovilizaciones sin la presencia de GOx. Aun así, en comparación con la inmovilización de β-gal individual, el combi-CLEA-IPA destaca por el incremento del rendimiento de GOS en un 36% (91 g_{GOS}/L frente a 125 g_{GOS}/L), una reducción del 30% en la fracción másica de glucosa en el contenido final de carbohidratos (0.20 vs 0.14) y del 33% de la galactosa libre.

Por otra parte, el cambio entre uso secuencial o simultáneo afectó solo la velocidad inicial de producción de GOS. De hecho, durante los primeros 50 minutos los perfiles fueron similares para el uso secuencial y el CLEA-IPA monoenzimático, lo que indica que las diferencias apreciadas efectivamente se dan a partir del momento en que la glucosa empieza a ser oxidada. No obstante, como se presenta en la figura 4-21, la concentración final alcanzada de ácido glucónico para el uso secuencial y simultáneo de GOx en el combi-CLEA fue estadísticamente equivalente en ambos escenarios, lo que acompaña un comportamiento final del perfil de GOS independiente del momento de inicio de la aireación en el medio.

Análogamente, los combi-CLEA-IPA con β-gal de *A. niger* exhibieron una producción acelerada de GOS con el uso simultáneo de GOx, consiguiendo un rendimiento del 30% (120 g_{GOS}/L) llegados los 100 minutos de reacción, pero también generando una degradación posterior de los prebióticos. Al considerar este comportamiento, el uso simultáneo de la GOx permitiría un mayor rendimiento que la aplicación secuencial, con la

condición de detener la reacción pasadas 1.6 horas. De esta forma, no perdería contenido de prebióticos en el medio y se consigue un 15% adicional de GOS, comparado con el máximo alcanzable con el sistema monoenzimático.

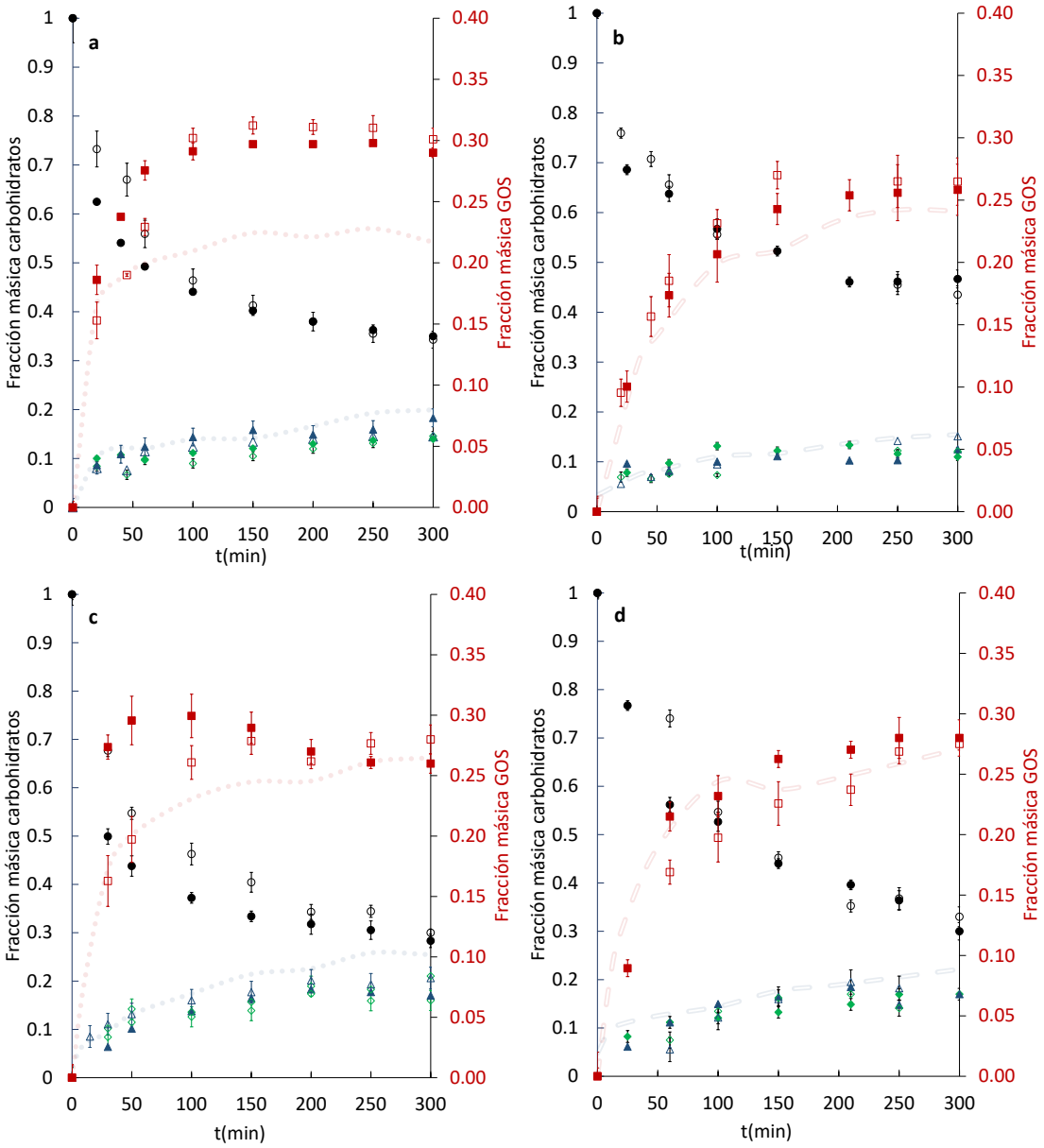


Figura 4-20. Perfiles de composición de carbohidratos en LaS 400 g_{lact}/L, con sistema mixto β-gal y GOx combi-CLEAS. pH 6.0 y aireación a 4 vvm.
Uso secuencial (marcadores sin relleno), y simultáneo (marcadores con relleno) de GOx. β-gal *A. oryzae* - *GOx* (a, b); β-gal *A. niger* - *GOx* (c, d); combiCLEA-IPA (a, c) y combi-CLEA Sulfato (b, d). (●, ○) Lactosa; (▲, Δ) Glucosa; (◆, ◊) Galactosa; (■, □) GOS; (····, ═) Glucosa con CLEA monoenzimática; (····, ═) GOS con CLEA monoenzimática.

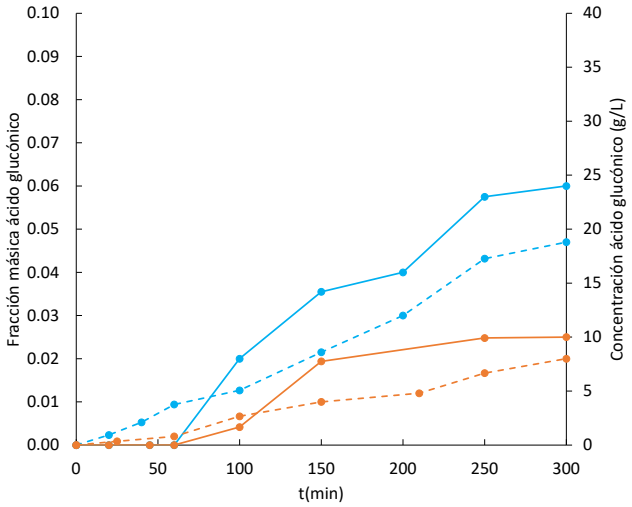


Figura 4-21 Producción promedio de ácido glucónico en lactosuero con Combi-CLEAS. (●) Combi-CLEAs-IPA; (●) combi-CLEAS-Sulfato; en uso secuencial (línea continua) y simultáneo (línea punteada) de GOx a β-gal de *A. oryzae* y *A. niger.* Incertidumbre de fracción másica con base en el contenido de carbohidratos: ±1.5%.

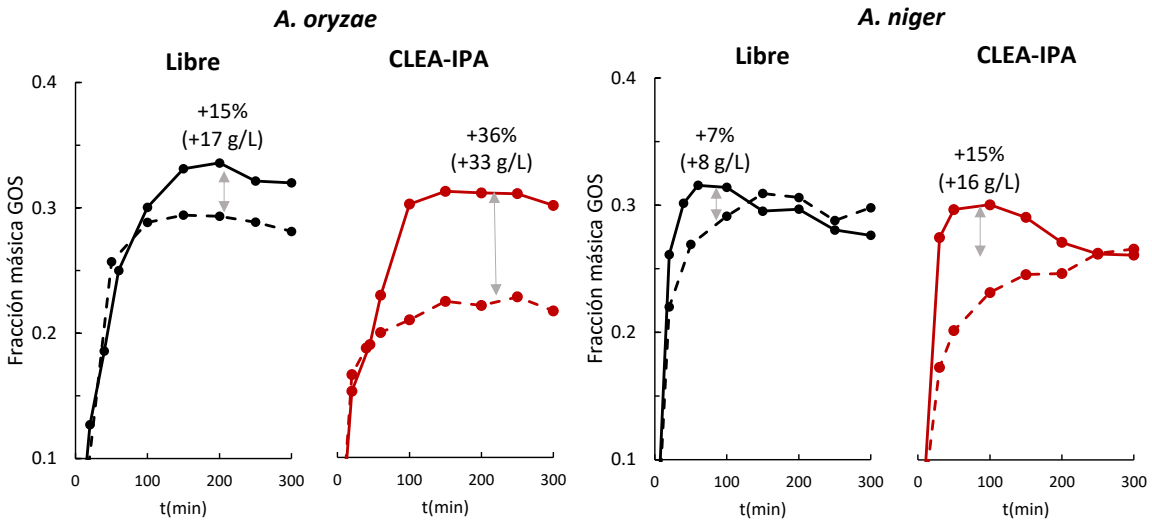


Figura 4-22. Brechas de contenido de GOS entre sistemas monoenzimáticos y multienzimáticos libres e inmovilizados. Fracción del contenido total de carbohidratos. LaS 400 g_{lact}/L, pH 6.0. Líneas punteadas: Sistemas monoenzimáticos. Líneas continuas: Sistemas multienzimáticos. (●) Sistemas Libres. (●) CLEAS-IPA y combi-CLEAS-IPA

De acuerdo con estos resultados, debe señalarse el comportamiento análogo entre las curvas cinéticas de GOS para los sistemas mixtos libres y combi-CLEAs IPA, en relación con los escenarios monoenzimáticos. En este sentido, la figura 4-22 resume en buena

medida los escenarios que, hasta este punto, han sido expuestos en el presente documento.

Para todos los casos de la figura 4-22, el rendimiento de prebióticos se incrementa con la presencia de GOx pero la brecha de ganancia es significativamente mayor con los CLEAS-IPA, comparado con las configuraciones libres. Con esto, se puede deducir que el efecto de la glucosa oxidasa en la concentración de GOS se potencia en dichos agregados.

Para ambas fuentes de β-gal, un análisis similar puede efectuarse a partir de los perfiles obtenidos con combi-CLEAs sulfato (figuras 4-20 b y d). Tras la exposición a sulfato de amonio sobresaturado en la co-inmovilización, una retención de actividad de la GOx significativamente menor condujo a una producción de ácido glucónico pequeña (10 g/L, figura 4-21), reduciendo la concentración de glucosa en 10%, con un incremento del 8% y 3% en el rendimiento de GOS, para β-gal de *A. oryzae* y *A. niger*, respectivamente. En este sentido, los entrecruzamientos pretratados con sulfato tienen una limitada viabilidad, dado que el protocolo y costo acarreado en la co-inmovilización no se refleja en el incremento del producto que se obtendría en la ausencia de GOx.

4.11.2 Indicadores para la síntesis de GOS

A partir de estos resultados, en la figura 4-23 se resumen los parámetros de seguimiento para el desempeño de los sistemas co-inmovilizados. Aunque en este caso el cambio entre el uso secuencial y simultáneo de GOx no generó variaciones estadísticamente significativas en la selectividad global, reducir el tiempo de aireación podría disminuir costos de operación con β-gal de *A. oryzae*, en tanto con β-gal de *A. niger* pese a no haber un efecto en los indicadores globales, el uso simultáneo aumenta el pico de concentración máxima de prebióticos en los primeros 100 minutos (figura 4-20 c).

