

**SINTESIS DE NUEVOS OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DEL LACTITOL A PARTIR
DE β - GALACTOSIDASAS COMERCIALES INMOVILIZADAS EN SOPORTE
MESOPOROSO**

YURI GERCYD BARRIOS NARVÁEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2018**

**SINTESIS DE NUEVOS OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DEL LACTITOL A
PARTIR DE β - GALACTOSIDASAS COMERCIALES INMOVILIZADAS EN
SOPORTE MESOPOROSO**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Química**

YURI GERCYD BARRIOS NARVÁEZ

Director:

ALFONSO ENRIQUE RAMIREZ SANABRIA, Ph.D
Grupo de investigación en Catálisis. Departamento de Química
Universidad Del Cauca

Co-Directores:

MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA, Ph.D
Grupo de Investigación Biotecnología, Calidad
Medioambiental y Seguridad Agroalimentaria
(BICAMSA) Departamento de Química. Universidad del Cauca

ANTONIA MONTILLA CORREDERA, Ph.D y MAR VILLAMIEL GUERRA, Ph.D
Grupo de Química y funcionalidad de carbohidratos y derivados
Instituto de Investigación en Ciencias de la
Alimentación CIAL (CSIC-UAM). Madrid-España

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2018**

NOTA DE ACEPTACIÓN

**ALFONSO ENRIQUE RAMIREZ
SANABRIA, Ph. D.
Director de trabajo de grado**

**DANNY ARTEGADA FUENTES Dr.
Jurado evaluador**

**RICARDO BENITEZ BENITEZ Dr.
Jurado evaluador**

Popayán, Noviembre de 2018

AGRADECIMIENTOS

La autora manifiesta sus agradecimientos a:

El profesor Alfonso E. Ramirez, director del trabajo de grado, por su apoyo y dedicación al desarrollo, continuación y finalización del proyecto.

A Antonia Montilla y Mar Villamiel, co directoras del trabajo de grado, por su gran colaboración y acompañamiento durante el desarrollo de la investigación.

A la profesora Maite del Pilar Rada, co-directora del trabajo de grado, por la oportunidad brindada.

A la Vicerrectoria de Investigaciones de la Universidad del Cauca (VRI) por su financiación y apoyo para la realización del proyecto.

Al Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) por sus recursos, espacio y aceptación.

A los jóvenes investigadores del CIAL por el acompañamiento, colaboración y amistad a lo largo de la estancia de investigación

A mi familia y amigos por su gran apoyo emocional a lo largo del proyecto.

In memoriam: Duvan y Natalia Q.E.P.D.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	vi
RESÚMEN.....	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. OLIGOSACÁRIDOS PREBIÓTICOS	2
2.1.1. Oligosacáridos prebióticos derivados de la lactosa: LACTITOL.....	5
2.2. ENZIMAS β -GALACTOSIDASAS	7
2.2.1. Fuentes de enzimas β -galactosidasas	7
2.2.2. Mecanismo de acción de las enzimas β -galactosidasas	9
2.3. SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS POR VÍA ENZIMÁTICA.....	10
2.4. INMOVILIZACION DE ENZIMAS β -GALACTOSIDASAS	13
2.5. SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS POR ENZIMAS INMOVILIZADAS.....	16
2.5.1 En Soportes Mesoporosos Ordenados: MCM-41.....	17
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo general.....	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	21
4.1. PREPARACIÓN DEL BIOCATALIZADOR (β -GALACTOSIDASAS/MCM-41).....	21
4.1.1. Activación del soporte MCM-41.....	21
4.1.2. Purificación de las enzimas β -galactosidasas.....	22
4.1.3. Inmovilización covalente de enzimas β -galactosidasas.....	22
4.2. CARACTERIZACIÓN DEL BIOCATALIZADOR.....	23
4.2.1. Caracterización del soporte MCM-41 activado	23
4.2.1.1. Análisis de Espectroscopia Infrarroja (FT-IR).....	23
4.2.2 Caracterización de enzimas β -galactosidasas purificadas.....	23

4.2.2.1. Determinación de la actividad enzimática (Método de DNS).....	23
4.2.2.2. Medida del contenido de proteína (Método de Bradford).....	24
4.2.3. Caracterización de enzimas β -galactosidasas inmovilizadas.....	25
4.2.3.1. Actividad enzimática unida al soporte (Método de DNS)	25
4.2.3.2. Proteína unida al soporte (Método de Bradford)	25
4.3. SINTESIS ENZIMÁTICA DE OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DEL LACTITOL.....	26
4.3.1. Usando enzimas β -galactosidasas libres.....	26
4.3.2. Usando enzimas β -galactosidasas inmovilizadas.....	26
4.3.3. Evaluación de reúsos.....	27
4.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE SÍNTESIS	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL BIOCATALIZADOR	30
5.1.1. Caracterización del soporte activado.....	30
5.1.2. Caracterización de enzimas β -galactosidasas libres e inmovilizadas.....	33
5.1.2.1. Actividad enzimática	33
5.1.2.2. Medida del contenido de proteína	36
5.2. SINTESIS ENZIMÁTICA DE OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DEL LACTITOL.....	41
5.2.1. Lactozym®6500	45
5.2.2. Lactozym®6500/MCM-41	47
5.2.3. BiolactasaNTLx2	50
5.2.4. BiolactasaNTLx2/MCM-41	53
5.2.5. Evaluación de la reutilización.....	57
6. CONCLUSIONES	60
7. RECOMENDACIONES.....	61
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de acción directa de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones.....	2
Figura 2. Condiciones que deben cumplir los ingredientes para ser considerados como prebióticos	3
Figura 3 Obtención de diferentes ingredientes bioactivos a partir de la lactosa.....	6
Figura 4. Estructura molecular del lactitol (4-O- β -d-galactopiranosil-d-glucitol).....	6
Figura 5. Diagrama de aminoácidos; Glu 461, Glu 537 y Gly 794 e interacción entre estos en una beta-galactosidasa	10
Figura 6. Procesos de hidrólisis / transgalactosilación catalizados por β -galactosidasas.....	11
Figura 7. Métodos de inmovilización de enzimas	14
Figura 8. Pasos de síntesis de soportes mesoporosos ordenados.....	18
Figura 9. Esquema de activación del soporte MCM-41	21
Figura 10. Proceso de inmovilización de β -galactosidasas en MCM-41 funcionalizado	22
Figura 11. Diagrama de la síntesis de oligosacáridos derivados el lactitol (LaOS).....	26
Figura 12. Diagrama para la re-utilización de los biocatalizadores sintetizados...	27
Figura 13. Reacciones del proceso de activación de MCM-41	30
Figura 14. Espectros IR para la activación de MCM-41	31
Figura 15. Resultados de la funcionalización con 3-aminopropil trietoxisilano (APTES).....	32
Figura 16. Biocatalizadores sintetizados.....	32
Figura 17. Reacciones del proceso de inmovilización covalente	33
Figura 18. Reacción de hidrólisis de una β -galactosidasa.....	34

Figura 19. Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	35
Figura 20. Método de Bradford	37
Figura 21. Actividades específicas β -galactosidasas comerciales libres e inmovilizadas.....	39
Figura 22. Mecanismo de acción β -galactosidasas	43
Figura 23. Evolución del contenido de carbohidratos Lactozym®6500	45
Figura 24. Cromatograma obtenido por GC/FID de Lactozym®6500	47
Figura 25. Evolución del contenido de carbohidratos Lactozym®6500/MCM-41	48
Figura 26. Cromatograma obtenido por GC/FID de Lactozym®6500/MCM-41	49
Figura 27. Evolución del contenido de carbohidratos BiolactasaNTLx2	50
Figura 28. Cromatograma obtenido por GC/FID de BiolactasaNTLx2	52
Figura 29. Evolución del contenido de carbohidratos Biolactasa NTLx2/MCM-41	53
Figura 30. Cromatograma obtenido por GC/FID de Biolactasa NTLx2/MCM-41	54
Figura 31. Cromatograma comparativo obtenido por GC/FID de Lactozym®6500/MCM-41 y Biolactasa NTLx2/MCM-41	56
Figura 32. Representación de los factores de importancia en la inmovilización de enzimas.....	58
Figura 33. Resultados para los reúsos de los Biocatalizadores	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Prebióticos comunes y emergentes alimentos funcionales	4
Tabla 2. Fuentes microbianas β -galactosidasas	8
Tabla 3. Mecanismos de inmovilización de enzimas.....	14
Tabla 4. Enzimas libres usadas en síntesis de LaOS y sus concentraciones	26
Tabla 5. Resultados actividad enzimática	36
Tabla 6. Resultados contenido de proteína	37
Tabla 7. Resultados actividad específica.....	39
Tabla 8. Resumen de resultados para la obtención del biocatalizador.....	40
Tabla 9. Resultados síntesis de LaOS.....	55
Tabla 10. Resultados para los reúsos de los biocatalizadores	57

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADE	Agente director de estructura
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
APTES	3-aminopropil trietoxisilano
ATR	Reflectancia total atenuada
BSA	Albúmina sérica bovina
CG-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización por llama
Di 1	Disacárido β -D-Gal-(1 \rightarrow 1)-D-Glc-ol
Di 2	Disacárido β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Glc-ol
DNS	Ácido dinitrosalicílico
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
FOS	Fructo-oligosacáridos
FT-IR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
GH	Glucósidos hidrolasas
GOS	Galacto-oligosacáridos
GP	Grados de polimerización
HMO	Oligosacáridos de leche humana
LaOS	Oligosacáridos derivados del lactitol
MCM-41	Mobile Composition of Matter N° 41
MMO	Materiales mesoporosos ordenados
PI	Patrón interno
RMN	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear
TEOS	Tetraetilortosilicato
Tri 0	Trisacárido β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol
Tri 1	Trisacárido β -D-Gal-(1 \rightarrow 1)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol
Tri 2	Trisacárido β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol
TMOS	Tetrametilortosilicato
TMSO	Trimetilsilil oximas
UE	Unidad de actividad enzimática

RESUMEN

En este trabajo se presenta la síntesis de oligosacáridos derivados del lactitol (LaOS) utilizando enzimas β -galactosidasas comerciales libres e inmovilizadas en el soporte mesoporoso tipo MCM-41 como catalizadores. La síntesis de LaOS se llevó bajo estas condiciones de reacción, 50°C y pH 7 por 24 horas tomando alícuotas cada cierto tiempo para monitorear la reacción; los carbohidratos presentes en las mezclas de reacción se analizaron mediante cromatografía de gases con detector de ionización por llama (CG-FID) encontrando disacáridos y trisacáridos derivados del lactitol, además de galactosa, sorbitol y lactitol residual. Las reacciones se realizaron con las enzimas en forma soluble e inmovilizadas, encontrando resultados similares en ambos casos, evidenciándose una mayor selectividad hacia la formación de trisacáridos, logrando identificar tentativamente al 4'galactosil lactitol, (1,1) galactosil lactitol y (1,6) galactosil lactitol.

De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible afirmar que las enzimas β -galactosidasas comerciales inmovilizadas en el soporte mesoporoso MCM-41 son buenos catalizadores para la síntesis de oligosacáridos derivados del lactitol. De esta forma se contribuye a diversificar el espectro de compuestos con potenciales propiedades prebióticas mediante preparaciones enzimáticas más rentables para su aplicación industrial.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, en el sector alimentario se compete por precio y calidad, además se requiere de una constante innovación para el desarrollo de nuevos productos que cubran las necesidades nutricionales y que aporten beneficios para la prevención de ciertas patologías tales como las intestinales debido al considerable aumento de consumidores cada vez más preocupados por el mejoramiento de su salud. Así

mismo, creando una demanda, cada vez más creciente, de los llamados, alimentos funcionales [1].

Un alimento funcional se define como aquel que, además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas, proporciona beneficios para la salud o reduce el riesgo de padecer enfermedades [2]. Entre los ingredientes con potencial funcionalidad, en los últimos años, han suscitado especial interés los relacionados con la función gastrointestinal, ya que los problemas relacionados con dicha función afectan a un gran sector de la población [3,4].

Estos beneficios para la función gastrointestinal podrían alcanzarse con nuevos oligosacáridos derivados de compuestos con propiedades prebióticas conocidas, como el lactitol [27]. Dichos oligosacáridos podrían llegar a las porciones más distales del colon donde se produce la mayor parte de enfermedades graves, hipótesis a partir de la cual se desarrolla esta investigación.

En la primera sección, para clarificar los términos generales y presentar los antecedentes de la investigación, se mostrará un marco teórico, que incluye los oligosacáridos prebióticos, las enzimas β -galactosidasas y la inmovilización de éstas. La siguiente sección está comprendida por unos objetivos que puntualizan las metas establecidas para este trabajo. Seguidamente en la sección experimental se detallarán los métodos usados, por ejemplo en la obtención del biocatalizador inmovilizado y la síntesis enzimática de los oligosacáridos derivados del lactitol (LaOS), entre otros.

A continuación, en los resultados y discusión se despliega un análisis sobre el proceso de inmovilización y las enzimas soportadas obtenidas. Asimismo, la comparación en la síntesis de los LaOS haciendo uso de las enzimas en estado soluble e inmovilizado. Posteriormente, unas conclusiones y recomendaciones que muestran la importancia de esta tesis de investigación. Para finalizar, en la última sección se encuentra la bibliografía usada que orienta al lector sobre la basta información tenida en cuenta para el presente trabajo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. OLIGOSACÁRIDOS PREBIÓTICOS

Los oligosacáridos son polímeros de bajo peso molecular, que contienen entre 2 a 10 unidades de monosacáridos unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos [5]. Dentro de este grupo pueden existir dos tipos de oligosacáridos; los digeribles y los no digeribles. Estos últimos son resistentes a la hidrólisis por parte de las enzimas

digestivas humanas [6], pudiendo llegar al colon, donde son metabolizados por la microbiota intestinal. Estos oligosacáridos se pueden considerar como prebióticos cuando son selectivamente fermentados por microorganismos (bifidobacterias y lactobacilos) que pueden aportar beneficios para la salud, dando lugar a la formación de dióxido de carbono, hidrógeno y ácidos grasos de cadena corta (AGCC). El requisito de selectividad es el más difícil de comprobar debido a la dificultad para demostrar la influencia del oligosacárido sobre el cambio en la microbiota, favoreciendo el crecimiento de microorganismos beneficiosos frente a los perjudiciales [1].

Los oligosacáridos prebióticos ejercen una serie de efectos beneficiosos tales como aumento de la movilidad intestinal e incremento de la excreción fecal; protección frente a infecciones de los sistemas respiratorio y urogenital así como del tracto gastrointestinal (Figura 1); tratamiento de la encefalopatía hepática, modulación del sistema inmune; actividad anticancerígena en el colon, mejora de la absorción de minerales, etc. Estos efectos influyen beneficiosamente en la salud, lo que hace que los alimentos con oligosacáridos prebióticos puedan considerarse alimentos funcionales [1,7, 8].

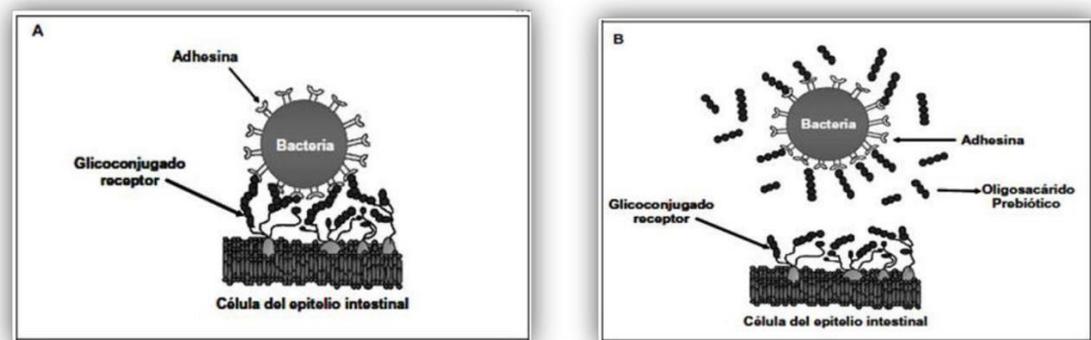


Figura 1. Modelo de acción directa de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones. (A) Las adhesinas bacterianas reconocen a los oligosacáridos receptores en las células del epitelio intestinal. (B) Inhibición de la adhesión bacteriana por prebióticos con estructuras similares a los glicanos receptores [1, 7, 8]

En la década de los 80's investigadores japoneses demostraron que determinados oligosacáridos no digeribles eran susceptibles de ser fermentados selectivamente por las bifidobacterias y tenían la capacidad de estimular el crecimiento de estas bacterias tras su ingesta [9]. Pero el concepto de prebiótico fue introducido por primera vez por Gibson y Roberfroid (1995) quienes propusieron la siguiente definición: "ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al hospedador al estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o un

limitado número de especies bacterianas en el colon, y que por lo tanto mejora la salud”. Como indica su definición un compuesto prebiótico debe ser resistente a la digestión y absorción, alcanzar el intestino grueso y ser fermentado selectivamente por microorganismos promotores de la salud como las bifidobacterias y los lactobacilos [9,10].

Este concepto se ha ido revisando y tanto investigadores como organismos internacionales han emitido distintas definiciones siendo una de las más recientes la que indicaron Roberfroid y col. (2010) como “ingredientes que producen una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad(es) de uno o de un limitado número de géneros/especies de microorganismos en la microbiota intestinal confiriendo beneficios para la salud del hospedador” [11]. Existe un amplio número de carbohidratos no digeribles, sin embargo no todos tienen actividad prebiótica. Para que los ingredientes prebióticos puedan considerarse como tales y por tanto producir estos efectos es indispensable que cumplan una serie de requisitos que se muestran en la Figura 2.

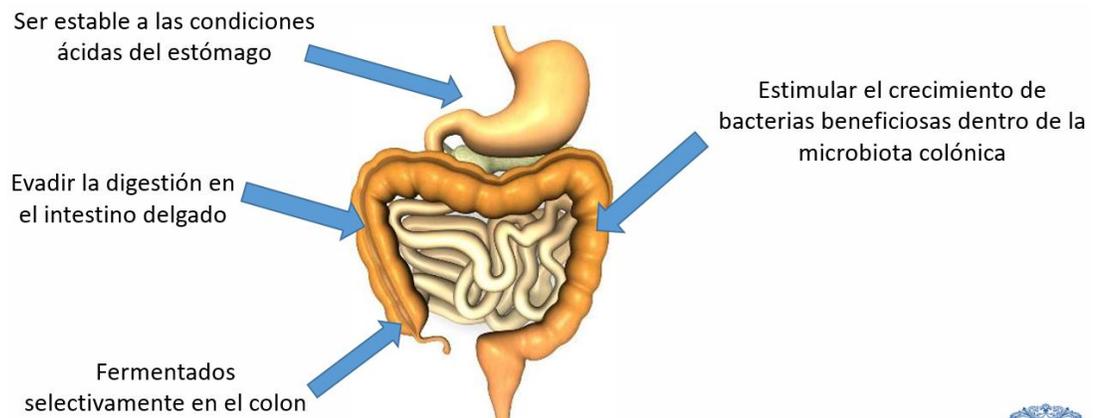


Figura 2. Condiciones que deben cumplir los ingredientes para ser considerados como prebióticos [1,12]

Por otra parte, algunas de las propiedades físico-químicas de los oligosacáridos que los hacen interesantes como ingredientes alimentarios son su elevada solubilidad en agua, sus propiedades gelificantes, bajo contenido calórico y su menor poder edulcorante conforme aumenta la cadena glucídica, haciéndoles, por ejemplo, excelentes sustitutos de la grasa en formulaciones dietéticas [1,9,13].

Aunque en el mercado mundial se están comercializando como prebióticos un gran número de carbohidratos, solamente existe evidencia científica de sus propiedades en humanos para los fructanos tipo inulina y fructo-oligosacáridos (FOS), los galacto-oligosacáridos (GOS) , la lactulosa y los oligosacáridos de leche humana (HMO), aunque hay numerosos oligosacáridos con claras evidencias de ejercer efecto prebiótico [14, 15]. En la Tabla 1, se muestran los prebióticos usualmente empleados y los candidatos a serlo.

Tabla 1. Prebióticos comunes y emergentes Alimentos funcionales [16]

<i>Tipo de oligosacáridos</i>	
Prebióticos reconocidos	Fructo-oligosacáridos (FOS) Galacto-oligosacáridos (GOS) Galacto-oligosacáridos/Oligosacáridos transgalactosilados (GOS / TOS) Inulina Isomalto-oligosacáridos Lactulosa Pirodextrinas Soja-oligosacáridos (SOS)
Prebióticos emergentes	Genti-oligosacáridos Gluco-oligosacáridos Isomalto-oligosacáridos (IMO) Lactosacarosa Levanos Oligosacáridos pécticos Almidón resistente Xiloligosacáridos (XOS) Alcoholes de azúcar

En general, se puede considerar que la adición de prebióticos puede ser una manera más natural y económica de modificar la flora intestinal que la adición de microorganismos probióticos [17].

Los oligosacáridos naturales se encuentran principalmente en la leche materna y en varios vegetales como fructanos (por ejemplo, espárragos, cebollas, ajo y puerros),

como estaquiosa en la soja, así como en la leche de vaca. En la leche humana, el contenido en oligosacáridos es aproximadamente de 5-10 g/L y se han identificado más de 130 compuestos [18]. Aunque los beneficios que aporta el consumo de dichos oligosacáridos son considerados únicos, su utilización en la elaboración de alimentos a gran escala es prácticamente imposible dado su escaso contenido en las leches habitualmente empleadas en la industria (vaca, oveja, cabra, búfala) [9,18]. Por ello existe un gran interés en el desarrollo de procedimientos de obtención de oligosacáridos derivados de lactosa y de otras fuentes que presenten propiedades prebióticas.

2.1.1 OLIGOSACÁRIDOS PREBIOTICOS DERIVADOS DE LA LACTOSA: LACTITOL

La lactosa, β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc, es el principal componente del suero de quesería, subproducto que se genera en grandes cantidades en la industria quesera. Este carbohidrato se recupera del suero por diferentes procesos que conllevan una concentración, cristalización, separación, refinado, secado y molienda. Para ampliar el espectro de utilización, la lactosa se puede modificar química o enzimáticamente, sometiéndose a reacciones de hidrólisis y transglicosilación, oxidación, reducción, isomerización o esterificación, obteniendo derivados tales como lactulosa, lactitol, ácido lactobiónico, D-tagatosa, galacto-oligosacáridos (GOS), lactosacarosa, sialillactosa o lactosil urea [1, 9, 19, 20], que se encuentran actualmente comercializados como diferentes ingredientes bioactivos, figura 3.

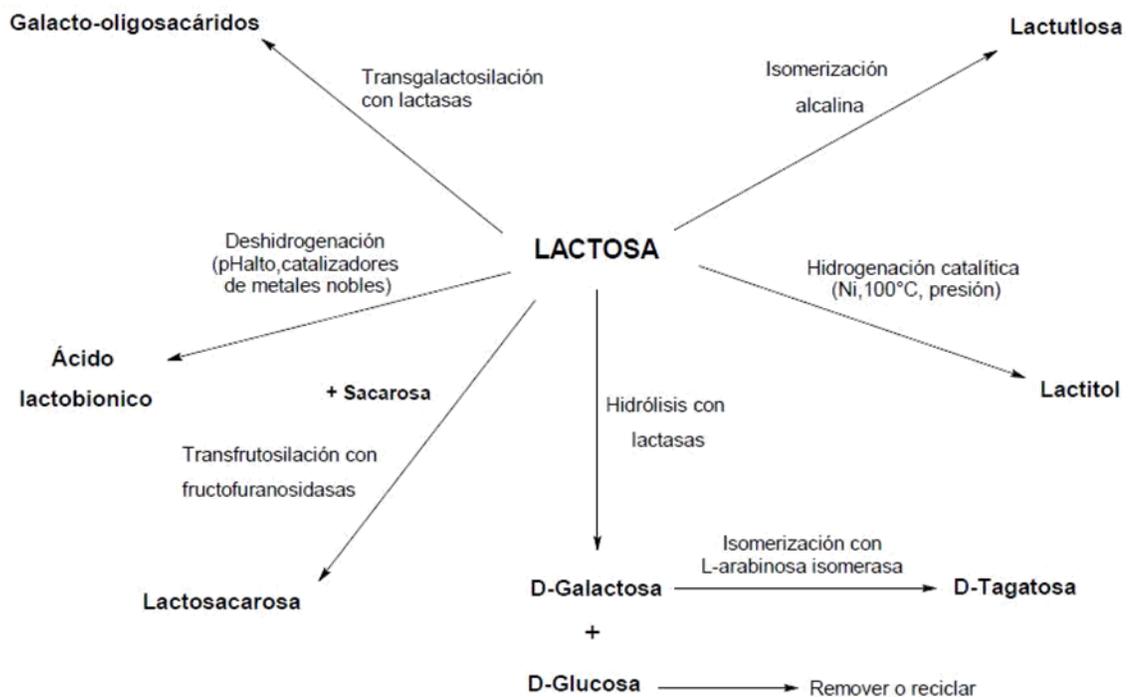


Figura 3. Obtención de ingredientes bioactivos a partir de la lactosa [9,19]

El lactitol β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol es un polialcohol disacárido que comprende una molécula de galactosa y una de sorbitol (Figura 4). Se puede obtener mediante la hidrogenación catalítica de la lactosa o mediante síntesis durante la hidrólisis de la lactosa usando β -galactosidasas en presencia de sorbitol [9, 21]. Dado que el grupo aldehído del residuo glucosídico se reduce al grupo hidroxilo (-OH), no produce una reacción de Maillard y su estabilidad al calor es mayor; tiene un bajo valor calorífico, y su calidad de sabor es similar al de la sacarosa, por lo tanto, se utiliza como edulcorante.

