



Evaluación de la actividad de la β -galactosidasa inmovilizada en perlas de quitosano funcionalizadas con los agentes reticulantes, glutaraldehído y almidón oxidado

Torres Cuenca, Estefanía Patricia

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Trujillo Toledo, Luis Enrique PhD.

06 de abril de 2021

Hoja de resultados de la herramienta Urkund



Urkund Analysis Result

Analysed Document: Urkund Tesis-V2-PatriciaTorres-Urkund.docx (D100536814)
Submitted: 4/2/2021 11:47:00 PM
Submitted By: letrujillo3@espe.edu.ec
Significance: 1 %

Sources included in the report:

1599843055_60_GTI.docx (D80622272)
Avance a entregar.pdf (D81510299)
<https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/16072/1/Tesis%20EBP.pdf>
<http://148.206.53.233/tesiuami/UAMI14029.pdf>



Dr. Luis E. Trujillo Toledo



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado **“Evaluación de la actividad de la β -galactosidasa inmovilizada en perlas de quitosano funcionalizadas con los agentes reticulantes, glutaraldehído y almidón oxidado”** fue realizado por la señorita **Torres Cuenca, Estefania Patricia** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 06 de abril de 2021



firmado electrónicamente por:
**LUIS ENRIQUE
TRUJILLO
TOLEDO.....**

Trujillo Toledo, Luis Enrique PhD.

C. C.: 1755850276



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Torres Cuenca, Estefania Patricia**, con C.C. 1722347828, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Evaluación de la actividad de la β -galactosidasa inmovilizada en perlas de quitosano funcionalizadas con los agentes reticulantes, glutaraldehído y almidón oxidado"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 06 de abril de 2021

Torres Cuenca, Estefania Patricia

C.C.: 1722347828



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Torres Cuenca, Estefania Patricia**, con C.C. 1722347828, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Evaluación de la actividad de la β -galactosidasa inmovilizada en perlas de quitosano funcionalizadas con los agentes reticulantes, glutaraldehído y almidón oxidado"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 06 de abril de 2021

Una firma manuscrita en tinta azul que dice "Torres Patricia".

Torres Cuenca, Estefania Patricia

C.C.: 1722347828

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mi familia y de manera especial a mis amados padres que con su esfuerzo, cariño, palabras y apoyo me llenaron de fortaleza para día a día seguir trabajando por lo que quería.

A mis hermanos cuyo apoyo y cariño ha sido incondicional y al amor de mi vida Cristhian Pineida y la familia Pineida Tarco que han sido como una bendición.

Estefania Patricia Torres Cuenca

Agradecimientos

A los profesores, Miguel Ángel Méndez, PhD. y José Álvarez Barreto, PhD., destacados profesionales de la Universidad San Francisco de Quito y personas maravillosas que sin conocerme en su momento depositaron su confianza en mí para el desarrollo de este trabajo y cuyos conocimientos y enseñanzas me ayudaron a mejorar como profesional a lo largo de este tiempo. A mi tutor, el profesor Luis Enrique Trujillo, PhD. y mi cotutor Petronio Gavilanes Quizhpi, M.Sc. cuyo apoyo incondicional y conocimientos han aportado en mi desarrollo como profesional y persona.

Al laboratorio Clydent S.A. y al ingeniero Daniel Aguilera que depositaron su confianza en mí y me permitieron trabajar en sus instalaciones y desarrollar mi proyecto de la mejor manera posible. Al ingeniero Dario Cueva que me ayudó y asesoró durante los momentos más difíciles del desarrollo del trabajo, le quedo agradecida por todo su cariño, confianza y apoyo durante mi estancia en las instalaciones de la hacienda La Esmeralda, cuyo personal fueron las mejores personas que pude haber conocido durante el tiempo de la pandemia, con todos ellos estaré agradecida eternamente.

A mis padres, Patricio y Graciela, cuyo amor, apoyo incondicional y sabiduría me han permitido ser la persona y profesional que soy, a mis hermanos Rosita y Patito quienes con mucho amor y paciencia supieron ser mi apoyo y alegraron mis días durante mi carrera estudiantil. Gracias a mi familia por todo el amor que me brindaron, por el apoyo y la comprensión, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

A mi esposo Cristhian Pineida que llegó como una bendición a mi vida, y cuyo amor me ha regalado las dichas más grandes y ha sido mi motor y motivo para salir adelante en los momentos más difíciles; mi gratitud también a su maravillosa familia quienes han sido un regalo para mí y de quienes he aprendido lecciones muy valiosas ayudándome a mejorar como persona.

A mi amiga hermosa, Sharon Ortiz que fue mi compañera, mi guía, mi confidente y apoyo desde el inicio de la carrera universitaria, sin tu valiosa compañía y ayuda nada hubiera sido igual, muchas gracias por tu cariño.

Finalmente agradezco a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE y todo el personal docente cuyo conocimiento, sabiduría y apoyo durante mi etapa de emprendedora, hizo posible mi desarrollo como profesional y sobre todo como persona.

Índice de contenido

<i>Certificación</i>	3
<i>Hoja de resultados de la herramienta Urkund</i>	2
<i>Responsabilidad de autoría</i>	4
<i>Autorización de publicación</i>	5
<i>Dedicatoria</i>	6
<i>Agradecimientos</i>	7
<i>Índice de contenido</i>	9
<i>Índice de tablas</i>	13
<i>Índice de figuras</i>	14
<i>Resumen</i>	16
<i>Abstract</i>	17
<i>Capítulo 1: Introducción</i>	18
<i>Antecedentes</i>	18
<i>Justificación</i>	20
<i>Objetivos de la investigación</i>	22
Objetivo general del proyecto.....	22
Objetivos específicos del proyecto.....	22
<i>Hipótesis de la investigación</i>	22
<i>Capítulo 2: Marco teórico</i>	24
<i>Lactosa</i>	24

	10
Enzimas	27
Conceptos básicos	27
La β -galactosidasa	29
Inmovilización enzimática	36
Generalidades	36
Ventajas y desventajas de la inmovilización.....	37
Quitosano	38
Modificación del quitosano	41
Funcionalización del quitosano	42
Glutaraldehído	43
Almidón oxidado	46
Capítulo 3: Materiales y métodos	51
Instituciones participantes	51
Colaboradores científicos	51
Área de estudio	51
Metodología	51
Preparación del almidón oxidado.....	51
Caracterización de la β -galactosidasa	52
Determinación de la glucosa en solución	53
Determinación de la concentración de proteína	55
Preparación de las perlas de quitosano.....	56
Funcionalización de las perlas e inmovilización de la β -galactosidasa	57
Diseño experimental de la inmovilización.....	59
Análisis estadístico	60

Medición de la actividad de la β -galactosidasa libre e inmovilizada.....	60
Indicadores de la eficacia de la inmovilización	63
Capítulo 4: Resultados y discusión.....	65
Caracterización de la enzima en solución	65
Características del soporte.....	68
Morfología de las perlas de quitosano	68
Funcionalización de las perlas de quitosano	70
Inmovilización de la β-galactosidasa	72
Evaluación de la actividad y la eficacia de la inmovilización	72
Capítulo 5: Conclusiones.....	83
Capítulo 6: Recomendaciones	85
Apéndices	87
Apéndice 1 Diseño experimental del proyecto de investigación.....	87
Apéndice 2 Análisis estadístico de los indicadores de eficacia de la inmovilización .	88
Apéndice 2.1 Análisis de la actividad retenida	88
Apéndice 2.2 Análisis del rendimiento de la inmovilización	89
Apéndice 2.3 Análisis de la retención del soporte	90
Apéndice 2.4 Análisis de la eficiencia de la inmovilización	91
Apéndice 3 Esquemas de referencia para la metodología	93
Apéndice 3.1 Diagrama de funcionalización e inmovilización de las perlas de quitosano	93
Apéndice 3.2 Diagrama de determinación de la concentración de proteína	93

Apéndice 3.3 Diagrama de los ensayos para la determinación y cálculos de la actividad.....	94
Referencias.....	95

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Diseño experimental empleado en el estudio</i>	60
Tabla 2 <i>Actividad de la β-galactosidasa inmovilizada</i>	73
Tabla 3 <i>Resultados obtenidos para los indicadores de la eficacia de la inmovilización</i>	75
Tabla A1 <i>Corridas del diseño experimental</i>	87

Índice de figuras

Figura 1 Estructura química de la lactosa.....	24
Figura 2 Transcurso de la reacción enzimática a través del tiempo con concentración constante de enzima.....	28
Figura 3 Representación gráfica de la estructura de la β -galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i>	31
Figura 4 Proceso de hidrólisis y transgalactosilación de la lactosa.....	32
Figura 5 Estructura química del quitosano, D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina..	39
Figura 6 Desacetilación de la quitina.....	39
Figura 7 Estructura del glutaraldehído y propiedades químicas.....	44
Figura 8 Esquema del quitosano reticulado y funcionalizado con glutaraldehído.....	44
Figura 9 Esquema de la enzima inmovilizada en el quitosano funcionalizado.....	45
Figura 10 Estructura del almidón.....	47
Figura 11 Esquema de la oxidación del almidón.....	49
Figura 12 Esquema del quitosano reticulado con almidón oxidado.....	50
Figura 13 Curva de calibración a diferentes concentraciones de glucosa ($R^2 > 0.99$).....	53
Figura 14 Curva estándar de BSA en buffer fosfato de potasio 0.1 M y pH 7.0.....	56
Figura 15 Coagulación del quitosano en la solución de NaOH:EtOH 1:1.....	57
Figura 16 Funcionalización de las perlas de quitosano.....	58
Figura 17 Inmovilización de la β -galactosidasa en las perlas funcionalizadas.....	59
Figura 18 Ensayos de actividad enzimática.....	62

Figura 19 <i>Curva de liberación de glucosa a través del tiempo</i>	65
Figura 20 <i>Liberación de glucosa a diferentes concentraciones de enzima</i>	67
Figura 21 <i>Morfología de las perlas obtenidas según el tamaño de la gota</i>	68
Figura 22 <i>Morfología de las perlas al coagular 8 μl de solución de quitosano</i>	69
Figura 23 <i>Perlas de quitosano tras la activación con los agentes reticulantes</i>	71
Figura 24 <i>Diagramas resumen para los resultados de la actividad recuperada</i>	74
Figura 25 <i>Histograma comparativo de los indicadores de eficacia</i>	76
Figura 26 <i>Diagramas resumen para los resultados de la eficiencia</i>	78

Resumen

La β -galactosidasa o lactasa es una enzima de gran importancia en la industria láctea, sin embargo en los procesos industriales, el empleo de enzimas en solución conlleva ciertas desventajas operativas, convirtiendo a los sistemas inmovilizados la alternativa tecnológica más adecuada y rentable. El objetivo del presente proyecto de investigación es evaluar la actividad de la β -galactosidasa inmovilizada en perlas de quitosano reticulado con dos agentes funcionalizantes, el glutaraldehído y el almidón oxidado, en dos concentraciones, 1% y 3%. A partir de los ensayos se concluye que el mejor reticulante del quitosano es el glutaraldehído sin un efecto significativo de la concentración. Para las cinco variables analizadas, los mejores valores son, 31.07 U/gss de actividad inmovilizada específica, 9.96% de actividad recuperada y 98.08% de lactasa retenida en el soporte al emplear glutaraldehído al 1%, un 100% de rendimiento usando glutaraldehído al 3% y un 24.7% de eficiencia con almidón oxidado al 1%. En esta investigación se comprueba que el glutaraldehído es un excelente reticulante del quitosano maximizando sus propiedades como soporte, sin embargo, siendo ésta de las primeras donde se reporta al sistema quitosano-almidón oxidado para la inmovilización de la β -galactosidasa, y con base a los resultados, el almidón oxidado es un agente reticulante prometedor en los sistemas de inmovilización enzimática.

Palabras clave:

- **β -GALACTOSIDASA**
- **INMOVILIZACIÓN**
- **QUITOSANO**
- **GLUTARALDEHÍDO**
- **ALMIDÓN OXIDADO**

Abstract

β -galactosidase or lactase is an enzyme of great importance in the dairy industry, however in industrial processes, the use of soluble enzymes involves certain operational disadvantages, making immobilization systems the most suitable and profitable technological alternative. The objective of this research project is to evaluate the activity of immobilized β -galactosidase in chitosan beads cross-linked with two functionalizing agents, glutaraldehyde and oxidized starch, in two concentrations, 1% and 3%. From the assays, it is concluded that the best crosslinking agent for chitosan is glutaraldehyde without a significant effect on the concentration. For the five variables analyzed, the best values are 31.07 U/gss of specific immobilized activity, 9.96% of recovered activity, and 98.08% of lactase retained in the support when 1% glutaraldehyde was used, a 100% yield when was used 3% glutaraldehyde and 24.7% immobilization efficiency with 1% oxidized starch. As in many investigations, glutaraldehyde is found to be a remarkable crosslinking agent for chitosan, maximizing its properties as a support, however, this research is one of the first where the chitosan-oxidized starch system is reported for the immobilization of β -galactosidase, and based on the results, oxidized starch is a promising crosslinking agent for enzyme immobilization systems.

Key words:

- **β -GALACTOSIDASE**
- **IMMOBILIZATION**
- **CHITOSAN**
- **GLUTARALDEHYDE**
- **OXIDIZED STARCH**

Capítulo 1: Introducción

Antecedentes

La β -galactosidasa, también conocida como lactasa, fue descubierta en 1894 y desde esa fecha ha sido empleada en muchos procesos, siendo los industriales aquellos de mayor desarrollo en la actualidad. (Vera et al., 2020; Vera & Illanes, 2016). Las investigaciones direccionadas a la inmovilización de la β -galactosidasa datan de la década de 1970 (T. P. Shukla & Wierzbicki, 1975), en el artículo de revisión realizado por Finocchiaro, Olson, & Richardson, (1980) se mencionaban las diversas fuentes de obtención de la enzima, *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces lactis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus oryzae* y *Curvularia inaequalis*, y los soportes que fueron empleados para la inmovilización, destacando las resinas de intercambio iónico, hidrogeles de agarosa, métodos con colágeno modificado y fibras de celulosa, sistemas de soporte de vidrio poroso, encapsulaciones con celulosa y nylon, etc.

En la actualidad existen muchas investigaciones con diferentes matrices y soportes empleados para la inmovilización de la β -galactosidasa, por ejemplo matrices de celulosa y concanavalina A (Ansari & Husain, 2010), macro y micro partículas de quitosano (Klein et al., 2012, 2013), matrices de sílice (Li et al., 2018), nanopartículas magnéticas (Pan et al., 2009), soportes clásicos como las perlas de alginato de calcio (Becerra et al., 2001), soportes sintéticos con resinas de intercambio iónico (Guidini et al., 2010), en membranas de polisulfona (Gonawan, 2019), nanopartículas (Alshanberi et al., 2021; Selvarajan et al., 2019) etc., que han direccionado las investigaciones a la aplicación a escala industrial.

Los sistemas de inmovilización con quitosano se registran en los años 1970 en adelante, sus ventajas atractivas como la abundancia de su precursor, quitina, en

muchos sistemas biológicos y su poca toxicidad lo volvieron un material llamativo para el uso en industria principalmente la alimenticia (Muzzarelli, 1980). Las primeras investigaciones del quitosano para la inmovilización de la β -galactosidasa se realizaban empleando el glutaraldehído como agente funcionalizante (Bissett & Sternberg, 1978; Leuba & Widmer, 1977; Stanley, W. & Watters, G. 1975 citado por Muzzarelli, 1980).

En la actualidad las formulaciones con quitosano para su empleo como soporte en la inmovilización de lactasa se han ido modificando, ejemplos como: soportes con sílice y quitosano (Ricardi et al., 2018), nanopartículas magnéticas de quitosano (Joseph et al., 2021; Pan et al., 2009), hidrogeles con quitosano, ácido acrílico, N-N'-metilenbisacrilamida y persulfato de potasio (Wolf et al., 2021), etc. A fin de emplear otros agentes reticulantes que no tengan características tóxicas como el glutaraldehído (Zeiger et al., 2005) se han investigado reticulantes como la genipina (Klein et al., 2016) o la epíclorhidrina (Urrutia et al., 2018). En esta investigación se propone el empleo del almidón oxidado como sustituto del glutaraldehído debido a que las reacciones entre los grupos funcionales del almidón y el quitosano son las mismas que con el glutaraldehído, es decir se forman bases de Schiff (Tharanathan, 2005).