En cuanto al efecto de los sistemas co-inmovilizados sobre la productividad, para ambas β-gal el uso de combi-CLEAs IPA condujo a incrementos en la velocidad de producción de GOS respecto a los sistemas monoenzimáticos. En contraste, el pretratamiento con sulfato generó cambios poco relevantes de rendimiento, productividad y selectividad, confirmando su menor viabilidad. De nuevo, se deduce que el uso de combi-CLEAs-IPA con β-gal de *A. oryzae* representa el mejor escenario, en comparación con la inmovilización individual de la β-gal y los sistemas mixtos con β-gal de *A. niger*, que se beneficia de la adición de la oxido-reductasa en una forma más discreta.

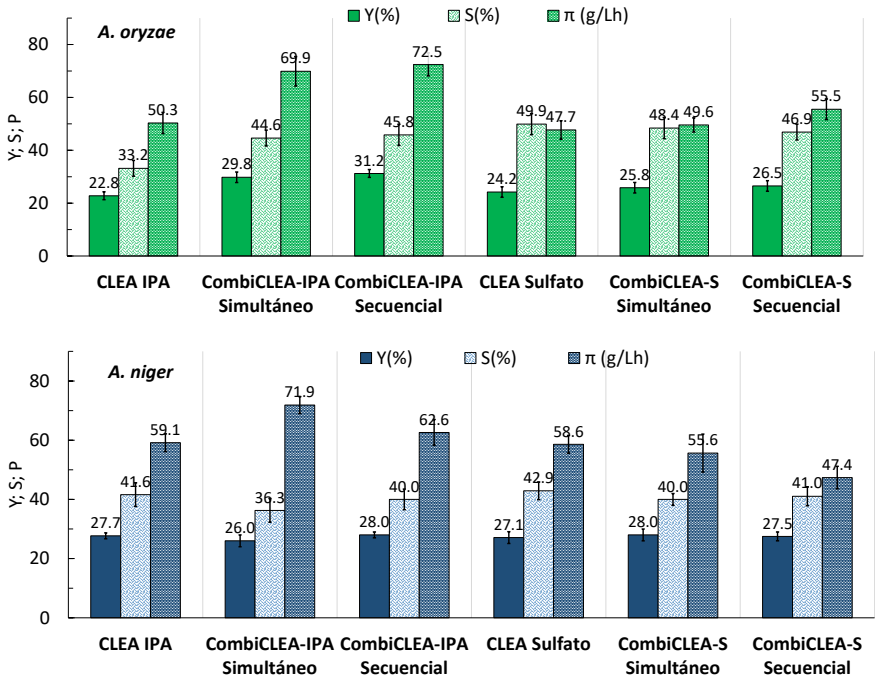


Figura 4-23 Indicadores de seguimiento de reacción para sistemas co-inmovilizados. Rendimientos y selectividades globales. Productividad pasados 100 minutos de reacción.

Para comparar el desempeño de cada sistema mixto con el avance de la reacción, la figura 4-24 muestra los cambios en la distribución de GOS (DP) y la selectividad, al avanzar la conversión del sustrato. A partir de esta, se observa la ventaja significativa del sistema combi-CLEA-IPA con β-gal de *A. oryzae* y GOx, pues durante casi todo el ciclo de reacción el consumo de lactosa para la producción fue selectiva hacia GOS, manteniendo este indicador sobre el 50%. Por el contrario, el aprovechamiento del sustrato es menos eficiente con los sistemas β-gal *A. niger*- GOx.

En cuanto al tamaño de las cadenas de GOS para la distribución de DP con β-gal de *A. oryzae*, la adición de GOx no modificó significativamente el contenido de trisacáridos ni de cadenas superiores. En cambio, para los sistemas mixtos con β-gal *A. niger*, el perfil se enriqueció en trisacáridos, en detrimento de oligómeros DP4 y DP5. A su vez, los sistemas pretratados con sulfato exhibieron cadenas más cortas que los agregados en contacto con isopropanol, tal como ocurrió con los sistemas monoenzimáticos.

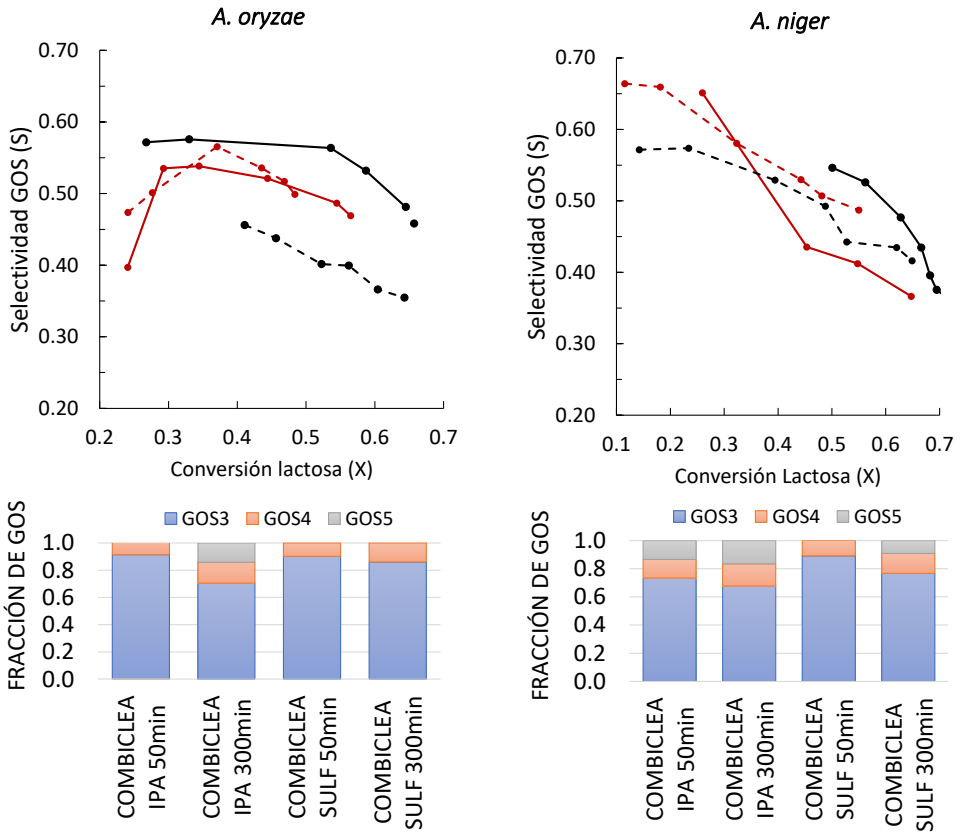


Figura 4-24 Selectividad para sistemas co-inmovilizados en función de la conversión de lactosa; distribución de DP.
LaS, pH 6.0 y 4 vvm. Líneas punteadas: Sistemas monoenzimáticos. Líneas continuas: Sistemas multienzimáticos. (●) CLEAs-IPA y combi-CLEAs-IPA; (●) CLEAs-Sulfato y combi-CLEAs-Sulfato.

4.11.3 Efecto de la variación de la relación β-gal:GOx

Al igual que en el sistema mixto de enzimas libres, para los sistemas combiCLEAs-IPA se comparó el desempeño de la capacidad transgalactosiladora y por tanto la acumulación de prebióticos, al duplicar la relación de unidades catalíticas de GOx, respecto a la β-gal (Figura 4-25). Los resultados, no obstante, permiten demostrar que esta adición no tiene un impacto significativo en el rendimiento de GOS, respecto al sistema mixto con relación 1:1.

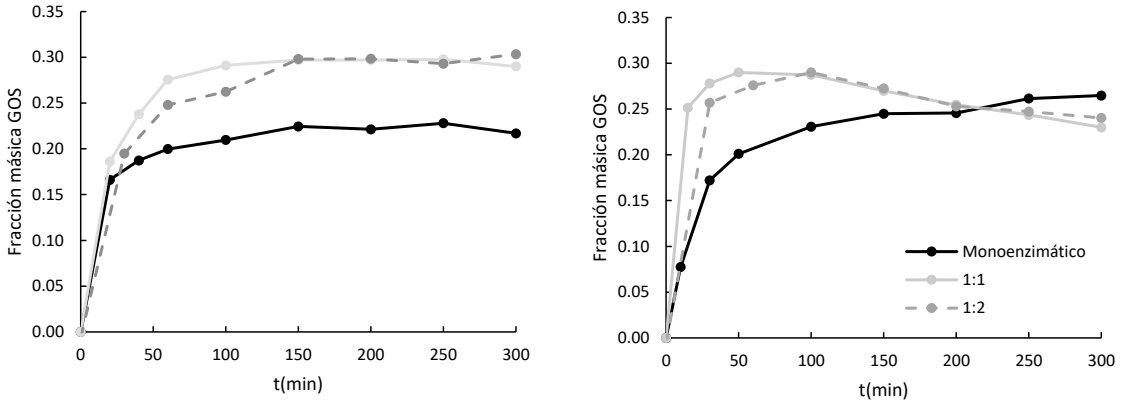


Figura 4-25 Acumulación de GOS en lactosuero, para sistemas co-inmovilizados combi-CLEAS-IPA, con variación en la relación β-gal: GOx.
LaS pH 6.0, 4 vvm. β-gal (*A. oryzae)*-GOx (izquierda); β-gal (*A. niger)*-GOx (derecha).

4.11.4 Comparación de combi-CLEAS con dos CLEAs independientes

Todos los sistemas multienzimáticos previamente mencionados se evaluaron también con la inmovilización individual de cada tipo de enzima (β-gal y GOx), mezclándolas posteriormente en el medio de reacción (véase figura 3-4). En ambos escenarios se obtuvieron resultados equivalentes a los mostrados en la figura 4-20 (ANEXO F). Por lo tanto, puede afirmarse que el efecto sobre los perfiles proviene esencialmente de la inmovilización en sí, y no de la cercanía en la distribución espacial de las enzimas en agregados mixtos, o de un control de la concentración local de glucosa, ejercida por la GOx.

4.12 Uso de sistemas co-inmovilizados en ciclos repetidos

A partir de los resultados obtenidos para los sistemas co-inmovilizados, se definió evaluar el uso de combi-CLEAs-IPA para cada sistema β-gal-GOX (*A. oryzae* y *A. niger*) en 20 ciclos repetidos de reacción, con el fin de determinar la estabilidad de los catalizadores en el tiempo, según el rendimiento final de GOS observado tras cada ciclo de 5 horas. Este estudio se hizo para sistemas con relación 1:1 y 1:2 de β-gal:GOx y, al igual que para la fase inicial de enzimas libres, se consideró el efecto de la relación E/S, en este caso sobre la pérdida gradual de rendimiento en el sistema.

De acuerdo con los incrementos de productividad y los perfiles de GOS en la figura 4-22, el tiempo de reacción podría ser más corto dado que la concentración máxima de prebióticos se alcanza en torno a los 100 minutos (respecto a las 5 horas requeridas para los sistemas monoenzimáticos). No obstante, en esta fase se emplearon ciclos de cinco horas, para hacer una comparación justa con las condiciones evaluadas en las etapas anteriores. Debido a la poca diferencia entre el sistema monoenzimático y bi-enzimático para CLEAS sulfato, dicha co-inmovilización no se estudió en esta parte del trabajo.

Al compararlos con los CLEAs-IPA monoenzimáticos (véase figura 4-11), los sistemas combi-CLEAs-IPA presentaron una menor estabilidad en el tiempo, como se detalla en la figura 4-26. En ésta se observa que, respecto al rendimiento en el primer uso de los sistemas mixtos (figura 4-23), la concentración de GOS se aleja gradualmente de los valores esperados para catalizadores que conservaran perfectamente su actividad (líneas continuas de la figura 4-26). Así, ciclo tras ciclo, los rendimientos de los sistemas multienzimáticos co-inmovilizados tienden a los valores de los CLEAS-IPA monoenzimáticos (líneas punteadas) y en las últimas reutilizaciones, la producción de prebióticos es incluso inferior a la configuración de β-gal individual. En consecuencia, para la co-inmovilización de GOx con β-gal de *A. oryzae* tras 20 ciclos de reacción se conservó el 60% y 43% del rendimiento de GOS inicial (E/S de 0.39% y 0.25%, respectivamente). En el caso de β-gal de *A. niger*, el contenido de GOS en el ciclo 20 descendió al 41% (E/S 0.39%) y el 75% (E/S 0.25%) del valor alcanzado en el primer uso de cada agregado.