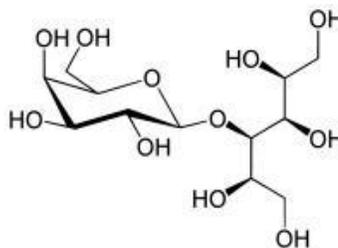


Figura 4. Estructura molecular del lactitol (4-O- β -d-galactopiranosil-d-glucitol)

El lactitol es conocido por sus propiedades prebióticas y encuentra muchas aplicaciones en la producción de alimentos [22-25]. También se utiliza para el tratamiento de la encefalopatía hepática [26] y está reconocido por la EFSA

(Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria), como un sustituto de la sacarosa, para reducir el aumento de la glucosa en sangre y evitar la desmineralización de los dientes [27]. Estas propiedades son debidas a que el lactitol no es digerible y alcanza el colon sin ser hidrolizado, estimulando el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias, es decir, a su carácter prebiótico [28]. Los oligosacáridos derivados del lactitol podrían presentar propiedades bioactivas mejoradas respecto al lactitol.

La formación de oligosacáridos a partir de lactitol mediante una reacción de transgalactosilación se ha realizado haciendo uso de enzimas β -D-galactosidasas de *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae* y β -D-galactosidasas de *Bacillus circulans* como biocatalizadores [26,29, 30].

2.2. ENZIMAS β -GALACTOSIDASAS

Las β -galactosidasas (β -D-galactohidrolasa) son enzimas que hidrolizan residuos de β -D-galactosilo de polímeros, oligosacáridos o metabolitos secundarios. Las β -galactosidasas específicas de polisacáridos incluyen β -galactanasas, que atacan los polímeros pécticos y las β -galactosidasas que atacan xiloglucanos. Estas enzimas tienen dos aplicaciones principales; la eliminación de la lactosa de los productos lácteos para las personas intolerantes a la lactosa y la producción de productos galactosilados [31-33]. También es ampliamente utilizada en la industria alimentaria para mejorar el sabor dulce, la solubilidad, el sabor y la digestibilidad de los productos lácteos [9, 26, 34]. Las principales enzimas industriales se obtienen de *Aspergillus sp.* y *Kluyveromyces sp.* [25, 35-37].

Estas enzimas se clasifican en la familia de glucósido hidrolasa 2 (GH-2) y glucósido hidrolasa 35 (GH-35). Las enzimas de la familia GH-2 se encuentran predominantemente en microorganismos, mientras que cerca del 70% de GH-35 están presentes en las plantas [38-40], funcionan en un rango de pH relativamente amplio dependiendo de la fuente.

2.2.1. Fuentes de enzimas β -galactosidasas

Las β -galactosidasas se encuentran en microorganismos (bacterias, hongos, levaduras), plantas especialmente en almendras, melocotones, albaricoques, manzanas y órganos animales [41, 42]. Las β -galactosidasas están ampliamente distribuidas en los tejidos vegetales. Se ha demostrado que estas enzimas están implicadas en procesos biológicos como el crecimiento de las plantas, la maduración de los frutos y la hidrólisis de la lactosa [53, 54].

La fuente de la cual provengan las enzimas β -galactosidasas tiene influencia en su actividad debido a los cambios en la estructura tridimensional por ejemplo, las enzimas bacterianas son generalmente tetraméricas o monoméricas y mucho más grandes que las enzimas vegetales, que son generalmente diméricas y mucho más pequeñas [43,44]. La Tabla 2 presenta un resumen de los microorganismos productores de β -galactosidasas de acuerdo a su fuente y algunas características.

Tabla 2. Fuentes microbianas de β -galactosidasas [45, 46, 1]

Fuente	Microorganismos productores de β-galactosidasas	Características
Hongos	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. palmi</i> // <i>Aspergillus foetidus</i> , <i>A. fonsecaeu</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. carbonarius</i> // <i>Auerobasidium pullulans</i> // <i>Beauveria bassiana</i> // <i>Curvularia inaequalis</i> // <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> // <i>Mucor meihei</i> , <i>M. pusillus</i> // <i>Neurospora crassa</i> // <i>Paecilomyces varioti</i> // <i>Penicillium conescen</i> , <i>P. chrysogenum</i> // <i>Rhizobium meliloti</i> // <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> // <i>Scopulariopsis sp.</i> // <i>Streptomyces violaceus</i> // <i>Trichoderma reesei</i> .	Tienen generalmente pH óptimo ácido en el intervalo de 2,5-5,4, por lo tanto, son más eficaces para la hidrólisis de lactosa presente en productos ácidos tales como suero de leche. Son enzimas termoestables; sin embargo, son más sensibles a la inhibición por el producto principalmente por la galactosa [47].
Levaduras	<i>Bullera singularis</i> // <i>Candida pseudotropicalis</i> // <i>Saccharomyces anamensis</i> , <i>S. fragilis</i> // <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> , <i>K. fragilis</i> , <i>K. lactis</i> , <i>K. marxianus</i> .	<i>Kluyveromyces lactis</i> es una importante fuente comercial de esta enzima porque su hábitat natural es el medio lácteo [48, 49] y es una de las enzimas más usadas en toda la

		industria [25]. Las lactasas de levadura son más activas en los tampones de pH 6,0-7,0 [50].
Bacterias	<i>Arthrobacter sp.</i> // <i>Bacillus acidocaldarius</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. stearothermophilus</i> // <i>Bacteroides polypragmatus</i> // <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. infantis</i> // <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. thermosulfurogens</i> // <i>Corynebacterium murisepticum</i> // <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>E. cloaceae</i> // <i>Escherichia coli</i> // <i>Klebsiella pneumonia</i> // <i>Lactobacill acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. lacti</i> , <i>L. sporogenes</i> , <i>L. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> // <i>Leuconostoc citrovorum</i> // <i>Pediococcus acidilacti</i> , <i>P. pento</i> // <i>Propionibacteriu shermanii</i> // <i>Pseudomonas fluorescens</i> // etc.	Han sido ampliamente utilizadas para la hidrólisis de la lactosa debido a la facilidad de fermentación, alta actividad de la enzima y buena estabilidad [51]. <i>Bifidobacterium sp.</i> junto con <i>Lactobacillus sp.</i> son las bacterias más aplicadas como probióticos debido a sus posibles beneficios para la salud, la primera ha sido elegida como bacteria modelo para estudiar la fermentación de la lactosa por la microbiota colónica [52].

2.2.2. Mecanismo general de acción para las enzimas β -galactosidasas

Las β -galactosidasas se encuentran en cuatro familias de glucósidos hidrolasas (GH), a saber, GH-1, GH-2, GH-35 y GH-42. Actualmente, alrededor de 1.700 hidrolasas glucósidas se asignan a GH-35 incluyendo β -galactosidasas, exo- β -glucosaminidasas, exo- β -1,4-galactanasas y β -1,3-galactosidasas. Entre ellos, se conocen aproximadamente 700 β -galactosidasas, pero sólo 10 de ellas se han caracterizado estructuralmente usando difracción de rayos X. En ausencia de datos estructurales, la información sobre las fuerzas estabilizadoras en el sitio activo de una enzima se ha deducido a partir de datos espectroscópicos [55].

La reacción enzimática deducida por Douglas Juers (2000) para *E. coli* consiste en dos etapas químicas, galactosilación y degalactosilación. La galactosilación es la primera etapa química en la reacción en la que Glu461 dona un protón a un oxígeno glicosídico, dando como resultado galactosa uniéndose covalentemente con Glu537. En la segunda etapa, la degalactosilación, el enlace covalente se rompe cuando Glu461 acepta un protón, reemplazando la galactosa con agua. Dos estados de transición ocurren en el sitio profundo de la enzima durante la reacción, una vez después de cada paso. Cuando el agua participa en la reacción, se forma galactosa; de lo contrario, cuando otro sustrato, más comúnmente la D-glucosa actúa como aceptor en la segunda etapa, se produce transgalactosilación. Las ubicaciones de dichos residuos en la enzima se pueden observar en la Figura 5. Los iones de potasio monovalentes (K^+), así como los iones de magnesio divalentes (Mg^{2+}) son necesarios para la actividad óptima de la enzima al actuar como estabilizantes. La unión beta del sustrato se escinde por un grupo carboxilo terminal en la cadena lateral de un ácido glutámico [56, 57].

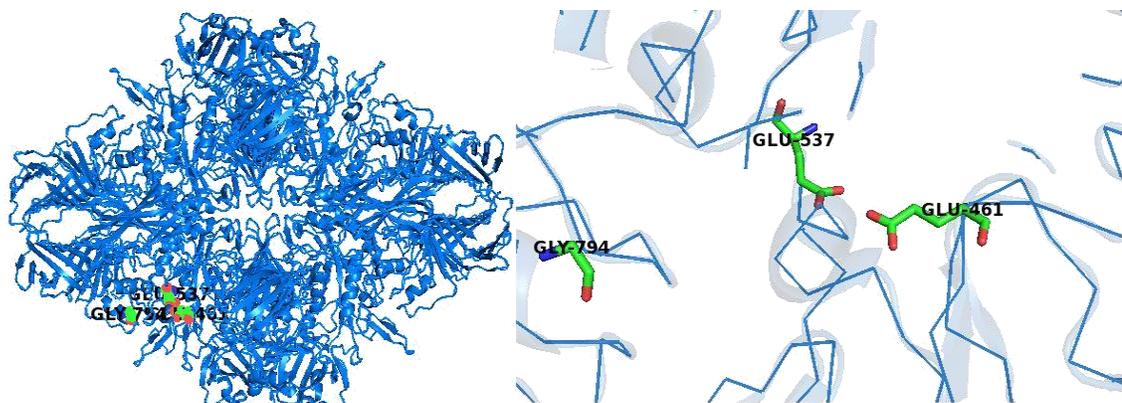


Figura 5. Diagrama de cinta de beta-galactosidasa que muestra la ubicación de Glu 461, Glu 537 y Gly 794 (izq) e interacción entre estos aminoácidos en una forma ampliada (der) [56]

2.3. SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS POR VÍA ENZIMÁTICA

La síntesis de oligosacáridos puede ser catalizada por dos tipos de enzimas, las glicosidasas, con actividad hidrolítica y de transglicosilación, activas frente a sustratos simples como la lactosa o la sacarosa, y las glicosil-transferasas, más específicas, pero que necesitan sustratos modificados como azúcares-nucleótidos encareciendo el proceso [58]. Por este motivo, la mayor parte de los carbohidratos prebióticos se obtienen mediante síntesis enzimática utilizando enzimas del primer tipo, que suelen ser de origen microbiano, provenientes de hongos filamentosos

(*Aspergillus oryzae* y *A. niger*), de levaduras (*Kluyveromyces lactis* y *K. marxianus*) y de bacterias (*Bacillus circulans* y *B. subtilis*). Una de las principales diferencias de estas enzimas es su pH óptimo de actuación, siendo de 3 a 5 para las de origen fúngico y de 6 a 7 para las de levaduras y bacterias [59,1].

En las reacciones de transgalactosilación, utilizando lactosa como único sustrato, la galactosa liberada durante la hidrólisis enzimática se transfiere a la galactosa de otra molécula de lactosa, uniéndose mediante diferentes enlaces glicosídicos β ($1\rightarrow 2$), β ($1\rightarrow 3$), β ($1\rightarrow 4$), β ($1\rightarrow 6$), etc., dependiendo de la fuente de la enzima. De esta manera se originan trisacáridos que pueden ser elongados mediante la adición de nuevas moléculas de galactosa; los grados de polimerización (GP) están comprendidos entre 2 y 8 [25, 9, 60]. Los residuos de galactosa también pueden ser transferidos a una glucosa para formar alolactosa, que es uno de los principales compuestos producidos por algunas enzimas β - galactosidasas a pH neutro [9]. Un resumen muy general de las reacciones que llevan a cabo las enzimas β -galactosidasas se observa en la Figura 6.

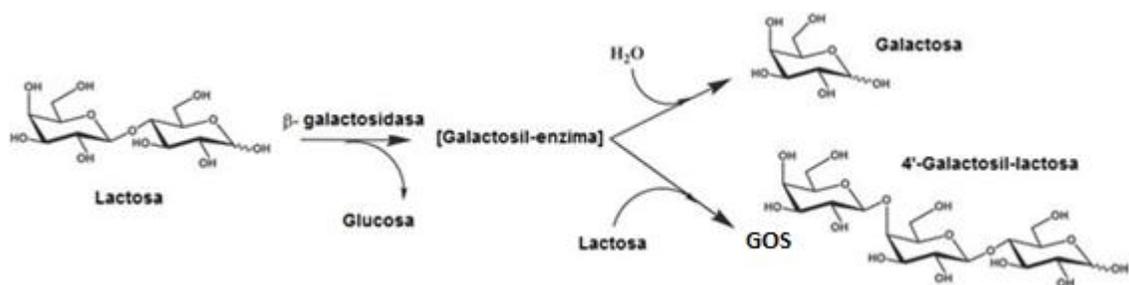


Figura 6. Procesos de hidrólisis / transgalactosilación catalizados por β -galactosidasas. Basado en Colinas (2013)

Estas reacciones dan lugar a mezclas complejas, difíciles de caracterizar, la composición de estas varía dependiendo de una serie de factores tales como el origen del enzima, la concentración de lactosa, la composición del sustrato utilizado y las condiciones de reacción como temperatura, tiempo y pH [25, 60]. En general, las distintas β -galactosidasas favorecen la formación de oligosacáridos con un enlace glicosídico característico, así la enzima de *Bacillus circulans* favorece el enlace β ($1\rightarrow 4$), *Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus oryzae* enlaces β ($1\rightarrow 6$). Este hecho permite sintetizar mezclas de galacto-oligosacáridos (GOS) con distintas propiedades fermentativas y así potenciar la selectividad que se exige a los prebióticos [9, 60]. El rendimiento de los oligosacáridos se puede aumentar mediante el uso de mayores concentraciones de sustrato o la disminución del contenido de agua [81].

En cuanto a la síntesis de compuestos Gal-sorbitol se han llevado síntesis enzimáticas con β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* encontrando 16,8% p/p en materia seca como el mayor contenido de Gal-sorbitol utilizando una solución al 35% (p/v) de lactosa y sorbitol (1:1). La temperatura ha mostrado un efecto mínimo sobre la cantidad del derivado de sorbitol sintetizado. Un aumento en el pH de 6,5 a 9,0 provoca un aumento del 9% en la cantidad de Gal-sorbitol y la presencia de 0,25-0,75 M de NaCl provoca un aumento del 11% en la cantidad del producto sintetizado sin embargo, este aumento en el pH y adición de NaCl disminuye la velocidad de reacción [26].

Por otro lado, más específicamente la formación de oligosacáridos a partir de lactitol mediante una reacción de transgalactosilación se ha realizado antes, es catalizada por β -D-galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, evidenciando seis compuestos trisacáridos que contienen una unidad de lactitol. Aunque tres de éstos se habrían obtenido antes por reducción de la galactosil-lactosa con borohidruro de sodio, no se había descrito su formación durante la hidrólisis del lactitol. Éstos oligosacáridos contenían enlaces β -(1 \rightarrow 3)-, β -(1 \rightarrow 4)-, β -(1 \rightarrow 6), β -(1 \rightarrow 5)- y β -(1 \rightarrow 1) unidos a grupos D-galactopiranosilo, potenciales para aplicaciones alimentarias y farmacéuticas [29].

Así mismo, usando β -D-galactosidasa de *Bacillus circulans* se catalizó la transferencia de unidades de galactosa a varios derivados de glucosa y galactosa, formando enlaces β -(1 \rightarrow 4). La síntesis de varios tri- y tetrasacáridos biológicamente relevantes logró rendimientos de 11-59% mediante la aplicación de esta enzima pero empleando lactulosa y lactitol, como sustratos donores dando lugar a los disacáridos regioisómeros β -(1 \rightarrow 4) y β -(1 \rightarrow 6), en una proporción 1:1 y de rendimientos mucho menores de 15 y 11%, respectivamente. Al emplear el lactitol también se han obtenido como productos secundarios y en trazas: el lactitol monogalactosilado (Trisacárido) β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol y el lactitol digalactosilado (Tetrasacárido), β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol [30].

Recientemente en la síntesis específica de oligosacáridos, se siguen diferentes estrategias para rentabilizar el proceso, debido a que las aplicaciones de la enzima libre fueron limitadas en los procesos industriales con respecto al problema de la inestabilidad y la pérdida rápida de la actividad catalítica durante los períodos de operación y almacenamiento que pueden ser debidos a una autólisis del despliegue o agregación de la proteína, además la eliminación de la enzima libre de la mezcla de reacción para evitar la contaminación del producto [61, 62]. Presentándose la inmovilización de enzimas sobre diferentes tipos de soportes como posible solución,

donde la enzima inmovilizada retiene la actividad bioquímica básica del catalizador libre mientras se asumen las características físicas del soporte.

2.4. INMOVILIZACION DE ENZIMAS β -GALACTOSIDASAS

La inmovilización de enzimas es una técnica ampliamente utilizada en aplicaciones industriales, ya que presenta ventajas tales como: aumento de la estabilidad de las enzimas, posibilidad de re-utilización del biocatalizador y aplicación en sistemas continuos. Las enzimas inmovilizadas se han utilizado principalmente en la producción de alimentos, productos farmacéuticos y otros productos biológicamente importantes [63 - 66].

La inmovilización se define como una unión o el atrapamiento de un biocatalizador en una fase distinta o separada que permite el intercambio de la fase donde se dispersan y/o monitorizan las moléculas de sustrato y/o inhibidor [67]. La inmovilización enzimática se ha estudiado durante varios años, lo que indica un interés continuo en esta área [68 - 70]. Esto es probablemente debido a los beneficios conocidos de la inmovilización enzimática y el deseo de mejorar las matrices y métodos de inmovilización [71, 72]. Los requisitos exactos para la matriz de inmovilización están dictados por el tipo de enzima y la aplicación prevista, siendo el material no degradable y compatible con las enzimas. El proceso de inmovilización también debe ser lo suficientemente suave; debido a que se debe unir tanta enzima como sea posible al soporte pero durante el procedimiento de inmovilización, la enzima no se debe desnaturalizar [73, 74], lo cual conduce muy a menudo a un aumento de la resistencia de las enzimas contra diversos factores desnaturalizantes tales como pH extremo, temperatura, elevada fuerza iónica, desnaturalizantes químicos, proteasas, etc.

La inmovilización elimina además las etapas de purificación posteriores y también disminuye el coste del catalizador de β -galactosidasa en la industria alimentaria [75]. Además, elevados rendimientos de inmovilización, expresión de alta actividad de la enzima unida y estabilización frente a la inactivación por varios parámetros desnaturalizantes son algunos de los puntos importantes que determinan el éxito de cualquier procedimiento de inmovilización en la industria [76]. La Figura 7 muestra varios de los métodos usados actualmente.

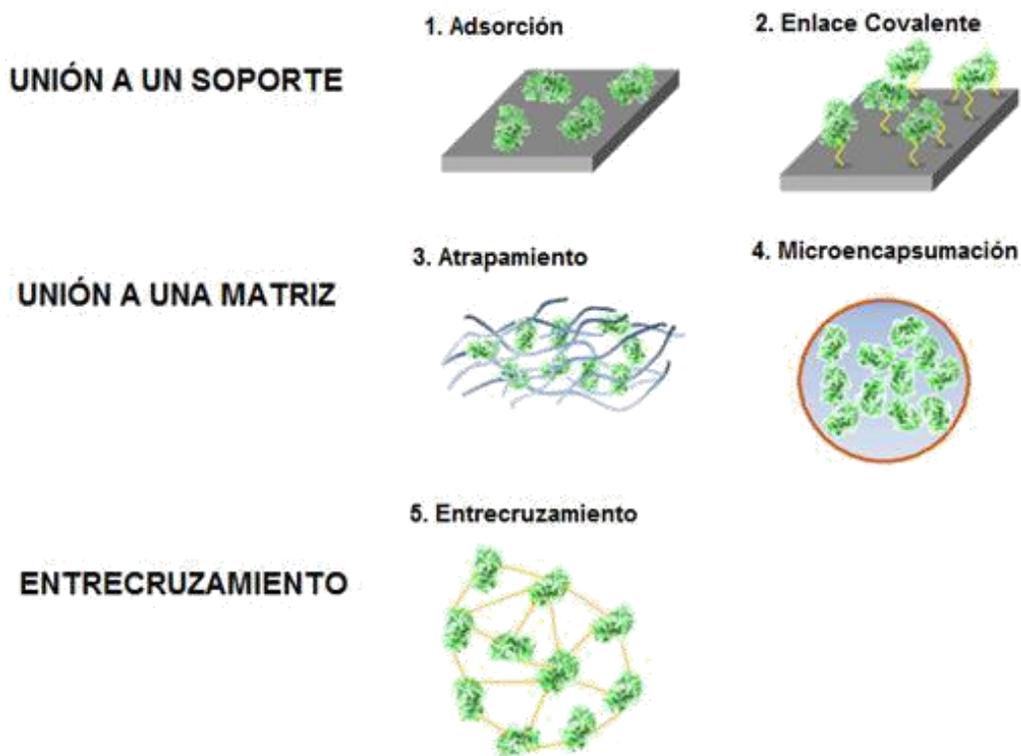


Figura 7. Métodos de inmovilización de enzimas. Basado en [77]

La Tabla 3 describe las características principales y algunos ejemplos de los mecanismos de inmovilización mostrados en la figura anterior.

Tabla 3. Mecanismos de inmovilización de enzimas

<i>Mecanismo</i>	<i>Descripción</i>
Adsorción	Este método se basa en la adsorción física de la enzima en la superficie de los portadores insolubles en el agua. Hay poco o ningún cambio conformacional de la enzima ni la destrucción en su sitio activo tiene lugar. Normalmente no se requieren reactivos y sólo un mínimo de pasos de activación para el proceso de adsorción. El procedimiento es simple y poco costoso [73, 78]. Algunos de los adsorbentes usados frecuentemente para la adsorción incluyen partículas magnéticas, alúmina, bentonita, carbono, carboximetil celulosa, colágeno, DEAE (Dietilaminoetil) celulosa, DEAE sephadex, vidrio, gel de sílice, etc. [79, 80, 58]. Se ha utilizado la adsorción de β -galactosidasa en superficies para la hidrólisis de lactosa en industrias alimentarias [81,82].