El almidón oxidado se ha empleado para inmovilizar enzimas, en la investigación de Jiugao et al., (1994) empleo el almidón oxidado con periodato para la inmovilización de la ureasa o para esta misma enzima se empleó almidón dialdehído poroso (Luo & Fu, 2010), este polímero también se ha empleado para β -galactosidasa a través de los agregados de enzimas reticuladas (CLEA) o las investigaciones más actuales se han centrado en el desarrollo de nanopartículas magnéticas con almidón dialdehído (Qiu et al., 2020; X. Yang et al., 2019; Ziegler-Borowska, 2019). Tan solo se encontró una investigación donde se empleaba el almidón oxidado como agente funcionalizante de quitosano, en el trabajo realizado por Chen et al., (2010), se empleó almidón dialdehído

con un grado de oxidación del 90% para la inmovilización de xilanasa logrando una recuperación de la actividad superior a la actividad obtenida con glutaraldehído, 60.8% y 54.2% respectivamente, con esta investigación se aclara el panorama sobre la posibilidad de usar este polímero modificado de bajo costo junto con el quitosano para la inmovilización de la lactasa.

Justificación

Alrededor del 70% de la población mundial adulta es intolerante a la lactosa (Dutra Rosolen et al., 2015), según Paz y Miño, (2016) un 70% de la población mestiza es en cierto grado intolerante a la lactosa, y considerando que en el país anualmente se producen aproximadamente 5.02 millones de litros de leche cruda por día donde el 37% de la leche se destina para el autoconsumo y un 53% es captado por las industrias para la elaboración de los productos y derivados lácteos en general (CILEcuador, 2018); la cantidad de leche que debe ser procesada para conseguir productos sin lactosa es muy grande de ahí la necesidad de emplear procesos eficientes para la utilización de la lactasa.

Las enzimas catalizan una variedad de reacciones siendo de mucho interés en la industria química, farmacéutica, alimenticia, química ,etc., sin embargo su empleo en forma de solución involucra varias dificultades técnicas importantes pues, en forma libre, las enzimas pierden estabilidad operativa si se emplean por largos periodos, el almacenamiento prolongado reduce su vida útil y una vez que se han vertido en una mezcla, la recuperación de estas es difícil impidiendo su reuso y encareciendo los procesos por la necesidad de una adquisición continua (Brena & Batista-Viera, 2006; Homaei et al., 2013). Los métodos de inmovilización permiten la reutilización de las enzimas al facilitar su separación del medio de reacción, además se ha visto que

mejoran el rendimiento, la estabilidad operacional y de almacenamiento, la especificidad y permiten el uso de las enzimas de forma continua (Li et al., 2017; Mateo et al., 2007; Xavier et al., 2018).

Para las aplicaciones industriales, el proceso de inmovilización debería cumplir con varias características: simplicidad en el método de fabricación del soporte y bajos costos de la materia prima; adicionalmente, al hablar de una enzima de amplio uso en la industria alimenticia, las características de biocompatibilidad y no toxicidad del soporte son necesarias (García-Galan et al., 2011; Klein et al., 2013). El quitosano, un poliaminosacárido que es subproducto de los desechos de la industria acuícola, cumple con las características mencionadas y en adición presenta propiedades antibacterianas contra microorganismos Gram positivos y negativos (Krajewska, 2004; Venugopal, 2019), y que ya ha sido empleado en sistemas de inmovilización enzimática (Nu et al., 2017; Z.-X. Tang et al., 2012; Tharanathan, 2005)

Según la información recopilada por Satar, Jafri, Rasool, & Ansari, (2017), la β -galactosidasa ha sido inmovilizada en variedad de soportes (gelatina, alginato de calcio, quitosano, agarosa, grafito, nanopartículas magnéticas, etc.) con ayuda del glutaraldehído como agente de reticulación que no solo activa los soportes al formar enlaces entre sus grupos carboxilo con los grupos amino de la enzima sino que también mejora la resistencia mecánica del soporte optimizando su rendimiento y evitando la descomposición en condiciones desfavorables (Klein et al., 2012; Satar et al., 2017). El glutaraldehído, sin embargo, es un agente irritante y corrosivo de la piel, ojos y vías respiratorias si no es manipulado con cuidado (Takigawa & Endo, 2006; Zeiger et al., 2005). Estudios sobre la toxicidad del glutaraldehído en solución demuestran que a bajas concentraciones (0.5 ppm), durante una exposición de tres días, puede provocar la muerte celular de cultivos *in vitro* de fibroblastos (Sung et al., 1999).

Por otro lado, el almidón oxidado se han estudiado bastante en unión con el quitosano para la formación de hidrogeles con efectos antimicrobianos (R. Tang et al., 2003) o como biopolímeros estructurales para ingeniería de tejidos y reparación de cartílagos (Kamoun, 2016), estas aplicaciones se han estudiado por las características de biocompatibilidad y biodegradabilidad de los hidrogeles (Teng, 2012). Así como el glutaraldehído, este polisacárido oxidado por reacciones de base de Schiff entre sus grupos carbonilo y los grupos amino de la enzima y puede emplearse para provocar la unión covalente de la β -galactosidasa con el quitosano (Hongge Chen et al., 2010).

Con estas consideraciones, el desarrollo de matrices económicas, biocompatibles y capaces de mejorar las características de la enzima se vuelve un tema de gran importancia para las industrias que emplean lactasa como parte de su proceso productivo.

Objetivos de la investigación

Objetivo general del proyecto

Evaluar la actividad de la β -galactosidasa inmovilizada en perlas de quitosano funcionalizadas con los agentes reticulantes, glutaraldehído y almidón oxidado.

Objetivos específicos del proyecto

1. Caracterizar la enzima y el soporte empleado en la inmovilización para establecer las condiciones idóneas de ensayo.
2. Explorar el efecto de utilizar glutaraldehído y almidón oxidado como agentes funcionalizantes de las perlas de quitosano en los parámetros de actividad, rendimiento y eficiencia de la inmovilización.

Hipótesis de la investigación

- La inmovilización de la β -galactosidasa con el almidón oxidado como agente reticulante presenta características similares a la inmovilización con glutaraldehído.

- La concentración de los agentes reticulantes tienen un efecto significativo en la inmovilización de la β -galactosidasa.

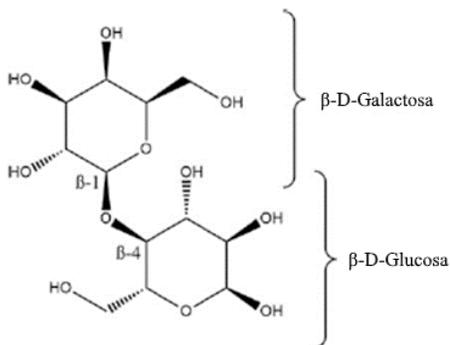
Capítulo 2: Marco teórico

Lactosa

La lactosa (nombre IUPAC 4-O-(β -D-galactopiranosil)-D-glucopiranososa) es un disacárido reductor por la presencia del grupo hemiacetal libre de la glucosa, está presente en la leche de la mayoría de mamíferos y se forma por la unión de una molécula de galactosa y una de glucosa mediante un enlace glucosídico β que une los grupos hidroxilo del carbono C1 y el carbono C4 de los respectivos monosacáridos (Fox, 2009; Mckee & Mckee., 2014; Ouellette & Rawn, 2018).

Figura 1

Estructura química de la lactosa.



Nota: Modificado de Gonawan, (2019)

La concentración de la lactosa en la leche dependerá de la especie, la leche de los primates, incluida la del humano, tiene las concentraciones más altas de lactosa, 7%, siendo la leche del mono verde la de mayor concentración, 10.2%; en el caso de la leche de vaca tiene una concentración de lactosa del 4.8% siendo este valor igual para la leche de oveja, de búfalo silvestre y de gato, etc. (Fox et al., 2015; Walker & Thomas, 2019).

La lactosa al ser un azúcar reductor puede formar un hemiacetal creando un nuevo centro quiral que provoca que la lactosa tenga dos anómeros, α y β , intercambiándose entre ellos por mutarrotación, estos anómeros tienen propiedades diferentes de rotación, solubilidad y cristalización (Fox, 2009). La lactosa es mucho menos dulce que la sacarosa y fructosa y de los menos solubles en comparación a los otros azúcares (Harper, 1992; Illanes, 2016).

La lactosa, en la industria, suele emplearse como agente endulzante en productos en donde no es requerido altos niveles de azúcar, se lo utiliza como ingrediente de fórmulas infantiles, en la industria farmacéutica es empleado para el recubrimiento o relleno de tabletas y suele ser la principal fuente de carbono para las bacterias ácido lácticas que participan en la elaboración de productos lácteos fermentados (Audic et al., 2003; Fox, 2009).

En la leche, la lactosa es fácilmente metabolizada durante el periodo de lactancia, sin embargo al pasar esta etapa la producción de la β -galactosidasa se ve sustancialmente reducida en las paredes intestinales lo que provoca una inadecuada metabolización que deriva en la producción de ácido láctico e hidrógeno generando los síntomas gastrointestinales comunes de la intolerancia a la lactosa, hinchazón abdominal, calambres intestinales, diarrea, flatulencia, dolor de cabeza e incluso problemas en la piel y articulaciones (Dutra Rosolen et al., 2015; Morelli et al., 2019; Szilagyi et al., 2019; Walker & Thomas, 2019). Alrededor del 70% de la población tiene intolerancia a la lactosa o es en cierto porcentaje incapaz de hidrolizarla por una insuficiente síntesis de lactasa (Szilagyi et al., 2019) provocando que la industria láctea cada día mejore los procesos para la obtención de productos libres de lactosa o bajos en lactosa siendo la β -galactosidasa la primera opción para conseguir la hidrólisis de este disacárido (Dutra Rosolen et al., 2015).

Otra fuente importante de lactosa y que es considerado material de desecho de las industrias lácteas es el suero de leche, y el permeado de suero teniendo este último una cantidad aproximada de lactosa del 85% en base seca (Illanes, 2016). El suero, que posee la mayor parte de la lactosa, se obtiene durante la elaboración de los quesos una vez que se ha formado la cuajada y la lactosa residual que queda en el queso es consumida gradualmente en el proceso de fermentación (Corzo et al., 2010); dependiendo del tipo de queso elaborado se pueden obtener dos sueros diferentes, el ácido y el dulce, siendo el primero el resultado de la producción del queso cottage por acidificación de la leche obteniéndose un suero de pH 5 o inferior, mientras que el segundo, un suero de pH 6, es el subproducto de la coagulación enzimática de la leche en la producción de la mayoría de quesos (Illanes, 2016; Zall, 1992).

En Ecuador, según el Centro de la Industria Láctea (CIL) se generan diariamente 900000 litros de suero al procesar 1.2 millones de litros de leche en la producción de queso y tan solo un 10% del suero de leche líquido es nuevamente empleado por la industria láctea (Mendoza & González, 2018), que según el Acuerdo Interministerial No. 177 solo es posible por parte de las industrias que cuenten con el certificado de Buenas Prácticas de Manufactura registrado en la ARCSA, para la elaboración de productos pulverizados y en la elaboración de quesos de suero o bebidas de suero debidamente etiquetadas (MPCEIP et al., 2019). El resto del suero, a nivel de industrial artesanal principalmente, suele emplearse como fuente de alimento para animales o descartado al alcantarillado convirtiéndose en un problema de contaminación pública (Marcial, 2012) puesto que la demanda química de oxígeno (DQO) de un litro de suero de leche se encuentra entre 60-70 g/L y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) entre un 35-45 g/L (Mawson, 1994) debiendo ser tratado previo a su disposición al cuerpo de agua receptor.

Enzimas

Conceptos básicos

Las enzimas en su mayoría son proteínas que poseen funciones catalíticas que al unirse a un ligando (moléculas de pequeño tamaño e inclusive otras proteínas) a través del sitio de fijación o sitio activo cambian su estructura tridimensional favoreciendo la formación del producto sin consumirse o afectarse permanentemente al concluir la reacción (Bender et al., 2016; Feduchi et al., 2011). Las enzimas al ser catalizadores aumentan la velocidad de las reacciones químicas disminuyendo la energía de activación de modo que las moléculas pueden superar más rápido la barrera energética y se transforman en productos (Nelson & Cox, 2005).

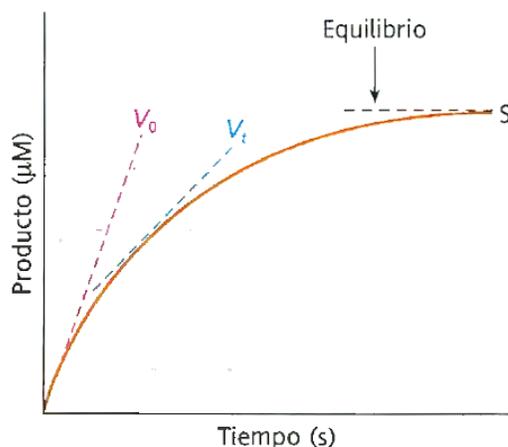
En general la actividad catalítica de las enzimas depende principalmente de las interacciones entre el sustrato y los aminoácidos que conforman el sitio activo sin embargo algunas enzimas requieren de componentes adicionales para funcionar a plenitud, los cofactores y las coenzimas, los primeros son iones metálicos como Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , etc., que suelen ser parte de la estructura proteica e incluso algunos se pueden unir al sustrato y mejorar la interacción con la enzima; los segundos hacen referencia a moléculas orgánicas o metaloorgánicas complejas que participan en el transporte transitorio de grupos funcionales, la mayoría se derivan de las vitaminas (Mckee & Mckee., 2014; Nelson & Cox, 2005; Punekar, 2018). En el caso de la β -galactosidasa un cofactor que afecta positivamente la actividad catalítica de la enzima es el ion Mg^{2+} y cuya presencia se ha visto puede mejorar un 135% la actividad de la enzima inmovilizada (Ansari & Husain, 2010).

Cuando se habla sobre la caracterización de las enzimas lo primero que se debe considerar es el estudio de la catálisis enzimática mediante ensayos de cinética con los

cuales es posible determinar la velocidad de la reacción, es decir formación de producto por unidad de tiempo, al emplear concentraciones de sustrato mucho mayores a la concentración de la enzima (Nelson & Cox, 2005). Las reacciones enzimáticas, sencillas, tienen principalmente tres etapas de reacción la primera corresponde a una cinética de primer orden donde la relación de la formación de producto a través del tiempo es lineal, una segunda etapa curvilínea donde la formación del producto se ve disminuida y la tercera etapa correspondiente a una cinética de orden cero que sin importar el tiempo transcurrido no se obtendrá una mayor concentración de producto, es decir, la velocidad no va variar así se aumente la concentración de sustrato (Feduchi et al., 2011).

Figura 2

Transcurso de la reacción enzimática a través del tiempo con concentración constante de enzima.



Nota: Tomado de Feduchi et al., (2011).

Del mismo modo para los estudios de cinética enzimática se debe considerar que existen factores externos que influyen notablemente en el desempeño de las proteínas, la temperatura y el pH. La temperatura tiene un efecto directo a nivel energético en las reacciones químicas y en la enzima favorece positivamente la

conformación tridimensional durante el acople con el sustrato, cuando la temperatura de la reacción está a la temperatura óptima de la enzima está cataliza la conversión del sustrato con su máxima eficiencia, sin embargo se debe tener cuidado de no trabajar con temperaturas elevadas porque se produciría la desnaturalización de la proteína provocando que esta pierda su función catalítica (Feduchi et al., 2011; Mckee & Mckee., 2014).

El pH, como medida de concentración de los iones hidrógeno, tiene un efecto directo en la afinidad del sustrato debido a que las variaciones en los estados de ionización de los grupos ácido-base de las cadenas laterales pueden alterar las interacciones con el sustrato, e incluso si existen modificaciones importantes en los grupos funcionales se puede ver afectada la estructura terciaria de la proteína. Cuando las variaciones del pH son muy bruscas la enzima tiende a desnaturalizarse (Feduchi et al., 2011).

La β -galactosidasa

Generalidades

La β -galactosidasa (β -D-galactósido galactohidrolasa, EC 3.2.1.23) es una glicosil hidrolasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces β -glicosílicos de los β -D-galactosidos como la lactosa, específicamente los terminales no reductores de la β -D-galactosa (Gonawan, 2019; Moss, 2020). Esta enzima está presente en una gran variedad de organismos, en animales las fuentes principales son los intestinos, en vegetales como manzanas, melocotones, albaricoques y almendras y en microorganismos como hongos, levaduras y bacterias (Harju et al., 2012; Husain, 2010; T. P. Shukla & Wierzbicki, 1975). Entre los microorganismos de mayor importancia industrial están los hongos: *Aspergillus aryzae* y *Aspergillus niger*, las levaduras:

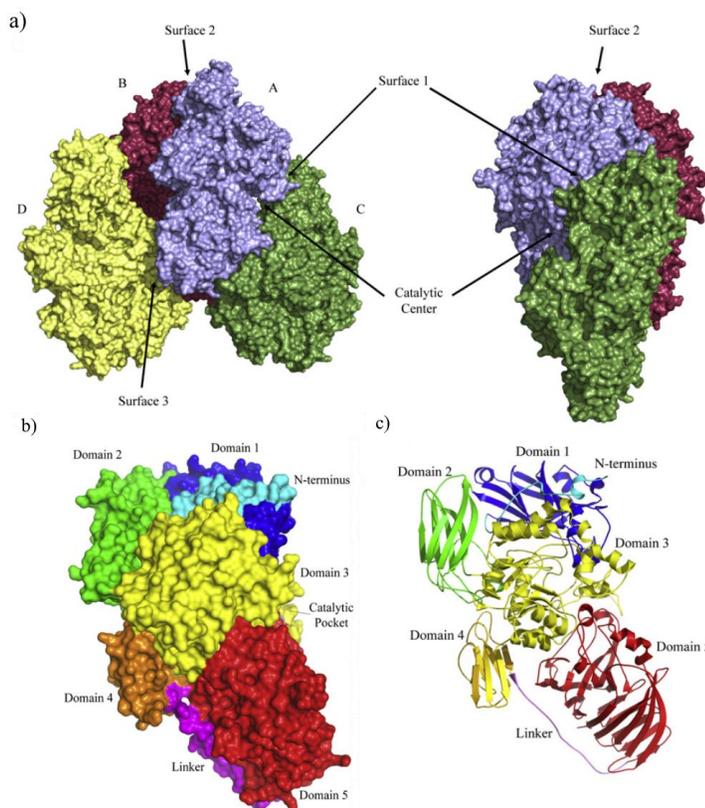
Kluyveromyces lactis y *Kluyveromyces fragilis* y las bacterias: *Escherichia coli* cuya β -galactosidasa fue una de las más estudiadas debido a la importancia del operon *Lac* en los estudios de regulación génica y de expresión, *Bacillus sp.* y *Lactobacillus sp.* (Anisha, 2017; Dutra Rosolen et al., 2015; Illanes, 2016).