Análogamente, en la figura 4-27 se ejemplifica que, para β-gal de *A. oryzae,* la disminución en la producción de GOS es más pronunciada ciclo tras ciclo al incrementar la proporción de GOx en los co-agregados. De hecho, en el décimo uso estos catalizadores mixtos – (1:2) perdieron entre el 23 y 30% del rendimiento de prebióticos, mientras el mismo sistema con proporción 1:1 (figura 4-26 a) tuvo una disminución del contenido final de GOS de solo 6 a 13%.

Para todos los escenarios mencionados, la pérdida de actividad con el tiempo se acompañó de una recuperación visiblemente menor de los CLEAS en cada ciclo, implicando la degradación física de estos agregados. Tal comportamiento no se observó en los CLEAS monoenzimáticos de β-gal (ver figura 4-11), lo que permitió su uso sin cambios significativos en 20 ciclos.

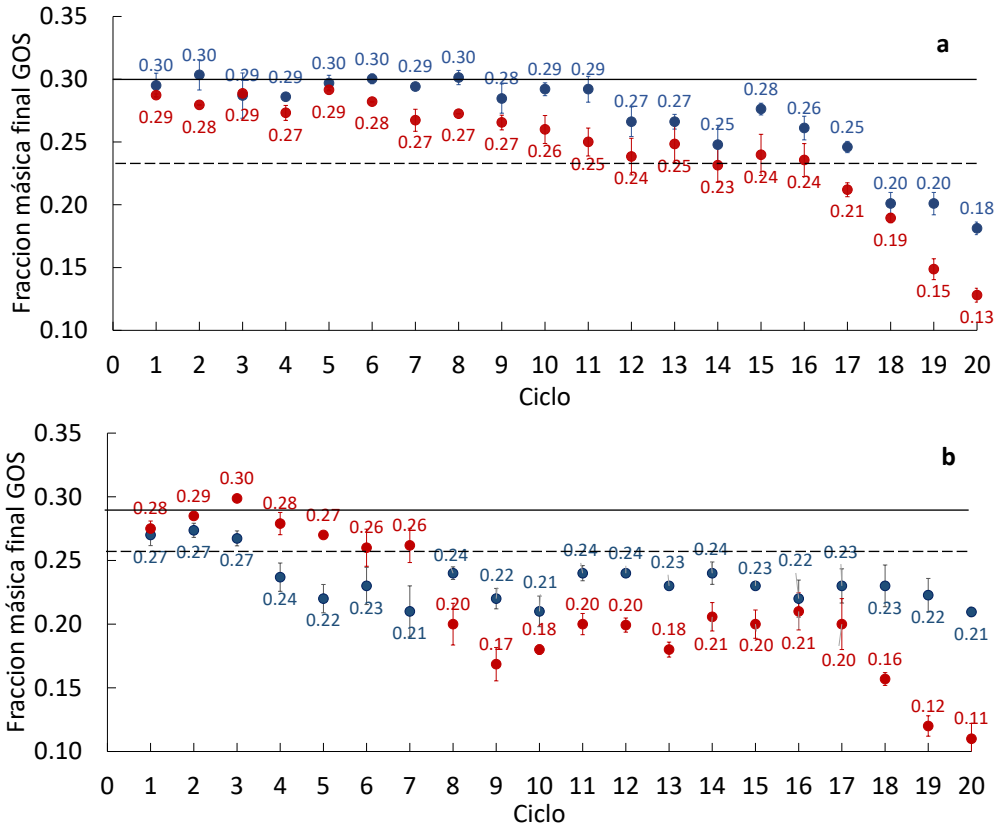


Figura 4-26 Concentración de GOS en ciclos repetidos de sistemas mixtos combi-CLEAs IPA de β-gal-GOx, en relación 1:1; LaS pH 6.0, 4 vvm. β-gal *A. oryzae* (a) y *A. niger* (b). (●) E/S 0.25% (220U/g*lact*); (●) 0.39% (340U/g_{lact}). Líneas de rendimiento en un solo ciclo con CLEA-IPA (punteada) y combi-CLEA ideal, sin degradación (continua).

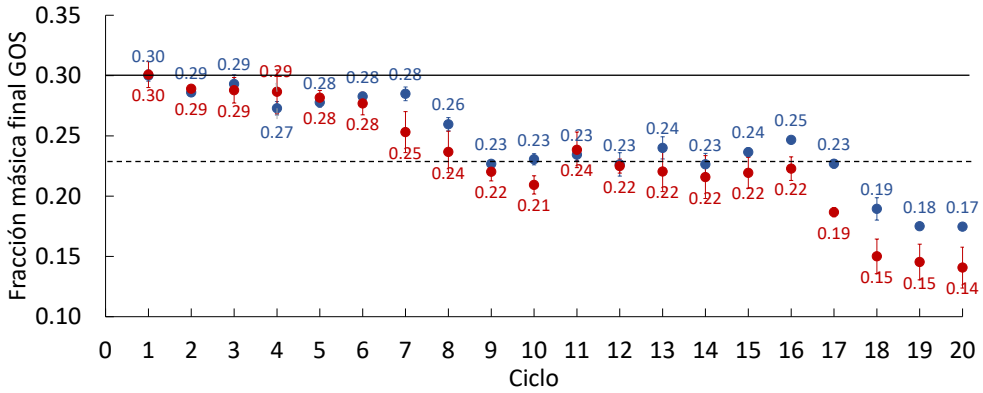


Figura 4-27 Rendimiento de GOS en ciclos repetidos de sistemas mixtos combi-CLEAs IPA β-gal *A. oryzae*- GOx, en relación 1:2.
LaS pH 6.0, uso secuencial. (●) E/S 0.25%; (●) E/S 0.39%. Líneas de rendimiento en un solo ciclo con CLEA-IPA (punteada) y combi-CLEA ideal, sin degradación (continua).

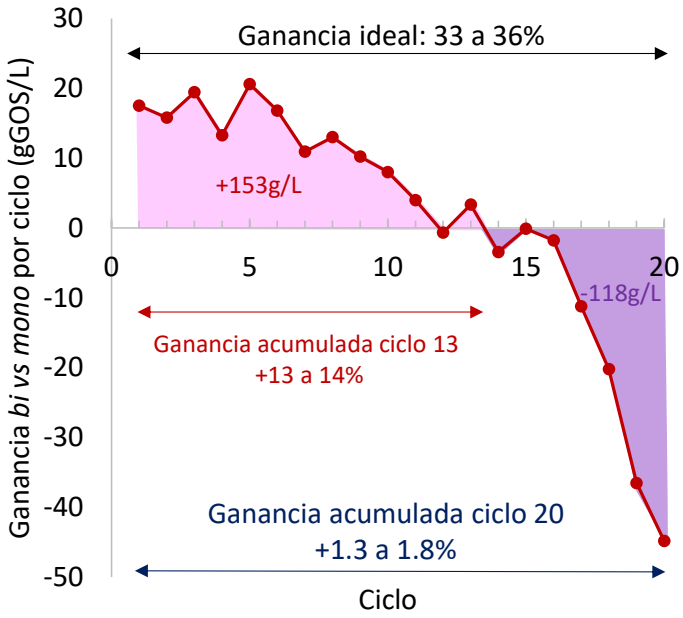


Figura 4-28 Ganancia acumulada en el contenido de GOS con el sistema combi-CLEA-IPA (β-gal *A. oryzae* + GOx), en comparación con CLEA-IPA (β-gal *A. oryzae*)

Al respecto, la figura 4-28 muestra que debido a esta pérdida progresiva de actividad, la ganancia de concentración acumulada de GOS (que idealmente debía ser de 36%) se reduce a apenas un 1.8%, pasados 20 ciclos de reacción. No obstante, el sistema mixto generaría 153 g de GOS adicionales por cada litro de medio, acumulados en los primeros 13 ciclos. Entonces, sumado a la producción de ácido glucónico como beneficio adicional, este puede considerarse un nuevo punto de partida para análisis futuros del efecto económico en dos escenarios: (1) evaluando solo 13 ciclos de reacción o (2) considerando 20 ciclos, como se hizo a lo largo de este estudio.

Profundizando en el origen de la inestabilidad de los agregados mixtos, puede afirmarse que ésta fue conferida por la presencia de la GOx entrecruzada. En este sentido, en la figura 4-29 se exhibe que para la inmovilización individual de GOx en CLEAs-IPA, cuando pasaron diez ciclos, se perdió entre 70 y 80% de la actividad expresada inicialmente. Tal fenómeno se acompañó por una reducción visible de la cantidad de agregados recuperados tras cada centrifugación y el aumento del contenido de proteína en el seno del fluido, indicando la disgregación y liberación de la oxido-reductasa. Entonces, el protocolo de entrecruzamiento es más efectivo en el tiempo con las β-gal independientes, comparado con la GOx y los sistemas mixtos; en éstos últimos, como se hizo explícito,

existen ganancias iniciales en la producción de prebióticos que no obstante son de alcance limitado por la inestabilidad misma de los catalizadores en conjunto.

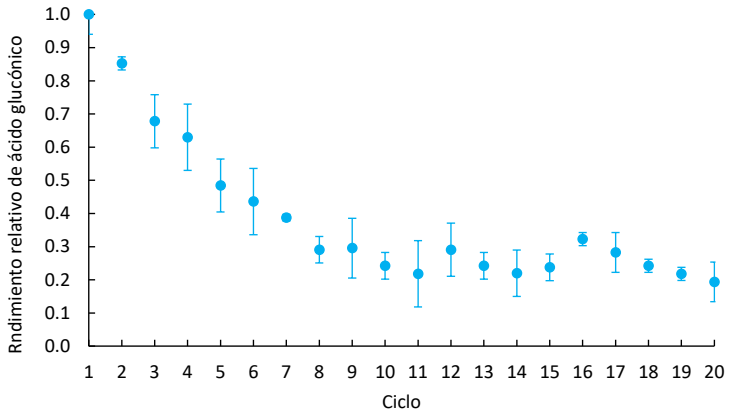


Figura 4-29 Rendimiento de ácido glucónico en ciclos con GOx en CLEAs-IPA. Glucosa 50 g/L, pH 6.0

Considerando esta pérdida progresiva de rendimiento de GOS, en la figura 4-30 se muestra la producción de GOS acumulada en 20 ciclos de reacción, para los sistemas combi-CLEAs IPA de β-gal (*A. oryzae*). Puede evidenciarse que, pasados 20 ciclos, los sistemas con mayor contenido de GOx tienen un comportamiento equivalente o inferior al sistema monoenzimático, por lo que no es recomendable su implementación al seguir los protocolos de inmovilización del presente estudio.

Para los sistemas mixtos con relación de enzimas 1:1, si bien la producción en los primeros ciclos supera a la configuración monoenzimática, la pérdida gradual de rendimiento hace que a la menor relación E/S, la producción neta acumulada de GOS sea equivalente a la de un sistema monoenzimático (ganancia del 1.8%). No obstante, para conseguir que el desempeño del sistema combi-CLEA sea superior al de la β-gal individualmente inmovilizada, las unidades añadidas al medio debieron incrementarse (E/S 0.39%), logrando una producción acumulada incrementada en un 11%.

Aun así, para este mayor contenido de enzimas sería necesario evaluar ciclos adicionales para encontrar el número de usos con los que el comportamiento se hace equivalente al sistema monoenzimático, o si éste último también exhibe degradaciones posteriores.

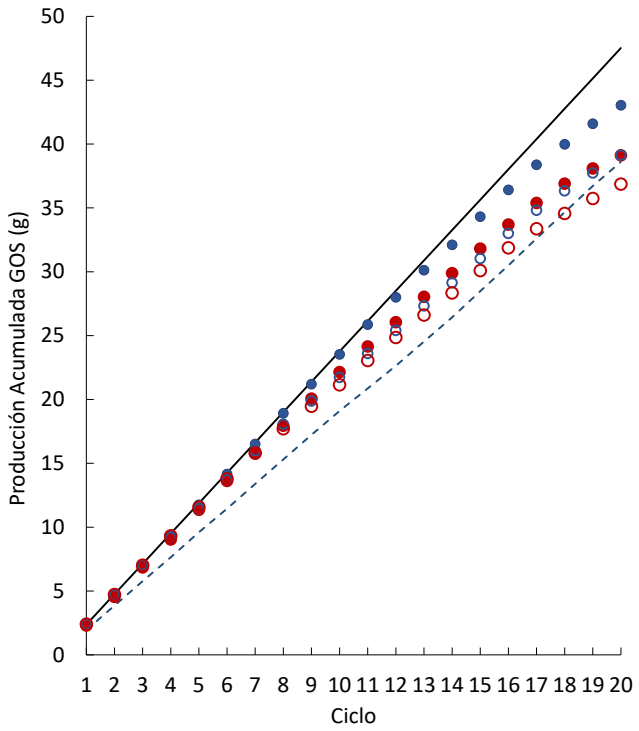


Figura 4-30 Producción másica acumulada de GOS en LaS, a escala de 20 mL. Combi-CLEAs IPA β-gal (*A. oryzae)* - Gox, en relación 1:1 (marcadores rellenos) y 1:2 (marcadores sin relleno); (●) E/S 0.25%; (●) 0.39%. Línea continua: Combi-CLEAs-IPA teórica sin pérdida de actividad. Línea punteada: CLEAS-IPA monoenzimática β-gal.