<p style="text-align: center;">Enlace Covalente</p>	<p>La unión covalente es un método estable y permanente por el enlace entre el soporte y la enzima, que evita la elución de proteína en la solución. Esto permite una gran flexibilidad en el diseño de una enzima inmovilizada con propiedades físicas y químicas específicas, tales como distribución de carga, relación hidrófoba / hidrófila, separación del brazo, etc. [83]. Sin embargo, los métodos covalentes son relativamente caros y complicados. A veces, el sitio activo de las enzimas puede modificarse a través de las reacciones químicas utilizadas para crear enlaces covalentes [84]. Se han realizado inmovilizaciones covalentes de β-galactosidasas sobre diferentes materiales como sílice, agarosa, tela de algodón, membranas de ultrafiltración, etc. Usualmente se funcionaliza el soporte con glutaraldehído como reactivo enlazante [85 - 90].</p>
<p style="text-align: center;">Atrapamiento</p>	<p>El atrapamiento de enzimas se define como la captura de enzimas en las reticulaciones de un gel semipermeable o en una red polimérica de matrices. Conserva una actividad enzimática muy alta y no requiere ninguna reacción química que conduzca a la inactivación de la enzima. La principal limitación es que la enzima atrapada no puede interactuar con sustratos de alto peso molecular que son incapaces de difundir dentro de la matriz. Por consiguiente, sólo pueden llevarse a cabo reacciones con reactantes y productos relativamente pequeños [58]. Con el fin de evitar la lixiviación de enzimas se ha llegado a la reticulación de estas utilizando reactivos bifuncionales o multifuncionales, preparación de lectina insoluble o la adsorción de enzima sobre partículas de finas [92, 93, 58].</p>
<p style="text-align: center;">Microencapsulación</p>	<p>El tipo de microcápsulas implica un atrapamiento dentro de una membrana semipermeable para la inmovilización de biomoléculas dentro de huéspedes minerales tales como gel de sílice. La preparación de microcápsulas enzimáticas requiere condiciones extremadamente controladas. El biopolímero debe proporcionar un ambiente adecuado para la microencapsulación de enzimas. La elección de una encapsulación ayuda en la eficiencia y preservación de la actividad catalítica [58]. La microencapsulación de las β-galactosidasas en los liposomas puede ser útil para superar la deficiencia del sabor de la leche de lactosa hidrolizada y protegiéndolas de la inactivación por proteólisis [94, 58].</p>

Entrecruza-miento o Reticulación	<p>La reticulación se basa en la formación de enlaces covalentes entre moléculas de enzima, mediante reactivos bifuncionales o multifuncionales, dando lugar a agregados tridimensionales reticulados. Se produce muy poca desorción ya que la enzima está fuertemente unida sin necesidad de soporte de inmovilización. Sin embargo, la reticulación puede causar cambios significativos en el sitio activo de las enzimas y también severas limitaciones de difusión que pueden conducir a una pérdida significativa de actividad. El reactivo más comúnmente utilizado para la reticulación incluye glutaraldehído, además de ácido 2,2'-disulfónico bis-diazobenzidina; diazobenzidina; hexametildiisocianato, etc. [58].</p>
---	---

2.5. SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS POR ENZIMAS β -GALACTOSIDASAS INMOVILIZADAS

La síntesis de oligosacáridos con enzimas inmovilizadas se ha usado principalmente en la producción de galacto-oligosacáridos (GOS), por ejemplo, la β -galactosidasa parcialmente purificada de *Bullera singularis* inmovilizada sobre tela de algodón tosilato se usó para la producción continua de GOS a partir de lactosa, logrando una producción máxima del 27% (p/p) de GOS/lactosa inicial, con una conversión de lactosa del 50% con 500 g/L de concentración inicial. Los trisacáridos fueron los tipos principales de GOS formados, representando más del 70% del GOS total producido en las reacciones. También la β -galactosidasa de *A. oryzae* inmovilizada con quitosano dió un rendimiento máximo de trisacáridos (17,3% del azúcar total) usando 20% (p/v) de lactosa, en 2 horas en comparación con 10% con enzima libre [81].

Además, se ha estudiado un sistema de enzimas inmovilizadas utilizando polietilenimina (PEI), glutaraldehído (GA) y tela de algodón, comparando la producción de galactooligosacáridos en la ultrafiltración de enzimas libres y en sistemas de enzimas inmovilizadas; encontrando en el proceso de inmovilización, aproximadamente un 50% a un 90% de inactivación enzimática con la combinación de PEI y GA. Y los sistemas enzimáticos libres e inmovilizados mostraron una producción de GOS máxima muy similar de aproximadamente 22% y 20% (p/v) a los 15 y 17 minutos con una conversión del 50% para sistemas libres e inmovilizados, respectivamente [81].

Recientemente, se ha propuesto un nuevo tipo de sistema de reactor de membrana cerámica que utiliza β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* inmovilizada para la

producción enzimática continua de GOS a partir de lactosa, que dio como resultado un máximo de 38% (p/p) cuando el tiempo de residencia promedio fue de 24 minutos, con una concentración de lactosa inicial del 30% (p/p) [81].

Se ha determinado además la influencia de los parámetros texturales del sólido y la naturaleza química de sus paredes, además del tamaño y forma de los poros (tipo canal o tipo caja y ventana) son fundamentales a la hora de lograr una inmovilización más efectiva [90]. Así mismo, la actividad de la enzima inmovilizada depende fuertemente del tamaño de partícula de los soportes, puesto que a medida que tamaño aumenta, la actividad enzimática disminuye fuertemente [96]. Por ende se han empezado a usar materiales mesoporosos ordenados (MMO) como soportes para enzimas β -galactosidasas.

2.5.1. En Soportes Mesoporosos Ordenados: MCM-41

En el año 1992, un grupo de investigadores de la empresa Mobil Oil publicó una ruta de síntesis que conducía a una familia de Materiales Mesoporosos Ordenados (MMO) que fue bautizada y patentada con el nombre M41S. Estos silicatos y aluminosilicatos se caracterizan por poseer un sistema poroso ordenado con una estrecha distribución de diámetros en el rango del mesoporo, que según la IUPAC son poros entre 2 y 50 nm, acompañados de elevada área superficial y volumen de poro definido [90, 95].

Desde su descubrimiento, los MMO se han postulado como excelentes soportes de inmovilización de biomoléculas y los pioneros trabajos de Balkus y Díaz (1996) se han probado con una gran variedad de enzimas; por ejemplo, se ha estudiado el comportamiento de enzimas lipasas inmovilizadas covalentemente sobre materiales mesoporosos ordenados (MMO) como MCM-41, SBA-15 y KIT-6 funcionalizados con más de un reactivo enlazante [96].

En términos generales, para la síntesis de un MMO la disolución micelar de un surfactante o tensioactivo se lleva al pH deseado, ácido o básico dependiendo de la naturaleza del surfactante y tras un tiempo de equilibrado se añade el precursor de silicio, generalmente un alcóxido, que suele ser tetraetilortosilicato (TEOS) o tetrametilortosilicato (TMOS) en la mayoría de los casos [91,96]. Este proceso se puede ver de una forma sencilla en la Figura 8.

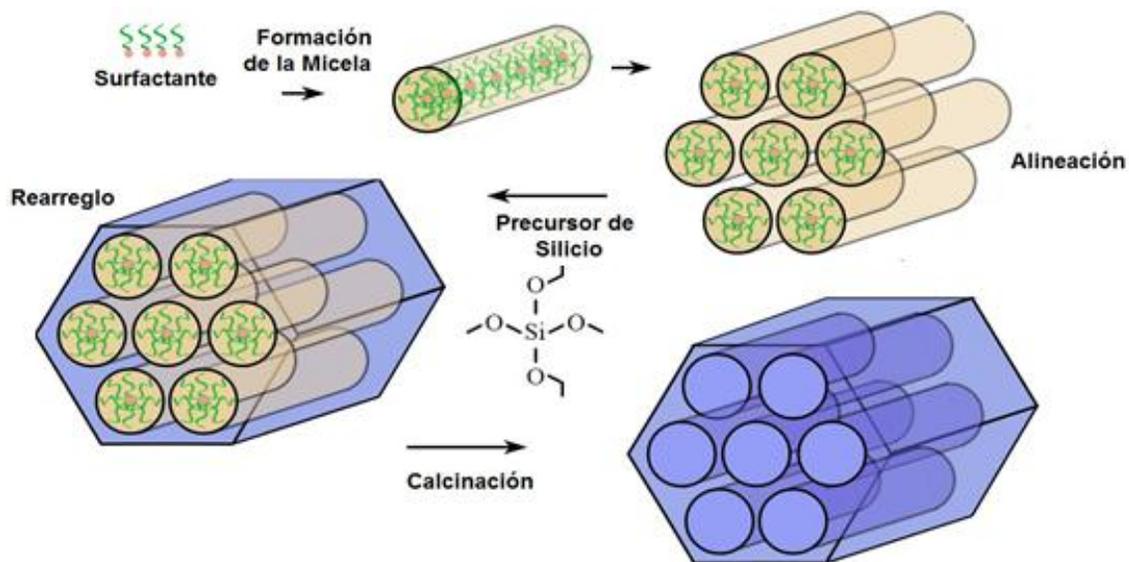


Figura 8. Pasos de síntesis de soportes mesoporosos ordenados. Basado en [96]

Tras un periodo de tiempo variable, durante el cual se produce un precipitado blanco que es ya el precursor de MMO, se introduce la muestra en autoclaves y se somete a un tratamiento hidrotermica que suele desarrollarse en torno a 100°C por un tiempo variable, normalmente no inferior a 24 horas. Esto promueve la condensación del óxido de silicio en las paredes, reduciendo el número de silanoles (especies sin condensar Si-OH) y mejorando la calidad del material en general, su estabilidad hidrotermal y su grado de ordenamiento. Una vez filtrado y secado, el polvo blanco obtenido se somete a una calcinación a alta temperatura bajo una corriente de aire, con el objetivo de eliminar el surfactante del interior y obtener finalmente un material ordenado y poroso.

Sin embargo, las paredes de los MMOs así preparados son de naturaleza amorfa y carecen del ordenamiento cristalino típico de los materiales zeolíticos. Esto hace que tanto la superficie de los poros como las paredes internas estén repletas de defectos estructurales, formados por grupos silanol que no han condensado durante el tratamiento térmico. La presencia de estos grupos permite la sencilla funcionalización de los MMO con una gran variedad de grupos funcionales, incluyendo cadenas hidrofóbicas suponiendo una mejora sobre las sílices amorfas preparadas por métodos sol-gel gracias a sus propiedades texturales [90, 96].

En el caso de la familia M41S el material más estudiado y utilizado es el MCM-41, formado por un empaquetamiento de canales unidireccionales en geometría hexagonal que satisfacen la simetría impuesta por el grupo plano $p6mm$. Posee áreas superficiales próximas a los 1000 m²/g, volúmenes de poro mayores a 0.8

cm³/g y un diámetro muy uniforme y fácilmente ajustable entre 1,5 y 10 nm, aunque típicamente en torno a 4 nm [90,97].

El soporte MCM-41 sintetizado por el método de Aldrich fue caracterizado por Usurriaga (2015). Hallando un área superficial de 1108 m²/g, tamaño de poro de 31,2 Å y volumen poroso de 1,09 cm³/g; este soporte fue usado para la inmovilización covalente de la β-galactosidasa comercial Lactozym®6500 de *Kluyveromyces lactis* para la hidrólisis de lactosa presente en muestras de leche, obteniendo resultados prometedores y evidenciando reusabilidad de hasta cinco ciclos [91]. Siendo el único trabajo donde se inmoviliza una β-galactosidasa en un MMO, abre paso a otras investigaciones basadas en posibles aplicaciones de β-galactosidasas inmovilizadas en MCM-41 como la síntesis de oligosacáridos prebióticos.

2.6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Consecuentemente con los antecedentes presentados, se lleva a cabo en este trabajo la inmovilización covalente de la β-galactosidasa comercial Lactozym®6500 de *Kluyveromyces lactis* y además de Biolactasa NTLx2, β-galactosidasa comercial de *Bacillus circulans* en el soporte MCM-41 considerando que éstas enzimas en forma soluble se han utilizado para obtener derivados galactosilados del lactitol y que este proceso podría resultar más rentable inmovilizando este tipo de enzima en un soporte mesoporoso ordenado. De esta manera, se busca innovar en la síntesis de oligosacáridos por una vía enzimática centrada en la reacción de transgalactosilación en lugar de la de hidrólisis donde se usa como único sustrato el derivado de la lactosa, lactitol. En conjunto, con la obtención de nuevos oligosacáridos a partir del lactitol se podrían proporcionar carbohidratos multifuncionales posiblemente con una metabolización más lenta y por lo tanto, actividad prebiótica. Con este propósito se lleva a cabo un importante estudio de la inmovilización de enzimas β-galactosidasas en soporte tipo MCM-41 para sintetizar oligosacáridos derivados del lactitol según los siguientes objetivos.

3.OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Síntesis de oligosacáridos derivados del lactitol mediante transgalactosilación a partir de la enzima β -galactosidasa comercial Lactozym®6500 (*Kluyveromyces lactis*) inmovilizada en el soporte mesoporoso MCM-41.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Inmovilizar la enzima β -galactosidasa *K. lactis* (Lactozym®6500) comercial sobre soportes de óxido de silicio mesoporoso tipo MCM-41 mediante enlace covalente teniendo en cuenta el grado de inmovilización y la actividad de la enzima inmovilizada.
- Sintetizar oligosacáridos derivados del lactitol (LaOS) con la β -galactosidasa comercial inmovilizada en el material mesoporoso utilizando lactitol como único sustrato.
- Cuantificar y caracterizar los oligosacáridos aislados derivados del lactitol con posible actividad biológica mediante la técnica CG-FID.

4. SECCIÓN EXPERIMENTAL

4.1. PREPARACIÓN DEL BIOCATALIZADOR (β -GALACTOSIDASA/ MCM-41)

4.1.1. Activación del soporte MCM-41

El soporte MCM-41 (Sigma-Aldrich) se sometió a un proceso de activación que constó de varios pasos sucesivos cada uno con condiciones de reacción específicas como se expone en la Figura 9, siguiendo el protocolo de Usurriaga (2015) adaptándolo a microescala y optimizando tiempos y temperaturas de secado. Se inició por pesar 500 mg \pm 1 mg de soporte MCM-41 a los cuales se les adicionaron 5 mL de HNO₃, 10%, dejando evaporar por 30 minutos a 80°C, luego el soporte se lavó con agua MilliQ usando un filtro de 0,2 μ m, dejando secar a 50°C por 1 hora. Posteriormente se añadió 10 mL de 3-aminopropil trietoxisilano (APTES), 15% en acetona, dejando evaporar a sequedad a 50°C para luego lavar con acetona:agua MilliQ (1:3), usando un filtro de 0,2 μ m y dejando secar a 50°C por 30 min. Por último, se agregan 7 mL de glutaraldehído, 2.5%, dejando en agitación por 2 horas para finalmente lavar con buffer de síntesis el MCM-41 activado usando filtro de 0,2 μ m y dejando secar a 50°C por 2 horas.

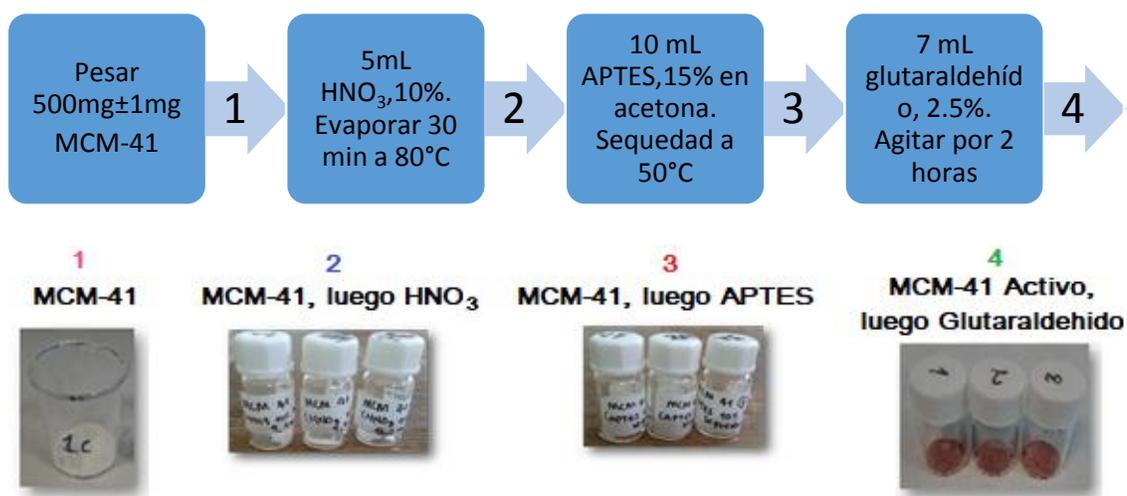


Figura 9. Esquema activación del soporte MCM-41

4.1.2. Purificación de las enzimas β -galactosidasas

Para purificar las enzimas comerciales se utilizaron columnas PD-10 desalinizadoras desechables pre-empaquetadas que contenían 8,3 mL de Sephadex™ G-25 Medium, siguiendo el protocolo de uso de las columnas [98] y Usurriaga (2015) [91]; se usó buffer pH 7 de fosfato de sodio a una concentración 0,05M que contiene cloruro de magnesio 0,005M denominado Buffer de síntesis para como fase móvil. Las soluciones recolectadas correspondían a una dilución enzima/buffer de síntesis 2,4 mL/3,5 mL para la enzima comercial de *Kluyveromyces lactis* Lactozym®6500 y 1,2 mL/3,5 mL para Biolactasa NTLx2, enzima comercial de *Bacillus circulans*, las cuales fueron los dos tipos de enzimas a inmovilizar. La relación enzima/buffer de síntesis fue mayor para la Biolactasa NTLx2 debido a que presentaba una mayor densidad y por ende mayor dificultad para eluir.

4.1.3. Inmovilización covalente de enzimas β -galactosidasas purificadas

El proceso inmovilización de las enzimas purificadas en el soporte mesoporoso activado fue de tipo covalente y se realizó siguiendo la metodología reportada en Usurriaga (2015) y nuevamente adaptándolo a microescala como se muestra en la Figura 10, donde se pesan 500 mg \pm 0,1 mg de soporte activo a los cuales se les adicionan 5 mL \pm 0,01mL de enzima purificada y se dejan en agitación a temperatura ambiente por 14 horas. Luego el sólido se lava con suficiente buffer de síntesis usando un filtro 0,2 μ m y se almacena en nevera para su posterior análisis. Donde se tendría una concentración esperada de 10 μ L de enzima por mg de soporte activo.



Figura 10. Proceso de inmovilización de β -galactosidasas en MCM-41 funcionalizado

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN DEL BIOCATALIZADOR

4.2.1. Caracterización del soporte activado

4.2.1.1. Análisis de espectroscopia infrarroja (FT- IR)

Se tomaron tres muestras correspondientes a los cuatro tipos sólidos obtenidos en proceso de activación, Figura 9; y se almacenaron para su posterior análisis por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier. Esta técnica utilizada para la identificación de compuestos mediante la frecuencia de vibración de los enlaces químicos y es de gran utilidad en la caracterización de materiales mesoporosos ya que confirma la efectividad de los procesos de extracción realizados para la eliminación del surfactante, y permite dar información acerca de los grupos Si-O presentes [99]; además de diferentes grupos funcionales. La región de infrarrojo medio, se encuentra aproximadamente entre 670 y 4000 cm^{-1} , y suele ser utilizada para la determinación de los picos más relevantes en los soportes de sílice mesoporosa [91].

Los sólidos se ubicaron en el accesorio de ATR, el cual funciona mediante la medición de los cambios que se producen en un haz de infrarrojos reflejado internamente cuando el haz entra en contacto con una muestra; eliminando la preparación de las mismas y por ende posibles errores. El análisis se realizó en un espectrofotómetro IR Nicole is10 Thermo Scientific provisto del accesorio de muestreo con reconocimiento automático ATR Smart iTR™ y el software OMNIC. El número de barridos fue de 64 a una resolución de 16 s/cm.

4.2.2. Caracterización de enzimas β -galactosidasas libres purificadas

4.2.2.1. Determinación de la actividad enzimática (Método de DNS)

La actividad de las β -galactosidasas utilizadas, Lactozym®6500 y Biolactasa NTLx2, sobre el sustrato lactitol se determinó mediante la medida de azúcares reductores liberados en la reacción de hidrólisis, en este caso, galactosa. El método se basa en una reacción redox, donde se utiliza ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), de color amarillo, para provocar la oxidación de los azúcares y al mismo tiempo su propia reducción endotérmica a 3-amino-5-nitrosalicílico, color rojo ladrillo [100, 101]; cuya presencia puede determinarse espectrofotométricamente a 540nm.

Para ello se incubaron a 50°C y 1400 rpm por 2 horas preparados enzimáticos de $20\ \mu\text{L}/\text{mL}$ de concentración, en 1 mL de una solución de lactitol a una concentración

de 250 mg/mL en tampón de fosfato sódico 0,05M y 0,005M de $MgCl_2$ y pH 7; realizando tomas de muestras cada 15, 30, 60 y 120 minutos, las cuales se inactivaban con 5 minutos en baño de agua en ebullición. A cada una de las muestras recolectadas se tomaron 20 μL a los cuales se les añadieron 80 μL de agua Milli Q y 100 μL de solución de DNS; esta mezcla se mantuvo en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos, para que se desarrollara la reacción y posteriormente se enfrió rápidamente en baño de hielo, para detener la reacción. A continuación, se añadieron 750 μL de agua y se transfieren a una placa multipocillos para la lectura a 540 nm. En todos los casos se prepararon muestras control o blanco con enzimas a iguales concentraciones, pero previamente inactivadas.

La curva de calibrado se construyó con patrón de galactosa de concentraciones entre 0,03 a 10 mg/mL para determinar la cantidad de este compuesto liberado. El ensayo se realizó por triplicado y finalmente, se calculó la actividad enzimática teniendo en cuenta que la unidad (UE) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de galactosa por mL y por minuto a 50°C y pH 7. La solución de DNS se prepara añadiendo 1 mg del ácido 3,5-dinitrosalicílico en 50 mL de agua tibia, luego, 20 mL de NaOH 2M mientras se agita y 30 g de tartrato de sodio y potasio (Sal de Rochelle) para posteriormente llevar el volumen a 100 mL.

4.2.2.2. Medida del contenido de proteína (Método de Bradford)

El contenido en proteína de los preparados comercial de las β -galactosidasas utilizadas, Lactozym®6500 y Biolactasa NTLx2, se determinó mediante el método colorimétrico del Bradford; el cual utiliza un colorante hidrofóbico, azul de Coomassie, cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico, al unirse a la proteína, origina un color azul intenso que se puede medir espectrofotométricamente a 595nm [102].

Se prepararon tres diluciones de los preparados enzimáticos de β -galactosidasas a 1/10, 1/50 y 1/100. De cada dilución se tomaron 30 μL y se añadieron 600 μL de la solución Bio-Rad, agitándose en vortex y dejándose 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se adicionaron 300 μL de la mezcla en la placa multipocillos y se lee la absorbancia a 595 nm. Paralelamente se construyó una recta de calibrado con albúmina sérica bovina (BSA) de concentraciones entre 0,8 y 0,016 mg/mL. El ensayo se realizó por triplicado. Así se calculó la

concentración de proteína en mg/mL de enzima que permite determinar la actividad específica UE/mg proteína. La solución Bio-Rad se preparó haciendo una disolución 1:2 del BioRad Protein Assay Dye Reagent comercial y agua Milli Q.

4.2.3. Caracterización de enzimas β -galactosidasas inmovilizadas

4.2.3.1. Actividad unida al Soporte (Método de DNS)

La eficiencia está dada por la actividad que presenta la enzima β -galactosidasa luego de la inmovilización, puesto que se necesita asegurar la no desnaturalización de las enzimas o daño sobre su sitio activo en este proceso. La actividad enzimática se determinó mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) teniendo en cuenta que la unidad (UE) se define en este caso como la cantidad de enzima inmovilizada que libera 1 μ mol de galactosa por mg de biocatalizador y por minuto a 50°C y pH 7. Para ello se realizó el mismo procedimiento que el descrito en la sección 4.2.2.1, pero haciendo uso de 20 mg de Lactozym®6500/MCM-41 y Biolactasa NTLx2/MCM-41 que corresponden según el grado de inmovilización a la enzima libre.

El ensayo se realizó por triplicado y la recta de calibración se construyó como se mencionó anteriormente usando patrón de galactosa. De esta manera se calcula la actividad enzimática (UE) en mg de biocatalizador y se halla la eficiencia que corresponde al porcentaje que representa en comparación con la actividad enzimática (UE) en estado libre a esa misma concentración aparente.