La β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* es una de las enzimas de más amplio uso en la industria (Plou et al., 2017). La lactasa es parte de la familia GH2 correspondiente a las glicosil hidrolasas procariotas y por eso su similitud estructural y catalítica con la β -galactosidasa de *E. coli* (Plou et al., 2017). En análisis estructurales por cristalografía se ha observado que la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* es una enzima tetramérica de cuatro subunidades formada por la dimerización de dímeros poseyendo dos sitios activos y donde cada subunidad, de aproximadamente 1024 residuos y 119 kDa, posee cinco dominios localizándose el sitio activo en el dominio 3 (**Figura 3**); contiene iones de magnesio y sodio que son claves durante la hidrólisis por estar directamente asociados con el acomodamiento de la galactosa en el sitio activo (Pereira-Rodríguez et al., 2012).

Empleando la técnica espectroscópica de dicroísmo circular, en la investigación de Kayukawa et al., (2020) se pudo determinar que la estructura secundaria de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* está compuesta aproximadamente por “un 22.6% de hélices α , un 29% de láminas β , un 20.9% de giros β y un 27.5% de espirales al azar (random coil)”.

Figura 3

Representación tridimensional de la estructura de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.



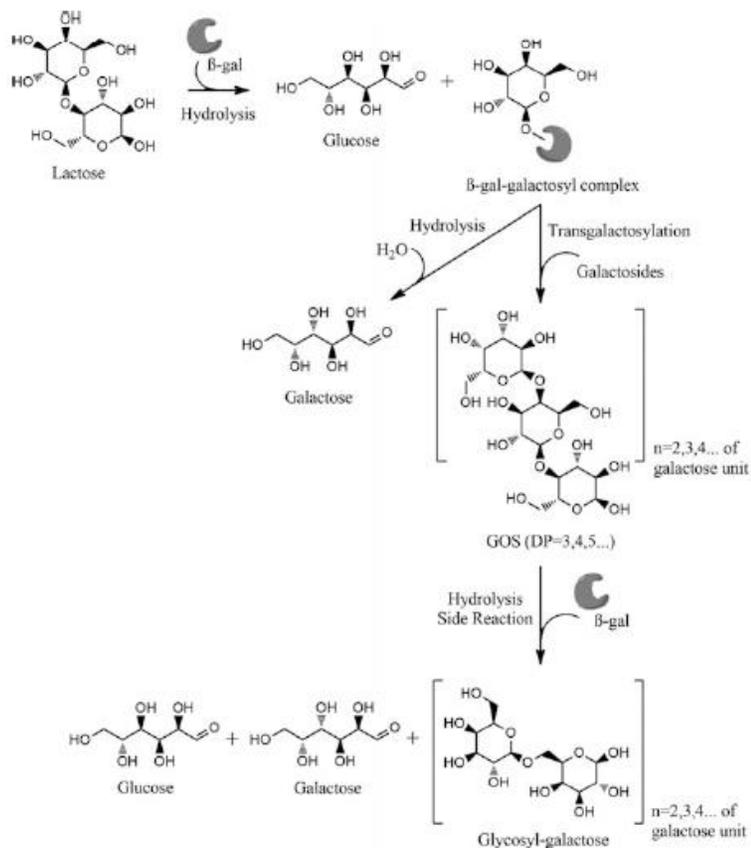
Nota: a) Representación superficial de la estructura cuaternaria de la β -galactosidasa como tetrámero (subunidades A, B, C y D), b) representación superficial de la estructura terciaria de una subunidad y c) representación en “cartoon” de la estructura secundaria de una subunidad. Fuente: Tomado de Pereira-Rodríguez et al., (2012)

La β -galactosidasa tiene actividad hidrolítica y de transgalactosilación donde la primera cataliza la conversión de lactosa en glucosa y galactosa, monosacáridos de fácil digestión, y con la segunda, en presencia de altas concentraciones de lactosa, se cataliza la formación de los galactooligosacáridos (GOS) al transferir los monosacáridos residuales (glucosa o galactosa) a moléculas de lactosa (**Figura 4**) conformando polímeros de difícil digestión que son empleados como prebióticos de la

microbiota intestinal favoreciendo la actividad del sistema inmune (Gonawan, 2019; Klein et al., 2013).

Figura 4

Proceso de hidrólisis y transgalactosilación de la lactosa.



Nota: Tomado de Gonawan, (2019)

La reacción de hidrólisis de la lactosa dentro del sitio activo de la β-galactosidasa tiene lugar en dos pasos por acción de dos grupos funcionales, en el primer paso el grupo imidazol actúa como nucleófilo porque ataca el centro anomérico del carbono C1 del β-galactósido produciendo el complejo galactosil-enzima y el segundo grupo, el grupo sulfhidrilo (-SH) actúa como un ácido que protona el átomo de oxígeno del enlace glicosídico activando la aglicona permitiendo la liberación del residuo glucosilo, en el segundo paso de la reacción el anión sulfhidrilo (S⁻) actúa como base

para extraer un protón del agua facilitando el ataque del grupo hidroxilo (OH^-) en el aceptor de galactosa que al recuperar su forma ácida ataca el complejo enzimático liberando la galactosa del sitio activo de la enzima (T. P. Shukla & Wierzbicki, 1975; Vera et al., 2020).

Para los estudios de actividad de la β -galactosidasa es factible el empleo de la lactosa como sustrato calculando la glucosa o galactosa residual y debido a las reacciones de transferencia se suele aconsejar la determinación de la aparición de producto como la desaparición del sustrato (Richmond et al., 1980). En la actualidad el sustrato más empleado para los ensayos de actividad es el *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) que es un sustrato cromogénico sintético que al hidrolizarse libera el *o*-nitrofenol que puede ser cuantificado por métodos espectrofotométricos a 420 nm (Anisha, 2017). En estudios con β -galactosidasa de *E. coli* se observó que las tasas de reacción (actividad) para el ONPG son mucho mayores en comparación con la lactosa (Ladero et al., 2001). En esta investigación se decidió emplear lactosa como sustrato para los ensayos de actividad

Dependiendo de las fuentes de la β -galactosidasa las condiciones de trabajo varían, por ejemplo aquellas enzimas procedentes de levaduras son empleadas en la hidrólisis de la lactosa en leche o suero dulce por tener un pH óptimo entre 6.5 y 7 mientras que aquellas enzimas provenientes de hongos trabajan en condiciones ácidas, pH 3.0 a 5.0 siendo óptimas para la hidrólisis de suero ácido (Anisha, 2017; Nath et al., 2014). En el caso de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*, Ha-Lactase™ 5200 de CHR HANSEN, en rango de pH es de 6.5 a 8.0 y que por otras investigaciones se sabe que el óptimo es de 6.5 a 7 (Klein et al., 2013).

Aplicaciones de la β -galactosidasa

Entre las primeras aplicaciones de la lactasa tenemos la elaboración de productos para las personas con intolerancia a la lactosa como la leche deslactosada, que industrialmente se obtiene por el empleo de la enzima en solución aunque ya existen empresas que utilizan sistemas inmovilizados para este propósito (Vera et al., 2020), productos bajos en lactosa como yogures y helados (T. P. Shukla & Wierzbicki, 1975), la enzima per se, sola o junto con otras enzimas digestivas, como suplemento para personas con intolerancia (Vera et al., 2020).

Adicionalmente la lactosa hidrolizada de la leche y el suero puede mejorar las características sensoriales y tecnológicas de los alimentos, por ejemplo en la producción de productos basados en leche concentrada (leche condensada, leche evaporada, leche congelada o helado) donde es necesaria la hidrólisis de la lactosa para minimizar su cristalización y aumentar su solubilidad (Mariotti et al., 2008; Xavier et al., 2018). La β -galactosidasa también puede utilizarse para tratar el problema de contaminación que genera el suero de leche y el permeado de suero que es descartado por la industria quesera al reducir la lactosa, el principal compuesto de estas soluciones y el de mayor aporte en cuando a DBO y DQO, y que no solo lo reduce o elimina sino que la β -galactosidasa es capaz de sintetizar productos de alto valor agregado empleando dichas fuentes como materia prima (Vera et al., 2020).

Los siguientes derivados de la lactosa obtenidas por la acción hidrolítica y sobre todo de transgalactosilación de la lactasa han ido ganando mayor interés a nivel industrial promoviendo la investigación y el desarrollo tecnológico durante los últimos tiempos a fin de mejorar la producción a grandes escalas.

Los *galacto-oligosacáridos* (GOS) son prebióticos de alto interés alimenticio que se obtienen por la actividad de transgalactosilación de la lactasa al transferir los residuos de galactosa obtenidos de la hidrólisis a una unidad de glucosa de una nueva molécula de lactosa u otro tipo de sacáridos (Basso & Serban, 2019; Gonawan, 2019).

La *tagatosa* es un endulzante que se puede obtener del aprovechamiento de la lactosa, como paso inicial es necesaria la hidrólisis de la lactosa, la glucosa residual es eliminada por deglicosilación y finalmente la galactosa es epimerizada en tagatosa con hidróxido de calcio Ca(OH)_2 aireado (Basso & Serban, 2019).

La *lactulosa* es un isómero de la lactosa cuyo residuo de glucosa es convertido en fructosa (Playne & Crittenden, 2009), empleando β -galactosidasa es posible sintetizar este disacárido usando lactosa y fructosa como sustratos iniciales (Guerrero et al., 2011; Lee et al., 2004), y durante estas reacciones también es posible encontrar la formación de los fructosil-galacto-oligosacáridos (fGOS) (Vera et al., 2020).

La *lactosacarosa* es un trisacárido edulcorante obtenido al emplear β -fructofuranosidasas en una reacción de transfructosilación donde un residuo de fructosa proveniente de la sacarosa es transferido a la glucosa; tiene efecto bifidogénico siendo considerado por tanto como prebiótico estimulante de la microbiota intestinal (Gänzle et al., 2008; Playne & Crittenden, 2009; Vera & Illanes, 2016). Sin embargo es posible emplear β -galactosidasas inmovilizadas para la elaboración de lactosacarosa usando como sustratos lactosa y sacarosa observándose también la formación de otros oligosacáridos (Duarte et al., 2017).

La cantidad de microorganismos que son capaces de emplear lactosa como fuente de carbono es bastante limitada en comparación a los microorganismos que emplean la glucosa y galactosa como fuente de energía (Dutra Rosolen et al., 2015;

Siso, 1996) permitiendo que el hidrolizado de suero gane valor en el mercado que busca emplear materia prima barata para la elaboración de sus productos, entre los que se pueden destacar: el metano, bioetanol, biobutanol, acetona, ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas (Audic et al., 2003; Illanes, 2016) e incluso biomasa de cultivos celulares que son de importancia comercial para la producción de proteína (Kosaric & Asher, 2005).

Inmovilización enzimática

Generalidades

La inmovilización de enzimas se refiere al atrapamiento o confinamiento físico de la enzima en una región del espacio de un soporte permitiendo que esta mantenga su actividad catalítica favoreciendo su uso en forma continua y repetitiva (Brena & Batista-Viera, 2006; Tosa et al., 1966 citado por Todea et al., 2020). Para lograr la inmovilización existen métodos físicos (suelen existir interacciones débiles entre la enzima y el soporte) como adsorción, encapsulación y atrapamiento o métodos químicos como la unión covalente o iónica, la reticulación que generalmente forma uniones covalentes, la conjugación electroquímica o por afinidad de ligandos y la autoinmovilización enzimática con el método de agregados enzimáticos reticulados (CLEA por su nombre en inglés) (Dwevedi, 2016; Selvarajan et al., 2019; Wang, 2012).

La inmovilización enzimática puede tener lugar en una variedad de soportes y dependiendo de los objetivos que se pretenden conseguir, los biocatalizadores o sistemas de inmovilización tendrán diferentes propiedades mecánicas, bioquímicas y cinéticas (Homaei et al., 2013). Existen una variedad de matrices que han sido empleados como soportes para la inmovilización de las enzimas: polímeros orgánicos sintéticos, biopolímeros, hidrogeles, soportes inorgánicos, polímeros inteligentes,

nanopartículas de oro o magnéticas, nanofibras, nanotubos, etc. (Dwevedi, 2016; Homaei et al., 2013; Wang, 2012).

En esta investigación la inmovilización para la β -galactosidasa se realiza en el hidrogel de quitosano mediante inmovilización de tipo química donde por entrecruzamiento con un agente bifuncional se activan los grupos amina ($-\text{NH}_2$) del quitosano y el otro grupo funcional libre es capaz de interactuar con los grupos amina ($-\text{NH}_2$) de la enzima formando las bases de Schiff que son enlaces de tipo covalente (Dwevedi, 2016; Wang, 2012).

Ventajas y desventajas de la inmovilización

El empleo de enzimas solubles en los procesos industriales puede presentar varias desventajas como su alta sensibilidad a condiciones desnaturalizantes que pueden presentarse durante el proceso productivo por efecto de las variaciones de temperatura, pH y sustancias en niveles traza que pueden actuar como inhibidores, es posible también observar contaminación en los procesos debido a la homogeneidad de los sistemas de catálisis y sobre todo lo complicado que puede ser la recuperación y reutilización de la enzima en su forma activa una vez que ha sido mezclada con el sustrato, así como la falta de estabilidad operativa a largo plazo (Homaei et al., 2013; Sheldon & van Pelt, 2013).

Dichas desventajas del trabajo con enzimas en solución pueden superarse al emplear sistemas de inmovilización porque permiten mejorar el trabajo con las enzimas debido a que estos sistemas son sólidos y pueden ser fácilmente separados y recuperados, adicionalmente permiten la reutilización de la proteína volviendo los procesos rentables, la inmovilización también aporta estabilidad a la enzima en condiciones operativas y de almacenamiento pues se mantiene la actividad enzimática,

y una vez que las enzimas han sido inmovilizadas se vuelven resistentes a las variaciones ambientales sobre todo de pH y temperatura. Con los sistemas de inmovilización se consiguen mejores rendimientos y productividades más altas debido al reuso durante múltiples ciclos permitiendo su operación en formatos tipo Batch o continuos, y se pueden aplicar métodos de co-inmovilización para la obtención de biocatalizadores multifunción (DiCosimo et al., 2013; Homaei et al., 2013; Sheldon & van Pelt, 2013).

A pesar de todas esas ventajas, se ha observado que generalmente la inmovilización afecta las propiedades catalíticas de la enzima comprobándose alteraciones cinéticas desfavorables como un mayor valor para la constante de Michaelis y una reducción de la actividad respecto de la enzima libre siendo esto resultado de los cambios estructurales, conformacionales y orientaciones perjudiciales que puede adoptar la enzima, además se crean diferentes microambientes respecto a la enzima libre y existen ciertas limitaciones de transferencia de masa y de difusión que afectan la capacidad del sustrato para acceder al sitio activo (DiCosimo et al., 2013; Krajewska, 2004; Secundo, 2013), mas estas desventajas pueden ser sobrellevadas al emplear reactores con diseños adecuados y habiéndose optimizado el sistema de inmovilización y las condiciones de trabajo.