Finalmente, la disparidad en la preservación de la actividad de β-gal y GOx y la restringida integridad física de los agregados ejemplifica uno de los retos más prevalentes en los sistemas enzimáticos co-inmovilizados. Idealmente, se buscaría que todas las enzimas presentes pierdan actividad a una tasa similar, de forma que en su reemplazo se esté aprovechando al máximo cada biocatalizador presente, sin perder otras enzimas que aún se encuentren activas, por inactivación o liberación en el seno del fluido (Arana-Peña et al., 2021). Como se observó, este no es el caso del sistema estudiado, por lo cual se puede continuar en la mejora del método de inmovilización o la exploración de otras alternativas de co-inmovilización o inmovilización independiente de la β-gal y GOx.

Entonces, tanto los escenarios evaluados en este trabajo como otros métodos alternativos, deberán analizarse a la luz de los potenciales costos y beneficios económicos, de modo que se entienda con mayor certeza el impacto de las mejoras observadas y su efecto global.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Comparadas con las enzimas libres, las β-gal inmovilizadas mediante todas las técnicas empleadas redujeron la sensibilidad del contenido de prebióticos frente a variaciones de pH, disminuyeron la velocidad de consumo de lactosa, el rendimiento de GOS y de monosacáridos en el medio de reacción.

Entre las técnicas de inmovilización evaluadas, las CLEAS-IPA generaron mejores resultados en cuanto permitieron preservar la mayor actividad de ambas β-galactosidasas y de la glucosa oxidasa. Para los sistemas monoenzimáticos, con los CLEAS-Sulfato se obtuvieron rendimientos de GOS equivalentes a los de los sistemas CLEAS-IPA, con mayor selectividad, pero a costa de una menor productividad. No obstante, el contacto con el sulfato de amonio redujo significativamente la actividad catalítica de la glucosa oxidasa.

El atrapamiento de β-gal en alginato de calcio aumentó la selectividad y redujo la velocidad de producción de GOS. Sin embargo, la degradación progresiva de las esferas en lactosuero y la inestabilidad del biopolímero en presencia de ácido glucónico, limitó su uso en múltiples ciclos de reacción, tanto para las β-gal como GOx.

En los sistemas multienzimáticos libres como co-inmovilizados, la presencia de glucosa oxidasa incrementó el rendimiento de GOS, con efectos más significativos en los combi-CLEAs IPA. Respecto a las inmovilizaciones monoenzimáticas, el uso conjunto de la β-gal de *A. oryzae* y la GOx en combi-CLEAS aumentó el contenido de prebióticos en un 36% (consiguiendo 125 g/L), en tanto el sistema mixto con *A. niger* generó un 15% adicional en un tiempo menor. En comparación, los sistemas mixtos co-inmovilizados pretratados con sulfato no mejoraron significativamente el rendimiento de prebióticos.

Para las configuraciones evaluadas, el desempeño de los sistemas mixtos con β-gal de *A. oryzae* fue superior a aquellos con la enzima de *A. niger*. Esto puede estar asociado a las

diferencias observadas en la actividad específica y disimilitudes estructurales entre los dos catalizadores, por su origen biológico.

Tanto para los sistemas libres mixtos como combi-CLEAS-IPA, el uso secuencial o simultáneo de GOx sólo afectó la velocidad inicial de producción de GOS, pero no el rendimiento final de prebióticos. Además, el uso secuencial permitió incrementar la concentración final de ácido glucónico y disminuir el contenido de glucosa en el medio.

En general, los métodos de inmovilización generaron una reducción en el grado de polimerización (DP), aumentando el contenido de trisacáridos y reduciendo el de GOS DP4 y DP5. Para enzimas libres, la presencia de glucosa oxidasa, se relacionó con la síntesis de cadenas más cortas. Para sistemas co-inmovilizados los combi-CLEAS-IPA preservaron oligómeros de mayor tamaño y los combi-CLEAS-Sulfato fueron más selectivos a trisacáridos.

Los CLEAS de β-gal inmovilizadas individualmente, pretratados con IPA o con sulfato, permitieron el uso estable de los catalizadores por 20 ciclos repetidos, a diferencia de las esferas de alginato que solo se pudieron recuperar por 11 ciclos.

Pese a que el rendimiento de combi-CLEAs-IPA en los primeros usos (13 de 20) fue superior al de los sistemas mono-enzimáticos, éstos mostraron una degradación progresiva de la capacidad de producción de GOS. Dicha inestabilidad fue conferida por la presencia de GOx en los agregados. No obstante, el sistema mixto generó 153 g de GOS adicionales por cada litro de medio durante los primeros 13 ciclos; sumado a esto, la producción paralela de ácido glucónico contribuye a incrementar el valor agregado del producto final generado.

5.2 Recomendaciones

En el presente estudio, no se observó la presencia de glutaraldehído libre por medio del análisis cromatográfico de las muestras; sin embargo, debido a que la inmovilización y co-inmovilización de las enzimas evaluadas se destina a la producción de compuestos para el consumo humano, se recomienda hacer una verificación del contenido de glutaraldehído en la fase líquida, para confirmar que no se libera en concentraciones superiores al límite de exposición recomendada.

Futuras investigaciones podrían considerar reducir la proporción de glucosa oxidasa en los agregados enzimáticos con el fin de determinar si esto incide en los rendimientos y, sobre todo, la estabilidad de los combi-CLEAs para su uso en ciclos repetidos.

Realizar modificaciones sobre el alginato para mejorar su estabilidad, cambiando la concentración y tipo de agente gelificante, el tiempo de gelificación y la carga enzimática en las esferas.

Evaluar menores tiempos de reacción, para aumentar la vida útil de los catalizadores.

Determinar el efecto de la adición de glucosa oxidasa libre a los agregados monoenzimáticos, de manera que se puede aumentar el rendimiento en cada ciclo repetido y recuperar la beta galactosidasa, dada su alta estabilidad en el tiempo. Esto, además, implica un análisis económico para determinar la viabilidad de esta configuración.

Evaluar el sistema usando CLEAs individuales para la β-gal, teniendo en cuenta diferentes configuraciones para la GOx. Ésta se podría inmovilizar en forma independiente en otros agregados, buscando condiciones de entrecruzamiento (e.g. agente precipitante, tiempo de entrecruzamiento, agente entrecruzante), que mejoren la estabilidad de la GOx en el tiempo.

Potencialmente, se podrían considerar otros métodos de inmovilización para dicha enzima, comparando los efectos económicos de las propuestas presentadas en este estudio y sus potenciales mejoras. Esta evaluación también se puede enfocar en la co-inmovilización misma, buscando condiciones que simultáneamente retengan la mayor actividad de ambas enzimas y aumenten la estabilidad en el tiempo.

Anexos

A. Ficha Técnica de Lactosuero

MLEKOVITA

Lider Polskiego Mleczarstwa*

100% POLSKIEGO KAPITAŁU

CERTYFICATE OF ANALYSIS

This is to certify that the product specified below, complies with the following specification:

DESCRIPION OF GOODS: Whey Permeate Powder 25kg

NET/GROSS WEIGHT: 22.500KGS NET/ 22.860,00KG GROSS

CONSIGNOR: Spółdzielnia Mleczarska Mlekovita
18-200 Wysokie Mazowieckie, ul. Ludowa 122

CONSIGNEE: INGREDIENTES Y PRODUCTOS FUNCIONALES SAS

NIT. 811.006.722-9, Cra. 42 No 75 - 277

Itagui – Antioquia – Postal code 055411; Colombia

COUNTRY OF DESTINATION : COLOMBIA

CHEMICAL CHARACTERISTIC:

MILK FAT :	MAX.1%
MOISTURE:	MAX.4,0%
LACTOSE	MIN. 68%
PROTEIN	MAX. 5%

PHYSICAL CHARACTERISTIC:

SOLUBILITY INEX	MAX. 1,20 ML
SCHPRCHED PARTICLES	DISC A

BACTEROLOGIGL CHARACTERISTIC:

COLIFORM IN 0,1 G	ABSENT
SALMONELA IN 25 G	ABSENT
BACERIAL COUNT	MAX.1/G

PL 20131601 WE

SPÓŁDZIELNIA MLECZARSKA "MLEKOVITA" 18-200 Wysokie Mazowieckie ul. Ludowa 122 LABORATORIUM KONTROLI JAKOŚCI QUALITY DEPARTMENT

MANUFACTURER: Spółdzielnia Mleczarska Mlekovita,
18-200 Wysokie Mazowieckie, ul. Ludowa 122, POLAND

FACTORY CODE: PL 20131601 WE

CONTAINER NO: GESU6384720

WYSOKIE MAZOWIECKIE,.2020.12.27

ANEXO B. FICHAS TÉCNICAS DE ENZIMAS

B-1. β-gal de *A. niger*.

Megazyme

β-GALACTOSIDASE from *Aspergillus niger* (Lot 140801a)

E-BGLAN
(EC 3.2.1.23) beta-D-galactoside galactohydrolase
CAZy GH Family 35

PROPERTIES

1. **ELECTROPHORETIC PURITY:**
   - Single band on isoelectric focusing.

2. **SPECIFIC ACTIVITY AND LEVEL OF OTHER ACTIVITIES:**

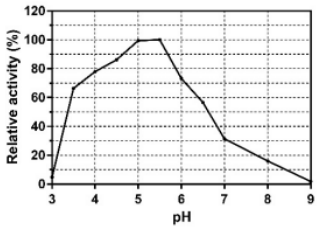
Substrate	Specific Activity (U/mg Protein)
p-NP-β-galactoside	240.0
p-NP-α-galactoside	0.0002
p-NP-α-L-arabinofuranoside	0.50
p-NP-α-L-arabinopyranoside	0.17
p-NP-α-glucoside	0.006
p-NP-β-glucoside	0.001
p-NP-β-xyloside	0.02
p-NP-β-mannoside	0.002
Ceralpha (α-amylase)	0.008
Sucrose (invertase)	0.006
Maltose (maltase)	0.008

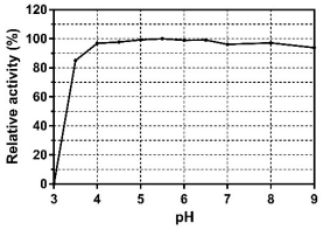
Protein concentration was determined by absorbance at 280 nm.

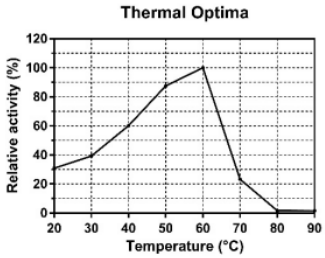
3. **PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES:**

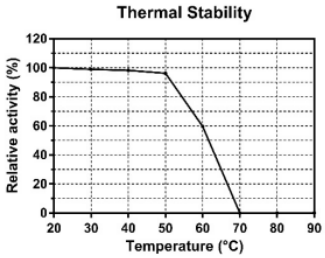
pH Optima:	4.5
pH Stability:	3.0-8.0
Temperature Optima:	60°C
Temperature Stability:	< 70°C

4. **STORAGE CONDITIONS:**
   The enzyme is supplied as an ammonium sulphate suspension in 0.02% sodium azide and should be stored at 4°C.









B-2. β-gal de *A. oryzae*

SPECIFICATION SHEET I.U.B. 3.2.1.1

DESCRIPTION
Is a B-galactosidase produced by the controlled fermentation of a Non-GMO strain of Aspergillus oryzae. The lactose hydrolyzes the B-1,4-glycosidic bonds in lactose; releasing an equal molar mixture of glucose and galactose. The food grade powder contains no chemical preservatives.