4.2.3.2. Proteína unida al Soporte (Método de Bradford)

El porcentaje de inmovilización está dado por la cantidad de enzima que se logró enlazar al soporte, este valor puede ser dado por la cantidad de proteína, en este caso, el contenido de proteína presente en el sólido MCM-41 luego del proceso de inmovilización, el cual, se determinó mediante el método colorimétrico del Bradford usando las soluciones y método descrito en la sección 4.2.2.2; pero en este caso se disolvieron en 1mL de buffer de síntesis cantidades de 5 mg, 10 mg y 20 mg de los biocatalizadores. De cada dilución se tomaron 30 μ L y se añadieron 600 μ L de la solución Bio-Rad, agitándose en vortex y dejándose 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se adicionan 300 μ L de la mezcla en la placa multipocillos y se lee la absorbancia a 595nm.

El ensayo se realizó por triplicado y la recta de calibración se construyó de la misma manera usando albúmina sérica bovina (BSA). De esta manera se calcula la concentración en mg de proteína en mg de biocatalizador y el porcentaje que representa en comparación con los mg de proteína presente en la enzima en estado libre a esa misma concentración aparente.

4.3. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DEL LACTITOL

4.3.1. Usando enzimas β -galactosidasas libres

Para ello se incubaron a 50°C y 1400 rpm por 24 horas, preparados enzimáticos de diferentes concentraciones, Tabla 4; en 1mL de una solución de lactitol comercial distribuido por Carbosynth Limited® a una concentración de 250 mg/mL en tampón de fosfato sódico 0,05M y 0,005M de MgCl₂ y pH 7; tomando alícuotas de 200 μ L cada 0,5; 1,0; 3,0; 6,0 y 24 horas, las cuales se inactivaban con 5 minutos en baño de agua en ebullición y se guardaban en congelación para la derivatización y el posterior análisis mediante cromatografía de gases. Un diagrama general de esto se encuentra en la Figura 11.

Tabla 4. Enzimas libres usadas en síntesis de LaOS y sus concentraciones

Nombre comercial	Fuente	Concentración (μ L/mL)
Lactozym®6500	<i>Kluyveromyces lactis</i>	10 y 20
Biolactasa NTLx2	<i>Bacillus Circullans</i>	10 y20

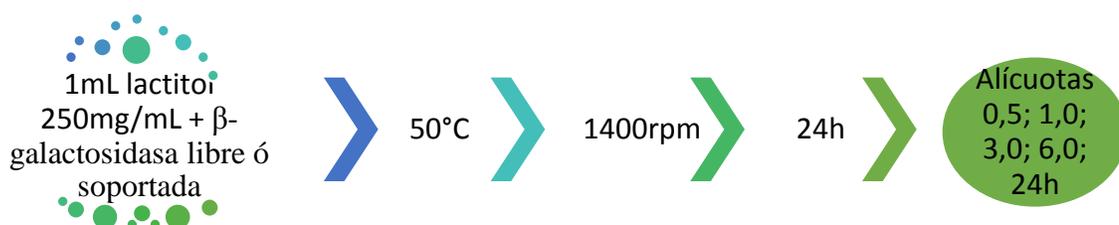


Figura 11. Diagrama de la síntesis de oligosacáridos derivados el lactitol (LaOS)

4.3.2. Usando β -galactosidasas inmovilizadas

La síntesis se realizó usando los biocatalizadores inmovilizados obtenidos en la sección 4.1.3, usando 50 mg de cada uno que corresponden a la enzima libre según el grado de inmovilización. Éstas fueron incubadas a 50°C y 1400 rpm por 24 horas,

en 1 mL de una solución de lactitol comercial distribuido por Carbosynth Limited® a una concentración de 250 mg/mL en tampón de fosfato sódico 0,05 M y 0,005 M de MgCl₂ y pH 7; realizando tomas de alícuotas de 100 µL cada 0,5; 1,0; 3,0; 6,0 y 24 horas, las cuales se inactivaban con 5 minutos en baño de agua en ebullición y se guardaban para la derivatización y el posterior análisis mediante cromatografía de gases, de la misma manera que con las enzimas libres.

4.3.3. Evaluación de reúsos

Se realizaron reacciones de síntesis continuas, tipo batch, usando 20 mg de Lactozym®6500/MCM-41 y 20 mg Biolactasa NTLx2/MCM-41 debido a que fue la cantidad con la cual se hizo el cálculo inicial de la actividad enzimática. Ésta cantidad de enzimas inmovilizadas se incubó a 50°C y 1400 rpm por 2 horas en 1 mL de una solución de lactitol a una concentración de 250 mg/mL en tampón de fosfato sódico 0,05M y 0,005M de MgCl₂ y pH 7; una vez transcurrido el tiempo se retiraba del medio de reacción y se centrifugaba por 3 minutos a 10.000 rpm y el sobrenadante se guardaban en nevera para la subsiguiente medición de azúcares reductores por el método de DNS y por otro lado, el sólido se lavó con 1 mL de buffer de síntesis y bien, se iniciaba de nuevo el proceso de síntesis y si era el caso se almacenaba en nevera. La Figura 12 resume el proceso llevado a cabo en esta sección.

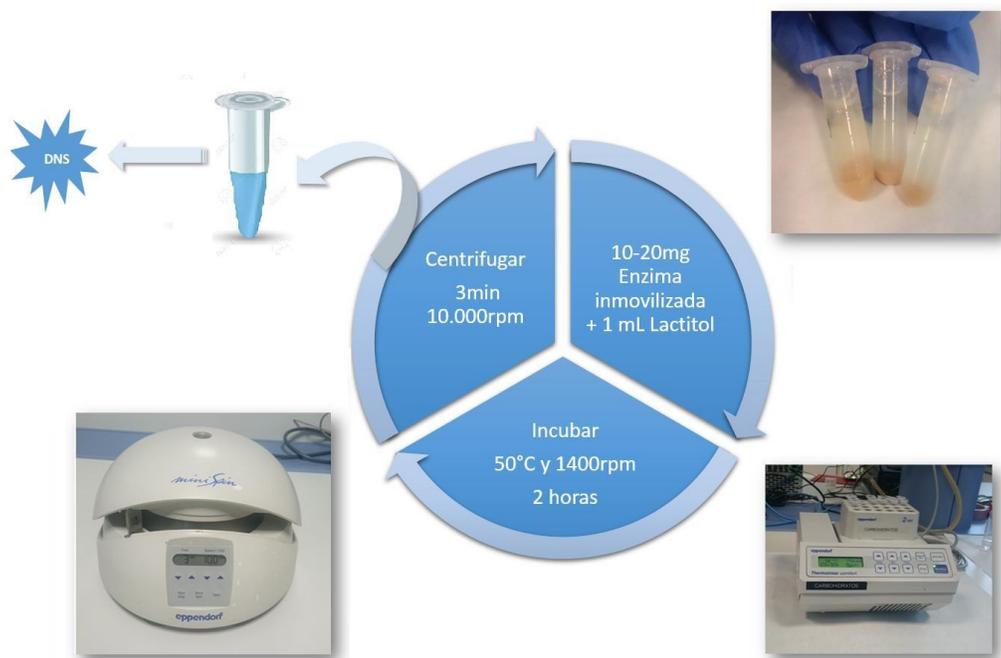


Figura 12. Diagrama para la Re-utilización de los biocatalizadores sintetizados

Los diagramas de esta sección fueron diseñados y hechos en SmartArt Microsoft® Word® 2013 MSO parte de Microsoft Office Professional Plus 2013 especialmente para este trabajo y se usaron imágenes originales de los procesos que fueron realizados. Las estructuras y reacciones se realizaron usando el programa ACD/ChemSketch (Freeware 2012) ACD/Labs®.

4.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE SÍNTESIS

El análisis de los oligosacáridos obtenidos en las mezclas de síntesis se realizó por cromatografía de gases (GC) siguiendo el método descrito por Ruiz-Matute (2012). Para ello se tomaron alícuotas de 20 μL que contenían 5 mg de carbohidratos de las mezclas de reacción y se llevaron a un matraz de corazón junto a 400 μL de β -fenilglucósido, utilizado como patrón interno (PI), preparado a una concentración de 0,5 mg/mL. En el caso de las muestras blanco se tomaron alícuotas de 50 μL luego de hacer una disolución 1/10. Estas mezclas, se llevaron a sequedad en un rotavapor, a 40°C. Para formar las trimetilsilil oximas (TMSO) derivados de los carbohidratos, se siguieron las siguientes etapas:

- a. Adición de 250 μL de cloruro de hidroxilamina al 2,5% en piridina, seguido de dos etapas de 15 min de incubación en estufa a 70°C.
- b. Adición de 250 μL de hexametildisilaxano y 25 μL de ácido trifluoroacético, seguidos de un periodo de 30 minutos de incubación en estufa a 50°C.

Estas reacciones se realizaron con agitación intensa para garantizar una correcta formación de los derivados. Por último, se centrifugó la muestra a 10.000 rpm durante 3 minutos y se recogió el sobrenadante en un vial para ser inyectado en el cromatógrafo. La cuantificación de los carbohidratos se realizó por el método del patrón interno y para calcular los factores de respuesta (f) se prepararon mezclas de patrones de galactosa (monosacáridos), sacarosa (disacáridos), rafinosa (trisacáridos), sorbitol y lactitol a distintas concentraciones de (2-0.005 mg/mL) y β -fenilglucósido (PI, 0.2 mg).

El análisis se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y empleando nitrógeno como gas portador a un flujo de 1 mL/min. Se utilizó una columna capilar

(SGE HT5 Aluminum Clad Fused Silica Capillary Column), de dimensiones 12 m x 0,32 mm x 0,10 μm (North Harrison Road, Bellefonte, EEUU). La temperatura del inyector fue de 280°C y la del detector 385°C. La temperatura inicial del análisis fue 150°C y la final 300°C, con una rampa de temperatura de 3°C/min. La adquisición y el tratamiento de los datos se llevaron a cabo utilizando el software Agilent ChemStation (Wilmington, DE, EEUU) [9, 91, 103, 104].

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL BIOCATALIZADOR

(β -GALACTOSIDASA /MCM-41)

5.1.1 Caracterización del soporte activado

El proceso de activación del soporte, constó de varias etapas de reacción sucesivas con condiciones específicas, en la Figura 13 se esquematiza la secuencia sintética usada para la activación del soporte MCM-41 descrita en la sección 4.1.1.

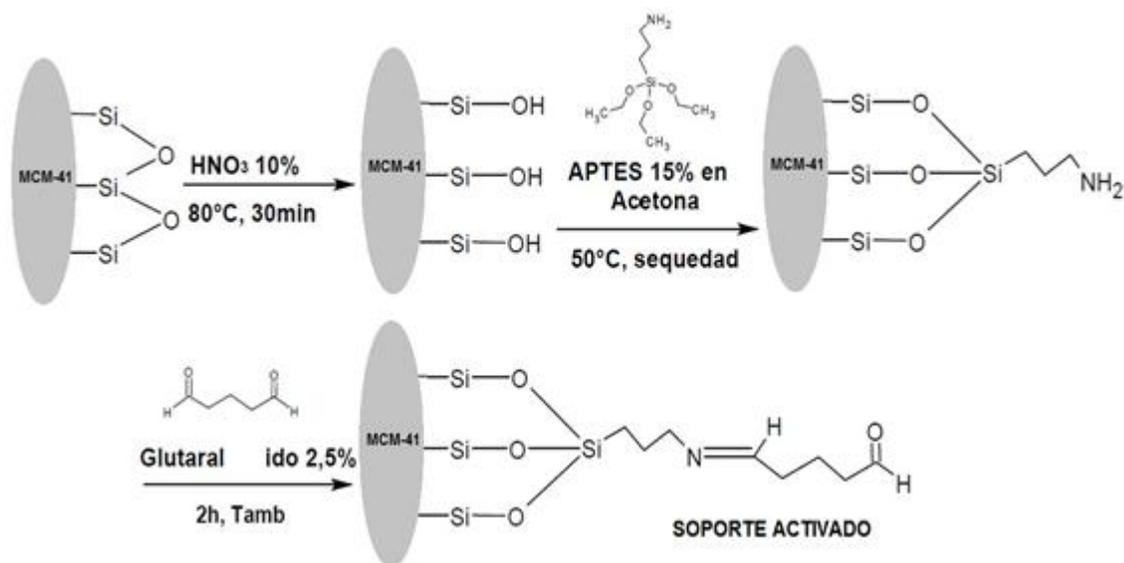


Figura 13. Reacciones del proceso de activación de MCM-41

En el primer paso de reacción se liberan los grupos hidroxilo del soporte mesoporoso por adición de ácido fuerte y temperatura, en una segunda etapa estos grupos reaccionan con los grupos etoxi del 3-aminopropil trietoxisilano (APTES) uniéndose esta molécula al soporte y quedando el grupo amino libre, que finalmente el cual reacciona con el siguiente reactivo, el glutaraldehído, que se une al soporte por el ataque nucleofílico del nitrógeno al carbono del grupo carboxilo formando una imina y dejando el grupo aldehído como grupo funcional del soporte en estado activo. Para analizar el proceso de activación se realizaron mediciones IR-FT a muestras tomadas al inicio y final de la activación además de en medio de cada paso; buscando confirmar los cambios en grupos funcionales según las reacciones. Los espectros encontrados se evidencian en la Figura 14.

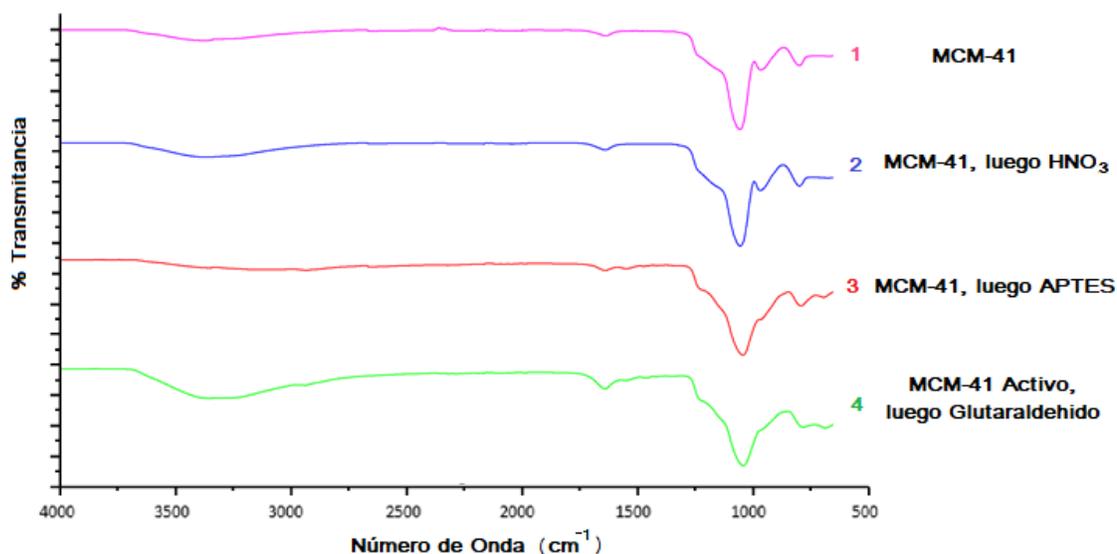


Figura 14. Espectros IR para la activación de MCM-41.

El espectro (1) de MCM-41 sin funcionalizar muestra una banda a 3380 cm^{-1} de poca intensidad asociada a la vibración de tensión de grupos Si-OH y -OH que correspondería a agua remanente cuya presencia se corrobora por la banda en 1633 cm^{-1} que corresponde a la flexión de los enlaces H-O-H [91, 105]. Además presenta bandas características de sílice mesoporosa como la banda intensa en 1052 cm^{-1} atribuida al estiramiento de los enlaces Si-O-Si además en 795 y 961 cm^{-1} bandas características para la flexión de enlaces tipo silanol Si-OH [106]. Por esto, en el espectro (2) de MCM-41 activado con ácido, se observa una mayor intensidad en estas bandas evidenciando una mayor cantidad de grupos silanoles libres en el soporte. Se observa además el solapamiento de la banda 1043 cm^{-1} probablemente con la banda que aparecía en 961 cm^{-1} , debido a la disminución de los enlaces Si-O-Si y al aumento de los Si-OH; esto se comprueba también con el ligero desplazamiento de ésta banda hacia menores longitudes de onda.

En el espectro (3) de MCM-41 luego de la adición APTES se observan bandas a 1634 , 1039 , 788 y 684 cm^{-1} propias de la sílice ligeramente disminuidas y bandas extras en 3289 cm^{-1} de poca intensidad y 1553 cm^{-1} debidas a la presencia de extensión y flexión de enlaces N-H de los grupos amino [106]. Y por último, en el espectro (4) de MCM-41 funcionalizado con glutaraldehyde, se observan conjuntamente con las bandas del material silíceo las bandas 2940 cm^{-1} y 1494 cm^{-1} debidas a los estiramientos y flexiones de los enlaces C-H saturados. También la banda de 3359 cm^{-1} aumentó su intensidad mientras las bandas en 1638 cm^{-1} , 1037 cm^{-1} , 794 cm^{-1} y 684 cm^{-1} se mantuvieron estables.

En resumen, las señales de los espectros IR corroboran cualitativamente la funcionalización del soporte aunque no dan cuenta de la cantidad de silanoles remanentes en la estructura del MCM-41. Por otro lado, se obtuvieron tres espectros idénticos por cada paso de la funcionalización debido a que cada proceso se realizó por triplicado, Figura 15.

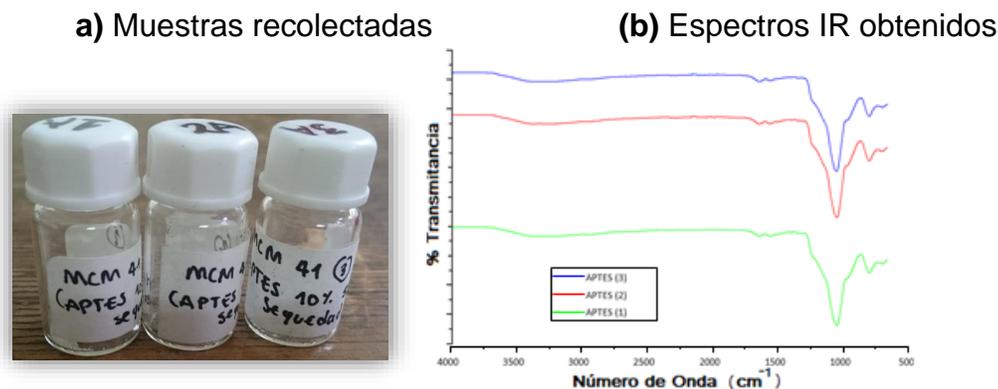


Figura 15. Resultados de la funcionalización con 3-aminopropil trietoxisilano

Tras la inmovilización, se obtuvieron biocatalizadores de coloración rojiza (Figura 16) que fueron almacenados en nevera para su posterior uso en la síntesis de derivados del lactitol. Cabe resaltar, que aunque el proceso fue descrito anteriormente en Usurriaga (2015), no había sido realizado a microescala con cantidades máximas de entre 200 y 500 mg de soporte activo lo cual a pesar de las dificultades en el pesaje conlleva a un ahorro de reactivos y costos. Se observó además que es un proceso sencillo a condiciones de reacción suaves de apenas 250 rpm y temperatura ambiente.



Figura 16. Biocatalizadores sintetizados

En el proceso de inmovilización, reaccionan los grupos carbonilos del soporte activo con los grupos amino terminales de las enzimas β -galactosidasas purificadas, llevándose a cabo una reacción de condensación que culmina con la formación de un enlace tipo imina y la eliminación de una molécula de agua, como se muestra en la Figura 17.

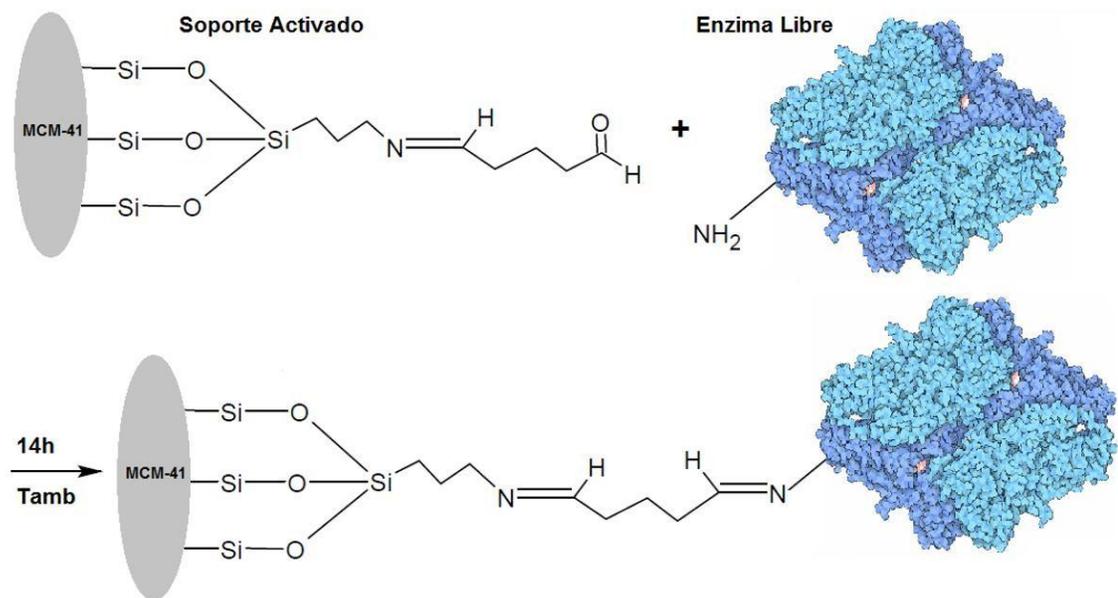


Figura 17. Reacciones del proceso de Inmovilización Covalente (Imagen de β -galactosidasa tomada de [107])

5.1.2. Caracterización de enzimas β -galactosidasas libres e inmovilizadas

Inicialmente, las enzimas fueron purificadas usando columnas de desalinización PD-10 que contienen Sephadex G-25 Medium; éstas se usan para el desalado, el intercambio de tampones y la limpieza de muestras, donde pequeñas moléculas como sal y otras impurezas se separan eficientemente de las sustancias de alto peso molecular de interés [98]; en este caso las enzimas de la solución salina en la que encuentran comercialmente. Posteriormente para caracterizar una solución enzimática es importante saber cuál es su actividad y que tanta proteína contiene; de esta manera se pueden comparar por ejemplo, con biocatalizadores inmovilizados. De esta manera, se llevó a cabo en este trabajo la caracterización comparativa de las enzimas purificadas libres e inmovilizadas en el soporte MCM-41.

5.1.2.1. Actividad enzimática

Al poner en contacto los preparados enzimáticos con la solución de lactitol se lleva a cabo la reacción de hidrólisis de éste; obteniendo como resultado sorbitol y galactosa (Figura 18). Esta es la primera parte de la prueba, debido a que se espera una actividad constante de la enzima y por ende una concentración creciente de

productos por esto se retiraron alícuotas cada 15, 30, 60 y 120 minutos. La segunda parte la prueba es la realización de la reacción con el reactivo DNS y finalmente, en una tercera parte, se mide espectrofotométricamente.

En este caso se hizo el seguimiento a la molécula de galactosa, debido a que es un azúcar reductor y existen varias pruebas espectrofotométricas sencillas para detectarlo. En la segunda parte de la prueba, la galactosa obtenida es puesta a reaccionar con un volumen constante de una solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico que contiene el medio necesario para llevar a cabo la reacción redox endotérmica que genera el 3-amino-5-nitrosalicílico (Figura 19a), éste compuesto presenta una coloración característica; así, una mayor coloración indica una mayor concentración de galactosa, como se muestra en la Figura 19b.