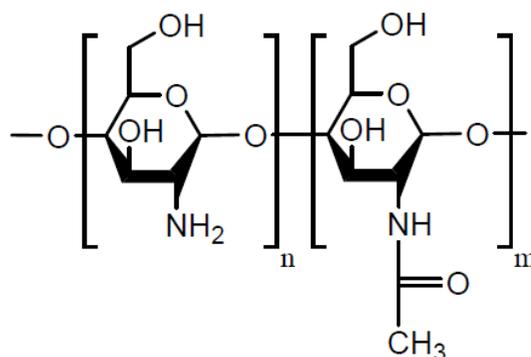
Quitosano

El quitosano es un poliaminosacárido semicristalino y lineal que se forma por la unión de los residuos *N*-acetil-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranososa (unidad acetilada también conocida como *N*-acetil-D-glucosamina) y 2-amino-2-deoxi-D-glucopiranososa (unidad desacetilada conocida como D-glucosamina) mediante un enlace glucosídico $\beta - (1 \rightarrow 4)$ (**Figura 5**) (Annu et al., 2017; Lopes et al., 2020; Ways et al., 2018). Este

polímero se obtiene comercialmente a partir de la quitina por *N*-desacetilación alcalina con NaOH concentrado entre 40 – 45% (**Figura 6**) o por hidrólisis enzimática empleando la quitina desacetilasa (Krajewska, 2004; S. K. Shukla et al., 2013).

Figura 5

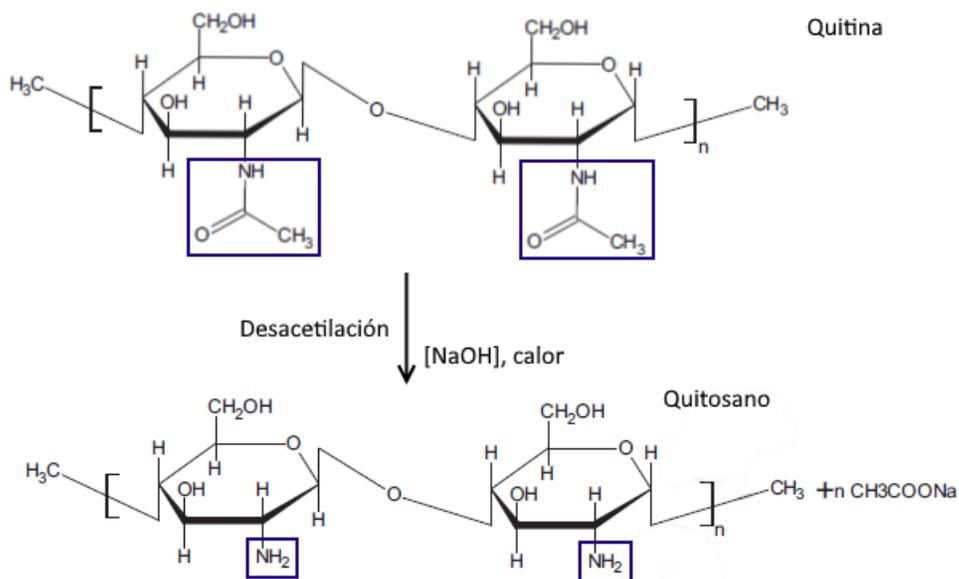
Estructura química del quitosano, D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina.



Nota: Tomado de Ways et al., (2018)

Figura 6

Desacetilación de la quitina.



Nota: Modificado de S. K. Shukla et al., (2013)

El quitosano está presente en las mismas fuentes de quitina y de estas las principales son los insectos como mariposas, mosquitos, moscas, gusanos de seda, arañas y miriápodos con un contenido de quitina entre el 20 y 60% (Teng, 2012), los crustáceos como camarones y cangrejos cuyo contenido de quitina es del 58 a 85% son las fuentes principales de obtención industrial del quitosano incluyendo también langostas y krills, siendo el exoesqueleto de estos crustáceos (con un contenido de quitina entre el 5 y 42%) la estructura de mayor aprovechamiento por ser un desecho de la industria acuícola y un material de bajo costo (Dotto & Pinto, 2017; Krajewska, 2004; Teng, 2012), moluscos de las clases anfineura, gasterópodos, escafópodos, bivalvos y cefalópodos con un contenido de quitina del 3 al 26% (Teng, 2012) y hongos de las clases zigomicetos, quitridiomicetos, deutoromicetos, ascomicetos y basidiomicetos tienen en su pared celular un 1 a 40% de quitina (Dotto & Pinto, 2017; Lopes et al., 2020).

Este biomaterial se caracteriza por ser una base fuerte con grupos amino -NH_2 libres en su estructura ($pK_a \approx 6.3$), cuando el pH desciende a 6 o menos los grupos amino se protonan formándose grupos NH_3^+ que dan lugar a un polisacárido policationico que es por tanto soluble en soluciones ácidas como el ácido acético, ácido fórmico, ácido clorhídrico y ácido nítrico e insoluble en agua, medios alcalinos e incluso solventes orgánicos cuando el pH es mayor a 6 (Annu et al., 2017; Dotto & Pinto, 2017; Raafat & Sahl, 2009). Con pH inferior a 6.5, forma agregados con compuestos polianiónicos y quelatos con metales pesados y propiedades que junto con la solubilidad permiten buenas propiedades para la formación de geles (Krajewska, 2004; Thakur & Thakur, 2014).

En cuanto a las propiedades biológicas, el quitosano es biodegradable, biocompatible, poco tóxico, tiene propiedades de mucoadhesión y actividad

antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena, antiinflamatoria, y hemostática, cualidades que le facultan al quitosano a formar geles de gran interés en la industria biotecnológica, en la alimenticia y de aditivos, en la biomédica con la ingeniería de tejidos y la cicatrización de heridas, en la agrícola, en la ambiental empleándolo en remediación de aguas, en la cosmética, en la farmacéutica como andamio para la liberación controlada de fármacos, etc. (Annu et al., 2017; Domalik-Pyzik et al., 2019; Krajewska, 2004; Lopes et al., 2020; Thakur & Thakur, 2014; Zargar et al., 2015).

Modificación del quitosano

El quitosano puede ser manipulado para conseguir diferentes formas, las más comunes son las nanopartículas, macro o microesferas, hidrogeles, películas, membranas, fibras tabletas o cápsulas dependiendo de la técnica de síntesis utilizada (Arfin, 2017; Dash et al., 2011). La manipulación e incluso la modificación del quitosano permiten su uso como soporte enzimático, en general un mismo método o técnica puede utilizarse para dar varias formas al quitosano (Wang, 2012), entre las técnicas más empleados están: 1) la evaporación del solvente con los métodos de recubrimiento por rotación (spin coating) o el secado por atomización (spray-drying), 2) la técnica de inversión de fase con los métodos de precipitación/coacervación (precipitation/coacervation), la reticulación con emulsión (emulsion cross-linking) y un método conjugado de los dos anteriores, el método de coalescencia de emulsión-gota (emulsion-droplet coalescence method); y 3) métodos que basados en las propiedades físicas y químicas del quitosano en conjunto con otras sustancias permiten obtener partículas, como el método de gelificación por ionización (ionotropic gelation), el método micelar inverso (reverse micellar method) y el método de tamizado (sieving method) (Dash et al., 2011; Wang, 2012; Xiao et al., 2012).

El método empleado en esta investigación fue el de precipitación/coacervación cuyo principio está basado en la propiedad de insolubilidad del quitosano cuando este se pone en contacto con una solución a pH alcalino y por tanto precipita o coacerva, para este método se han empleado soluciones de hidróxido de sodio (NaOH), NaOH-etanol, NaOH-metanol y etilendiamina que facilitan la formación precipitados de quitosano cuando se dejan caer gotas de esta solución a través de boquillas con aire comprimido y que luego pueden ser recuperadas por filtración o centrifugación con lavados consecutivos de agua; los tamaños de las partículas, macro y micropartículas, se pueden controlar dependiendo de la presión del aire y el diámetro de la boquilla empleados (Dash et al., 2011; Krajewska, 2004; Xiao et al., 2012).

Funcionalización del quitosano

La mayoría de los métodos previamente enlistados suelen requerir de un agente reticulante o redes de polímeros para mejorar las cualidades del quitosano como soporte y darle rigidez y estabilidad a las estructuras fabricadas (Pavinatto et al., 2017), en la activación del quitosano se pueden emplear agentes como el glicidol, epiclorhidrina, etilendiamina, glutaraldehído, hexametildiamina, carbodiimidas, etc. (Cacicedo et al., 2019; Krajewska, 2004). Los agentes funcionalizantes o reticulantes del quitosano, a más de facilitar la unión de la enzima al soporte, mejoran las propiedades mecánicas del material e impiden su disolución en condiciones extremas de pH o temperatura debido a la formación de enlaces covalentes (Cacicedo et al., 2019).

La reacción que tiene lugar entre el quitosano y el glutaraldehído se denomina base de Schiff y fue descrita por primera vez en 1864 por Hugo Joseph Schiff (Antony et al., 2019), esta reacción tiene lugar por la condensación de una amina primaria con un

grupo carbonilo (aldehído o cetona) y comienza con la formación de una carbonilamina que al deshidratarse da lugar a un doble enlace entre el carbono y el nitrógeno conocido a esto como grupo imina (-RC=N-) (Antony et al., 2019; Jin et al., 2009; Martínez-Mejía et al., 2019).

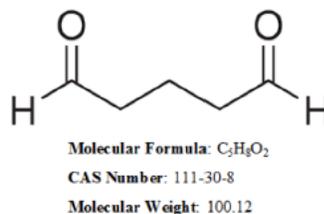
El quitosano tiene varias ventajas cuando se considera su uso en la inmovilización de enzimas, ventajas como su alta afinidad a proteínas, la disponibilidad de grupos funcionales amino (-NH₂) e hidroxilo (-OH) que pueden reaccionar directamente con las enzimas o que pueden ser modificados químicamente para facilitar la interacción con las proteínas y la variedad de configuraciones geométricas que se pueden conseguir en dependencia de la técnica de preparación empleada (Krajewska, 2004; Wang, 2012), adicionalmente cuando es modificado las ventajas mejoran aún más consiguiendo soportes con mayor estabilidad mecánica, resistencia a la degradación química por ejemplo en presencia de soluciones ácidas (pH < 2), mayor rigidez y mejores propiedades en la superficie del soporte (Juang et al., 2001; Krajewska, 2004).

Glutaraldehído

El glutaraldehído (C₅H₈O₂) es un dialdehído lineal de cinco carbonos, soluble en agua, alcohol y solventes orgánicos capaz de reaccionar con los grupos amino terminales de péptidos y aminoácidos y residuos sulfhidrilos para formar piranos, hidratos y polímeros en general con buena estabilidad química y térmica (Kumar et al., 2015; Satar et al., 2017).

Figura 7

Estructura del glutaraldehído y propiedades químicas.

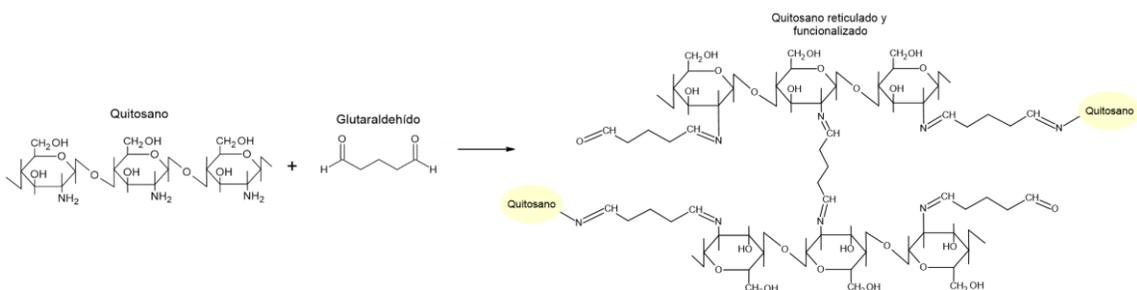


Nota: Tomado de Satar et al., (2017)

La reacción del glutaraldehído con los grupos amino primarios del quitosano produce enlaces covalentes y la reacción de Schiff puede involucrar ambos aldehídos con diferentes cadenas de quitosano para reticularlo (**Figura 8**), o al quedar libre uno de los dos grupos aldehídos, en una reacción posterior, son capaces de interactuar con los grupos amino de la enzima formándose el mismo enlace covalente (grupo imina) inmovilizando la proteína (**Figura 9**) con alta fuerza iónica; siendo así como el glutaraldehído cumple la función de agente reticulante y funcionalizante del quitosano (Klein et al., 2012; Monteiro & Airoidi, 1999; Satar et al., 2017).

Figura 8

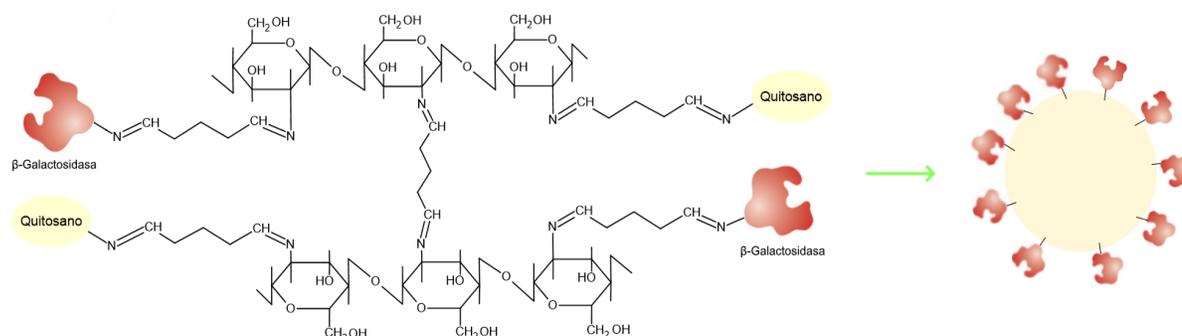
Esquema del quitosano reticulado y funcionalizado con glutaraldehído.



Nota: Estructura química elaborada en el programa ChemSketch

Figura 9

Esquema de la enzima inmovilizada en el quitosano funcionalizado.



Nota: Estructura química elaborada en el programa ChemSketch

Cuando el quitosano es reticulado con el glutaraldehído los enlaces imina formados son irreversibles mejorando la estabilidad operacional de las perlas (Wang, 2012) y se ha observado que el quitosano en membrana al ser reticulado con este agente consigue una mayor hidrofobicidad y que en comparación a un hidrogel de quitosano sin reticulación, el glutaraldehído mejoran la resistencia mecánica y evita en cierto grado el hinchamiento gel (Dudek & Turczyn, 2017; Uragami et al., 1994).

El glutaraldehído se ha empleado como el principal agente reticulante del quitosano (Silva et al., 2004) sin embargo es sabido que esta sustancia puede causar efectos adversos para la salud humana tales como decoloración de la piel, dermatitis, ulceraciones e irritación en ojos y las vías respiratorias (Beauchamp et al., 1993; Takigawa & Endo, 2006). En la investigación realizada por Silva et al., (2004) se evaluó la citotoxicidad de membranas de quitosano reticulado con glutaraldehído en fibroblastos de pulmón de ratón por tres días y se observó que mientras mayor era la concentración de glutaraldehído (superior o igual a 10%) la viabilidad celular disminuía sin embargo con las concentraciones más bajas (menor a 10%) la viabilidad celular se

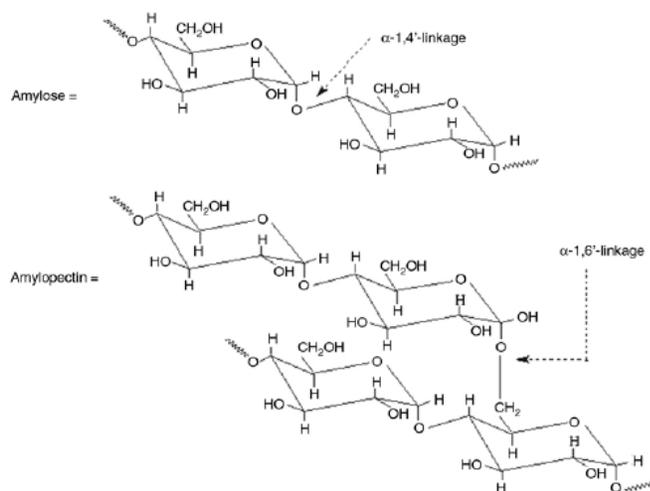
mantenía en un 80% aproximadamente, estos resultados fueron similares a los hallados por Martínez-Mejía et al., (2019) quienes observaron que las membranas de quitosano reticuladas con glutaraldehído en concentraciones de 2, 4 y 6 % presentaron aproximadamente un 95% células de fibroblastos humanos viables mientras las concentraciones de 8 y 10% fueron consideradas citotóxicas. Es así que las investigaciones se han orientado en investigar la eficacia de otros compuestos sin características citotóxicas como la genipina (Klein et al., 2016; Yin & Li, 2012) o el almidón oxidado (Hongge Chen et al., 2010) versus el glutaraldehído.

Almidón oxidado

El almidón es un polímero compuesto por amilopectina y amilosa cuyo monómero estructural es la α -D-glucosa, es un biopolímero de origen vegetal siendo de los más abundantes en la naturaleza cuya obtención es de bajo costo y sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad no toxicidad y solubilidad en agua caliente son muy llamativas para la industria papelera, textilera y farmacéutica (Karaki et al., 2016; Lu et al., 2009; Rodrigues & Emeje, 2012).