PHYSICAL PROPERTIES
An off white to light tan colored, free-flowing powder, soluble in water, free of offensive odor and taste. Particle size is -140 mesh (105 microns, .105mm), 81%.

ENZYMATIC PROPERTIES
The pH optimum is 4.0 to 5.0 with a stability range of 4.0 to 7.5. The optimum temperature is 55ºC with a stability range from 30ºC to 55ºC.

ACTIVITY
One FCC Lactase Unit (ALU) is defined as the quality of enzyme that will liberate one micromole of o-nitrophenol per minute at 37º C and a pH of 4.5. It is based on a 15 minute hydrolysis of an o-nitrophenol-beta-D-galactopyranoside substrate. The acceptance criteria for all enzyme assays is: NLT 85.0% and NMT 115.0% of the declared units of enzyme activity.*

COUNTRY OF ORIGIN USA

STORAGE/SHELF LIFE/STANDARD PACK SIZE
Product is stable for two years (24 months) if stored at or below 10ºC in sealed poly bags in boxes or drums away from sunlight and high humidity. Product is packed in 25 kilo fiber drums or double-wall boxes.

HANDLING PRECAUTIONS
Avoid the formation of aerosol and dust of the product. Repeated inhalation of enzyme aerosol or dust may cause allergic type reactions in sensitized individuals. For detailed information please refer to the SDS.

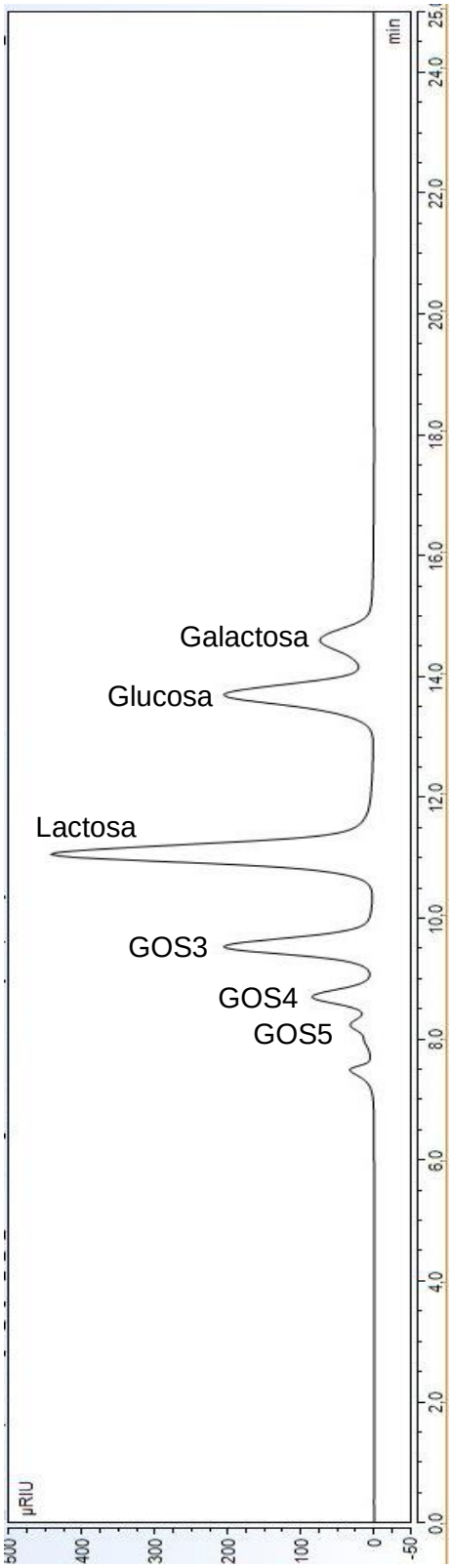
Description	Specification	Method
Activity:	NLT 100,000 ALU/GM	FCC
Identity:	Lactase Fungal	FTIR
Moisture:	NMT 10%	Ohaus MB-45
Metals:		
Lead	NMT 5 ppm	SW-846 6020
Microbiological Data:		
TPC	<10,000 CFU/g	Soleris / AOAC 990.12
E.coli	Negative/10g	Soleris / AOAC 991.14
Entero	<100 CFU/g	AOAC 2003.01
Salmonella**	Negative/25g	BAM Ch. 5 / AOAC 2011.03
Yeast	<1,000 CFU/g	Soleris / AOAC 997.02
Mold	<1,000 CFU/g	Soleris / AOAC 997.02
Coliforms	<100 CFU/g	Soleris / AOAC 991.14

B-3 Glucosa oxidasa de *A. oryzae*

Gluzyme® Mono 10000 BG

Valid from	**2011-01-31**
Product Characteristics:	
Declared enzyme	Glucose oxidase
Declared activity	10000 GODU/g
Colour	Yellow to light brown Colour can vary from batch to batch. Colour intensity is not an indication of enzyme activity.
Physical form	Granulate
Particle size	Approx. 50-212 microns
Diluents	Wheat flour
Stabilisers	Sodium chloride
	This product is standardized by Documented Addition in a process controlled by Novozymes ISO 9001 quality system. See Documented Addition Info Sheet for further information.
Solubility	Active component is readily soluble in water at all concentrations that occur in normal usage. Standardisation components can cause turbidity in solution.
Production organism	Aspergillus oryzae
Production method	Produced by submerged fermentation of a genetically modified micro organism. The enzyme protein, which in itself is not genetically modified, is separated and purified from the production organism.

ANEXO C. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE SÍNTESIS DE GOS EN LACTOSUERO



ANEXO D. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

D-1. SISTEMA MONOENZIMÁTICO LIBRE

ANOVA RENDIMIENTO GOS

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		28,875	0,204	141,46	0,000	
Enzima	-0,550	-0,275	0,204	-1,35	0,197	1,00
E/S	1,050	0,525	0,204	2,57	0,020	1,00
pH	4,300	2,150	0,204	10,53	0,000	1,00
Enzima*E/S	-1,050	-0,525	0,204	-2,57	0,020	1,00
Enzima*pH	-0,200	-0,100	0,204	-0,49	0,631	1,00
E/S*pH	0,700	0,350	0,204	1,71	0,106	1,00
Enzima*E/S*pH	-1,200	-0,600	0,204	-2,94	0,010	1,00

R-cuadrado
89,60%

ANOVA SELECTIVIDAD MÁXIMA GOS

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		48,663	0,816	59,60	0,000	
Enzima	2,525	1,263	0,816	1,55	0,142	1,00
E/S	-2,425	-1,213	0,816	-1,49	0,157	1,00
pH	13,475	6,737	0,816	8,25	0,000	1,00
Enzima*E/S	0,875	0,438	0,816	0,54	0,599	1,00
Enzima*pH	1,975	0,987	0,816	1,21	0,244	1,00
E/S*pH	0,825	0,412	0,816	0,51	0,620	1,00
Enzima*E/S*pH	0,625	0,312	0,816	0,38	0,707	1,00

R-cuadrado
82,39%

D-2. SISTEMA MONOENZIMÁTICO INMOVILIZADO

ANOVA RENDIMIENTO GOS

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	15	365,323	24,355	24,35	0,000
Lineal	5	297,414	59,483	59,48	0,000
ENZIMA	1	31,202	31,202	31,20	0,000
PH	1	43,892	43,892	43,89	0,000
METODO	3	222,321	74,107	74,11	0,000
Interacciones de 2 términos	7	61,348	8,764	8,76	0,000
ENZIMA*PH	1	3,467	3,467	3,47	0,072
ENZIMA*METODO	3	37,536	12,512	12,51	0,000
PH*METODO	3	20,346	6,782	6,78	0,001
Interacciones de 3 términos	3	6,561	2,187	2,19	0,109
ENZIMA*PH*METODO	3	6,561	2,187	2,19	0,109
Error	32	32,000	1,000		
Total	47	397,323			

R-cuadrado
91,95%

ANOVA SELECTIVIDAD GOS

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	15	4157,1	277,14	17,32	0,000
Lineal	5	2993,5	598,69	37,42	0,000
ENZIMA	1	198,0	198,05	12,38	0,001
PH	1	1191,0	1191,02	74,44	0,000
METODO	3	1604,4	534,80	33,42	0,000
Interacciones de 2 términos	7	844,3	120,61	7,54	0,000
ENZIMA*PH	1	307,5	307,55	19,22	0,000
ENZIMA*METODO	3	286,8	95,61	5,98	0,002
PH*METODO	3	249,9	83,31	5,21	0,005
Interacciones de 3 términos	3	319,3	106,45	6,65	0,001
ENZIMA*PH*METODO	3	319,3	106,45	6,65	0,001
Error	32	512,0	16,00		
Total	47	4669,1			

R-cuadrado
89,03%

D-3. SISTEMA MULTIENZIMÁTICO LIBRE

ANOVA RENDIMIENTO GOS

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	20,6025	6,8675	6,87	0,013
Lineal	2	20,4150	10,2075	10,21	0,006
ORIGEN β-gal	1	19,5075	19,5075	19,51	0,002
Uso sim-sec	1	0,9075	0,9075	0,91	0,369
Interacciones de 2 términos	1	0,1875	0,1875	0,19	0,676
ORIGEN β-gal*Uso sim-sec	1	0,1875	0,1875	0,19	0,676
Error	8	8,0000	1,0000		
Total	11	28,6025			

ANOVA SELECTIVIDAD GOS

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	166,76	55,59	3,47	0,071
Lineal	2	144,07	72,04	4,50	0,049
ORIGEN β-gal	1	132,67	132,67	8,29	0,021
Uso sim-sec	1	11,41	11,41	0,71	0,423
Interacciones de 2 términos	1	22,69	22,69	1,42	0,268
ORIGEN β-gal*Uso sim-sec	1	22,69	22,69	1,42	0,268
Error	8	128,00	16,00		
Total	11	294,76			

D-3. SISTEMA MULTIENZIMÁTICO CO-INMOVILIZADO

ANOVA RENDIMIENTO GOS

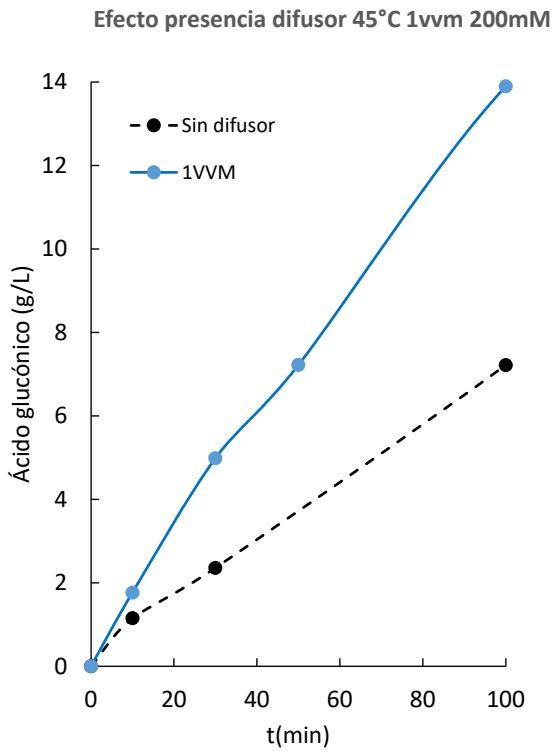
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	73,9200	10,5600	10,56	0,000
Lineal	3	29,7150	9,9050	9,90	0,001
origen beta gal	1	5,4150	5,4150	5,41	0,033
MÉTODO	1	19,4400	19,4400	19,44	0,000
USO	1	4,8600	4,8600	4,86	0,042
Interacciones de 2 términos	3	42,9900	14,3300	14,33	0,000
origen beta gal*MÉTODO	1	39,0150	39,0150	39,01	0,000
origen beta gal*USO	1	0,1350	0,1350	0,13	0,718
MÉTODO*USO	1	3,8400	3,8400	3,84	0,068
Interacciones de 3 términos	1	1,2150	1,2150	1,22	0,287
origen beta gal*MÉTODO*USO	1	1,2150	1,2150	1,22	0,287
Error	16	16,0000	1,0000		
Total	23	89,9200			