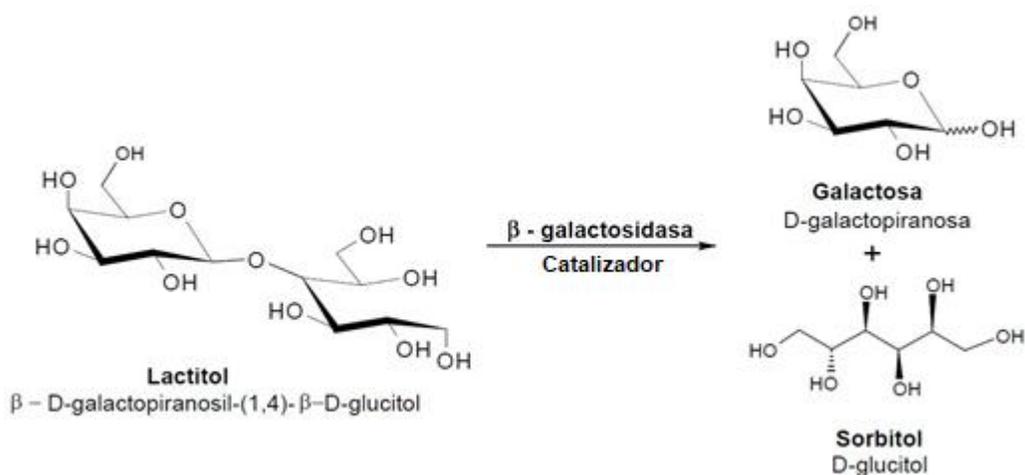


Figura 18. Esquema de reacción de hidrólisis de una β -galactosidasa

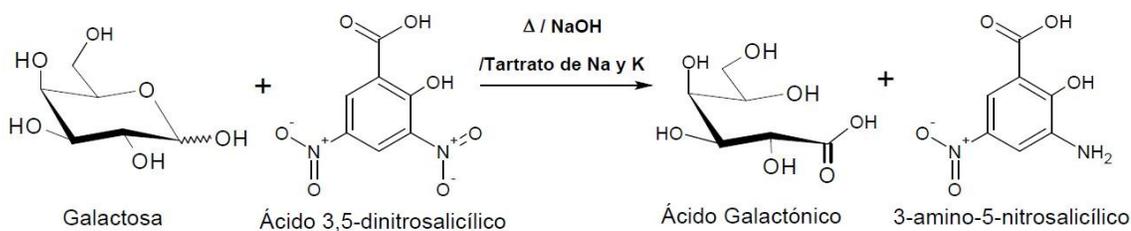


Figura 19. a) Esquema de reacción Método de DNS

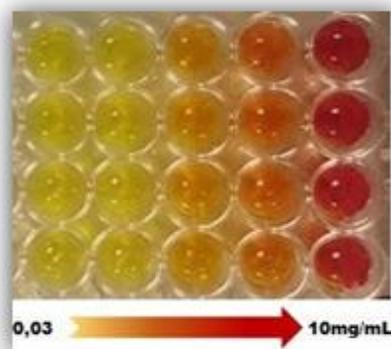


Figura 19. Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) **b)** Fotografía resultado de la curva patrón de galactosa en placa multipocillos

Los resultados de absorbancias se calcularon usando patrones de galactosa con concentraciones entre 0,03 a 10mg/mL, como se observó en la figura anterior; obteniendo la recta de calibrado $y = 0,102x - 0,014$ con un R^2 de 0,9941 para las enzimas en estado libre y $y = 0,1714x - 0,043$ con un R^2 de 0,9952 para los biocatalizadores inmovilizados. Los ensayos se realizaron por triplicado. La unidad para la actividad catalítica es el katal (kat) según el Sistema Internacional de Unidades, pero es una unidad demasiado grande y suele usarse la actividad enzimática (UE) siendo, 1 μmol sustrato convertido por minuto, en este caso 1 μmol de galactosa por mL y por minuto a 50°C y pH 7. La ecuación usada fue la siguiente:

$$Ec. 1. UE = \frac{[Gal] \times 1000 \times V_{solución}}{PM_{Gal} \times 15 \times V_{enzima}}$$

Donde, [Gal] se refiere a la concentración de galactosa hallada que se encuentra en miligramos/ mililitro (mg/mL). V_{enzima} corresponde al volumen de enzima añadido y por ende, $V_{solución}$, al volumen usado del sustrato más en volumen añadido de enzima; en este trabajo; 1,0 mL de solución de lactitol en buffer de síntesis y 0,02 mL de enzima. Otros valores constantes en la ecuación son 1000, factor de conversión de miligramos a microgramos y PM_{Gal} , peso molecular de la galactosa en gramos (g). Las actividades enzimáticas encontradas usando el método de mínimos cuadrados y posteriormente la Ecuación 1 para cada una de las enzimas β -galactosidasas libres e inmovilizadas se encuentran condensados en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados Actividad Enzimática

Enzimas	LIBRE	INMOVILIZADA	% Actividad Unida a soporte MCM-41
	UE (μ mol galactosa/ min. mL enzima)	UE (μ mol galactosa/min. mg soporte)	
Lactozym®6500	34,90	12,19	34,9
Biolactasa NTLx2	49,52	9,86	19,9

Las actividades enzimáticas de mayores valores se encontraron con las enzimas libres, debido a que tienen todos sus grados de libertad. Además, se observa que los biocatalizadores inmovilizados aunque menores, también presentaron actividad sobre lactitol, lo cual no ha sido reportado antes, obteniendo valores de 12,19 y 9,86 UE para el Lactozym®6500/MCM-41 y BiolactasaNTLx2/MCM-41, respectivamente. Por otro lado, al considerar la actividad encontrada con las enzimas libres como el 100%, se logra unir un 34,9% de esta actividad en el caso de Lactozym®6500 y un 19,9% para la BiolactasaNTLx2 en el soporte MCM-41.

Este resultado es consecuente con lo reportado en la bibliografía, puesto que se ha evidenciado que mediante la unión covalente las enzimas pierden parte de su actividad [58, 84-89]. La diferencia entre los porcentajes de actividad unida al soporte entre las enzimas β -galactosidasa se pueden deber a el método de inmovilización; puesto que éste ha sido probado antes con Lactozym®6500 [91], se espera una mejor unión; y ésta es la primera vez que se ha soportado la BiolactasaNTLx2 en el soporte mesoporoso MCM-41.

5.1.2.2. Medida del contenido de Proteína

Se calculó el contenido en proteína de los preparados comerciales de β -galactosidasas y en los biocatalizadores inmovilizados mediante el método de Bradford donde se pasa de una coloración café a azul debido a la unión del colorante azul de Comassie con la proteína en un entorno hidrofóbico; por esto entre más intenso es el color azul, mayor va a ser la concentración proteica como se observa en la Figura 20.

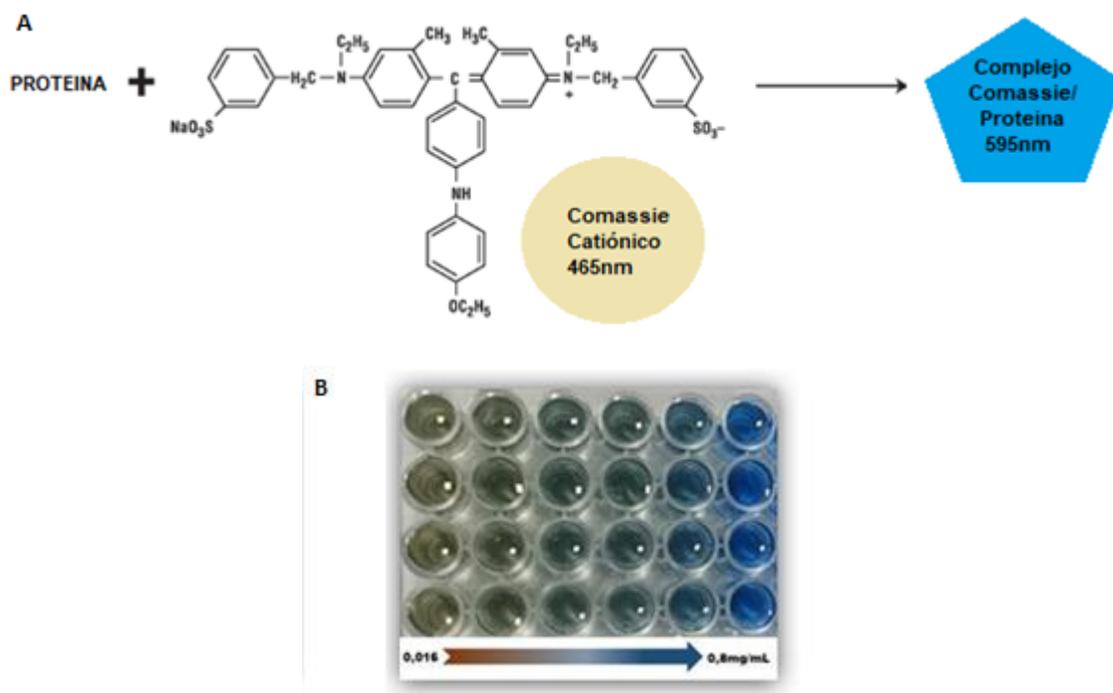


Figura 20. Método de Bradford **a)** Principio del método de Bradford y **b)** Fotografía resultado de la curva patrón de galactosa en placa multipocillos

Luego, haciendo uso de una recta de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) de concentraciones entre 0,8 y 0,016 mg/mL se llegó a la recta $y = 1,4398x + 0,0483$ con un R^2 de 0,9917 para las enzimas libres y $y = 1,2954x + 0,0594$ con un R^2 de 0,9955 para la enzimas soportadas. Los resultados se encuentran condensados en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados Contenido de proteína

Enzimas	LIBRE (mg Proteína/ mL enzima)	INMOVILIZADA (mg Proteína/ mg soporte)	% Proteína Unida a soporte MCM-41
Lactozym®6500	0,77	0,53	68,83
Biolactasa NTLx2	0,84	0,47	55,95

Considerando la proteína encontrada con las enzimas libres como el 100%, se observa que en ambos casos se logró inmovilizar más del 50% de enzimas β -galactosidasas que se encontraban en solución, alcanzando un mayor porcentaje de proteína enlazada de la enzima Lactozym®6500 (68,83%) que de Biolactasa NTLx2 (55,95%); a pesar de esto, los resultados son bastante favorables, al lograr enlazar covalentemente por medio de un enlace tipo imina al soporte MCM-41 una enzima β -galactosidasa de otra fuente (Biolactasa NTLx2, *Bacillus circulans*).

Luego de conocer el contenido proteico de una solución enzimática o de un biocatalizador inmovilizado, se calcula la actividad específica, ésta se refiere a la actividad de una enzima por miligramo de proteína, y se suele expresar en μmol de sustrato obtenido por minuto y además por mg. Esta unidad da una idea de la pureza de la enzima debido a que las soluciones enzimáticas comerciales generalmente contienen además proteínas inertes, ácido nucleicos, etc.; que no representan ninguna actividad, por esto es útil también calcular la concentración proteica de las enzimas β -galactosidasas libres. En el caso de las enzimas inmovilizadas sirve para conocer el porcentaje de la inmovilización definida en este caso como la cantidad de enzima inmovilizada que libera 1 μmol de galactosa por mg de biocatalizador y por minuto a 50°C y pH 7. Por esto, en adición, se calculó la actividad específica, haciendo uso de la ecuación 2.

$$\text{Ec. 2. } UE/mg = \frac{UE}{[Proteína]}$$

Donde, [Proteína] se encuentra en miligramos de proteína por mililitro de enzima (mg/mL). Esta nueva unidad permite hacer una comparación directa entre las β -galactosidasas libres e inmovilizadas debido a que no incluye la fase en la que se encuentra la enzima como μL de preparado enzimática o mg de soporte. Los valores encontrados se encuentran en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados Actividad específica

Enzimas	UE/mg ($\mu\text{mol galactosa min. mg proteína}$)
Lactozym®6500	45,33
Biolactasa NTLx2	58,95
Lactozym®6500/MCM-41	23,01
Biolactasa NTLx2/MCM-41	18,60

Se observa cómo entre las enzimas libres se alcanzó una mayor actividad específica; la Biolactasa NTLx2 (58,95 UE/mg) por encima de Lactozym®6500 (45,33 UE/mg); esto se debe a que provienen de diferentes fuentes *Bacillus circulans* que es una bacteria y *Kluyveromyces lactis* que es una levadura, respectivamente. Puesto que se sabe que la β -galactosidasa de *B. circulans* produce una cantidad más abundante de los oligosacáridos que la β -galactosidasas de *Kluyveromyces spp* [115]. Por el contrario para las enzimas inmovilizadas se encontró una mayor actividad específica para Lactozym®6500/MCM-41 (23,01 UE/mg), lo cual era predecible debido a que alcanzó valores más altos de actividad enzimática y de cantidad proteica unida al soporte que para Biolactasa NTLx2.

Para mostrar de una forma más clara los resultados de actividad específica encontrada para las enzimas libres e inmovilizadas se presenta la Figura 21.

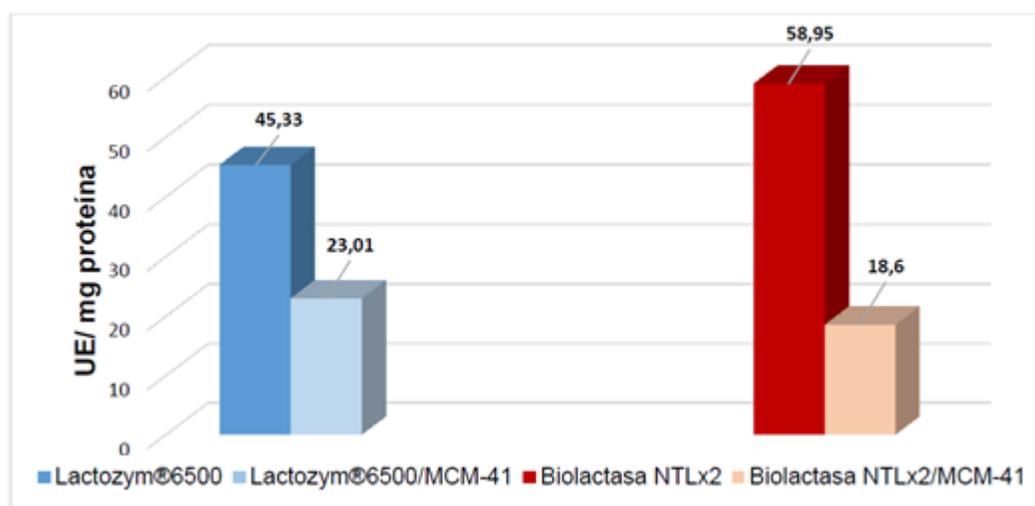


Figura 21. Actividad específica de β -galactosidasas comerciales libres e inmovilizadas

Se visualiza que la β -galactosidasa Biolactasa NTLx2 proveniente de *Bacillus circulans* alcanzó la mayor actividad específica (58,95 UE/mg) aún sin encontrarse en sus condiciones de pH óptimo, esto se debe a que existen otros factores que influyen de manera significativa en la acción de las enzimas, como por ejemplo, el sustrato, puesto que la interacción con la estructura del sustrato y la enzima influencia no solo el porcentaje sino también juega un rol vital en la formación de los productos [30]. Al inmovilizarse, formando la Biolactasa NTLx2/MCM-41 se presentó la menor actividad específica (18,60 UE/mg); este resultado es coherente con lo encontrado previamente para esta β -galactosidasa soportada; debido a que se logró unir 55,95% de Biolactasa NTLx2 libres al soporte pero en este proceso pudieron sufrir cambios conformacionales o desnaturalización que llevaron a conservar sólo un 19,9% de actividad enzimática inicial, lo cual se ve reflejado en una menor actividad específica final.

Por otro lado, el Lactozym®6500 aunque presentó una menor actividad específica (45,33 UE/mg) al inmovilizarse, formando el Lactozym®6500/MCM-41 no disminuyó significativamente su actividad específica (23,01 UE/mg) debido a que se logró unir una mayor cantidad de proteína (68,83%) y una mayor cantidad de actividad enzimática (34,9%); lo cual se ve reflejado en una actividad específica final superior. Los resultados obtenidos para la obtención de los biocatalizadores inmovilizados BiolactasaNTLx2/MCM-41 y Lactozym®6500/MCM-41 se encuentran resumidos en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de resultados para obtención del Biocatalizador

Enzima unida al soporte	Proteína unida al soporte		Actividad unida al soporte		Actividad específica unida al soporte (UE/mg)
	mg/mg	% ^a	UE/mg	% ^b	
	MCM-41		MCM-41		
Lactozym®6500	0,53	68,83	12,19	34,9	23,01
BiolactasaNTLx2	0,47	55,95	9,86	19,9	18,60

^a Cantidad de proteína inmovilizada expresada como porcentaje de la cantidad proteína aplicada (rendimiento de inmovilización por proteína).

^b Cantidad de actividad inmovilizada expresada como porcentaje de la cantidad de actividad aplicada (rendimiento de actividad aplicada).

En resumen se lograron inmovilizar dos tipos de enzimas β -galactosidasas comerciales Lactozym®6500 y BiolactasaNTLx2 en el soporte mesoporoso ordenado MCM-41, lo cual cumple el primer objetivo propuesto y además es de gran importancia debido a que, el Lactozym®6500 ha sido soportado antes sobre MCM-41, encontrando que sólo un 5 % del biocatalizador estaba compuesto por la enzima [91] pero sin datos específicos de concentración proteica o actividad específica del biocatalizador sintetizado, por lo cual este trabajo amplía el conocimiento que se tenía hasta el momento del catalizador Lactozym®6500/MCM-41 y en adición, no se conocen hasta el momento reportes de BiolactasaNTLx2 en MCM-41. Resaltando además que el biocatalizador BiolactasaNTLx2/MCM-41 logró una actividad específica cercana al Lactozym®6500/MCM-41 a pesar de tener menor cantidad de enzima inmovilizada.

Así, luego de cumplir el primer objetivo del trabajo que era inmovilizar las enzimas β -galactosidasas Lactozym®6500 y BiolactasaNTLx2 mediante enlace covalente teniendo en cuenta el grado de inmovilización (porcentaje de proteína unida al soporte 68,83% y 55,95%, respectivamente) y la actividad de la enzima inmovilizada (porcentaje de actividad específica unida al soporte 23,01% y 18,60%, respectivamente), donde se midió la actividad hidrolítica sobre el lactitol debido a que sería proporcional a la actividad transgalactosidasa, siendo ésta bien conocida desde Mahoney (1998), la que permite la síntesis de oligosacáridos derivados del lactitol (LaOS); es decir, si la enzima presenta una actividad hidrolítica alta, así mismo será su actividad transgalactosidasa. Por esto, luego de comprobar que los dos tipos de enzimas tenían actividad hidrolítica sobre el lactitol (liberando galactosa que se midió por el método de DNS) era necesario hacer un análisis de todas las mezcla de reacción para conocer el tipo de oligosacáridos (mono-, di-, tri-sacáridos) que se están sintetizando, midiendo el contenido de carbohidratos en el tiempo de reacción; dando paso al segundo y tercer objetivo del trabajo, la síntesis de LaOS con las β -galactosidasas comerciales inmovilizadas y libres utilizando lactitol como único sustrato y su medición por medio de la técnica CG-FID.

5.2. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DEL LACTITOL (LaOS)

Las condiciones elegidas para llevar a cabo las reacciones enzimáticas se seleccionaron basándose en estudios previos sobre la obtención de fructo-oligosacáridos (FOS) [44] y de galacto-oligosacáridos (GOS) [108] debido a que las

enzimas β -galactosidasas pueden realizar reacciones de transgalactosilación e hidrólisis, como se mencionó anteriormente, pero esta última en mayor medida; para evitar esto y direccionar la reacción, se han tenido en cuenta trabajos en los que se había optimizado el pH de actuación de enzimas de diferente origen. En preparados enzimáticos de levadura *Kluyveromyces lactis* la actividad mayor actividad β -galactosidasa se ha observado a pH 6,5 - 7,5 y a 50 °C. Por otra parte también Corzo- Martínez (2013) observaron alta actividad con β -galactosidasa de *Bacillus circulans* utilizando permeados de suero a pH de 5,5 - 7,5 y temperaturas de 40 a 60°C [1, 9, 91, 109- 112].

El lactitol en todas las reacciones de este trabajo se usó como único sustrato y en la concentración estándar de 250 mg/mL, estos debido a que la reacción de transgalactosilación se ve favorecida por altas concentraciones del reactivo el cual va a actuar como nucleófilo del grupo galactosil, en este caso el mismo lactitol [30]. Teniendo en cuenta lo anterior, las condiciones elegidas fueron: pH 7, agitación de 1400 rpm y temperatura de 50°C usando como medio de reacción tampón de fosfato sódico 0,05 M y 0,005 M de $MgCl_2$ llamado como buffer de síntesis.

Para entender la síntesis de LaOS, se tiene que conocer a fondo el proceso de transgalactosilación seguido por la familia 2 de glicosidas hidrolasas (GH 2) de la cual hacen parte las enzimas β -galactosidasas extraídas de microorganismos. Las GH 2 tienen un sitio activo que está compuesto por dos restos catalíticos: un nucleófilo catalítico y un catalizador ácido - base en general corresponden a residuos de glutamato [55-57]. Son además de β -retención y emplean un mecanismo de doble desplazamiento, donde, en primer lugar, el nucleófilo catalítico (1) ataca el centro anomérico del lactitol, generando el intermediario galactosil-enzima (2) y liberando una molécula de sorbitol, todo con la asistencia de un catalizador ácido/base. Posteriormente, este intermediario experimenta hidrólisis (A) o transgalactosilación (B). Esto ocurre puesto que a altas concentraciones de sustrato algunas β -galactosidasas cambian de un mecanismo hidrolítico a un mecanismo sintético por el cual el mismo sustrato, en lugar del agua, actúa como aceptor de la galactosa unida covalentemente al sitio activo [113]. El producto formado es generalmente un galacto-oligosacárido pero en este caso son los LaOS como se observa en la Figura 22.

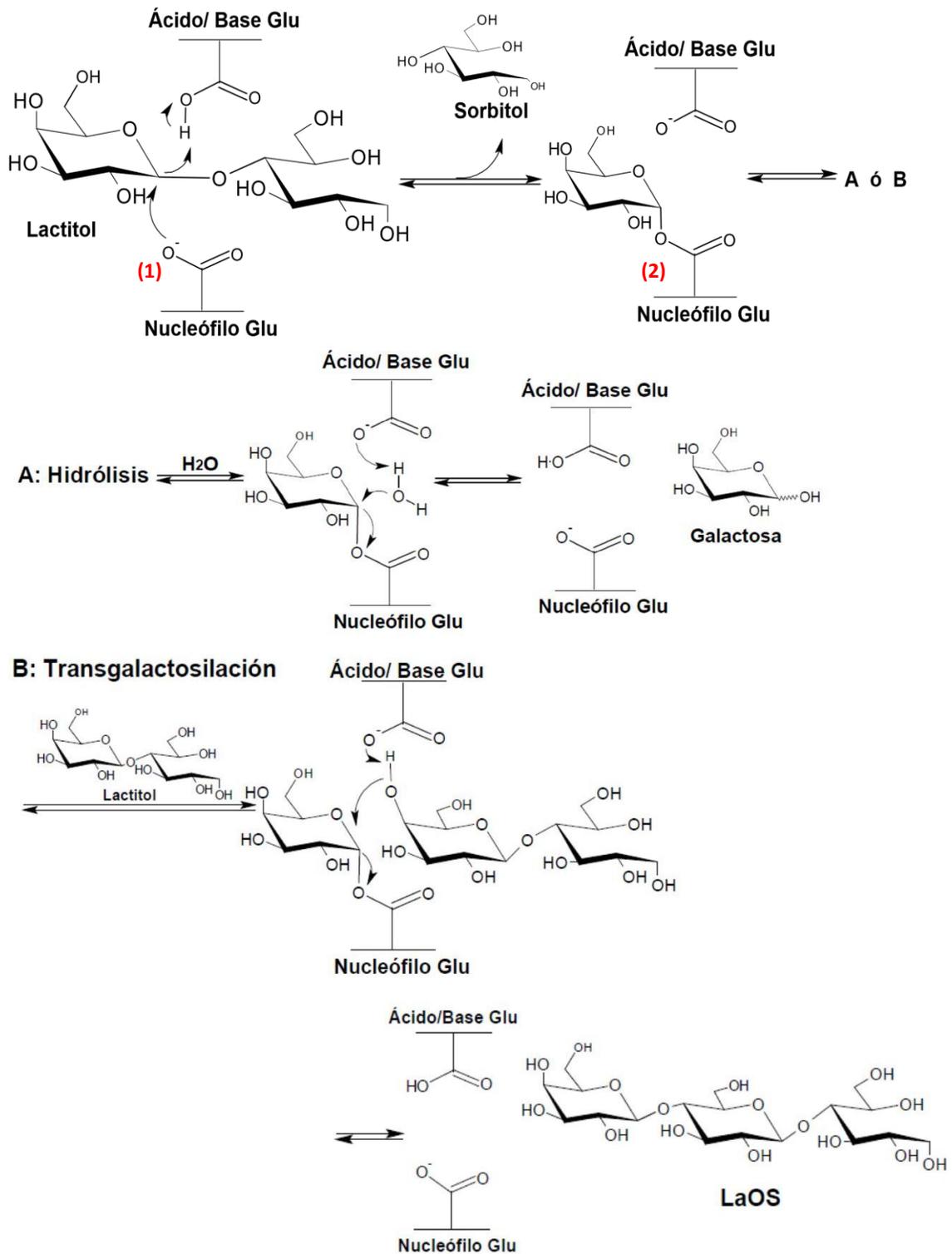


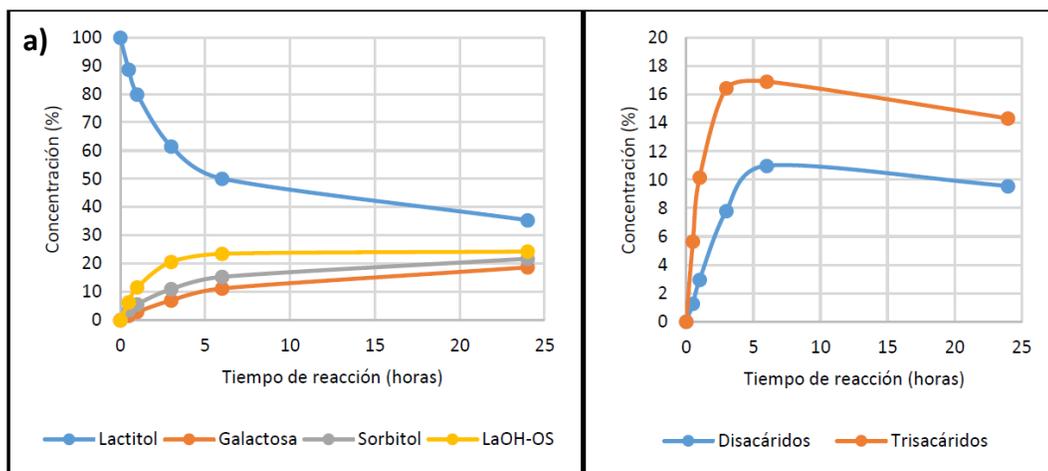
Figura 22. Esquema del mecanismo de acción β -galactosidasas: Galactosilación y Degalactosilación. Basado en [113]

En la figura anterior se observan las dos formas de degalactosilación que puede seguir el mecanismo de reacción de estas enzimas donde se escinde la unión covalente de galactosa y el sitio activo de la enzima por (A) reacción de hidrólisis, utilizando agua como sustrato aceptor y (B) reacción de transglucosilación, usando lactitol como sustrato aceptor. Ambas reacciones proceden de acuerdo con un mecanismo de doble desplazamiento y usan lactitol como sustrato donante y requieren también la asistencia de un catalizador ácido/base general. Los mecanismos de reacción propuestos se basaron en lo propuesto por Bultema (2014), para la síntesis de GOS. Además en la figura se evidencia la formación del 4'galactosil-lactitol β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc-ol; como LaOS [30].