Figura 10

Estructura del almidón.



Nota: Tomado de Lu et al., (2009)

El almidón es de los materiales más baratos debido a su alta disponibilidad (Vanier et al., 2017), las fuentes principales de obtención son los cereales, tubérculos y raíces, con el maíz como la principal fuente a nivel industrial, seguido por el trigo, sorgo, el arroz, la papa y la yuca (Bergthaller, 2004; Tharanathan, 2005; Vanier et al., 2017) y también existen otras fuentes para la obtención de este polímero como la zanahoria blanca, la papa oca, la achira (Santacruz et al., 2002), camote, mango, amaranto, quinua, frijol, etc. (Moorthy, 2004). Sin embargo en forma nativa el almidón tiene baja solubilidad y alta hidrofilia provocando que este material sea propenso a modificaciones químicas, físicas y enzimáticas a fin de mejorar sus propiedades (Lewicka et al., 2015).

Modificación de polímeros. Existen muchos métodos de modificación del almidón, las modificaciones físicas incluyen técnicas como la dextrinización, la gelatinización, radiación electromagnética, etc.; entre las principales técnicas de modificación química están la oxidación, reducción, esterificación, eterificación, acetilación, aminación, polimerización de injerto (graft polymerization),

entrecruzamiento, etc. (Tomasik, 2004), y las modificaciones enzimáticas que pueden incluir el uso de enzimas como las lipasas y proteasas en reacciones de acilación o esterificación y enzimas como las peroxidasas o lacasas en reacciones de copolimerización (Karaki et al., 2016).

La oxidación del almidón se produce cuando un grupo hidroxilo primario es convertido a un grupo carbonilo (-CHO) o carboxilo (-COOH) en presencia de un agente oxidante como el periodato de sodio (NaIO_4), el ácido nítrico (HNO_3), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el hipoclorito de sodio (NaClO), el dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), ozono, etc., en presencia o no de catalizadores metálicos (Lewicka et al., 2015; Tharanathan, 2005; Tomasik & Schilling, 2004). Estas reacciones son exotérmicas y de mayor velocidad a pH neutro y le confieren al almidón una menor viscosidad debido a despolimerización, mayor solubilidad sobre todo en agua caliente y tendencia a la retrogradación (reasociación molecular ordenada) (Lewicka et al., 2015; J. Singh et al., 2016; Tharanathan, 2005; Ziegler-Borowska et al., 2018).

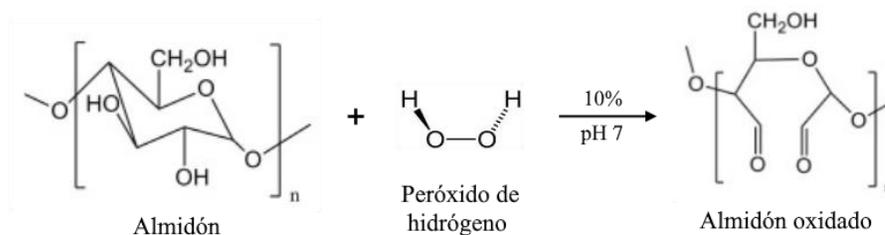
Durante la oxidación los grupos hidroxilo en la posición C-2, C-3 y C-6 son oxidados a grupos carbonilo y luego a grupos carboxilo (J. Singh et al., 2016), por ejemplo en el caso del periodato, este produce la ruptura oxidativa de los carbonos C2 y C3 de los monómeros de glucosa provocando que los grupos hidroxilo formen dos grupos aldehídos o “dialdehídos” y de ahí el término de almidón dialdehído (Tomasik & Schilling, 2004). La oxidación del almidón puede generar grupos aldehídos (-CHO) que mejoran las propiedades hidrófilas y de flexibilidad del almidón además de reducir su viscosidad y las entalpías de gelatinización y retrogradación (Hongge Chen et al., 2010; J. Singh et al., 2016).

En esta investigación se empleó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como agente oxidante del almidón de zanahoria blanca, respecto de este agente se sabe que la

oxidación forma principalmente grupos carbonilo y una pequeña cantidad de grupos carboxilo (Sangseethong et al., 2010) (**Figura 11**), además la oxidación con peróxido tiene la ventaja de ser de bajo costo y no produce efectos ambientales negativos pues el peróxido se descompone rápidamente en oxígeno y agua siendo estos desechos no tóxicos (Lewicka et al., 2015; Vanier et al., 2017; Y. R. Zhang et al., 2012). Antes de la oxidación siempre se recomienda gelatinizar el almidón para destruir la estructura cristalina del almidón nativo de tal forma que los grupos hidroxilo de la región cristalina y la amorfa del almidón sean capaces de reaccionar con el peróxido (Y. R. Zhang et al., 2012). El peróxido de hidrógeno por si solo es capaz de lograr grados de oxidación superiores al 55% (S. D. Zhang et al., 2009) sin embargo el empleo de catalizadores metálicos como cobre, hierro, cobalto, titanio, etc., puede mejorar la activación del peróxido debido a una rápida descomposición y generación de radicales hidroxilo de alta reactividad con carbohidratos (Lewicka et al., 2015; Vanier et al., 2017).

Figura 11

Esquema de la oxidación del almidón



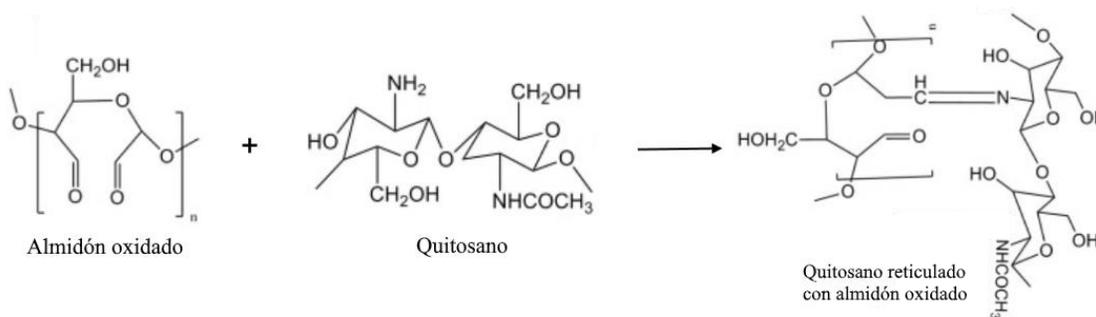
Nota: Modificado de Kamoun, (2016)

Hidrogel de quitosano y almidón oxidado. Cuando el almidón dialdehído es empleado en la reticulación del quitosano se espera que uno de los grupos forme la base de Schiff (**Figura 12**) y el otro esté disponible para otras reacciones, por ejemplo su empleo en la inmovilización de la β -galactosidasa (Teng, 2012). En la formación de

los hidrogeles con ambos polímeros no solo participan las bases de Schiff (grupos imina) que son los que forman los enlaces covalentes sino que también existen enlaces físicos como las interacciones hidrofóbicas y los enlaces de hidrógeno que favorecen la interacción entre las cadenas de ambos polímeros (Serrero et al., 2010).

Figura 12

Esquema del quitosano reticulado con almidón oxidado.



Nota: Modificado de Kamoun, (2016)

En estudios de síntesis de hidrogeles de quitosano entrecruzados con almidón oxidado, también conocido como almidón dialdehído o DAS, se ha observado que el empleo del almidón oxidado evita que el quitosano se hinche y que la rigidez del quitosano aumenta a mayores concentraciones de reticulante (Baran et al., 2004). Adicionalmente se ha visto que los hidrogeles mantienen la actividad antimicrobiana que es característica del quitosano siendo esta una propiedad de alta importancia cuando se trata de aplicaciones biomédicas (R. Tang et al., 2003) y que en contraste a los hidrogeles de quitosano reticulado con glutaraldehído no produce efectos citotóxicos (Wegrzynowska-Drzymalska et al., 2020).

Capítulo 3: Materiales y métodos

Instituciones participantes

La presente investigación forma parte del convenio entre el laboratorio del Instituto de Desarrollo de Energías y Materiales Alternativos – IDEMA de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) y el Laboratorio de Investigación Aplicada Clydent S.A.

Colaboradores científicos

Luis Enrique Trujillo, PhD.	Director de tesis
Petronio Gavilanes Quizhpi, M.Sc.	Codirector de tesis
Miguel Ángel Méndez, PhD.	Docente líder del proyecto por parte de la Universidad San Francisco de Quito
José Álvarez Barreto, PhD.	Docente líder del proyecto, a cargo del laboratorio de biomateriales del instituto IDEMA, Universidad San Francisco de Quito

Área de estudio

El desarrollo experimental del proyecto de investigación fue ejecutado en las instalaciones del Laboratorio de Investigación Aplicada Clydent S.A. en Taura, Guayas, Ecuador.

Metodología

Preparación del almidón oxidado

El almidón de zanahoria blanca gentilmente donado por el Laboratorio de Biomateriales del Colegio de Ciencias e Ingeniería de la Universidad San Francisco de Quito se oxidó con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) según el método propuesto por Viteri Narváez, (2018).

Se preparó una solución de almidón al 2 % en agua destilada a 80 °C manteniendo en agitación por 30 min para lograr la gelatinización del almidón, después la solución fue enfriada en un baño de agua fría hasta alcanzar la temperatura ambiente. La oxidación se llevó a cabo en agitación constante en un ambiente oscuro, se añadieron lentamente por goteo, en un periodo de 1 h, 6.25 mL de H₂O₂ al 10 % por cada 100 mL de solución de almidón, manteniendo el pH en 7 durante todo el proceso empleando soluciones 0.1 M de NaOH y HCl. Tras el tiempo de oxidación se añadió etanol al 70 % en una relación 1:1 respecto del volumen del almidón oxidado para provocar la precipitación del mismo, se dejó reposar la mezcla por 1 h.

Cuando el proceso de oxidación terminó, la mezcla fue centrifugada a 5000 rpm por 5 min descartando el sobrenadante y lavando el precipitado tres veces con abundante agua destilada. El almidón oxidado se colocó en moldes de silicona para secarlos en estufa a 40 °C por 48 horas hasta alcanzar un peso constante.

Caracterización de la β -galactosidasa

Para el estudio se empleó la β -galactosidasa en solución, Ha-Lactase™ 5200 de CHR HANSEN, obtenida de la levadura *Kluyveromyces lactis* con una actividad garantizada mayor o igual a 4800 NLU/g, la concentración fue calculada empleando el método de Bradford. La caracterización de la enzima fue direccionada hacia la verificación de las mejores condiciones de trabajo, es decir determinar la actividad en diferentes condiciones de ensayo con el objetivo de definir el tiempo de reacción y concentración de enzima óptimas para los ensayos de inmovilización.

Estos ensayos se realizaron manteniendo parámetros constantes como la temperatura: 37 °C, concentración del sustrato: solución de lactosa 150 mM preparada en buffer fosfato de potasio 0.1 M pH 7, el volumen de reacción: 500 μ L conformado por

50 μL de la solución de enzima y 450 μL de la solución de lactosa; la detención de la reacción se realizó empleando un baño de agua caliente a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min.

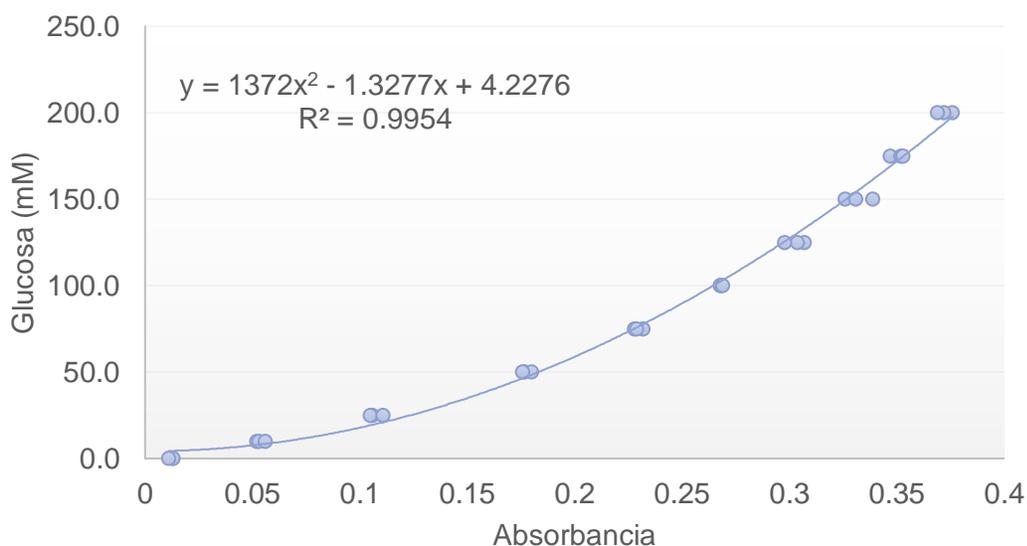
Determinación de la glucosa en solución

Para la cuantificación de la glucosa en solución se adaptó el kit comercial K-GLOX de Megazyme a las condiciones de trabajo en el laboratorio, 25 $^{\circ}\text{C}$ y 48 % de humedad.

La concentración de la glucosa se estableció en base a una curva de calibración (Figura 13; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) obtenida con el kit enzimático, para esto a partir de una solución stock 250 mM de glucosa, convenientemente diluida en buffer fosfato de potasio 0.1 M pH 7, se prepararon 10 diluciones, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 mM, para cada concentración el análisis se lo realizó por triplicado y aleatorizando todas las mediciones.

Figura 13

Curva de calibración a diferentes concentraciones de glucosa ($R^2 > 0.99$).



Al ser un método enzimático el empleado para detectar la cantidad de D-glucosa en solución para validar su sensibilidad como procedimiento analítico se determinó la cantidad más pequeña de analito que puede ser medida con el kit enzimático calculando para dicho propósito el límite del blanco (LoB) y el límite de detección (LoD) en base a lo mencionado por Armbruster & Pry, (2008).

Siendo el límite del blanco o LoB la concentración de analito más alta que se espera encontrar en una muestra que no contiene dicho analito y el límite de detección o LoD la concentración de analito más baja que de manera confiable se puede diferenciar del LoB y cuya detección es factible. Para el cálculo de estos parámetros se emplean las siguientes ecuaciones:

$$LoB = \bar{x}_{blanco} + 1.645(sd_{blanco}) \quad \text{Ecuación 1}$$

$$LoD = LoB + 1.645(sd_{x_{bajo}}) \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

- \bar{x}_{blanco} : promedio de las mediciones del blanco.
- sd_{blanco} : desviación estándar del blanco.
- $sd_{x_{bajo}}$: desviación estándar de la medición a la concentración más baja.

Con los datos de las mediciones del blanco se procedió a calcular el promedio de las absorbancias, 0.012 y la desviación estándar 0.001, al emplear estos valores en la Ecuación 1 se obtuvo un valor de LoB igual a 0.014; para el cálculo del LoD se determinó la desviación estándar del promedio de las absorbancias para la concentración de glucosa 10 mM obteniéndose el valor de 0.002, reemplazando los datos en la Ecuación 2 se obtuvo un valor de 0.018 siendo este el valor más bajo de

absorbancia que puede ser considerado como confiable para emplearlo en la ecuación y calcular la concentración de glucosa.

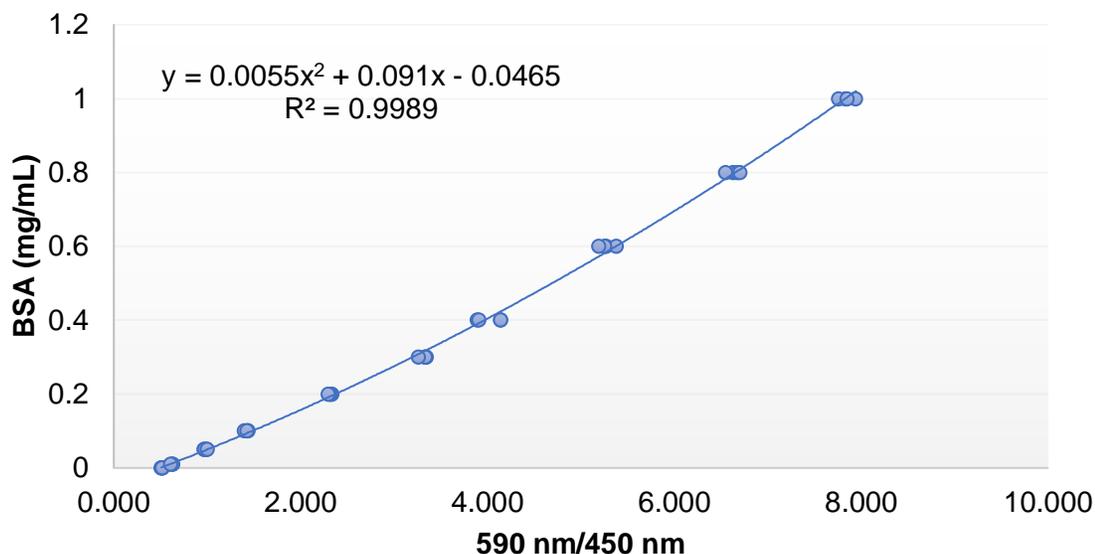
Determinación de la concentración de proteína

Se empleó el método de Bradford en la determinación de la concentración de proteína (Bradford, 1976; Zor & Selinger, 1996). En tubos Eppendorf de 2 mL, se mezclaron 100 μ L de la proteína con 1000 μ L de reactivo de Bradford, se dejó en reposo por 5 min a temperatura ambiente y la absorbancia fue medida en el espectrofotómetro Hach DR6000 a una longitud de onda de 450 nm y 590 nm, calculando la relación 590/450 (Apéndice 3.2).

Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) como proteína estándar para la elaboración de la curva de calibración, para esta se emplearon soluciones a diferentes concentraciones de proteína, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/mL a partir de una solución stock de 1 mg/mL de BSA preparada en buffer fosfato de potasio 0.1 M y pH 7. La ecuación de la curva fue empleada en la determinación de la cantidad de lactasa en solución. Los análisis se realizaron con cuatro repeticiones aleatorizadas para cada concentración de BSA (**Figura 14**).

Figura 14

Curva estándar de BSA en buffer fosfato de potasio 0.1 M y pH 7.



Preparación de las perlas de quitosano

Las perlas de quitosano se prepararon según el método de precipitación descrito por Klein et al., (2012), brevemente, se empleó una solución de ácido acético 0.35 M para preparar la solución de quitosano 2 % p/v manteniendo en agitación por 30 min a temperatura ambiente hasta la completa dilución del quitosano.

Se preparó una solución coagulante (proporción 1:1 vol:vol) formada por NaOH 1 M y etanol (EtOH) al 26 % v/v. Para la formación de las perlas se empleó un agitador magnético con calefacción Thermo Scientific CIMAREC⁺, se colocó la solución coagulante sobre la plancha y en esta se dejó caer gota a gota la solución de quitosano manteniendo la mezcla en agitación lenta (~ 90 rpm) por 1 hora para una adecuada coagulación del quitosano; transcurrido el tiempo las perlas se lavaron en agua destilada y en buffer fosfato 0.1 M hasta lograr la neutralidad (pH 7). Para definir el

tamaño adecuado de las perlas se probaron diferentes instrumentos, bureta y micropipetas en las diferentes presentaciones.

Figura 15

Coagulación del quitosano en la solución de NaOH:EtOH 1:1



Funcionalización de las perlas e inmovilización de la β -galactosidasa

La investigación se orientó en comparar el efecto de los agentes reticulantes, glutaraldehído y almidón oxidado, en la inmovilización de la lactasa, de modo que los ensayos de inmovilización se llevaron a cabo con una solución de enzima 0.25 mg/mL preparada en buffer de actividad consistente en buffer fosfato de potasio 0.1 M (pH 7) que contiene $MgCl_2$ 1.5 mM (Klein et al., 2012).

Se empleó el protocolo de inmovilización descrito por Klein et al., (2013) (Apéndice 3.1). Primero se prepararon las soluciones reticulantes a las concentraciones de ensayo empleando buffer fosfato de potasio 0.1 M pH 7 como solvente, las soluciones de glutaraldehído fueron preparadas a temperatura ambiente mientras que el almidón oxidado requirió ser mezclado a 80 °C en agitación constante por 30 min para su gelatinización.

La funcionalización del quitosano consistió en suspender 150 perlas (0.7072 ± 0.0273 g) en 5 mL del agente reticulante manteniendo en agitación mecánica a 60 rpm por 3 horas con ayuda de la incubadora de mesa con agitación Corning® LSE™; el exceso de reticulante fue retirado con lavados sucesivos de agua destilada y buffer.

Figura 16

Funcionalización de las perlas de quitosano.



Para la inmovilización de la β -galactosidasa se mezclaron 5 mL de la enzima en solución, 0.25 mg/mL, junto con las perlas funcionalizadas, esto se mantuvo cubierto y en agitación constante a 60 rpm por 15 horas en temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de inmovilización se realizaron 5 lavados sucesivos de las perlas, empleando 5 mL de buffer fosfato de potasio en cada lavado, para eliminar la enzima no unida; tanto las soluciones del sobrenadante como de los lavados se recolectaron para los ensayos de actividad enzimática.

Figura 17

Inmovilización de la β -galactosidasa en las perlas funcionalizadas.



Diseño experimental de la inmovilización

Se empleó un diseño factorial completo 2^2 cuyas variables de entrada fueron el tipo de agente reticulante, glutaraldehído y almidón oxidado, y la concentración de reticulante, 1 % y 3 %; las variables de salida fueron: el rendimiento de la inmovilización en términos de actividad, la eficiencia de la inmovilización, la actividad recuperada y la retención del soporte. Para todos los ensayos se mantuvieron constantes las variables: concentración de la enzima, tiempos de funcionalización e inmovilización, cantidad de perlas y volúmenes de las soluciones.

Los tratamientos del diseño experimental se muestran en la **Tabla 1**. Para controlar todo el proceso de inmovilización y verificar la influencia de las perlas funcionalizadas se realizaron controles para cada tratamiento en los cuales se empleó buffer como reemplazo de la solución enzimática en el proceso de inmovilización. Los tratamientos del diseño se ensayaron por triplicado y en el caso de los controles por duplicado obteniendo un total de 20 corridas experimentales que fueron aleatorizadas empleando la versión libre del programa Design-Expert 11 para fin de docencia (**Apéndice 1**).

Tabla 1

Diseño experimental empleado en el estudio.

Tratamientos	Tipo de reticulante	Concentración del reticulante (%)
G1	Glutaraldehído	1
G3	Glutaraldehído	3
A1	Almidón oxidado	1
A3	Almidón oxidado	3

Análisis estadístico

Para estudiar el efecto de cada variable de entrada en la actividad enzimática y los indicadores de la eficacia de la inmovilización se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a fin de determinar la existencia de diferencias significativas en los datos evaluados, y un test de Tukey para comparar las medias de los niveles de cada tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar de las tres replicas para cada variable de respuesta. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

Se empleó el software RStudio para los cálculos estadísticos del diseño experimental y la elaboración de los diagramas de interacción, el resto de cálculos y diagramas fueron elaborados en el programa Microsoft Excel.

Medición de la actividad de la β -galactosidasa libre e inmovilizada

La actividad relativa de la β -galactosidasa ($U \approx \mu\text{mol}/\text{min}$) se determinó empleando lactosa como sustrato y midiendo la glucosa resultante a 510 nm, con ayuda del espectrofotómetro Hach DR6000, según el ensayo de la glucosa oxidasa empleando

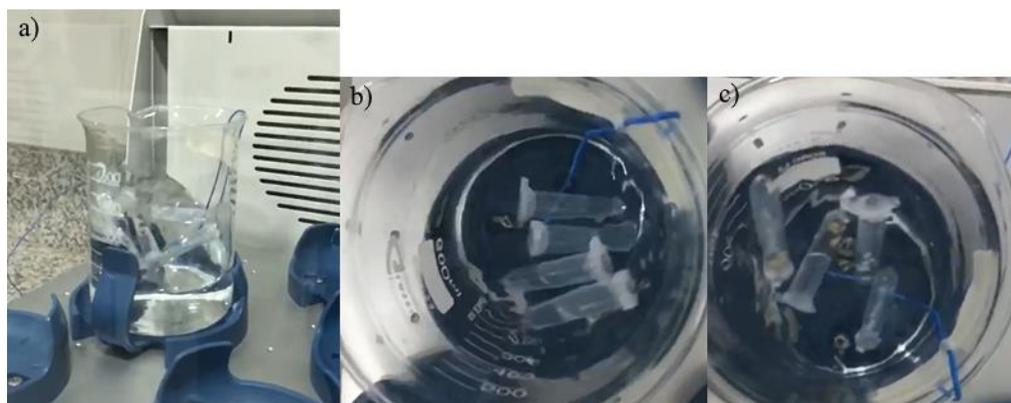
el kit comercial K-GLOX de Megazyme. La unidad de actividad de la β -galactosidasa fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol de lactosa a glucosa por minuto. El diagrama del protocolo detallado a continuación se encuentra en el Apéndice 3.3

Las reacciones de hidrólisis para la enzima libre se llevaron a cabo en tubos Eppendorf de 2 mL mezclando 1000 μ L de solución de lactosa 0.15 M preparada en buffer fosfato de potasio 0.1 M (pH 7) conteniendo $MgCl_2$ 1.5 mM (buffer de actividad) con 100 μ L de la enzima en solución. La reacción enzimática se realizó en agitación mecánica a 200 rpm durante 5 min en un sistema que simulaba un baño maría con el fin de controlar la temperatura, 37 °C y poder prevenir las limitaciones de la transferencia de masa que son comunes en los sistemas de inmovilización enzimática (Dwevedi, 2016); para detener la reacción se utilizó un baño de agua caliente a 90 °C por 3 min. Este proceso fue empleado para determinar la actividad de la enzima libre, la enzima sobrenadante de la inmovilización y las fracciones de lavado, en el caso de estos últimos se mezclaron las alícuotas (1 mL) de cada lavado y a esta mezcla se determinó la actividad.

Para los ensayos con la enzima inmovilizada, en tubos Eppendorf de 2 mL, se colocaron 1000 μ L de solución de lactosa 0.15 M preparada en buffer de actividad y se agregaron 15 perlas (0.0716 ± 0.0058 g) representativas de cada ensayo o corrida y se realizó el ensayo de hidrólisis manteniendo las mismas condiciones de reacción que se describieron anteriormente; la detención de la reacción se logró simplemente separando la solución de las perlas.

Figura 18

Ensayos de actividad enzimática..



Nota: a) Simulación del baño maría, b) ensayos con la enzima en solución, c) ensayos con la enzima inmovilizada en el soporte

La actividad de la enzima en solución se calculó para el volumen total de la enzima usando como base el dato inicial de la actividad para los 100 μl de la solución enzimática, este tipo de cálculo se aplicó para la enzima inicial en solución, la enzima residual en el sobrenadante y las fracciones de lavado, en el caso de la actividad de la enzima inmovilizada se empleó el valor obtenido de actividad para las 15 perlas de quitosano y se calculó para el total de perlas empleadas durante la inmovilización, es decir 150.

Por recomendación de Sheldon & van Pelt, (2013), las actividades empleadas en el cálculo de los indicadores de eficacia fueron actividades totales y tan solo para fin de comparación se calculó la actividad específica inmovilizada (U/gss) que resulta ser la actividad por gramo de soporte seco, en esta investigación el gss se determinó pesando las 150 perlas una vez retirada toda la solución buffer del rededor y entre estas con ayuda de una micropipeta.

Indicadores de la eficacia de la inmovilización

Los siguientes indicadores son los de más amplio uso cuando se pretende analizar el efecto de la inmovilización en la actividad enzimática, así como para determinar la capacidad de carga de las perlas (Sheldon & van Pelt, 2013).

Rendimiento de la inmovilización (R_i)

$$R_i (\%) = \frac{A_i - A_{fl}}{A_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde A_i (U) es la actividad inicial de la enzima en solución y A_{fl} (U) es la actividad de la enzima residual en el sobrenadante y las fracciones de lavado (Sheldon & van Pelt, 2013).

Eficiencia de la inmovilización (E)

$$E (\%) = \frac{A_o}{A_i - A_{fl}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde A_o (U) es la actividad observada en la enzima inmovilizada, A_i (U) es la actividad inicial de la enzima en solución y A_{fl} (U) es la actividad de la enzima residual en el sobrenadante y las fracciones de lavado (Sheldon & van Pelt, 2013).

Actividad recuperada (A_r)

$$AR (\%) = \frac{A_o}{A_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde A_o (U) es la actividad observada en la enzima inmovilizada, A_i (U) es la actividad inicial de la enzima en solución (Sheldon & van Pelt, 2013).

Retención del soporte (R_s)

$$R_s (\%) = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde C_i (mg/mL) es la concentración inicial de enzima y C_f (mg/mL) es la concentración de enzima residual en el sobrenadante y fracciones de lavado (Li et al., 2018).

Capítulo 4: Resultados y discusión

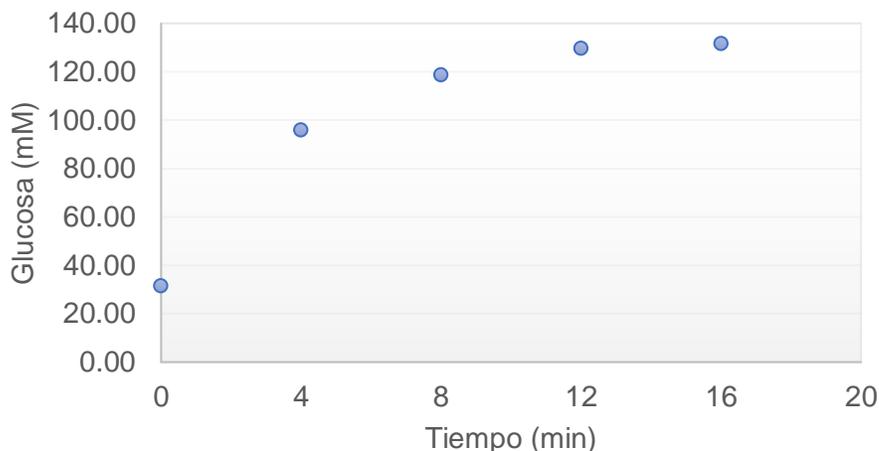
Caracterización de la enzima en solución

Para esta investigación se importó la enzima Ha-Lactase™ 5200 para los ensayos enzimáticos debido a que Ecuador no es un país productor de β -galactosidasa. Antes de iniciar con los ensayos enzimáticos fue necesario determinar la concentración de proteína presente en la solución stock, para esto se utilizó el método de Bradford y tras realizar tres repeticiones para dos diluciones diferentes preparadas en buffer fosfato de potasio 0.1 M pH 7 se pudo determinar que la concentración promedio de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* de la marca Ha-Lactase™ 5200 tiene una concentración aproximada de 62 mg/mL.

Los ensayos enzimáticos para estudiar el efecto del tiempo en la formación del producto se llevaron a cabo empleando una concentración de enzima y sustrato constante, 0.5 mg/mL y 150 mM respectivamente, a una temperatura de 37 °C y pH 7. Como se observa en la **Figura 19**, con el transcurso del tiempo la concentración de la glucosa va aumentando hasta llegar a una etapa de equilibrio donde no existe la formación de más producto porque el sustrato ha sido hidrolizado por completo (Feduchi et al., 2011).

Figura 19

Curva de liberación de glucosa a través del tiempo.



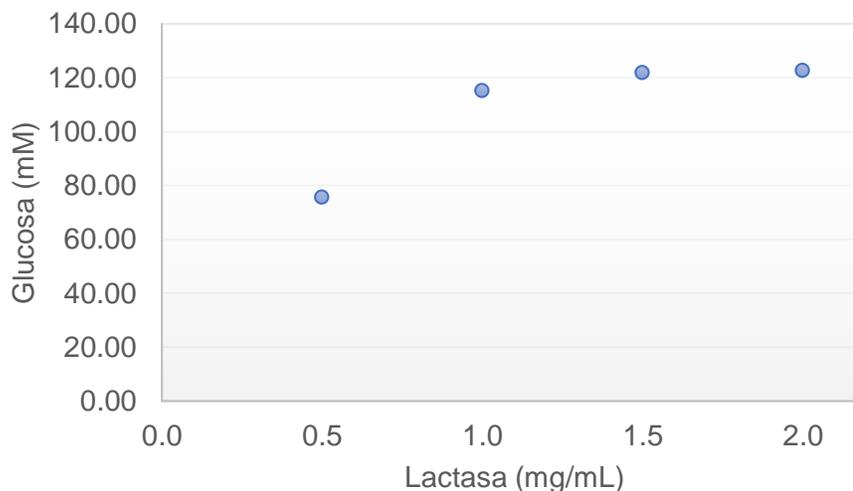
De esta gráfica es posible desatacar que durante los primeros minutos la conversión del sustrato tiene un comportamiento lineal, y a partir de los ocho minutos es evidente la formación de una curvatura marcando el inicio de la etapa estacionaria. Adicionalmente se observa que tan pronto como la enzima entró en contacto con el sustrato se produjo la liberación de la glucosa al medio, en general las enzimas son capaces de aumentar los índices de reacción en factores superiores a 10^6 demostrando la lactasa una rápida acción catalítica (Bender et al., 2016). En base a estos resultados se decidió para los ensayos posteriores evaluar la actividad de la enzima en un tiempo de reacción de 5 minutos.