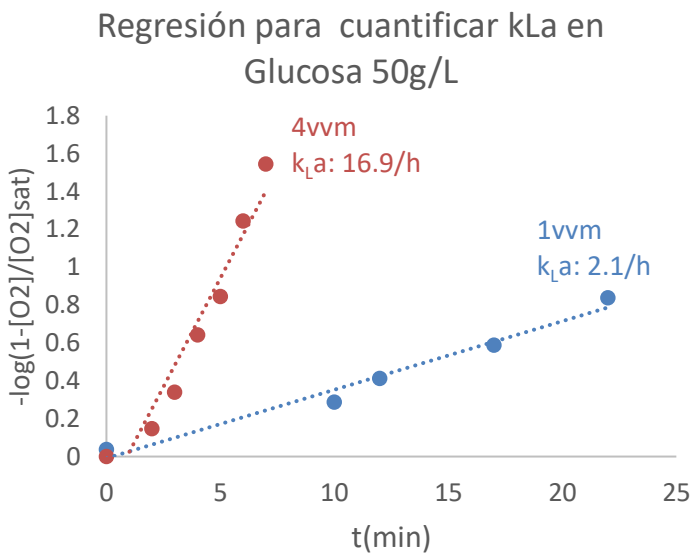
R-cuadrado
82,21%

ANOVA SELECTIVIDAD GOS

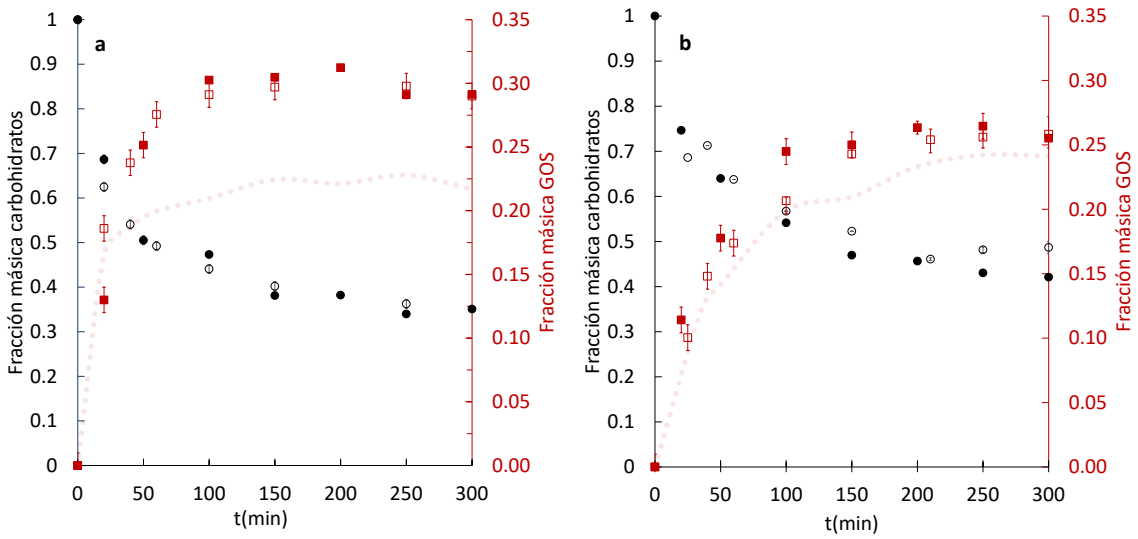
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	449,085	64,155	4,01	0,010
Lineal	3	413,115	137,705	8,61	0,001
origen beta gal	1	355,740	355,740	22,23	0,000
MÉTODO	1	54,000	54,000	3,38	0,085
USO	1	3,375	3,375	0,21	0,652
Interacciones de 2 términos	3	35,235	11,745	0,73	0,547
origen beta gal*MÉTODO	1	2,535	2,535	0,16	0,696
origen beta gal*USO	1	15,360	15,360	0,96	0,342
MÉTODO*USO	1	17,340	17,340	1,08	0,313
Interacciones de 3 términos	1	0,735	0,735	0,05	0,833
origen beta gal*MÉTODO*USO	1	0,735	0,735	0,05	0,833
Error	16	256,000	16,000		
Total	23	705,085			

ANEXO E.


Efecto presencia difusor 45°C 1vvm 200mM
Sin difusor
1VVM
Ácido glucónico (g/L)
t(min)
0
2
4
6
8
10
12
14
0
20
40
60
80
100


Regresión para cuantificar kLa en Glucosa 50g/L
4vvm
k_La: 16.9/h
1vvm
k_La: 2.1/h
-log(1-[O2]/[O2]sat)
t(min)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
1.8
0
5
10
15
20
25

ANEXO F



Comparación ente Combi-CLEAs y 2 CLEAS (β-gal y GOx) independientes con enzima de *A. oryzae*, añadidas en lactosuero para la síntesis de GOS (pH 6.0)

Combi-CLEAS (marcadores sin relleno), 2 CLEAS independientes (marcadores con relleno) de GOx. β-gal *A. oryzae* – *GOx* IPA(a); β-gal *A. niger* – *GOx Sulfato* (b); (●, ○) Lactosa; (■, □) GOS; (⋯) GOS con CLEA-IPA monoenzimática.

Bibliografía

Alnadari, F., Xue, Y., Almakas, A., Mohedein, A., Samie, A., Abdel-Shafi, M., & Abdin, M. (2021). Large batch production of Galactooligosaccharides using β-glucosidase immobilized on chitosan-functionalized magnetic nanoparticle. *Journal of Food Biochemistry*, *45*(2). https://doi.org/10.1111/jfbc.13589

Ammam, M., & Fransaer, J. (2010). Two-enzyme lactose biosensor based on β-galactosidase and glucose oxidase deposited by AC-electrophoresis: Characteristics and performance for lactose determination in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *148*(2), 583–589. https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.05.027

AOAC, I. (2002). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (17th ed.).

Arana-Peña, S., Carballares, D., Morellon-Sterlling, R., Berenguer-Murcia, Á., Alcántara, A. R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2021). Enzyme co-immobilization: Always the biocatalyst designers' choice…or not? *Biotechnology Advances*, *51*, 107584. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107584

Araya, E., Urrutia, P., Romero, O., Illanes, A., & Wilson, L. (2019). Design of combined crosslinked enzyme aggregates (combi-CLEAs) of β-galactosidase and glucose isomerase for the one-pot production of fructose syrup from lactose. *Food Chemistry*, *288*, 102–107. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.024

Argenta, A. B., Nogueira, A., & de P. Scheer, A. (2021). Hydrolysis of whey lactose: Kluyveromyces lactis β-galactosidase immobilisation and integrated process hydrolysis-ultrafiltration. *International Dairy Journal*, *117*, 105007. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105007

Ayhan, F., & Ispirli, Y. (2011). Cross- Linked Glucose Oxidase Aggregates: Synthesis and Characterization. *Hacettepe J. Biol. & Chem*, *39*(3), 241–251.

Azcarate-Peril, M. A., Ritter, A. J., Savaiano, D., Monteagudo-Mera, A., Anderson, C., Magness, S. T., & Klaenhammer, T. R. (2017). Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals.

Proceedings of the National Academy of Sciences, *114*(3). https://doi.org/10.1073/pnas.1606722113

Barile, D., & Rastall, R. A. (2013). Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Current Opinion in Biotechnology*, *24*(2), 214–219. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.01.008

Bauer, J. A., Zámocká, M., Majtán, J., & Bauerová-Hlinková, V. (2022). Glucose Oxidase, an Enzyme "Ferrari": Its Structure, Function, Production and Properties in the Light of Various Industrial and Biotechnological Applications. *Biomolecules*, *12*(3), 472. https://doi.org/10.3390/biom12030472

Benavides, J., & Palomares, M. (2017). *Aqueous two-phase systems for bioprocess development for the recovery of biological products*. Springer Science+Business Media.

Bensadoun, A., & Weinstein, D. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry*, *70*(1), 241–250. https://doi.org/10.1016/S0003-2697(76)80064-4

Bernal, C., Marciello, M., Mesa, M., Sierra, L., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., & Guisan, J. M. (2013). Immobilisation and stabilisation of β-galactosidase from Kluyveromyces lactis using a glyoxyl support. *International Dairy Journal*, *28*(2), 76–82. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.08.009

Bilal, M., & Iqbal, H. M. N. (2019). Sustainable bioconversion of food waste into high-value products by immobilized enzymes to meet bio-economy challenges and opportunities – A review. *Food Research International*, *123*, 226–240. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.066

BIOCON. (2021). *PRODUCCIÓN Y CONTROL DE LECHE DESLACTOSADA*. https://biocon.es/wp-content/uploads/2017/01/Leche-deslactosada.pdf

Blandino, A., Macías, M., & Cantero, D. (2001). Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, *36*(7), 601–606. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00240-5

Botvynko, A., Bednářová, A., Henke, S., Shakhno, N., & Čurda, L. (2019). Production of galactooligosaccharides using various combinations of the commercial β-galactosidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *517*(4), 762–766. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.001

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Brás, N. F., Moura-Tamames, S. A., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2008). Mechanistic studies on the formation of glycosidase-substrate and glycosidase-inhibitor covalent intermediates. *Journal of Computational Chemistry*, *29*(15), 2565–2574. https://doi.org/10.1002/jcc.21013

Brena, B., González-Pombo, P., & Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In J. M. Guisan (Ed.), *Immobilization of Enzymes and Cells* (Vol. 1051, pp. 15–31). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2

Cardelle-Cobas, A., Olano, A., Irazoqui, G., Giacomini, C., Batista-Viera, F., Corzo, N., & Corzo-Martínez, M. (2016). Synthesis of Oligosaccharides Derived from Lactulose (OsLu) Using Soluble and Immobilized Aspergillus oryzae β-Galactosidase. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *4*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00021

Carvalho, F., Prazeres, A. R., & Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of The Total Environment*, *445–446*, 385–396. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038

Castro, G. (2020). *Evaluación de un proceso de producción-separación de galactooligosacáridos mediante un sistema acuoso de dos fases asistido por microondas*. Universidad Nacional de Colombia.

Catenza, K. F., & Donkor, K. K. (2021). Recent approaches for the quantitative analysis of functional oligosaccharides used in the food industry: A review. *Food Chemistry*, *355*, 129416. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129416

Chanfrau, P., Núñez, J., Lara, M., & Rivera LM. (2017). Milk-Whey From a problematicbyproduct to a source of valuable products for health and industry: An overview from biotechnology. *La Prensa Medica*, *103*(4). https://doi.org/10.4172/lpma.1000257

Charalampopoulos, D., & Rastall, R. A. (2012). Prebiotics in foods. *Current Opinion in Biotechnology*, *23*(2), 187–191. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.12.028

Chen, T.-L., & Weng, H.-S. (1986). A method for the determination of the activity and optimal pH of glucose oxidase in an unbuffered solution. *Biotechnology and Bioengineering*, *28*, 107–109.

Chmura, A., Rustler, S., Paravidino, M., Van Rantwijk, F., Stolz, A., & Sheldon, R. A. (2013). The combi-CLEA approach: Enzymatic cascade synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid. *Tetrahedron: Asymmetry*, *24*(19), 1225–1232. https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2013.08.013

Chourasia, R., Phukon, L. C., Abedin, M. M., Padhi, S., Singh, S. P., & Rai, A. K. (2022). Whey valorization by microbial and enzymatic bioprocesses for the production of nutraceuticals and value-added products. *Bioresource Technology Reports*, *19*, 101144. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101144

Corral, J. M., Bañuelos, O., Adrio, J. L., & Velasco, J. (2006). Cloning and characterization of a β-galactosidase encoding region in Lactobacillus coryniformis CECT 5711. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *73*(3), 640–646. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0510-7

Crittenden, R. G., & Playne, M. J. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, *7*(11), 353–361. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(96)10038-8

Damin, B. I. S., Kovalski, F. C., Fischer, J., Piccin, J. S., & Dettmer, A. (2021). Challenges and perspectives of the β-galactosidase enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*(13), 5281–5298. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11423-7

de Albuquerque, T. L., de Sousa, M., Gomes e Silva, N. C., Girão Neto, C. A. C., Gonçalves, L. R. B., Fernandez-Lafuente, R., & Rocha, M. V. P. (2021). β-Galactosidase from Kluyveromyces lactis: Characterization, production, immobilization and applications - A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *191*, 881–898. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.133

Dekker, P. J. T. (2019). Enzymes Exogenous to Milk in Dairy Technology: β-d-Galactosidase. In *Reference Module in Food Science* (p. B9780081005965007435). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00743-5

Deng, C., Chen, J., Nie, Z., & Si, S. (2010). A sensitive and stable biosensor based on the direct electrochemistry of glucose oxidase assembled layer-by-layer at the

multiwall carbon nanotube-modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, *26*(1), 213–219. https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.06.013

Ding, H., Zhou, L., Zeng, Q., Yu, Y., & Chen, B. (2018). Heterologous Expression of a Thermostable β-1,3-Galactosidase and Its Potential in Synthesis of Galactooligosaccharides. *Marine Drugs*, *16*(11), 415. https://doi.org/10.3390/md16110415

Dubey, M. K., Zehra, A., Aamir, M., Meena, M., Ahirwal, L., Singh, S., Shukla, S., Upadhyay, R. S., Bueno-Mari, R., & Bajpai, V. K. (2017). Improvement Strategies, Cost Effective Production, and Potential Applications of Fungal Glucose Oxidase (GOD): Current Updates. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1032. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01032

Dunnill, P. (1979). Immobilized enzymes—Research and development. *Biochemical Education*, *7*(3), 73. https://doi.org/10.1016/0307-4412(79)90055-4

Erazo, R., & Cárdenas, J. (2001). DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO (kLa) EN UN BIORREACTOR BATCH. *Rev. Per. Qufm. Ing. Qufm.*, *VoL 4*(2), 22–27.