De esta manera se da paso a analizar los resultados de las síntesis de oligosacáridos derivados del lactitol con las β -galactosidasas Lactozym®6500 y BiolactasaNTLx2 libres e inmovilizadas en el soporte MCM-41.

5.2.1. Lactozym®6500

La obtención de LaOS usando esta enzima se realizó, teniendo en cuenta las condiciones optimizadas por Martínez-Villaluenga (2008a) y Montilla (2012) para la obtención de GOS utilizando Lactozym 3000 L proveniente de la misma fuente (*Kluyveromyces lactis*); decidiendo así, estudiar la influencia de la concentración de enzima. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23, donde, el contenido de cada uno de los carbohidratos fue expresado en porcentaje respecto a los carbohidratos iniciales.



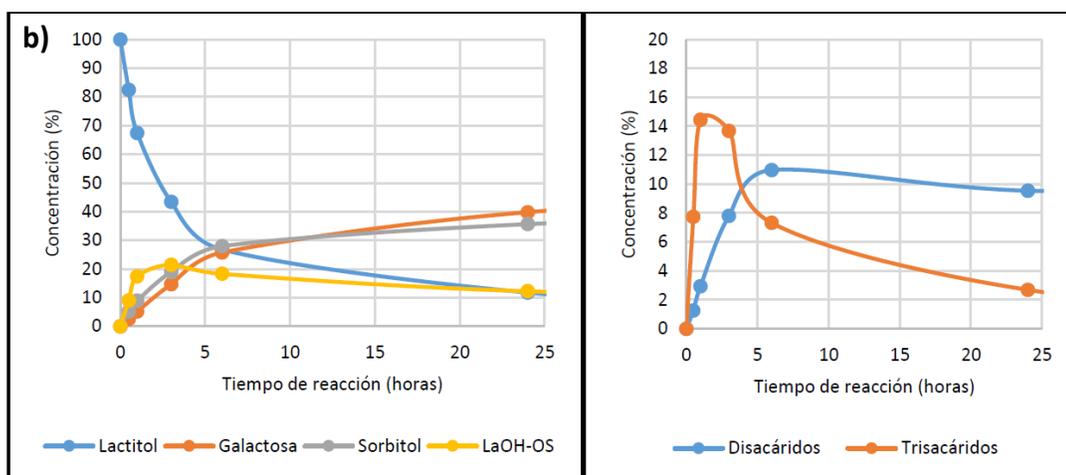


Figura 23. Evolución del contenido de carbohidratos totales (izq.) y de LaOS (der.) en función del tiempo de reacción a 50°C, 1400rpm, pH 7 buffer fosfato de sodio 0,05M y 0,005M MgCl₂. **a)** Para 10µL y **b)** Para 20µL de Lactozym®6500

En las gráficas de carbohidratos totales, izquierda, se observa que a ambas concentraciones de enzima se llega a un máximo de LaOS (23-21%) entre las 3 y 6 horas de reacción pero a mayor concentración de enzima la cantidad de derivados del lactitol decrece luego de ese tiempo mientras que a menor concentración de enzima se mantiene aproximadamente estable hasta las 24 horas de reacción. En cuanto a otras síntesis de LaOS se han llevado síntesis enzimáticas con β-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* encontrando apenas un 16,8% p/p en materia seca como el mayor contenido de Gal-sorbitol utilizando una solución al 35% (p/v) de lactosa y sorbitol (1:1) [26] mientras que en este caso se partió únicamente del lactitol.

La conversión de lactitol es mucho más alta, casi del 90% en 20µL de Lactozym®6500 pero se observa como en su mayoría se convierte en productos de la hidrólisis, galactosa y sorbitol, por el contrario la conversión del lactitol usando 10µL es de apenas 65% pero en su mayoría se obtienen productos de transgalactosilación.

En la síntesis de los LaOS (Di- y Trisacáridos), gráficas de la derecha, se evidencia una tendencia hacia la formación de trisacáridos que se mantiene constante a menor concentración de enzima y que a mayores concentraciones decrece a partir

de las 3 horas de reacción. Esto se debe a las condiciones de reacción usadas, que permiten la estabilización de los trisacáridos por que es bien conocido el efecto de las condiciones de reacción en la formación de di- y trisacáridos, en el caso de la síntesis de GOS apartir de Lactozym 3000 L, las condiciones óptimas para galactobiosa y de alolactosa (disacáridos) fueron 50 °C, pH 6.5, 250 mg/mL de lactosa y 300 minutos, mientras que las mejores condiciones de reacción para la producción de 6'galactosil lactosa (trisacárido) fueron 40°C, pH 7.5, 250 mg/mL de lactosa y 120 minutos [111], lo que quiere decir al considerar únicamente el tiempo, que los trisacáridos han mostrado ser menos estables como se observó a mayores concentraciones de enzima (Figura 23b, izq.) pero que esto se puede controlar disminuyendo la cantidad de enzima adicionada (Figura 23a, izq.) a 50 °C, pH 7 y 250 mg/mL de lactitol.

Por otro lado, como se observa en la Figura 23 a y b derecha los resultados a las dos concentraciones son similares a los encontrados en la síntesis de FOS usando sacarosa como sustrato, donde a concentraciones mayores de enzima la reacción de hidrólisis es mucho más rápida [1].

Las mezclas de síntesis fueron cuantificadas usando cromatografía de gases por medio del método de patrón interno. Cabe resaltar que inicialmente se realizó un barrido de 80 minutos y hasta 380°C esto para observar todo el espectro de compuestos que se obtenían y se observó que luego de los 60 minutos no se encontraban más picos. Los picos que se encuentran luego de este tiempo corresponden usualmente a compuestos con un mayor grado de polimerización, por ejemplo tetrasacáridos.

En la Figura 24 se observan los picos encontrados y como fueron integrados, en orden (1) sorbitol, (2) galactosa, la cual presenta dos picos debido a que su carbono anomérico le permite formar dos tipos de oxima, (3) patrón interno, (4) lactitol, (5) zona de disacáridos, y (6) zona de trisacáridos.

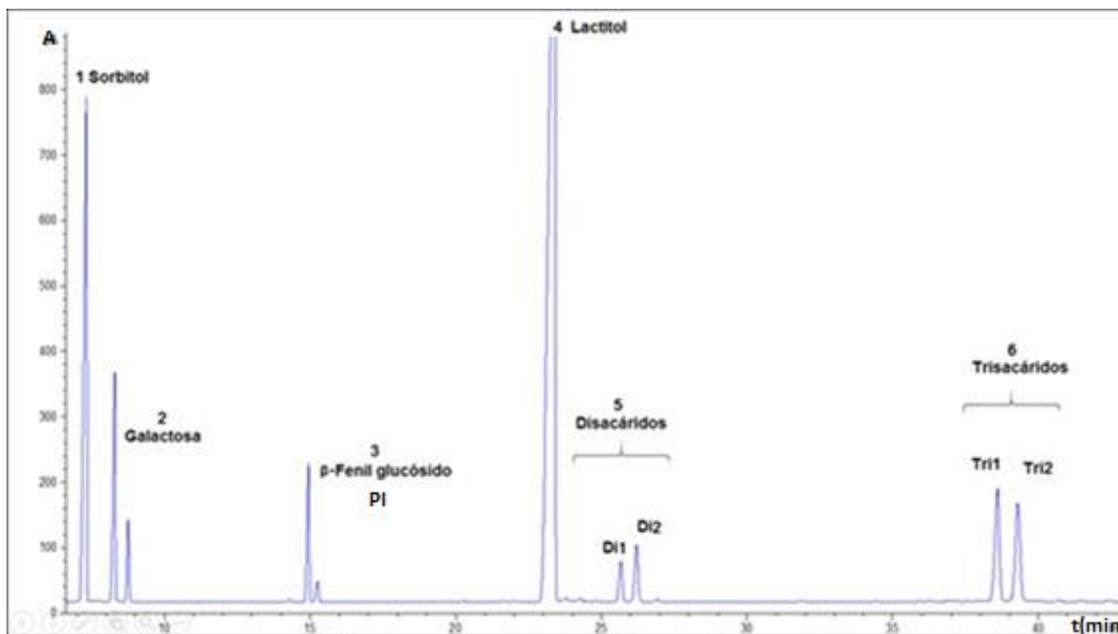


Figura 24. Cromatograma obtenido por GC/FID de la mezcla de síntesis obtenida a 10 μ L de Lactozym®6500 a 50°C, 1400rpm, pH 7 buffer fosfato de sodio 0,05M y 0,005M MgCl₂ y 3 horas de reacción

En las zonas de disacáridos y trisacáridos se lograron detectar picos individuales que para facilitar los cálculos de LaOS, fueron sumados y cuantificados de manera grupal. Se encontraron disacáridos y trisacáridos de mayor abundancia en comparación con el pico de PI. Con ayuda de datos bibliográficos fueron identificados tentativamente de manera cualitativa como **Disacárido 1** como β -D-Gal-(1 \rightarrow 1)-D-Glc-ol (25,7min); **Disacárido 2** como β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- D-Glc-ol (26,2min) ; **Trisacárido 1** como β -D-Gal-(1 \rightarrow 1)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol (38,6min) y **Trisacárido 2** como β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol (39,3min) [25,30]. Una forma para identificar de manera concreta los compuestos es mediante el análisis por espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) y/o espectrometría de masas MALDI-TOF como se describe en Schöder (2004) permitiendo caracterizar mezclas de reacción similares [35,114].

5.2.2. Lactozym®6500/MCM-41

La obtención de LaOS usando 50 mg del bioconizador inmovilizado Lactozym®6500/MCM-41 que tiene aproximadamente la misma cantidad enzimática según el grado de inmovilización; obtuvo los resultados condensados en

la Figura 25. Donde, el contenido encontrado de cada uno de estos carbohidratos fue expresado en porcentaje respecto a los carbohidratos totales.

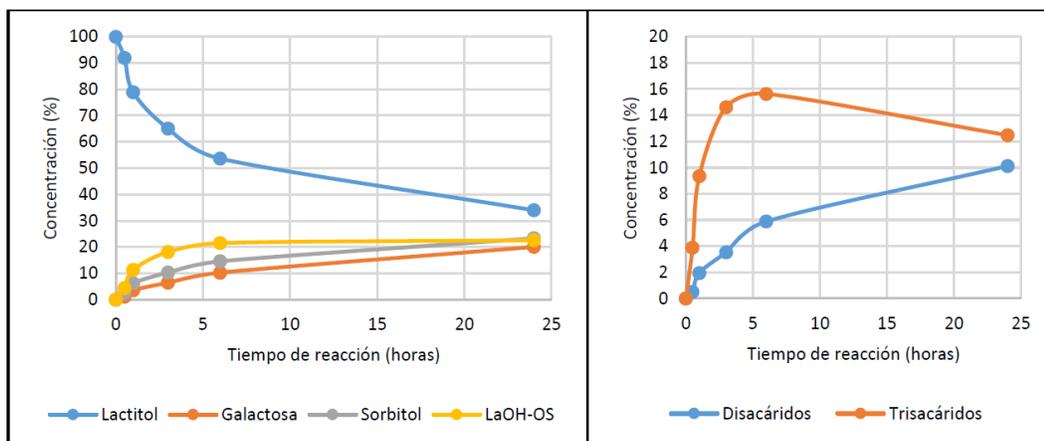


Figura 25. Evolución del contenido de carbohidratos totales (izq.) y de LaOS (der.) en función del tiempo de reacción para 50mg de Lactozym®6500/MCM-41 a 50°C, 1400rpm, pH 7 buffer fosfato de sodio 0,05M y 0,005M MgCl₂

Primero que todo, se observa la obtención de productos de transgalactosilación LaOH-OS mayor que los productos de hidrólisis (monosacáridos), llegando al máximo de 22% a las 6 horas y manteniéndose estable hasta las 24 horas de reacción; todo con una conversión del lactitol del 63%. Hay que subrayar que estos resultados son muy semejantes a los hallados con la enzima libre (Figura 23a) lo cual indica que las enzimas no perdieron ni cambiaron su actividad transgalactosidasa en el proceso de inmovilización. Por otro lado, al igual que con la enzima libre se observó una selectividad hacia la formación de trisacáridos por encima de los disacáridos, obteniendo un máximo de 16% de trisacáridos y 6% disacáridos para un total del 22% de derivados galactosil-lactitol a las 6 horas de reacción. Estos resultados presentan una mejora a el contenido de galactooligosacáridos que se formaron durante la hidrólisis de la leche entera con el uso de la misma enzima inmovilizada en Usurriga (2015) donde se obtuvo un porcentaje de GOS aproximadamente del 14% en las muestras hidrolizadas durante 8 horas y 20°C [91].

Las mezclas de síntesis fueron cuantificadas de igual manera usando cromatografía de gases por medio del método de patrón interno, encontrando perfiles cromatográficos idénticos que con la enzima libre; por ende, se analizó otro factor importante como lo es la estabilidad de los LaOS sintetizados; en la Figura 26 se muestran los cromatogramas encontrados en 1 y 24 horas superpuestos.

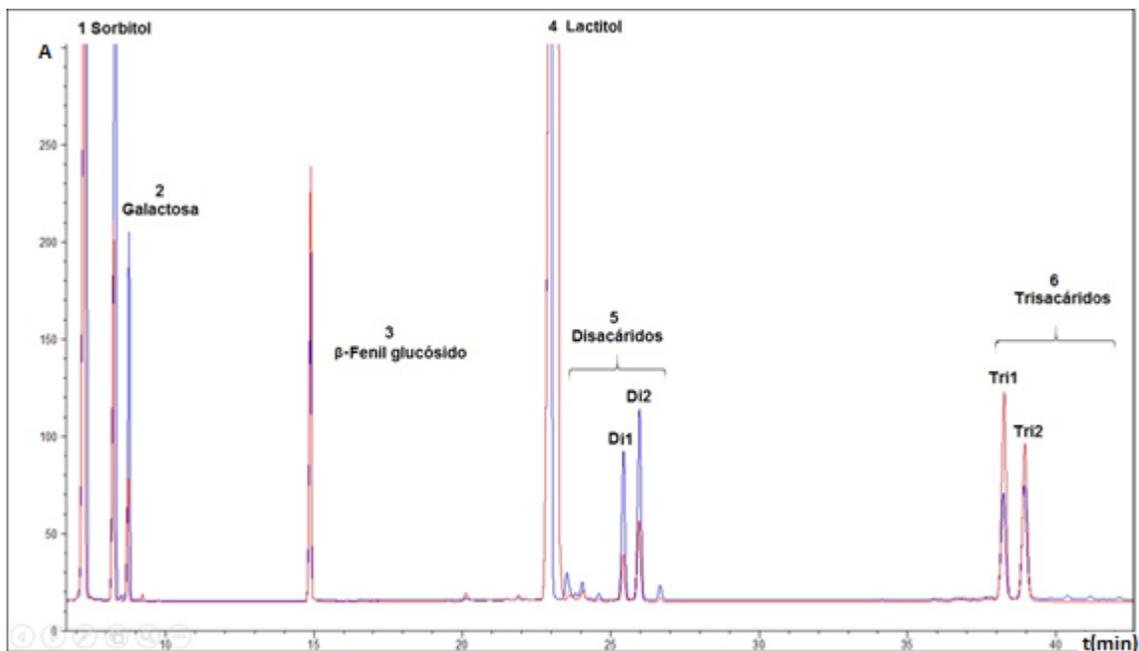


Figura 26. Cromatograma obtenido por GC/FID de la mezcla de síntesis obtenida a 50 mg de Lactozym®6500/MCM-41 a 50°C, 1400rpm, pH 7 buffer fosfato de sodio 0,05M y 0,005M MgCl₂ a 1 (rojo) y 24 (azul) horas de reacción

Se logra apreciar como a una hora de reacción (rojo) existe una preferencia a la formación de los **trisacáridos** 1, β -D-Gal-(1→1)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc-ol (38,6min) y 2, β -D-Gal- (1→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc-ol (39,3min) que hacia la generación de **disacáridos** 1, β -D- Gal-(1→1)-D-Glc-ol (25,7min) y 2, β -D-Gal-(1→6)-D-Glc-ol (26,2min); esto se debe a la alta concentración de sustrato; además la inexistencia de otros LaOS indica que este tipo de enzima tiene una tendencia particular a formar estos cuatro compuestos. Luego de las 24 horas de reacción, aunque siguen presentes éstos 4 compuestos, se observa un claro aumento en la concentración de disacáridos y la disminución de **Tri 1** y **Tri 2** acompañado de la aparición de otros derivados como disacáridos en 23,5min; 24,1min y 26,7min; trisacáridos en 40,4min; 41,1min y 42,1min; siendo en total 8 disacáridos y 5 trisacáridos los detectados al igual que con la enzima β -galactosidasa Lactozym®6500 soluble.

En general, los resultados obtenidos en la producción y tipo de LaOS con la enzima en estado soluble e inmovilizada son muy semejantes, pero la enzima soportada en MCM-41 mostró como ventaja una mayor tendencia hacia la formación de trisacáridos lo cual es de gran importancia.

5.2.3. BiolactasaNTLx2

La obtención de oligosacáridos derivados del lactitol usando la enzima comercial de *B. circulans*, BiolactasaNTLx2, presentó los resultados que se muestran en la Figura 27.

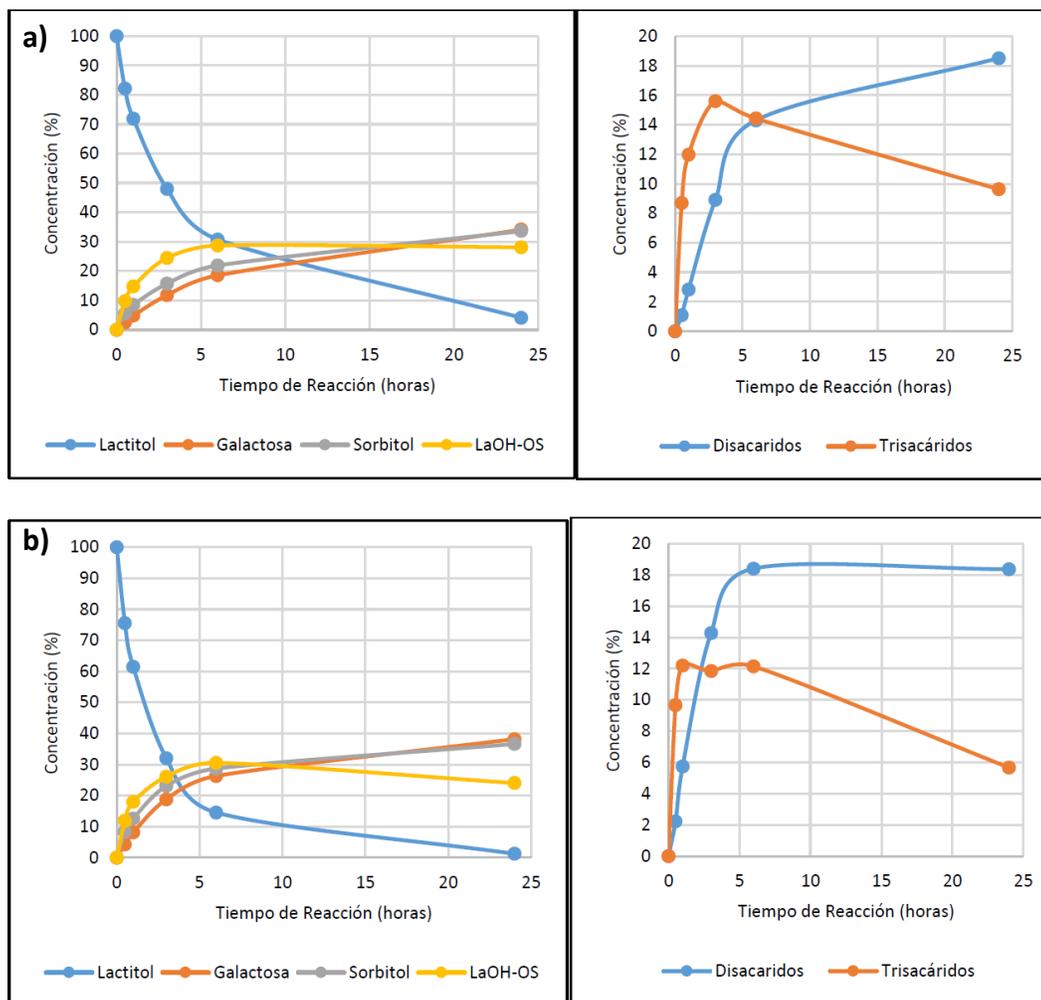


Figura 27. Evolución del contenido de carbohidratos totales (izq.) y de LaOS (der.) en función del tiempo de reacción a 50°C, 1400rpm, pH 7 buffer fosfato de sodio 0,05M y 0,005M MgCl₂. **a)** Para 10µL y **b)** Para 20µL de BiolactasaNTLx2

Como puede observarse en las gráficas de carbohidratos totales (der. a y b), la cantidad de enzima utilizada en la síntesis no presentó mayor diferencia en la conversión del lactitol al alcanzar casi el 100% a las 24 horas de reacción.

Análogamente, la producción de derivados del lactitol fue similar hasta las 6 horas de reacción, después a mayor concentración de enzima empieza a predominar los productos de hidrólisis por encima de los LaOS; esto debido a la mayor actividad enzimática que conlleva a que los productos de transgalactosilación sean también hidrolizados. Analizando la producción de LaOS (der. a y b), la formación de los trisacáridos fue muy rápida para las dos condiciones obteniendo rendimientos máximos de un 15% (10 μ L) y 12% (20 μ L) al cabo de 3 horas de síntesis. Sin embargo los trisacáridos formados se van hidrolizando y a las 24 horas el contenido se reduce a 10% (10 μ L) y 6% (20 μ L).