Los siguientes ensayos se enfocaron en verificar el efecto de la concentración enzimática para la hidrólisis de 150 mM de lactosa, en la **Figura 20** se puede observar que a partir de una concentración enzimática de 1 mg/mL la cantidad de producto formado no varía sin importar que la concentración enzimática vaya aumentando. Según Majore & Ciproviča, (2020), la hidrólisis de lactosa produce concentraciones equimolares de glucosa y galactosa y cuando las concentraciones de ambos azúcares son diferentes puede deberse a la actividad de transgalactosilación en las que la

cantidad de glucosa es superior a la de galactosa debido a que esta última está formando oligosacáridos.

Figura 20

Liberación de glucosa a diferentes concentraciones de enzima.



La concentración de glucosa liberada por las concentraciones más altas de enzima corresponde a valores de 122.03 y 122.71 mM de glucosa para las concentraciones de 1.5 y 2.0 mg/mL de lactasa respectivamente, este resultado no es coincidente con la concentración estequiométrica teórica que se debería liberar si la enzima fuera capaz de hidrolizar el 100 % de la lactosa, es decir 150 mM de glucosa. El tiempo prologado de almacenamiento afecta la actividad de la enzima cuando se encuentra en solución (Lima et al., 2010) y en el caso de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* su actividad no fue completa al momento de ser empleada en los ensayos, antes de su empleo estuvo en almacenamiento a 4 °C por al menos un periodo de 12 meses.

Con los resultados de ambas gráficas se decidió al final evaluar las condiciones de inmovilización de la enzima con una concentración de proteína de 0.25 mg/mL y 5

minutos como tiempo de reacción, manteniendo uniforme las demás condiciones, temperatura en 37 °C y pH 7.

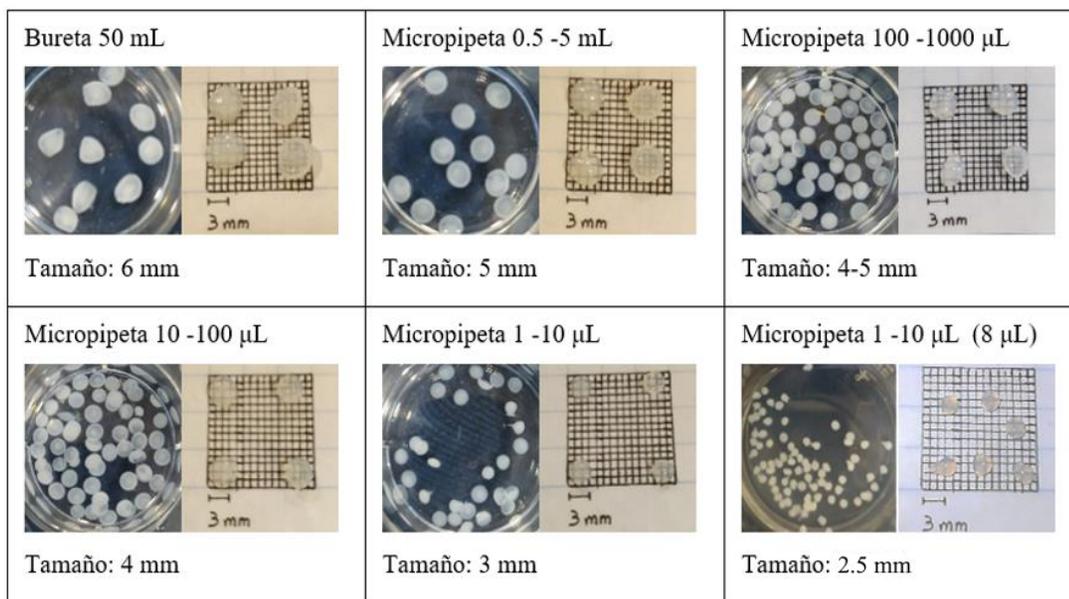
Características del soporte

Morfología de las perlas de quitosano

Para la elaboración de las perlas se evaluaron los tamaños de las gotas de quitosano empleando diferentes instrumentos, bureta y micropipetas; se observó que las gotas de quitosano de mayor tamaño al caer en la solución de coagulación tomaban una forma cóncava en la zona interna de la perla y a medida que el tamaño de la gota disminuía la perla se volvía más uniforme y redonda (**Figura 21**).

Figura 21

Morfología de las perlas obtenidas según el tamaño de la gota.

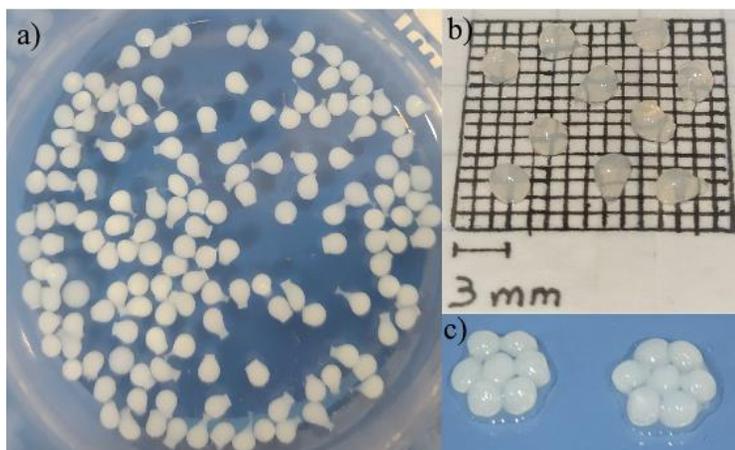


La solución de quitosano (8 µL) al caer en la solución coagulante precipita provocando que las gotas de solución se gelifiquen y tomen una forma esférica con bordes lisos (perlas), algunas eran por completo redondas mientras que otras se tornaban elípticas y ligeramente planas, se observó la presencia de una extensión o

cola que se formaba durante la caída de la gota; en general las perlas presentaron un diámetro aproximado de 2.5 mm y tenían una coloración blanquecina transparente (Figura 22).

Figura 22

Morfología de las perlas al coagular 8 μ L de solución de quitosano.



Nota: a) Perlas después de la coagulación, b) Perlas observadas en una cuadrícula de referencia, c) Perlas agrupadas por su simetría.

Según lo mencionado por Yang et al., (2014) para que las partículas de quitosano tomen una forma esférica debe existir un equilibrio en las fuerzas dinámicas entre las tensiones de restauración interfaciales y la viscosidad del líquido caso contrario se empiezan a formar partículas con una cola y a medida que se solidifican las perlas con cola en la superficie de la solución coagulante, continua desgastándose la tensión de restauración interfacial disminuyendo así la cantidad de perlas esféricas o elípticas y aumentando aquellas con esta característica. Como se observa en la **Figura 22a** una buena cantidad de perlas presentan colas alargadas, medianas e incluso planas.

Durante la coagulación se pudo observar la agrupación de las perlas con cola en el centro de la superficie de la solución coagulante (NaOH:EtOH 1:1) mientras se agitaba

con ayuda del magneto. Para controlar este fenómeno las nuevas gotas fueron soltadas en la zona intermedia cerca de los bordes del vaso de precipitación y se mezclaban de forma manual con un agitador plástico cada 30 perlas para facilitar que aquellas retenidas en la superficie precipitaran al fondo del recipiente y continuar así la coagulación de las siguientes perlas hasta obtener las 150 perlas para los ensayos posteriores.

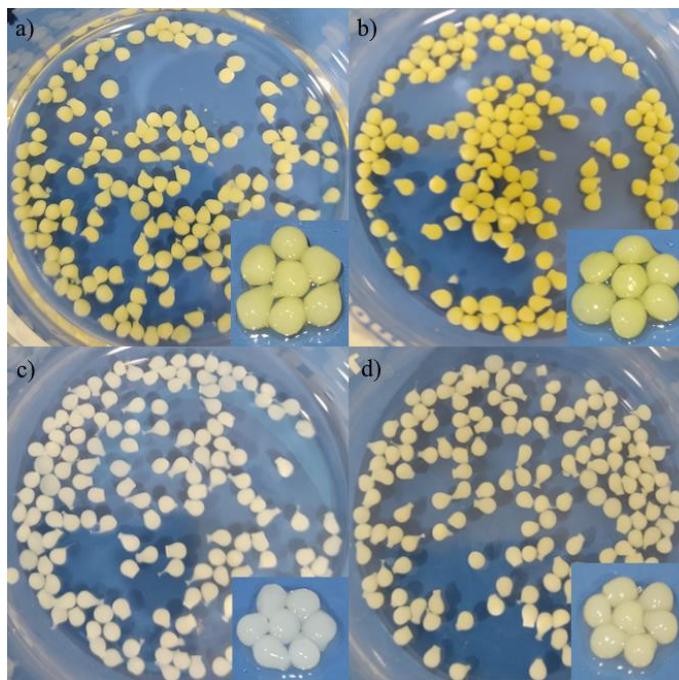
Funcionalización de las perlas de quitosano

En inicio cuando las perlas se elaboraban presentaban una coloración blanca translúcida (**Figura 22**) pero tras la funcionalización del quitosano se observó que estas se tornaron amarillas en el caso de la activación con el glutaraldehído (**Figura 23a** y **Figura 23b**) y con el almidón oxidado dependiendo de la concentración 1 % y 3 % se tornaron de color crema y ligeramente amarillentas respectivamente (**Figura 23c** y **Figura 23d**). Del mismo modo en la investigación realizada por Belho & Ambasht, (2021) que empleó perlas de quitosano funcionalizadas con glutaraldehído para la inmovilización de fitasa recuperada de frijol arroz, observaron que las perlas reticuladas con esta sustancia por la formación de las bases de Schiff cambiaban su color de blancas a cafés-amarillentas. En el caso de la investigación realizada por Klein et al., (2016) el glutaraldehído generaba perlas amarillas y en esa investigación, al emplear genipina como reticulante las perlas se tornaron de una coloración azul oscuro.

La reticulación de las perlas provocó que estas ganaran más firmeza al contacto, en el caso del glutaraldehído las perlas se volvieron un poco frágiles al manipularlas de manera individual, mientras que aquellas funcionalizadas con el almidón oxidado mantenían su cualidad de hidrogel con mayor resistencia que las perlas sin inmovilizar.

Figura 23

Perlas de quitosano tras la activación con los agentes reticulantes.



Nota: a y b) Glutaraldehído 1 % y 3 %, c y d) almidón oxidado 1 % y 3 %.

El glutaraldehído al ser una molécula bifuncional reacciona con los grupos amino de las unidades de D-glucosamina entre las cadenas de quitosano entrecruzando toda la estructura y fortaleciendo con esto la perla (A. N. Singh et al., 2011). Los enlaces irreversibles formados entre el quitosano y el glutaraldehído promueve que las perlas aumenten su estabilidad operativa, mejoran la resistencia mecánica y evita un rápida degradación química (Juang et al., 2001; Wang, 2012) sin embargo se ha observado que las perlas reticuladas con altas concentraciones de glutaraldehído tienden a fragilizarse (A. N. Singh et al., 2011).

En la investigación realizada por Biró et al., (2008), se estudió el efecto de los diferentes tamaños de partícula de quitosano para la inmovilización covalente de la β -galactosidasa empleando diferentes concentraciones de glutaraldehído para cada

tamaño, observaron que las macroesferas con un diámetro medio de 3.2 mm al ser reticuladas con glutaraldehído al 5 % se volvían duras pero eran más frágiles en comparación a las macroesferas reticuladas con 1 % de glutaraldehído. Esta situación fue similar a la observada durante la funcionalización de las perlas, aquellas que se trataron con 3 % de glutaraldehído eran mucho más frágiles que las tratadas con un 1 % y por tanto debían ser manipuladas con mayor cuidado en comparación a las perlas funcionalizadas con almidón oxidado en las mismas concentraciones.

Del mismo modo que con el glutaraldehído, la presencia de grupos aldehídos en el almidón, obtenidos gracias a la oxidación, permiten la formación del grupo imina, dando lugar al establecimiento de un enlace covalente entre ambos polisacáridos permitiendo la formación de estructuras más rígidas (Tharanathan, 2005) y según Serrero et al., (2010) no solo estos enlaces forman una red en la perla sino que también existen interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno que le ayudan al hidrogel, quitosano-almidón oxidado, a ser insoluble y mejorar su resistencia a las variaciones de pH.

Inmovilización de la β -galactosidasa

Evaluación de la actividad y la eficacia de la inmovilización

Para la inmovilización de la lactasa se evaluó el efecto del glutaraldehído y almidón oxidado, en dos concentraciones, como agentes reticulantes y funcionalizantes de las perlas de quitosano. Inicialmente se comentó que para los cuatro tratamientos se evaluaron dos ensayos de control (el diseño experimental realizado se puede ver en la **Tabla A1**), con estos se comprobó que no existe efecto de la perla funcionalizada sobre la determinación de la concentración de glucosa y por ende en el cálculo de la actividad.

En la **Tabla 2**, se encuentra resumido, para cada uno de los tratamientos evaluados, los valores calculados de actividad para el total de perlas empleadas en la inmovilización.

Tabla 2

Actividad de la β -galactosidasa inmovilizada.

Tratamientos	Actividad inmovilizada (U)	Actividad específica inmovilizada (U/gss*)	Actividad recuperada (%)
G1	19.78 \pm 3.97 ^a	31.07 \pm 6.25 ^a	9.96 \pm 0.97 ^a
G3	11.54 \pm 1.79 ^b	17.95 \pm 2.38 ^b	5.91 \pm 1.20 ^b
A1	9.66 \pm 0.34 ^b	15.46 \pm 0.55 ^b	5.62 \pm 1.13 ^b
A3	10.41 \pm 1.66 ^b	16.50 \pm 2.63 ^b	5.40 \pm 1.21 ^b

Nota: *gss: gramos de soporte seco.

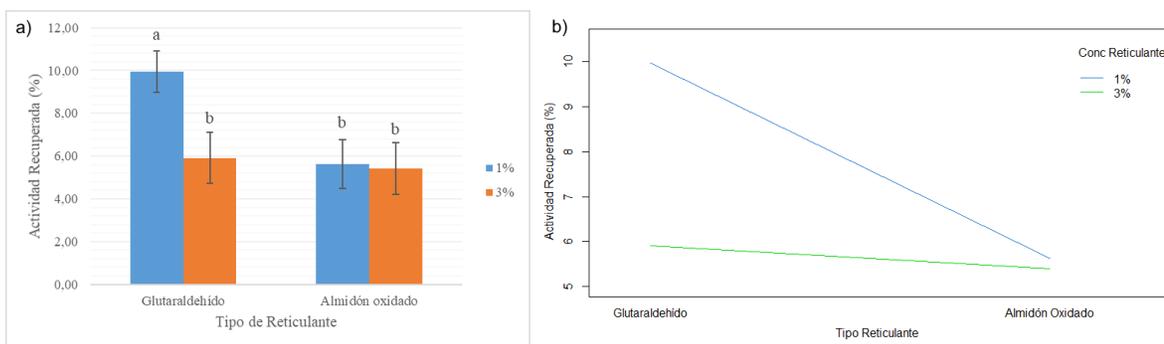
Para evaluar cuál factor tenía un efecto significativo sobre la actividad recuperada, que es uno de los cuatro indicadores de la eficacia de la inmovilización, se empleó el análisis ANOVA y para determinar efecto de los niveles se realizó una prueba de Tukey, empleando un nivel de confianza del 95 % y un $\alpha = 0.05$ (Apéndice 2.1). Se observó que tanto el tipo de reticulante como la concentración tienen un efecto significativo en la actividad recuperada ($p = 0.006$ y $p = 0.012$ respectivamente), en el caso de los niveles con la prueba de Tukey se pudo verificar que respecto al tipo de reticulante el glutaraldehído tiene una mayor influencia en la variable de respuesta y que la concentración al 1 % es la que mejora los resultados de la actividad recuperada.

En la **Figura 24a** se puede observar que los tratamientos con almidón oxidado en ambas concentraciones junto con el tratamiento con glutaraldehído al 3 % lograron actividades estadísticamente similares y que el mejor tratamiento resultó ser el

glutaraldehído al 1 % con un 9.96 ± 0.97 %. De la **Figura 24b** se destaca que efectivamente existe una interacción entre ambos factores (así como determinó el ANOVA, $p = 0.019$) y que el empleo del almidón oxidado en cualquier concentración no va a permitir mejorar la retención de la actividad por sobre el 6 %.

Figura 24

Diagramas resumen para los resultados de la actividad recuperada.



Nota: a) histograma comparativo de los resultados, b) diagrama de interacción.

Las 150 perlas que se reticularon y funcionalizaron con glutaraldehído al 1 % tuvieron una actividad específica inmovilizada de 31.07 ± 6.25 U/gss representando este dato una recuperación de la actividad del 9.96 % de la actividad inicial total que fue 195.48 U. En la investigación realiza por Klein et al., (2012) las perlas de 2 mm de diámetro funcionalizadas con 5 % de glutaraldehído lograron una retención de la actividad de 10.7 % al emplear una concentración inicial de enzima de 1560 U, en sus ensayos la mayor retención fue de 13.4 %.