FAO. (2006). *Specific methods, Enzyme preparations*. http://www.fao.org/docrep/009/a0691e/A0691E07.htm

Farias, D. de P., de Araújo, F. F., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2019). Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. *Trends in Food Science & Technology*, *93*, 23–35. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.004

FEDEGAN. (2022). *Cifras del sector ganadero: Producción y acopio de leche en Colombia*. https://www.fedegan.org.co/estadisticas/produccion-0

FINAGRO. (2023). *Crecimiento del sector agropecuario y Agroexpo 2023*. https://www.finagro.com.co/noticias/articulos/crecimiento-del-sector-agropecuario-agroexpo-2023-reto-desarrollo-del-campo-0

Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2015). Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*, *48*, 15–22. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.003

Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2018a). Combination of two β-galactosidases during the synthesis of galactooligosaccharides may enhance yield and structural diversity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *506*(1), 211–215. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.091

Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2018b). Synthesis of Galactooligosaccharides in Milk and Whey: A Review: Synthesis of galactooligosaccharides…. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(3), 678–697. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12344

Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2019). Effect of glucose depletion during the synthesis of galactooligosaccharides using a trienzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology*, *121*, 45–50. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.10.009

Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2021). Synthesis of galactooligosaccharides by Cryptococcus laurentii and Aspergillus oryzae using different kinds of acid whey. *International Dairy Journal*, *112*, 104867. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104867

Frenzel, M., Zerge, K., Clawin-Rädecker, I., & Lorenzen, P. Chr. (2015). Comparison of the galacto-oligosaccharide forming activity of different β-galactosidases. *LWT - Food Science and Technology*, *60*(2), 1068–1071. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.064

Füreder, V., Rodriguez-Colinas, B., Cervantes, F. V., Fernandez-Arrojo, L., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A. O., & Plou, F. J. (2020). Selective Synthesis of Galactooligosaccharides Containing β(1→3) Linkages with β-Galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* (Saphera). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(17), 4930–4938. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00997

Gao, X., Wu, J., & Wu, D. (2019). Rational design of the beta-galactosidase from Aspergillus oryzae to improve galactooligosaccharide production. *Food Chemistry*, *286*, 362–367. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.212

Garcia-Cruz, C. H., Foggetti, U., & Silva, A. N. D. (2008). Alginato bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção. *Química Nova*, *31*(7), 1800–1806. https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700035

Gargova, S., Pishtijski, I., & Stoilova, I. (1995). Purification and Properties of β-Galactosidase from Aspergillus Oryzae. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *9*(4), 47–51. https://doi.org/10.1080/13102818.1995.10818861

Gennari, A., Mobayed, F. H., Volpato, G., & De Souza, C. F. V. (2018). Chelation by collagen in the immobilization of Aspergillus oryzae β-galactosidase: A potential biocatalyst to hydrolyze lactose by batch processes. *International Journal of*

Biological Macromolecules, *109*, 303–310. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.088

Göktuğ, T., Sezgintürk, M. K., & Dinçkaya, E. (2005). Glucose oxidase-β-galactosidase hybrid biosensor based on glassy carbon electrode modified with mercury for lactose determination. *Analytica Chimica Acta*, *551*(1–2), 51–56. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.07.021

Gómez Soto, J. A., & Sánchez Toro, Ó. J. (2022). Producción de galactooligosacáridos: Alternativa para el aprovechamiento del lactosuero. Una revisión. *Ingeniería y Desarrollo*, *37*(01), 129–158. https://doi.org/10.14482/inde.37.1.637

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

Gouda, M. D., Singh, S. A., Rao, A. G. A., Thakur, M. S., & Karanth, N. G. (2003). Thermal Inactivation of Glucose Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(27), 24324–24333. https://doi.org/10.1074/jbc.M208711200

Grosová, Z., Rosenberg, M., & Rebroš, M. (2008). Perspectives and applications of immobilised β-galactosidase in food industry – a review. *Czech Journal of Food Sciences*, *26*(No. 1), 1–14. https://doi.org/10.17221/1134-CJFS

Guerrero, C., Aburto, C., Suárez, S., Vera, C., & Illanes, A. (2018). Effect of the type of immobilization of β-galactosidase on the yield and selectivity of synthesis of transgalactosylated oligosaccharides. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *16*, 353–363. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.021

Guerrero, C., Aburto, C., Súarez, S., Vera, C., & Illanes, A. (2020). Improvements in the production of Aspergillus oryzae β-galactosidase crosslinked aggregates and their use in repeated-batch synthesis of lactulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, *142*, 452–462. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.117

Guerrero, C., Vera, C., Conejeros, R., & Illanes, A. (2015). Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β-galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology*, *70*, 9–17. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006

Guerrero, C., Vera, C., Serna, N., & Illanes, A. (2017). Immobilization of Aspergillus oryzae β-galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different

methods and application to the synthesis of lactulose. *Bioresource Technology*, *232*, 53–63. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.003

Guío, A. F. (2014). *EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE MATERIAS PRIMAS LÁCTEAS CON BETA-GALACTOSIDASA INMOVILIZADA*. Universidad Nacional de Colombia.

Guisán, JoséM. (1988). Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, *10*(6), 375–382. https://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90018-X

Hackenhaar, C. R., Spolidoro, L. S., Flores, E. E. E., Klein, M. P., & Hertz, P. F. (2021). Batch synthesis of galactooligosaccharides from co-products of milk processing using immobilized β-galactosidase from Bacillus circulans. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *36*, 102136. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102136

Hernandez, K., Berenguer-Murcia, A., C. Rodrigues, R., & Fernandez-Lafuente, R. (2012). Hydrogen Peroxide in Biocatalysis. A Dangerous Liaison. *Current Organic Chemistry*, *16*(22), 2652–2672. https://doi.org/10.2174/138527212804004526

Hetrick, E. M., Sperry, D. C., Nguyen, H. K., & Strege, M. A. (2014). Characterization of a Novel Cross-Linked Lipase: Impact of Cross-Linking on Solubility and Release from Drug Product. *Molecular Pharmaceutics*, *11*(4), 1189–1200. https://doi.org/10.1021/mp4006529

Huerta, L. M., Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L., & Illanes, A. (2011). Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized β-galactosidases from Aspergillus oryzae. *Process Biochemistry*, *46*(1), 245–252. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.018

Jain, M., Gote, M., Dubey, A. K., Narayanan, S., Krishnappa, H., Kumar, D. S., Ravi, G., Vijayasarathi, S., & Shankar, S. (2018). Safety evaluation of fructooligosaccharide (FOSSENCE ™): Acute, 14-day, and subchronic oral toxicity study in Wistar rats. *Toxicology Research and Application*, *2*, 239784731878775. https://doi.org/10.1177/2397847318787750

Jasti, L. S., Dola, S. R., Fadnavis, N. W., Addepally, U., Daniels, S., & Ponrathnam, S. (2014). Co-immobilized glucose oxidase and β-galactosidase on bovine serum albumin coated allyl glycidyl ether (AGE)–ethylene glycol dimethacrylate (EGDM)

copolymer as a biosensor for lactose determination in milk. *Enzyme and Microbial Technology*, *64–65*, 67–73. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.07.005

Katrolia, P., Liu, X., Li, G., & Kopparapu, N. K. (2019). Enhanced Properties and Lactose Hydrolysis Efficiencies of Food-Grade β-Galactosidases Immobilized on Various Supports: A Comparative Approach. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *188*(2), 410–423. https://doi.org/10.1007/s12010-018-2927-8

Ladero, M., Santos, A., García, J. L., Carrascosa, A. V., Pessela, B. C. C., & García-Ochoa, F. (2002). Studies on the activity and the stability of β-galactosidases from Thermus sp strain T2 and from Kluyveromyces fragilis. *Enzyme and Microbial Technology*, *30*(3), 392–405. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00506-3

Liu, H., Li, H., Ying, T., Sun, K., Qin, Y., & Qi, D. (1998). Amperometric biosensor sensitive to glucose and lactose based on co-immobilization of ferrocene, glucose oxidase, β-galactosidase and mutarotase in β-cyclodextrin polymer. *Analytica Chimica Acta*, *358*(2), 137–144. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00576-X

Loğoğlu, E., Sungur, S., & Yildiz, Y. (2006). Development of Lactose Biosensor Based on β-Galactosidase and Glucose Oxidase Immobilized into Gelatin. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, *43*(3), 525–533. https://doi.org/10.1080/10601320600575256

Long, J., Pan, T., Xie, Z., Xu, X., & Jin, Z. (2020). Co-immobilization of β-fructofuranosidase and glucose oxidase improves the stability of Bi-enzymes and the production of lactosucrose. *LWT*, *128*, 109460. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109460

Lorenzen, P. Chr., Breiter, J., Clawin-Rädecker, I., & Dau, A. (2013). A novel bi-enzymatic system for lactose conversion. *International Journal of Food Science & Technology*, *48*(7), 1396–1403. https://doi.org/10.1111/ijfs.12101

Lu, L., Guo, L., Wang, K., Liu, Y., & Xiao, M. (2020). β-Galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates. *Biotechnology Advances*, *39*, 107465. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107465

Lu, L., Xu, S., Zhao, R., Zhang, D., Li, Z., Li, Y., & Xiao, M. (2012). Synthesis of galactooligosaccharides by CBD fusion β-galactosidase immobilized on cellulose. *Bioresource Technology*, *116*, 327–333. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.108

Mano, N. (2019). Engineering glucose oxidase for bioelectrochemical applications. *Bioelectrochemistry*, *128*, 218–240. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.04.015

Marilho, I. (2016). *Degradation of Calcium Gels of alginate and Periodate Oxidised Alginate* [Norwegian University of Science and technology]. https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/bitstream/handle/11250/2441304/16008_FULLTEXT.pdf?sequence=1

Martínez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., & Olano, A. (2008). Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*(7), 540–544. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.05.008

Megazyme. (2023). *Megazyme: Beta-galactosidase from Aspergillus niger*. https://www.megazyme.com/documents/Data_Sheet/E-BGLAN_DATA.pdf

MINAGRICULTURA. (2022). *Plan de ordenamiento productivo de la cadena láctea.*

Ministerio de Salud. (2007). *Resolución 2997*.

Mordor Intelligence. (2023). *Global Feed Prebiotics Market 2017-2029*.