En otras palabras con la menor concentración de enzima ensayada se obtiene el máximo rendimiento en producción de LaOS (29%) a las 6 horas de reacción quedando un 30% de lactitol sin reaccionar y en estas condiciones los trisacáridos y disacáridos formados se encuentran en una relación 1:1 aproximadamente. Y al final del período de incubación estudiado (24 horas), se vislumbra un 24% de LaOS que siguen estables siendo en su mayoría disacáridos (18%). Los resultados anteriores ponen de manifiesto que, aunque la capacidad de BiolactasaNTLx2 de formar LaOS trisacáridos es alta, éstos sufren hidrólisis a mayores tiempos de reacción cuando la concentración del sustrato se ve disminuida, lo cual se esperaba debido a que esta β -galactosidasa presentó la actividad específica más alta (Tabla 7). Así mismo, usando β -D-galactosidasa de *Bacillus circulans* se ha realizado la síntesis de LaOS empleando lactulosa como sustrato y adicionando lactitol como donador, dando lugar a los disacáridos regioisómeros β -(1 \rightarrow 4) y β -(1 \rightarrow 6), en una proporción 1:1 y rendimientos mucho menores de 15 y 11%, respectivamente [30].

Por otro lado la síntesis de GOS de Rodríguez-Colinas (2012), catalizada por BiolactaseTM 3, otra preparación comercial de β -galactosidasa de *Bacillus circulans*, usando 400 g/L de lactosa y 15 U/mL de enzima, alcanzó el rendimiento máximo de 49,4% p/p de carbohidratos totales en la mezcla, lo cual es menor al aproximadamente 70% de carbohidratos totales producidos con BiolactasaNTLx2.

La Figura 28 presenta los picos encontrados a las 3 horas de reacción, los cuales, en general corresponden a los picos hallados con Lactozym®6500, como (1) sorbitol, (2) galactosa, (3) patrón interno y (4) lactitol; pero en las (5) zona de disacáridos y (6) zona de trisacáridos se encontraron no sólo diferentes picos sino también distintas abundancias respecto al PI

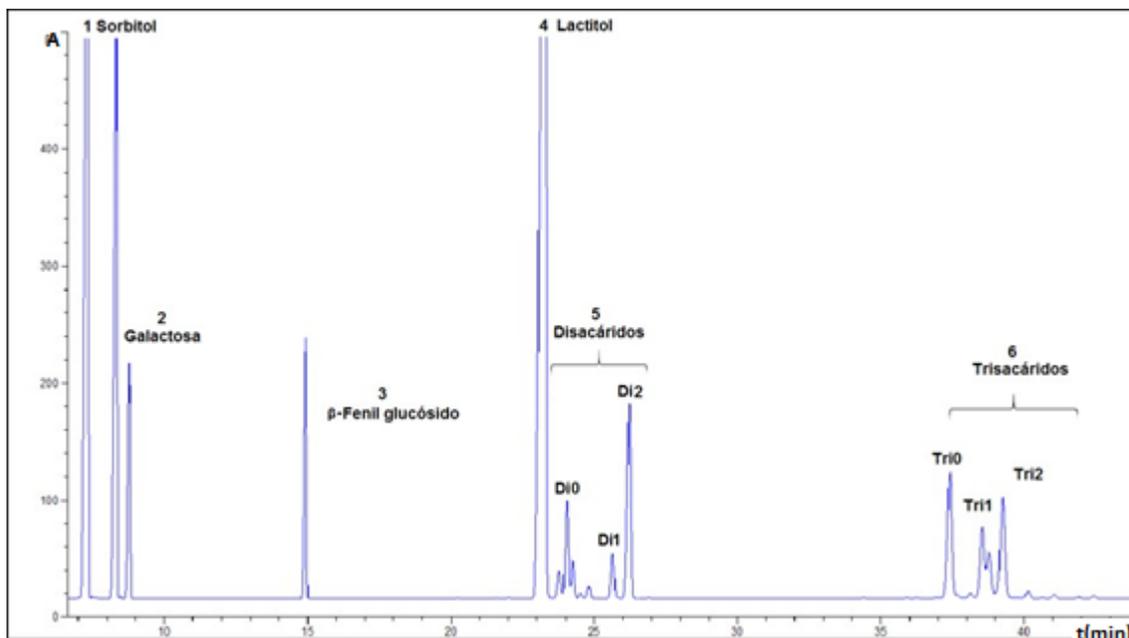


Figura 28. Cromatograma obtenido por GC/FID de la mezcla de síntesis obtenida a 10 μ L de BiolactasaNTLx2 a 50°C, 1400rpm, pH 7 buffer fosfato de sodio 0,05M y 0,005M MgCl₂ y 3 horas de reacción

De la misma manera que se realizó con Lactozym®6500 en las zonas de disacáridos y trisacáridos se logaron detectar picos individuales que se integraron por separado pero para facilitar el cálculo de los mismos fueron sumados y cuantificados de manera grupal. Fueron también identificados tentativamente los LaOS encontrados con Lactozym®6500 **Di 1**= β -D-Gal-(1 \rightarrow 1)-D-Glc-ol, 25,6 min; **Di 2**= β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Glc-ol, 26,2 min; **Tri 1**= β -D-Gal-(1 \rightarrow 1)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol, 38,5 min y **Tri 2**= β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol, 39,2 min. Pero se encontraron conjuntamente 16 compuestos más siendo los más abundantes **Di 0**=sin identificación tentativa, 24,0 min y **Tri 0**= β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc-ol, 37,3 min, que se sintetiza puesto que, como es bien sabido, la β -D-galactosidasa BiolactasaNTLx2 cataliza la transferencia de unidades de galactosa a varios derivados de glucosa y galactosa, formando enlaces β -(1 \rightarrow 4) [30] y en la síntesis de varios trisacáridos se ha reportado compuestos como β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-Lac [109] usando como sustrato lactosa; de esta manera es consecuente pensar en la formación del 4'galactosil- lactitol; éste ha sido sintetizado y reportado por Farkas (2003) pero obtenido como producto secundario y en trazas, denominado "lactitol monogalactosilado β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol" aunque cabe resaltar que el método de síntesis sigue una ruta más compleja mediante el empleo de

lactulosa y lactitol, como sustratos donores y el metil α -D-glucopiranosido como aceptor [30].

5.2.4. Biolactasa NTLx2/MCM-41

La obtención LaOH-OS usando 50 mg del biocalizador inmovilizado Biolactasa NTLx2/MCM-41 que tiene aproximadamente la misma cantidad enzimática de 10 μ L; se realizó teniendo en cuenta las condiciones usadas con la enzima libre obteniendo los resultados que se exponen en la Figura 29.

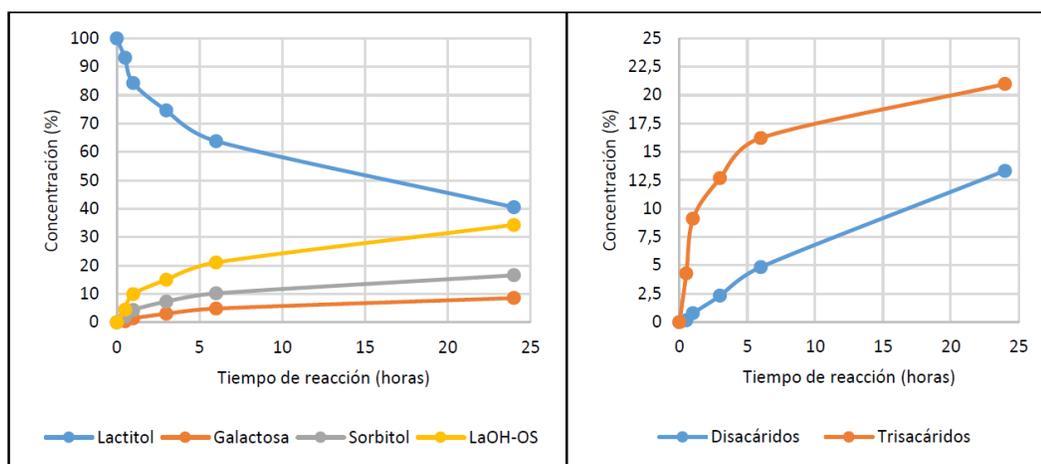


Figura 29. Evolución del contenido de carbohidratos totales (izq.) y de LaOS (der.) en función del tiempo de reacción para 50mg de Biolactasa NTLx2/MCM-41 a 50°C, 1400 rpm, pH 7 buffer fosfato de sodio 0,05 M y 0,005 M MgCl₂

A diferencia de la enzima libre, Figura 27a, con la enzima inmovilizada se observa aumento constante en la producción de LaOS muy por encima de los monosacáridos evidenciado la predilección hasta la reacción de transgalactosilación; alcanzando a las 24 horas de reacción un máximo de 34% (Fig. 29 izq.), de los cuales un 21% son trisacáridos y un 13% son disacáridos (Fig. 29 der.), manteniendo también una mayor tendencia hacia la formación de los compuestos con mayor grado de polimerización. Se aprecia además que luego de 24 horas aún existe un 40% de lactitol residual, esto significa que la reacción se direcciona llevada de manera lenta, lo cual da como resultado la mayor generación de oligosacáridos derivados del lactitol que de galactosa y glucitol.

Estos resultados son de gran valor debido a que esta enzima mostró los mejores resultados en actividad enzimática específica entre las enzimas libres en la producción de derivados del lactitol y aun así estos resultados se vieron mejorados

usando la misma enzima soportada en MCM-41 y no existen reportes previos de la síntesis de LaOS utilizando Biolactasa NTLx2 inmovilizada en este tipo de material.

Las mezclas de síntesis fueron cuantificadas de igual manera usando cromatografía de gases por medio del método de patrón interno, encontrando perfiles cromatográficos muy similares a los hallados con la enzima libre; por ende, se analizó la estabilidad de los LaOS sintetizados en el tiempo por esto en la Figura 30 se muestran los cromatogramas encontrados en 1 y 24 horas superpuestos.

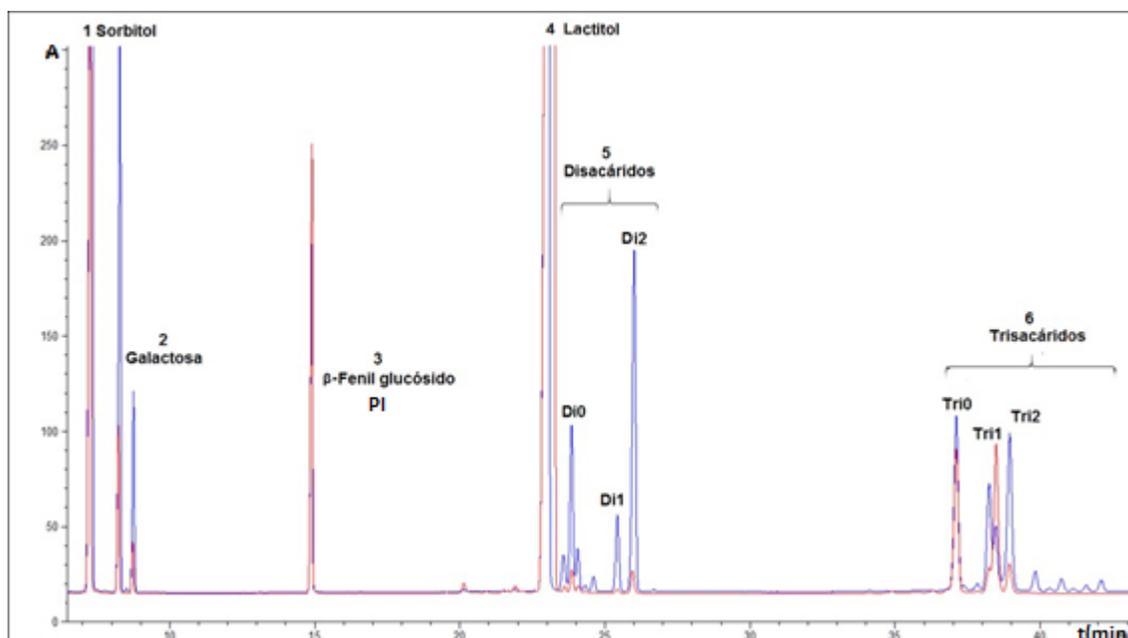


Figura 30. Cromatograma obtenido por GC/FID de la mezcla de síntesis obtenida a 50 mg de Biolactasa NTLx2/MCM-41a 50°C, 1400 rpm, pH 7 buffer fosfato de sodio 0,05M y 0,005M MgCl₂ a 1 (rojo) y 24 (azul) horas de reacción

Se distingue a una hora de reacción (rojo) la mayor formación de **Tri 0**, β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc-ol (37,1min) y **Tri 1**, β -D-Gal-(1 \rightarrow 1)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol (38,5min) por encima de otros trisacáridos y una muy baja generación de disacáridos; sin embargo pasadas las 24 horas se visualiza la formación de una gran variedad de LaOS; específicamente 7 diferentes disacáridos, siendo el más abundante **Di 2**, β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Glc-ol (26,0min) y 10 trisacáridos, los más abundantes **Tri 0** y **Tri 2**, β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol (39,0min) y los demás no han sido reportados antes.

Finalmente la Tabla 9, resume los mejores resultados obtenidos para la síntesis de derivados del lactitol y las condiciones usadas por las enzimas β -galactosidasas comerciales libres e inmovilizadas.

Tabla 9. Resultados Síntesis de LaOS

	Lactozym® 6500	Lactozym®6500 /MCM-41	Biolactasa NTLx2	BiolactasaNTLx2 /MCM-41
Cantidad de Catalizador	10 μ L	50mg	10 μ L	50mg
Tiempo de Reacción	6h	6h	6h	6h
Producción de LaOS	23%	22%	29%	22%
Lactitol Residual	50%	54%	30%	60%
Producción Monosacáridos	27%	24%	41%	18%
Estado de Producción LaOS	Estable	Estable	Estable	En Aumento

En la tabla anterior, la enzima Biolactasa NTLx2 se posiciona como la mejor enzima β -galactosidasa libre para sintetizar LaOS alcanzando un porcentaje de 29% con una conversión del 70% del lactitol inicial, todo a 6 horas de reacción y una concentración baja de enzima; además de una mayor variedad de compuestos detectados, 8 diferentes disacáridos y 12 distintos trisacáridos; algunos de estos sólo encontrados con esta enzima y con una mayor abundancia hacia **Tri 0**.

La β -galactosidasa comercial Lactozym®6500, la cual es una de las enzimas más usadas en la industria, alcanzó apenas un 23% de LaOS y una conversión del 50% del lactitol también a las 6 horas de reacción y un volumen de enzima de apenas 10 μ L. Logrando sintetizar 8 disacáridos y 5 trisacáridos con una mayor abundancia hacia **Tri 1** y **Tri 2**. Con esta enzima se han reportado estudios donde la producción de GOS se encuentra en rangos de 32,7%, a 12,9%, con concentraciones de lactosa de 200, 250 y 500 g/L [91], es decir que de acuerdo a la concentración de lactitol usada (250 mg/mL) el porcentaje de productos de transgalactosilidación se encuentra en el rango encontrando en la bibliografía.

Por otro lado, la Biolactasa NTLx2 inmovilizada en el soporte mesoporoso MCM-41, mostró el porcentaje más alto en la producción de LaOS de 34% los cuales corresponden 8 diferentes disacáridos y 12 distintos trisacáridos, con una conversión del 60% del lactitol inicial; además, la producción de LaOS seguía en aumento a las 24 horas de reacción. Considerando los resultados anteriores, se posiciona como el mejor biocatalizador entre los libres e inmovilizados para la síntesis de derivados del lactitol a 50°C y pH 7. En el mismo sentido, es de importancia que ambos biocatalizadores inmovilizados mostraron actividad con el sustrato lactitol debido a que Lactozym®6500 y BiolactasaNTLx2 se han usado principalmente para para hidrólisis de lactosa y síntesis de galacto-oligosacáridos [85 - 90].

En adición para analizar los compuestos derivados del lactitol sintetizados usando los dos tipos de biocatalizadores se presenta la Figura 31, donde los cromatogramas encontrados a las tres horas de reacción fueron superpuestos.

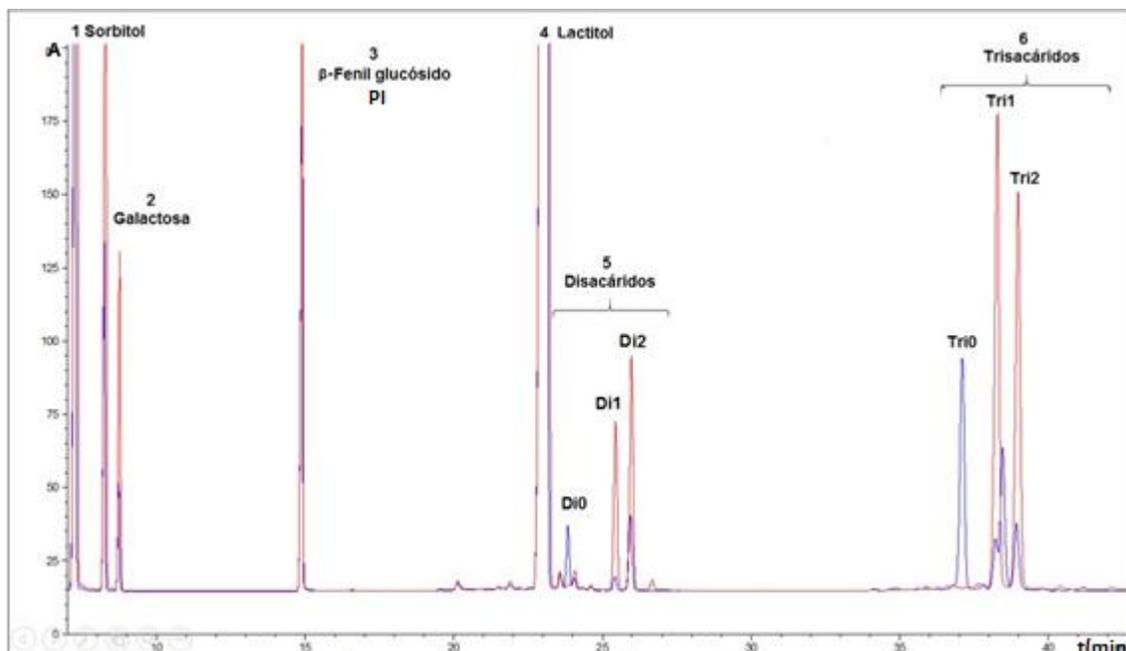


Figura 31. Cromatograma comparativo obtenido por GC/FID a 50°C, 1400rpm, pH 7 buffer fosfato de sodio 0,05M y 0,005M MgCl₂ y 3 horas de reacción para 50 mg de Lactozym®6500/MCM-41 (Rojo) y Biolactasa NTLx2/MCM-41 (Azul)

Para el Lactozym®6500/MCM-41 (rojo) se observa la mayor abundancia de los picos **Di 1**, **Di 2**, **Tri 1** y **Tri 2** usando como referencia el pico del PI; esto se debe a que ésta β- galactosidasa mostró una reacción ligeramente más rápida alcanzado

a las 3 horas de reacción un 18% de LaOS por encima de un 15% alcanzado con Biolactasa NTLx2/MCM-41 (Figuras 25 y 29, izq.). Por otro lado, se aprecia la obtención de un mayor número de picos correspondientes a diferentes LaOS con la enzima Biolactasa NTLx2 inmovilizada (azul), evidenciando la diversificación de posibles compuestos con actividad prebiótica, siendo los más abundantes **Di O** y **Tri O**, los cuales no se obtienen con el Lactozym®6500 inmovilizado. El trisacárido O ha sido sintetizado y reportado por Farkas (2003) obtenido como producto secundario y en trazas aunque cabe resaltar que el método de síntesis fue más complejo mediante el empleo de lactulosa y lactitol, como sustratos donores y el metil α -D-glucopiranosido como aceptor [30].

Luego de realizar la síntesis de derivados del lactitol usando los biocatalizadores inmovilizados y conocer el porcentaje de inmovilización y la actividad específica (sección 5.1.2), es necesario analizar nuevamente los biocatalizadores soportados para conocer la cantidad de ciclos que puede realizar sin perder su actividad inicial significativamente.

5.2.5. Evaluación de la reutilización

La evaluación de la reutilización mediante reacciones de síntesis tipo Batch de 2 horas a 50°C y 1400 rpm usando los biocatalizadores sintetizados arrojó información acerca de la estabilidad de éstos. Los resultados obtenidos para cinco reúsos corresponden a porcentajes hallados al considerar la actividad específica inicial como el 100% y se encuentran consignados en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados para los Reúsos de los Biocatalizadores

Reacción	%EU/mg (μ mol galactosa/min. mg proteína soportada)	
	Lactozym®6500/MCM-41	Biolactasa NTLx2/MCM-41
	Inicial	100,0
Reúso 1	61,6	55,2
Reúso 2	37,0	49,9
Reúso 3	34,1	44,2
Reúso 4	29,1	42,1
Reúso 5	15,4	41,5

Una mejor visualización se representa en la Figura 32.

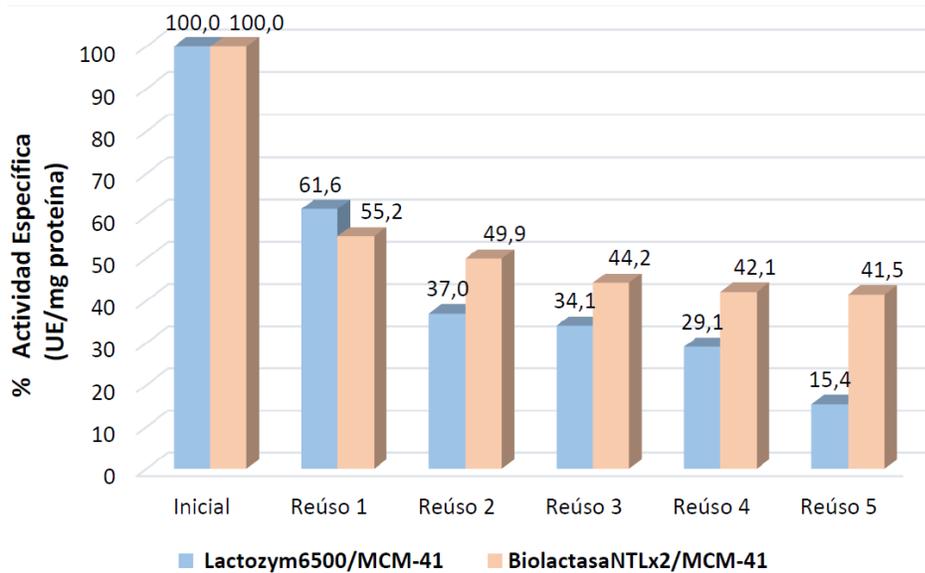


Figura 32. Resultados para los Reúso de los Biocatalizadores

Se observa que en cada ciclo de reacción el porcentaje de actividad específica disminuye, esto debido a que las enzimas que se lograron unir pueden perder actividad paulatinamente en su reutilización.

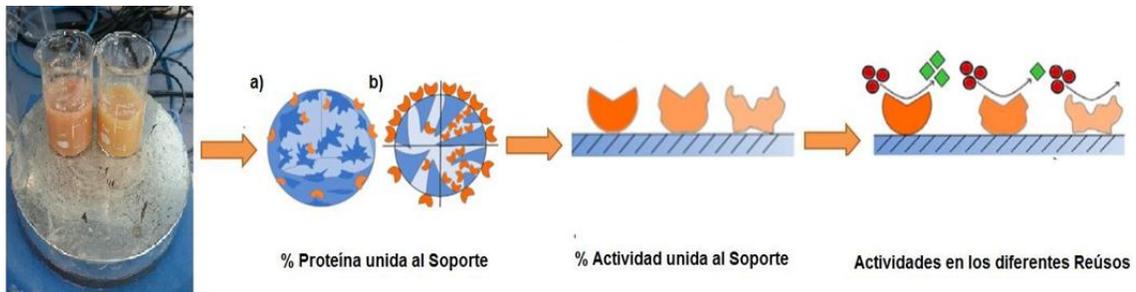


Figura 33. Representación de los factores de importancia en la inmovilización de enzimas

Se observa que BiolactasaNTLx2/MCM-41 a cinco reúso había disminuido su actividad específica mostrando un 41,5% de actividad residual, es decir que a pesar de presentar una menor cantidad de enzima y actividad unida al soporte, exhibe una mayor estabilidad en ciclos de reutilización por consiguiente debería considerarse analizar un mayor número de reúso además de posibles investigaciones en modelos de reacción continua, los cuales son los de mayor importancia en la industria.

Por el contrario el Lactozym®6500/MCM-41 presenta únicamente el 15,4% de su actividad inicial, indicando así que aunque se logró enlazar una alta cantidad de enzima y actividad enzimática, ésta se pierde paulatinamente en cada uno de los reusos por esto, no se descarta la viabilidad de posibles mejoras en su estabilidad.

Teniendo en cuenta los resultados del trabajo, como se mencionó anteriormente, la Biolactasa NTLx2 inmovilizada en el soporte mesoporoso MCM-41 se posiciona como el mejor biocatalizador entre los libres e inmovilizados para la síntesis de LaOS al mostrar el porcentaje más alto en la producción de LaOS de 34% a las 6 horas, los cuales corresponden a 8 diferentes disacáridos y 12 distintos trisacáridos, con una conversión del 60% del lactitol inicial; donde la producción de LaOS seguía en aumento a las 24 horas de reacción. Sumado a que mostró la mayor estabilidad en ciclos alcanzando 5 ciclos perdiendo parte de su actividad inicial aunque es de gran interés que puedan reutilizarse y de esa manera se ven cumplidos los objetivos del trabajo de investigación.

6. CONCLUSIONES

Se logró inmovilizar las enzimas β -galactosidasas comerciales Lactozym®6500 y BiolactasaNTLx2 con una metodología a microescala en el soporte mesoporoso MCM-41 alcanzando porcentajes de inmovilización de proteína de 68,83% y 55,95%, respectivamente. Además, éstos biocatalizadores presentaron actividad con el sustrato lactitol obteniendo valores 23,01 EU/mg para el Lactozym®6500/MCM-41 y 18,60 EU/mg para BiolactasaNTLx2/MCM-41 de actividad específica unida al soporte; esta última mostró la mayor estabilidad en ciclos con un 41,5% de actividad residual a diferencia del Lactozym®6500/MCM-41 que presentaba únicamente el 15,4% de actividad residual en comparación con la exhibida inicialmente. Cabe resaltar que se hallaron mediante CG/FID los mismos compuestos con las enzimas inmovilizadas y libres evidenciando que no perdieron ni cambiaron su actividad transgalactosidasa en el proceso de inmovilización.

Se consiguió sintetizar oligosacáridos derivados del lactitol mediante transgalactosilación catalizada por dos diferentes β -galactosidasas comerciales en estado soluble e inmovilizado, identificando tentativamente a β -D-Gal-(1 \rightarrow 1)-D-Glc-ol (disacárido 1), β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Glc-ol (disacárido 2), β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc-ol (trisacárido 0), β -D-Gal-(1 \rightarrow 1)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol (trisacáridos 1) y β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-ol (trisacárido 2).

El biocatalizador BiolactasaNTLx2/MCM-41 presentó los mejores resultados con un máximo de 34% de LaOS de los cuales un 21% son trisacáridos (12 distintos trisacáridos) y un 13% son disacáridos (8 diferentes disacáridos), con una conversión del 60% del lactitol inicial; además, la producción de LaOS seguía en aumento a las 24 horas de reacción.

El presente trabajo contribuye al desarrollo de nuevas metodologías para la síntesis de oligosacáridos con potenciales propiedades prebióticas. El sintetizar oligosacáridos derivados del lactitol haciendo uso de biocatalizadores inmovilizados y obteniendo resultados similares a los encontrados con las enzimas libres pero con la ventaja de su re-utilización. De esta forma, se diversifica el espectro de compuestos con posible actividad prebiótica y su forma de obtención mediante preparaciones enzimáticas más rentables para su aplicación industrial

7. RECOMENDACIONES

Se necesitan más estudios de caracterización utilizando por ejemplo espectrometría de masas MS, resonancia magnética nuclear protónica y carbono 13, ^1H - y ^{13}C -RMN, para conocer de manera acertada las estructuras y los enlaces de los oligosacáridos derivados del lactitol que se lograron sintetizar que debido a la poca información existente no pudieron ser identificados.

Debería considerarse para futuras investigaciones, una evaluación de los biocatalizadores sintetizados por la técnica de Análisis Termogravimétrico (TGA) luego de cada ciclo de re-úso; ayudando a aclarar si se pierde actividad enzimática específica por deterioro del sitio activo o por pérdida de proteína unida al soporte.

Además, a manera de profundización sobre este trabajo se podría realizar la evaluación del potencial prebiótico de las diferentes fracciones de LaOS sintetizados (Di- y Trisacáridos) con estudios de fermentación *in vitro* de los oligosacáridos mediante ensayos y evaluación del crecimiento bacteriano, determinación del carácter bifidogénico, etc.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Villarejo, V. (2013) Utilización de distintas glicosidasas para la obtención de carbohidratos bioactivos derivados de la lactosa y sacarosa. Tesis. Universidad Autónoma de Madrid.
- [2] Ashwell, M. (2005) Conceptos sobre Alimentos Funcionales. ILSI Europe. Serie de Monografías Concisas, 40.
- [3] Saarela, M., Lähteenmäki, R., Crittenden, R., Salminen, S. & Mattila-Sandholm, T. (2002) Gut bacteria and health foods-the European perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 99-117.
- [4] Swennen, K., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2006) Non-digestible Oligosaccharides with Prebiotic Properties. *Critical Reviews in Food Science and nutrition*, 46: 459-471.
- [5] Weijers, C. A. G. M., Franssen, M. C. R. & Visser, G. M. (2008) Glycosyltransferase catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 26: 436-456.
- [6] Patel, S. & Goyal, A. (2011) Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 27:1119-1128.
- [7] Rivero-Urgell, M. & Santamaria-Orleans, A. (2001) Oligosaccharides: Application in infant food. *Early Human Development*, 65: S43-S52.
- [8] Sharon, N. (2006) Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760(4): 527-537.
- [9] Savater-Sánchez C., Montilla A., Pródanov M, Corzo N., (2015) Síntesis e identificación de Oligosacáridos derivados de Lactosa y Lactulosa a partir de permeado de suero de Quesería. Tesis. Universidad Autónoma de Madrid.
- [10] Macfarlane, G.T. and J.H. Cummings (1999) Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?. *British Medical Journal*.318: 999–1003.
- [11] Corzo, N., Alonso J., Azpiroz F., Calvo M.; Cirici M. (2015) Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1): 99-118.
- [12] Tuohy, K., Rouzaud G., Brück W. & Gibson G. (2005) Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-Assessment of efficacy. *Current Pharmaceutical Design*, 11(1): 75-90.

- [13] Mussatto, S. & Mancilha I. (2006) Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68: 587-597.
- [14] Gibson, G. & Roberfroid M. (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2): 259-275.
- [15] Villamiel, M., Montilla A., Olano A. & Corzo N. (2014) Production and Bioactivity of Oligosaccharides Derived from Lactose. En *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity* (135-167). Madrid, España: John Wiley & Sons Ltd.
- [16] Ronald Ross Watson & Victor Preedy (2015) Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Bioactive Foods in Health Promotion*. (1): 938. Elsevier Academic Press.
- [17] Bode, L. (2009) Human milk oligosaccharides: Prebiotics and beyond. *Nutrition Reviews*. 67:183-191
- [18] Corzo, N., Montilla A., Cardelle-Cobas A., Olano A. (2009). Carbohidratos prebióticos derivados de la lactosa. En *Funcionalidad de Componentes Lácteos* (159-178). Madrid, España: CYTED.
- [19] Playne, M. and R. Crittenden (2009) Galacto-oligosaccharides and other products derived from lactose. *Advanced dairy chemistry*, Springer. 121-201.
- [20] Gänzle, M. (2012) Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. *International Dairy Journal*. 22(2):116-122.
- [21] Klewicki, R & Klewicka E. (2004) Antagonistic activity of lactic acid bacteria as probiotics against selected bacteria of the Enterobacteriaceae family in the presence of polyols and their galactosyl derivatives. *Biotechnology Letters*. 26(4):317-20.
- [22] Crittenden, R., Laitila A., Forssell P., Mättö J. (2001) Adhesion of Bifidobacteria to Granular Starch and Its Implications in Probiotic Technologies. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(8): 3469–3475.
- [23] Linden, G. & Lorient D. (1999). *New Ingredients in Food Processing*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- [24] Van Zundert, M. & Hoffmann R. (1999) Lactose derivatization. *Carbohydrates in Europe*. 25: 28-29.
- [25] Klewicki, R. (2007) The stability of gal-polyols and oligosaccharides during pasteurization at a low pH. *LWT-Food Science and Technology*, 40: 1259-1265.
- [26] Seki, N. and H. Saito, (2012) Lactose as a source for lactulose and other functional lactose derivatives. *International Dairy Journal*, 22(2):110-115.

- [27] EFSA, (2011) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to the sugar replacers xylitol, sorbitol, maltitol, lactitol, isomalt, erythritol, D-tagatose, isomaltulose, sucralose and polydextrose and maintenance of tooth mineralisation by decreasing tooth demineralisation and reduction of post-prandial glycaemic responses pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal. 9(4):1-25.
- [28] Venema, K. (2012) Intestinal fermentation of lactose and prebiotic lactose derivatives, including human milk oligosaccharides. International Dairy Journal. 22:123-140.
- [29] Yanahira, S., Suguri T., Yakabe T., Ikeuchi Y. (1992) Formation of oligosaccharides from lactitol by *Aspergillus oryzae* β -D-galactosidase. Carbohydrate Research. 232:151-159.
- [30] Farkas, E., Schmidt U., Thiem J., Kowalczyk J. (2003) Regioselective synthesis of galactosylated Tri- and Tetrasaccharides by use of β -Galactosidase from *Bacillus circulans*. Synthesis. 5: 699-706.
- [31] Hsu, C., Yu R. & Chou C. (2005) Production of beta-galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. International Journal of Food Microbiology. 104(2):197-206.
- [32] Heyman, M. (2006) Lactose Intolerance in Infants, Children, and Adolescents. Pediatrics. 118 (3): 1279-1286.
- [33] Neri, D., Balcão V., Carneiro-da-Cunha M., Carvalho L., Teixeira J. (2008) Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic (mPOS–PVA) composite for lactose hydrolysis. Catalysis Communications. 9: 2334-2339.
- [34] 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: 1-14.
- [35] Klewicki, R. (2007) Effect of selected parameters of lactose hydrolysis in the presence of β -galactosidase various sources on the synthesis of galactosyl-polyol derivatives. Engineering in Life Sciences 7(3): 268-274.
- [36] Zhou, A. & Chen X. (2001) Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Biochemical Engineering Journal. 9(1):33-40.
- [37] Jurado, E., Camacho F., Luzón G., Vicaria J. (2002) A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbial Technology. 31(3):300-309.
- [38] Lee, D., Kang S., Suh S., Byun J. (2003) Purification and characterization of a beta- galactosidase from peach (*Prunus persica*). Molecular Cell. 15(1):68-74.

- [39] Jacob, R., Peters K. & Naim H. (2002) The Prosequence of Human Lactase-Phlorizin Hydrolase Modulates the Folding of the Mature Enzyme. *Journal of biological Chemistry*. 277(10): 8217-8225.
- [40] Alcantara, P., Martim L., Silva C., Dietrich S., Buckeridge M. (2006) Purification of a β -galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44:619-627.
- [41] Nagy, Z., Kiss T., Szentirmai A., Biró S. (2001) β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, Purification, and Characterization of the Enzyme. *Protein Expression and Purification*. 21: 24-29.
- [42] Haider, T. & Husain Q. (2007) Preparation of lactose-free milk by using salt-fractionated almond (*Amygdalus communis*) β -galactosidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87: 1278-1283.
- [43] Biswas, S., Kayastha A. & Seckler R. (2003) Purification and characterization of a thermostable β -Galactosidase from kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. PDR14. *Journal of Plant Physiology*. 160: 327-337.
- [44] Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N. & Prapulla, S. G. (2005) Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 442-457.
- [45] Panesar P., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F. & Kumar, H. (2006) Microbial production, immobilization and applications of β -galactosidase. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, 81: 530-543.
- [46] Juers D. (2000) A structural View of Beta-galactosidase on Action. Tesis. Universidad de Oregon.
- [47] Pakula, T., Salonen K., Uusutalo J., Penttila M. (2005) The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Microbiology*. 151:135–143.
- [48] Tello, S., Jiménez J., Sarabia C., Gómez L. (2005) Determination of the Secondary Structure of *Kluyveromyces lactis* β -Galactosidase by Circular Dichroism and Its Structure–Activity Relationship as a Function of the pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:10200-10204.
- [49] Numanoglu Y. & Sungur S. (2004) β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose–gelatin carrier system. *Process Biochemistry*. 39: 705-711.
- [50] Li, S., Han J., Chen K. & Chen C. (2001) Purification and characterization of isoforms of β -galactosidases in mung bean seedlings. *Phytochemistry*. 57: 349-359.
- [51] Vasiljevic T. & Jelen P. (2002) Lactose hydrolysis in milk as affected by neutralizers used for the preparation of crude β -galactosidase extracts from

- Lactobacillus bulgaricus*. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 3: 175-184.
- [52] Kim C., Ji E. & Oh D. (2004) A new kinetic model of recombinant beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. Biochemical and Biophysical Research Communications. 316:738-743.
- [53] Carrillo, A., Cruz A., Cárabez A., Guevara F. (2002) Hydrolytic Activity and Ultrastructural Changes in Fruit Skins from Two Prickly Pear (*Opuntia* sp.) Varieties during Storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50(6):1681-1685.
- [54] Smith, D., Starrett D. & Gross K. (1998) A Gene Coding for Tomato Fruit β -galactosidase II Is Expressed during Fruit Ripening. Plant Physiology and Biochemistry. 117: 417-423.
- [55] Pickens J., Wang F. & Striegler S. (2017) Picomolar inhibition of β – galactosidase (bovine liver) attributed to loop closure. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 25: 5194- 5202.
- [56] Juers, D. Matthews B. & Huber R. (2012) LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. Protein Science. 21(12): 1792-1807.
- [57] Monsan, P. & Paul, F. (1995) Enzymatic synthesis of oligosaccharides. FEMS Microbiology Reviews. 16: 185-192.
- [58] Husain, Q. (2010) β -Galactosides and their potencial applications: A review. Critical Reviews in Biotechnology. 30(1): 41-62.
- [59] Barile, D. & Rastall R. (2013) Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. Current opinion in biotechnology. 24(2): 214-219.
- [60] Szczodrak, J. (2000) Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β - galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 10: 631-637.
- [61] Xie, Y., Chin C., Campos D., Lee C. (2005) A Five-Zone Simulated Moving Bed for the Isolation of Six Sugars from Biomass Hydrolyzate. Industrial & Engineering Chemistry Research. 44 (26): 9904-9920
- [62] Bayramoglu, G., Tunai Y. & Arica M. (2007) Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly(GMA–MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. Catalysis Communications. 8: 1094-1101.
- [63] Haider, T. & Husain Q. (2009) Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate–starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk. International Dairy Journal. 19: 172-177.

- [64] Tischer W. & Kasche V. (1999) Immobilized enzymes: crystals or carriers?. *Trends in Biotechnology*. 17: 326-335.
- [65] Norouzzian, D. (2003) Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology. *Iran Journal of Biotechnology*. 1(4):197-206.
- [66] Mateo, C., Palomo J., Fernandez G., Guisan J. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 1451-1463.
- [67] Deng, H., Xu Z., Wu J., Ye P. (2004) A comparative study on lipase immobilized polypropylene microfiltration membranes modified by sugar-containing polymer and polypeptide. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 28: 95-100
- [68] Sanjay, G. & Sugunan S. (2005) Immobilization of α -amylase onto K-10 montmorillonite: characterization and comparison of activity in a batch and a fixed-bed reactor. *Clay Minerals*. 40: 499-510.
- [69] Reshmi, R., Sanjay G. & Sugunan S. (2006) Enhanced activity and stability of α -amylase immobilized on alumina. *Catalysis Communications*. 7: 460-465.
- [70] Lalonde, J. & Margolin, A. (2002) Immobilization of Enzymes, in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*, Second Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
- [71] Girelli, A. & Mattei E. (2005) Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Chromatography B*. 819: 3-16.
- [72] Khan, A., Akhtar S. & Husain Q. (2005) Simultaneous purification and immobilization of bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidases on bioaffinity support. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80: 198-205.
- [73] Kulshrestha, Y. & Husain Q (2006) Direct immobilization of peroxidase on DEAE cellulose from ammonium sulphate fractionated proteins of bitter melon (*Momordica charantia*). *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 470-477.
- [74] Cipolatti, E., Andrade E., Fernández R., Guimarães D. (2017) Support engineering: relation between development of new supports for immobilization of lipases and their applications. *Biotechnology Research and Innovation*.
- [75] Cunha, A., Fernández G., Bevilaqua J., Destain J. (2008) Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase—a Comparison of Stability of Physical Adsorption and Covalent Attachment Techniques. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 146:49–56.

- [76] Genari, A., Passos F. & Passos F. (2003) Configuration of a Bioreactor for Milk Lactose Hydrolysis. *Journal of Dairy Science*. 86: 2783-2789.
- [77] Plou F., Ballesteros A. (Septiembre de 2017). Research lines. Blogger. Applied Biocatalysis Group. Recuperado de <http://www.franciscopoulouab.eu/p/research-lines.htm>
- [78] Mandal, M., Kundu S., Kumar S., Panigrahi S. (2005) Magnetite nanoparticles with tunable gold or silver Shell. *Journal of Colloid and Interface Science*. 286:187-194.
- [79] Amaral, I., Carneiro-da-Cunha M., Carvalho L., Bezerra R. (2006) Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. *Process Biochemistry*. 41: 1213-1216.
- [80] Portaccio, M., Stellato S., Rossi S., Bencivenga U. (1998) Galactose competitive inhibition of β -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) immobilized on chitosan and nylon supports. *Enzyme and Microbial Technology*. 23:101-106.
- [81] Panesar, P., Kumari S. & Panesar R. (2010) Potential Applications of Immobilized β - Galactosidase in Food Processing Industries. *Enzyme Research*.
- [82] Husain, Q., Ansari S., Alam F. & Azam A. (2011) Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*. 49: 37-43.
- [83] Serio, M., Maturo C., Alteriis E., Parascandola P. (2003) Lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase: the effect of the supports and the kinetics. *Catalysis Today*. 79-80: 333-339.
- [84] Giacomini C., Villarino A. & Franco L. (1998) Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 4: 313–327.
- [85] Li X., Zhou Q., Chen X., (2007). Pilot-scale lactose hydrolysis using β -galactosidase immobilized on cotton fabric. *Chemical Engineering and Processing* 46: 497–500.
- [86] Panaro-Mariotti M., Yamanaka H., Araujo A., (2008) Hydrolysis of Whey Lactose by Immobilized β -Galactosidase. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*. 51(6): 1233-1240.
- [87] Kishore D., Talat M., Srivastava O. (2012). Immobilization of β -Galactosidase onto Functionalized Graphene Nano-sheets Using Response Surface Methodology and Its Analytical Applications. *PLoS ONE* 7(7): e40708.
- [88] Klein M., Fallavena L., Schöffler J., Ayub M. (2013) High stability of immobilized β -D-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers*. 95: 465-470.

- [89] Regenhardt. S. (2010) Estudio de la Inmovilización de la β -Galactosidasa para la reutilización de la lactosa del suero de Quesería. Tesis. Universidad Nacional del Litoral.
- [90] Serra-Alonso B. (2011). Inmovilización de Enzimas en Materiales Mesoporosos Ordenados. Tesis. Universidad Autónoma de Madrid.
- [91] Usurriaga, Y.; Rada M., Ramírez A., Montilla, A. & Villamiel, M. (2015). Obtención de leches hidrolizadas con β -galactosidasa inmovilizada sobre un soporte de óxido de silicio mesoporoso MCM-41. Tesis. Universidad del Cauca.
- [92] Musthapa, M., Akhtar S., Khan A., Husain Q. (2004) An economical, simple and high yield procedure for the immobilization/stabilization of peroxidases from turnip roots. *Journal of Scientific and Industrial Research*.63: 540-547.
- [93] Matto, M. & Husain Q. (2009) A novel calcium alginate-starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.57:164-170.
- [94] Laridi, R., Kheadr E., Benech R., Vuillermard J. (2003) Liposome encapsulated nisin Z: Optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*.13:325-336.
- [95] IUPAC (1976) Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II. *Pure and Applied Chemistry* 46: 71 - 90.
- [96] Corma A. (1997) From Microporous to Mesoporous Molecular Sieve Materials and Their Use in Catalysis. *Chemical Society Reviews* 97(6): 2373-2420.
- [97] ACS Material Store. (Septiembre del 2017) MCM-41. ACS Material – Advanced Chemicals Supplier. Recuperado de <https://www.acsmaterial.com/mcm-605.html>. [98] GE, Healthcare. (2007) PD-10 Desalting Column. Sweden: GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- [98] Esquivel, M. (2011) Síntesis, caracterización y aplicaciones de materiales periódicos mesoporosos organosilícicos. Tesis. Universidad de Córdoba.
- [99] Summer, J. & Howell S. (1935) A method for determination of saccharase activity. *Journal of Biological Chemistry*.108: 51-54.
- [100] Casablanca E., Ríos N., Álvarez M. & Terrazas E. (2009) Optimization of anaerobic thermophilic culture conditions for increasing xylanase enzyme production with encapsulated and free bacteria strains. *BIOFARBO*. 17(2): 51-59.
- [101] Bradford 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: 248-254.

- [102] Padilla, B., Ruiz A., Belloch C., Cardelle A., Corzo, N. (2012) Evaluation of oligosaccharide synthesis from lactose and lactulose using β -galactosidases from *Kluyveromyces* isolated from artisanal cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 5134-5141.
- [103] Rodríguez, S., Hernández O., Ruiz A. & Sanz M. (2011). A derivatization procedure for the simultaneous analysis of iminosugars and other low molecular weight carbohydrates by GC–MS in mulberry (*Morus* sp.) *Food Chemistry* 126: 353-359.
- [104] Daza, K. (2013). Síntesis de sílice mesoporosa ordenada hexagonalmente MCM-41 pentóxido de niobio incorporado y su efecto fotodegradante. Tesis. Universidad del Cauca.
- [105] Echeverry M., Giraldo L. & Lopez B. (2007) Synthesis and Functionalization of Silica Nanoparticles with Spherical Morphology. *Scientia et Technica* Año XIII, 36.
- [106] David Goodsell. (Septiembre del 2017). Beta-galactosidase. Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). Protein Data Bank (PDB). Recuperado de <https://pdb101.rcsb.org/motm/198>.
- [107] Torres, D., Gonçalves M., Teixeira J. & Rodrigues L. (2010) Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 438-454.
- [108] Corzo M., Copoví P., Olano A., Moreno J., Montilla A., (2012) Synthesis of prebiotic carbohydrates derived from cheese whey permeate by a combined process of isomerisation and transgalactosylation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93: 1591-1597.
- [109] Cardelle, A., Martínez M., Villamiel M., Olano A. & Corzo, N. (2008) Synthesis of oligosaccharides derived from lactulose and Pectinex Ultra SP-L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 3328-3333.
- [110] Montilla, A., Olano, A., Martínez C. & Corzo, N. (2011) Study of influential factors on oligosaccharide formation by fructosyltransferase activity during stachyose hydrolysis by Pectinex Ultra SP-L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59:10705-10711.
- [111] Martínez, C., Cardelle A., Corzo N., Olano A., Villamiel, M. (2008) Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chemistry*. 107:258-264.
- [112] Bultema, J., Kuipers B. & Dijkhuizen L. (2014) Biochemical characterization of mutants in the active site residues of the β -galactosidase enzyme of *Bacillus circulans* ATCC 31382. *FEBS Open Bio*. 4:1015-1020.

- [113] Schroder, S., Schmidt U. &Thiem J. (2004) Synthesis of oligosaccharides as potential novel food components and upscaled enzymatic reaction employing the β - galactosidase from bovine testes. *Tetrahedron*. 60: 2601–2608.
- [114] Boon M., Janssen A., Riet K. (2000) Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 271–281.