Movahedpour, A., Ahmadi, N., Ghalamfarsa, F., Ghesmati, Z., Khalifeh, M., Maleksabet, A., Shabaninejad, Z., Taheri-Anganeh, M., & Savardashtaki, A. (2021). β-Galactosidase: From its source and applications to its recombinant form. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, bab.2137. https://doi.org/10.1002/bab.2137

Muset, G., & Castells, L. (2017). *VALORIZACIÓN Colección TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA Suma valor a un país de ideas.*

Nakano, H., Takenishi, S., & Watanabe, Y. (1987). Substrate Specificity of Several *β* -Galactosidases toward a Series of *β* -1,4-Linked Galactooligosaccharides. *Agricultural and Biological Chemistry*, *51*(8), 2267–2269. https://doi.org/10.1080/00021369.1987.10868356

Neri, D. F. M., Balcão, V. M., Dourado, F. O. Q., Oliveira, J. M. B., Carvalho, L. B., & Teixeira, J. A. (2009). Galactooligosaccharides production by β-galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane–polyaniline particles. *Reactive and Functional Polymers*, *69*(4), 246–251. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2009.01.002

Nguyen, V. D., Styevkó, G., Madaras, E., Haktanirlar, G., Tran, A. T. M., Bujna, E., Dam, M. S., & Nguyen, Q. D. (2019). Immobilization of β-galactosidase on chitosan-coated magnetic nanoparticles and its application for synthesis of lactulose-based galactooligosaccharides. *Process Biochemistry*, *84*, 30–38. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.021

Ölçücü, G., Krauss, U., Jaeger, K.-E., & Pietruszka, J. (2023). Carrier-Free Enzyme Immobilizates for Flow Chemistry. *Chemie Ingenieur Technik*, *95*(4), 531–542. https://doi.org/10.1002/cite.202200167

Ospina-Corral, S., Cardona Alzate, C. A., & Orrego Alzate, C. E. (2019). Prebiotics in Beverages: From Health Impact to Preservation. In *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages* (pp. 339–373). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816685-7.00011-2

Panesar, P. S., Kumari, S., & Panesar, R. (2010). Potential Applications of Immobilized *β* -Galactosidase in Food Processing Industries. *Enzyme Research*, *2010*, 1–16. https://doi.org/10.4061/2010/473137

Parashar, A., Jin, Y., Mason, B., Chae, M., & Bressler, D. (2016). Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. *Journal of Dairy Science*, *99*(3), 18591867. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10059

Pawlak-Szukalska, A., Wanarska, M., Popinigis, A. T., & Kur, J. (2014). A novel cold-active β-d-galactosidase with transglycosylation activity from the Antarctic Arthrobacter sp. 32cB – Gene cloning, purification and characterization. *Process Biochemistry*, *49*(12), 2122–2133. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.09.018

Peirce, S., Virgen-Ortíz, J. J., Tacias-Pascacio, V. G., Rueda, N., Bartolome-Cabrero, R., Fernandez-Lopez, L., Russo, M. E., Marzocchella, A., & Fernandez-Lafuente, R. (2016). Development of simple protocols to solve the problems of enzyme coimmobilization. Application to coimmobilize a lipase and a β-galactosidase. *RSC Advances*, *6*(66), 61707–61715. https://doi.org/10.1039/C6RA10906C

Pereira-Rodríguez, Á., Fernández-Leiro, R., González-Siso, M. I., Cerdán, M. E., Becerra, M., & Sanz-Aparicio, J. (2012). Structural basis of specificity in tetrameric Kluyveromyces lactis β-galactosidase. *Journal of Structural Biology*, *177*(2), 392–401. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.031

Rastall, R. A. (2010). Functional Oligosaccharides: Application and Manufacture. *Annual Review of Food Science and Technology*, *1*(1), 305–339. https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100746

Ren, S., Li, C., Jiao, X., Jia, S., Jiang, Y., Bilal, M., & Cui, J. (2019). Recent progress in multienzymes co-immobilization and multienzyme system applications. *Chemical Engineering Journal*, *373*, 1254–1278. https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.05.141

Rico-Díaz, A., Ramírez-Escudero, M., Vizoso-Vázquez, Á., Cerdán, M. E., Becerra, M., & Sanz-Aparicio, J. (2017). Structural features of *Aspergillus niger* β-galactosidase define its activity against glycoside linkages. *The FEBS Journal*, *284*(12), 1815–1829. https://doi.org/10.1111/febs.14083

Rico-Rodríguez, F. (2018). *Evaluación de un sistema mixto de enzimas para la producción de galactooligosacáridos y ácido glucónico a partir de lactosuero como fuente de lactosa*. Universidad Nacional de Colombia.

Rico-Rodríguez, F., Noriega, M. A., Lancheros, R., & Serrato-Bermúdez, J. C. (2021). Kinetics of galactooligosaccharide (GOS) production with two β-galactosidases combined: Mathematical model and raw material effects. *International Dairy Journal*, *118*, 105015. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105015

Rico-Rodríguez, F., Villamiel, M., Ruiz-Aceituno, L., Serrato, J. C., & Montilla, A. (2020). Effect of the lactose source on the ultrasound-assisted enzymatic production of galactooligosaccharides and gluconic acid. *Ultrasonics Sonochemistry*, *67*, 104945. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104945

Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*, *137*(3), 830S-837S. https://doi.org/10.1093/jn/137.3.830S

Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., & Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.*, *42*(15), 6290–6307. https://doi.org/10.1039/C2CS35231A

Rodriguez, C., Lavandera, I., & Gotor, V. (2012). Recent Advances in Cofactor Regeneration Systems Applied to Biocatalyzed Oxidative Processes. *Current Organic Chemistry*, *16*(21), 2525–2541. https://doi.org/10.2174/138527212804004643

Roy, I., Mukherjee, J., & Gupta, M. N. (2017). Cross-Linked Enzyme Aggregates for Applications in Aqueous and Nonaqueous Media. In S. D. Minteer (Ed.), *Enzyme*

Stabilization and Immobilization (Vol. 1504, pp. 109–123). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6499-4_9

Saqib, S., Akram, A., Halim, S. A., & Tassaduq, R. (2017). Sources of β-galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech*, *7*(1), 79. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5

Segel, I. H. (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and SteadyState Enzyme Systems*. John Wiley & Sons, Inc.

Serey, M., Vera, C., Guerrero, C., & Illanes, A. (2021). Immobilization of Aspergillus oryzae β-galactosidase in cation functionalized agarose matrix and its application in the synthesis of lactulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, *167*, 1564–1574. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.110

Shahriari, D., Koffler, J., Lynam, D. A., Tuszynski, M. H., & Sakamoto, J. S. (2016). Characterizing the degradation of alginate hydrogel for use in multilumen scaffolds for spinal cord repair. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *104*(3), 611–619. https://doi.org/10.1002/jbm.a.35600

Srisimarat, W., & Pongsawasdi, P. (2008). Enhancement of the oligosaccharide synthetic activity of β-galactosidase in organic solvents by cyclodextrin. *Enzyme and Microbial Technology*, *43*(6), 436–441. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.06.007

Superintendencia de Industria y comercio. (2020). *EStudios económicos sectoriales. Análisis del sector lácteo en Colombia. Eviencia para el período 2010-2020*.

Tankeshwar, A. (2023). *ONPG: β-galactosidase Test*. https://microbeonline.com/onpg-test-galactosidase-principle-procedure-results/

Terrasan, C. R. F., de Morais Junior, W. G., & Contesini, F. J. (2019). Enzyme Immobilization for Oligosaccharide Production. In *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 415–423). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22444-X

Todea, A., Benea, I. C., Bîtcan, I., Péter, F., Klébert, S., Feczkó, T., Károly, Z., & Biró, E. (2021). One-pot biocatalytic conversion of lactose to gluconic acid and galacto-oligosaccharides using immobilized β-galactosidase and glucose oxidase. *Catalysis Today*, *366*, 202–211. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.06.090

Torres, D. P. M., Gonçalves, M. do P. F., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2010). Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance

as Prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(5), 438–454. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x

Trademap. (2020). *Cheese whey*. https://www.trademap.org/Country_SelProductCountry_TS.aspx?nvpm=1%7c414%7c%7c%7c%7c0401%7c%7c%7c4%7c1%7c1%7c2%7c2%7c1%7c2%7c1%7c%7c1

Treid. (2022). *Exportaciones colombianas de quesos en los primeros 9 meses de 2020, 2021 y 2022*. https://www.treid.co/post/exportaciones-colombianas-de-quesos-en-los-primeros-9-meses-de-2020-2021-y-2022#:~:text=En%20Colombia%20la%20producci%C3%B3n%20promedio,est%C3%A1%20el%20queso%20fresco%20%C3%A1cido

Trobo, L. (2018). *Co-inmovilización y estabilización de enzimas y cofactores: Glicosilación regioselectiva de compuestos bioactivos catalizada por glicosiltransfeasas.* Universidad Autónoma de Madrid.

Tzortzis, G., & Vulevic, J. (2009). Galacto-Oligosaccharide Prebiotics. In D. Charalampopoulos & R. A. Rastall (Eds.), *Prebiotics and Probiotics Science and Technology* (pp. 207–244). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79058-9_7

Urrutia, P., Mateo, C., Guisan, J. M., Wilson, L., & Illanes, A. (2013). Immobilization of Bacillus circulans β-galactosidase and its application in the synthesis of galacto-oligosaccharides under repeated-batch operation. *Biochemical Engineering Journal*, *77*, 41–48. https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.015

Varnam, A. H., & Sutherland, J. P. (2001). *Milk and milk products: Technology, chemistry and microbiology*. Aspen Publishers.

Vera, C., Córdova, A., Aburto, C., Guerrero, C., Suárez, S., & Illanes, A. (2016). Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: State of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*(12), 197. https://doi.org/10.1007/s11274-016-2159-4

Vera, C., Guerrero, C., Aburto, C., Cordova, A., & Illanes, A. (2020). Conventional and non-conventional applications of β-galactosidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1868*(1), 140271. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140271

Vera, C., Guerrero, C., Conejeros, R., & Illanes, A. (2012). Synthesis of galacto-oligosaccharides by β-galactosidase from Aspergillus oryzae using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. *Enzyme and Microbial Technology*, *50*(3), 188–194. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.12.003

Vera, C., Guerrero, C., & Illanes, A. (2011). Determination of the transgalactosylation activity of Aspergillus oryzae β-galactosidase: Effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. *Carbohydrate Research*, *346*(6), 745–752. https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.030

Wang, G., Wang, H., Chen, Y., Pei, X., Sun, W., Liu, L., Wang, F., Umar Yaqoob, M., Tao, W., Xiao, Z., Jin, Y., Yang, S.-T., Lin, D., & Wang, M. (2021). Optimization and comparison of the production of galactooligosaccharides using free or immobilized Aspergillus oryzae β-galactosidase, followed by purification using silica gel. *Food Chemistry*, *362*, 130195. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130195

Wang, G., Zhu, J., Liu, L., Yaqoob, M. U., Pei, X., Tao, W., Xiao, Z., Sun, W., & Wang, M. (2020). Optimization for galactooligosaccharides synthesis: A potential alternative for gut health and immunity. *Life Sciences*, *245*, 117353. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117353

Wolf, M., Gasparin, B. C., & Paulino, A. T. (2018). Hydrolysis of lactose using β-d-galactosidase immobilized in a modified Arabic gum-based hydrogel for the production of lactose-free/low-lactose milk. *International Journal of Biological Macromolecules*, *115*, 157–164. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.058

Xavier, J. R., Ramana, K. V., & Sharma, R. K. (2018). β-galactosidase: Biotechnological applications in food processing. *Journal of Food Biochemistry*, *42*(5), e12564. https://doi.org/10.1111/jfbc.12564

Yañez-Ñeco, C. V., Cervantes, F. V., Amaya-Delgado, L., Ballesteros, A. O., Plou, F. J., & Arrizon, J. (2021). Synthesis of β(1 → 3) and β(1 → 6) galactooligosaccharides from lactose and whey using a recombinant β-galactosidase from Pantoea anthophila. *Electronic Journal of Biotechnology*, *49*, 14–21. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.10.004

Yang, G., Wu, J., Xu, G., & Yang, L. (2010). Comparative study of properties of immobilized lipase onto glutaraldehyde-activated amino-silica gel via different

methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *78*(2), 351–356. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.022

Yin, H., Bultema, J. B., Dijkhuizen, L., & van Leeuwen, S. S. (2017). Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the β-galactosidases from Bacillus circulans, Kluyveromyces lactis and Aspergillus oryzae. *Food Chemistry*, *225*, 230–238. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.030

Yin, H., Dijkhuizen, L., & van Leeuwen, S. S. (2018). Synthesis of galacto-oligosaccharides derived from lactulose by wild-type and mutant β-galactosidase enzymes from Bacillus circulans ATCC 31382. *Carbohydrate Research*, *465*, 58–65. https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.06.009

Zamora, H. (2008). *MÉTODOS SELECTOS DE BIOQUIMICA EXPERIMENTAL*. Universidad Nacional de Colombia.

Zhang, H., Ding, X., Chen, X., Ma, Y., Wang, Z., & Zhao, X. (2015). A new method of utilizing rice husk: Consecutively preparing d-xylose, organosolv lignin, ethanol and amorphous superfine silica. *Journal of Hazardous Materials*, *291*, 65–73. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.03.003