Se debe destacar que el sustrato empleado en la investigación de Klein et al., (2012) fue el ONPG, que como se mencionó previamente es un sustrato sintético de reacción rápida, de ahí que las diferencias en cuanto a valores de actividad sean tan notorias, a pesar de la diferencia cinética entre aquel sustrato y la lactosa los

porcentajes de actividad retenida son similares en ambas investigaciones asociando este resultado a la capacidad que tiene el quitosano como soporte, en forma de perla o macropartícula, cuando es funcionalizado con el glutaraldehído.

Al evaluar los resultados de absorbancia (datos no mostrados) y en base a lo mencionado por Armbruster & Pry, (2008) sobre el límite de detección (*LoD*) aplicado para la curva estándar de glucosa obtenida con el kit K-GLOX, se pudo concluir que, respecto a la enzima residual del proceso de inmovilización, solo para el sobrenadante se logró determinar la cantidad de glucosa liberada y que las fracciones de lavado no tenían la cantidad suficiente de enzima como para liberar glucosa que sea detectable de manera confiable por el kit enzimático. De modo que para el cálculo del rendimiento y la eficiencia de inmovilización se emplearon las actividades obtenidas de la enzima inicial en solución y la enzima en el sobrenadante.

En la **Tabla 3** se encuentran los resultados obtenidos para los demás indicadores de la eficacia de la inmovilización: el rendimiento, la retención del soporte y la eficiencia para los cuatro tratamientos evaluados.

Tabla 3

Resultados obtenidos para los indicadores de la eficacia de la inmovilización.

Tratamientos	Rendimiento de la inmovilización (%)	Retención del soporte (%)	Eficiencia (%)
G1	90.79 ± 15.95 ^a	98.08 ± 3.32 ^a	12.29 ± 3.07 ^{ab}
G3	100.00 ^a	97.98 ± 3.50 ^a	5.91 ± 1.20 ^b
A1	24.22 ± 6.76 ^b	24.11 ± 4.14 ^b	24.70 ± 9.87 ^a
A3	26.81 ± 14.67 ^b	23.57 ± 3.04 ^b	22.87 ± 9.13 ^{ab}

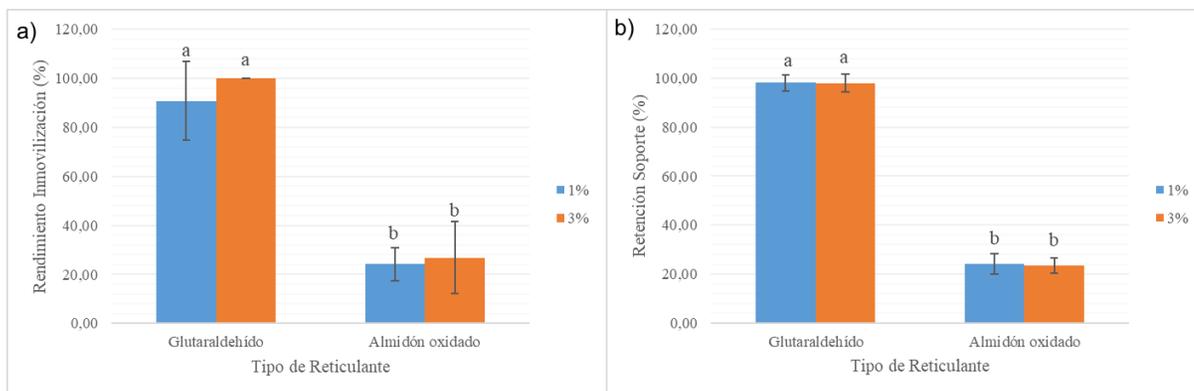
Bajo las mismas características se realizaron los análisis estadísticos ANOVA y prueba de Tukey para las variables de respuesta. Los resultados estadísticos para el rendimiento y la retención del soporte (Apéndice 2.2 y Apéndice 2.3) demostraron llegar a la misma conclusión; para estas variables, tan solo el tipo de reticulante tiene un efecto significativo en la inmovilización, siendo el glutaraldehído aquel con que se consigue los mejores resultados y que sin importar el nivel empleado del reticulante este no va a tener un efecto representativo para mejorar la inmovilización.

Se debe distinguir por la *Ecuación 3* y la *Ecuación 6* que el rendimiento se calcula en base a la actividad residual presente en el sobrenadante y las fracciones de lavado mientras que la retención se calcula en base a la cantidad de enzima que es retenida por el soporte funcionalizado. Tener conocimiento de ambas variables puede ser empleado para determinar la carga proteica en el soporte y descartar fenómenos de desactivación de la enzima libre, sobre todo al contrastar los resultados con la eficiencia de la inmovilización (Sheldon & van Pelt, 2013).

Al evaluar la **Figura 25** es evidente como los resultados para ambas variables son congruentes entre sí demostrando que el quitosano cuando es funcionalizado con glutaraldehído es capaz de inmovilizar la totalidad de la proteína en solución, para esta investigación se empleó un total de 1.25 mg de β -galactosidasa, los cuales pueden ser exitosamente inmovilizados al emplear 150 perlas o 0.7072 ± 0.0273 g de micropartículas de quitosano. En el caso del almidón oxidado, las 150 perlas funcionalizadas con este agente son capaces de inmovilizar aproximadamente 0.298 mg de enzima.

Figura 25

Histograma comparativo de dos de los indicadores de eficacia.

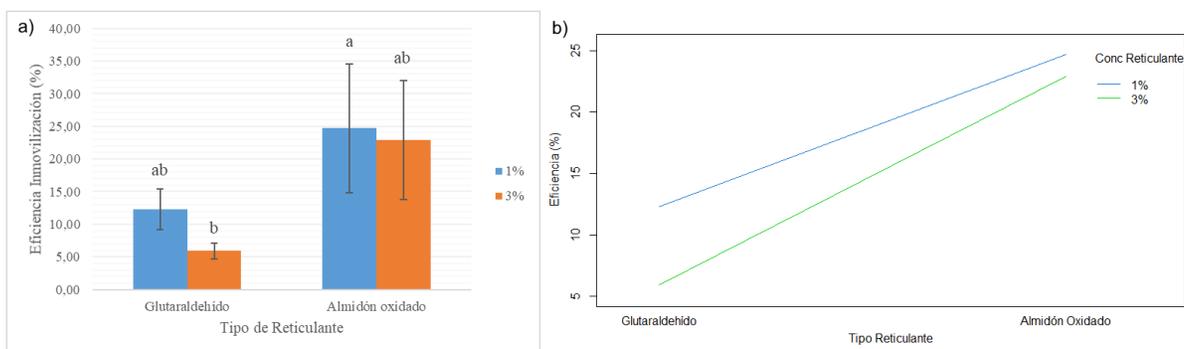


Nota: a) histograma para el rendimiento de la inmovilización, b) histograma para la retención del soporte.

Cuando comparamos los resultados con la eficiencia de la inmovilización se obtienen conclusiones bastante diferentes, como se observa en la **Figura 26a** los datos para el almidón oxidado son mayores respecto al glutaraldehído. Estadísticamente, el ANOVA muestra el mismo resultado que el tipo de reticulante es la fuente de variabilidad con significancia para la inmovilización de la β -galactosidasa ($p = 5.24 \times 10^{-6}$) y tan solo con la prueba de Tukey se puede evidenciar que el efecto significativo corresponde al almidón oxidado, con esta misma prueba se pudo determinar la diferencia entre los cuatro tratamientos ensayados observándose que esta es significativa entre el tratamiento A1 y G3 y que las medias de los tratamientos A3 y G3 no son significativamente diferentes a los tratamientos A1 y G3 (**Tabla 3** y Apéndice 2.4).

Figura 26

Diagramas resumen para los resultados de la eficiencia.



Nota: a) histograma comparativo de los resultados, b) diagrama de interacción.

La **Figura 26b** corrobora el resultado de que no existe interacción entre los factores estudiados (ANOVA para la interacción TipoRet:ConcRet con valor $p = 0.627$) y que el empleo del almidón oxidado en cualquiera de las dos concentraciones va a mejorar la eficiencia de la inmovilización maximizándose el resultado al usar una concentración de 1 %, que también es la concentración con un mejor efecto cuando se trata de la funcionalización con el glutaraldehído.

En la investigación de Biró et al., (2008) se empleó el mismo método de preparación y funcionalización de las perlas usando glutaraldehído al 5 % y ONPG como sustrato, ellos encontraron que las perlas de 3.2 mm de diámetro tenían una actividad inmovilizada específica de 66 U/g de soporte seco con un rendimiento de inmovilización del 16.9 %. En esta investigación, la funcionalización de las perlas con el glutaraldehído al 1 y 3 % permitió obtener actividades de 31.07 y 17.95 U/g con rendimientos de 90.79 y 100 % (**Tabla 2** y **Tabla 3**), siendo que la actividad inmovilizada es menor a la obtenida por Biró et al., (2008) y los rendimientos mucho mayores los resultados se asocian a la concentración de enzima empleada en ambas investigaciones. La inmovilización realizada por Biró et al., (2008) empleó 5 mL de una

solución 1:4 de la enzima Maxilact LX 5000 para 1 g (en peso húmedo) de perlas, mientras que en esta investigación se emplearon 5 mL de una solución 1:248 de la enzima Ha-Lactase™ 5200 para 0.7072 g (en peso seco) de perlas, de modo que un exceso en la concentración de enzima pudo haber afectado el rendimiento en la investigación de referencia y en este caso el empleo de una baja concentración proteica (0.25 mg/mL) permitió que las perlas empleadas sean capaces de retener más del 90 % de la enzima.

Al comparar las concentraciones del reticulante para los cuatro indicadores de eficacia de la inmovilización (actividad retenida, rendimiento, retención del soporte y eficiencia) se puede observar que al emplear glutaraldehído al 1 % se consiguen los mejores resultados en casi todas las variables en comparación al glutaraldehído al 3 % (**Tabla 2** y **Tabla 3**). Estos resultados, específicamente los de actividad inmovilizada, son congruentes con la investigación realizada por He Chen et al., (2013) que emplearon el mismo método de precipitación y reticulación con glutaraldehído demostrando que a mayores concentraciones del dialdehído, por ejemplo 3 %, la actividad inmovilizada en $\mu\text{mol ONP}/\text{min}/\text{g}$ (U/g) disminuía, 10 U/g, y que cuanto menor era la concentración mayor resultaba la actividad inmovilizada, para 0.5 % valores mayores a 50 U/g.

Esto se puede explicar porque el glutaraldehído al ser un dialdehído en altas concentraciones va generar un exceso de aldehídos en la superficie de la perla causando que la enzima forme uniones multipunto con el reticulante causando modificaciones en la estructura espacial del centro activo pudiendo afectar la conformación tridimensional de la enzima, modificando su flexibilidad e incluso actuando como desnaturizante (Belho & Ambasht, 2021; He Chen et al., 2013; Liese & Hilterhaus, 2013) y de ahí que la actividad retenida haya sido significativamente menor

al emplear un 3 % en comparación al 1 % del reticulante (5.91 ± 1.20 % y 9.96 ± 0.97 % respectivamente).

Es por esta misma razón que se emplea el indicador de eficiencia debido a que las enzimas durante el proceso de la inmovilización pueden desactivarse o formar uniones con el soporte tales que bloquen el sitio activo (Sheldon & van Pelt, 2013). Al analizar los resultados de la **Tabla 3** que muestra como a pesar de que el glutaraldehído consigue un rendimiento entre el 90 y 100 % en ambas concentraciones, la eficiencia de inmovilización no resulta tan buena logrando resultados entre el 5 y 13 % siendo estos opuestos a los que se obtuvo con el empleo del almidón oxidado entre el 22 y 25 % en ambas concentraciones.

En el caso del almidón oxidado este no logró obtener resultados muy elevados para el rendimiento y la retención del soporte, sin embargo, la actividad retenida es estadísticamente similar a la obtenida con el glutaraldehído al 3 % y solamente en el caso de la eficiencia se consiguieron mejores resultados en comparación al glutaraldehído. Sobre este polisacárido funcionalizado existe tan solo una investigación en la cual se lo haya empleado para funcionalizar quitosano y cuyo complejo fuera utilizado en la inmovilización de enzimas.

En la investigación de Hongge Chen et al., (2010) se evaluó el almidón dialdehído como agente reticulante del quitosano para la inmovilización de xilanas de *Aspergillus niger* comparando su efecto con el uso del glutaraldehído, el protocolo de elaboración de las perlas se basó en el mismo principio de precipitación con la diferencia de utilizar hexametafosfato de sodio ((NaPO_3)₆) como agente coagulante. Los resultados fueron un 54.2 % de actividad recuperada para el quitosano funcionalizado con glutaraldehído y un 60.8 % de actividad para el almidón oxidado empleando 1 mL y 1 g de cada reticulante respectivamente; en esta investigación se obtuvo una

recuperación de la actividad del 9.96 % para el glutaraldehído y 5.62 % del almidón cuando se empleó una concentración del 1 %.

Al comparar las actividades retenidas con el glutaraldehído hay una diferencia evidente entre la inmovilización de la xilanasas y la β -galactosidasa; por los datos obtenidos de la eficiencia se puede afirmar que efectivamente el glutaraldehído provocó la inactivación enzimática resultando en una retención total de la enzima, pero con baja actividad. En el caso del almidón oxidado en todos los indicadores de eficacia se observó que la concentración no tuvo un efecto significativo en los resultados (**Figura 24, Figura 25 y Figura 26**) y que en contraste con los resultados obtenidos por Hongge Chen et al., (2010) son mucho menores, no obstante en su investigación se menciona que el almidón dialdehído empleado fue uno cuyo grado de oxidación era superior al 90 %.

El grado de oxidación es la cantidad total de grupos carbonilos (CHO) y grupos carboxilos (COOH) por cada 100 unidades de glucosa (Y. R. Zhang et al., 2012), mientras mayor sea el grado de oxidación mayor será la cantidad de grupos carbonilos capaces de reaccionar con los grupos amino del quitosano y la enzima. Los métodos de oxidación con peróxido de hidrógeno pueden conseguir buenas cantidades de grupos carbonilos, 32.9 % (Han, 2016), 55.4 % (S. D. Zhang et al., 2009) y 53.4 % (Viteri Narváez, 2018). Al haber empleado el mismo método de oxidación que Viteri Narváez, (2018) se esperaría que la cantidad de grupos carbonilos sea similar y de serlo justificaría que no se hayan conseguido valores tan elevados de actividad retenida como en la investigación de Hongge Chen et al., (2010).

Algo que también se debe destacar del empleo del almidón oxidado es que los valores para el rendimiento y la eficiencia (**Tabla 3**) son prácticamente los mismos,

inclusive en la retención del soporte, de modo que toda la β -galactosidasa que fue inmovilizada es activa.

Al no existir una diferencia con las concentraciones, la sugerencia para mejorar la eficacia de la inmovilización al emplear almidón oxidado sería modificar de alguna manera el protocolo de oxidación con el peróxido de hidrogeno a fin de obtener un mayor grado de oxidación y por ende una mayor concentración de grupos carbonilos. Para este fin se ha observado que el uso de catalizadores metálicos generan rápidamente radicales hidroxilo que inmediatamente reaccionan con los carbohidratos para generar los grupos funcionales carbonilo (Vanier et al., 2017).

Capítulo 5: Conclusiones

La β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* es una enzima de mucha importancia industrial, la constante demanda y el procesamiento de grandes cantidades de sustancia hacen de los métodos de inmovilización una alternativa viable y llamativa porque mejoran las características operacionales de la enzima, en este sentido el quitosano funcionalizado puede ser una opción muy prometedora.

La caracterización de la enzima y del soporte empleado para la inmovilización es un paso clave e importante para la continuación de los estudios enzimáticos y de inmovilización. El empleo de lactasa en una concentración de 0.25 mg/mL en condiciones uniformes de trabajo, temperatura 37 °C, pH 7 y tiempo de reacción de 5 minutos, facilitaron los ensayos con un total de 150 perlas de quitosano (0.7072 ± 0.0273 g; 2.5 mm) que se funcionalizaron con dos tipos de reticulante, glutaraldehído y almidón oxidado, en dos concentraciones de trabajo, 1 y 3 %.

De la experimentación se concluyó que el mejor reticulante para el quitosano es el glutaraldehído a la concentración de 1 % porque alcanzó los valores más altos en la actividad inmovilizada específica, 31.07 U/gss y en dos de los cuatro indicadores de eficacia de la inmovilización, 9.96 % de actividad recuperada y 98.08 % de enzima retenida en el soporte. En los otros dos indicadores empleados, los tratamientos con el mejor resultado fueron el glutaraldehído al 3 % con un 100 % para el rendimiento de la inmovilización y el almidón oxidado al 1 % con un 24.7 % para la eficiencia de la inmovilización.

Con los resultados obtenidos se puede afirmar que el mejor reticulante para las perlas de quitosano es el glutaraldehído en cualquier concentración más si se desea potenciar su efecto funcionalizante lo mejor es emplearlo en bajas concentraciones y que por la investigación realizada, con un 1 % se consigue las mejores características

de inmovilización, a pesar de ello se destaca bastante el trabajo con el almidón oxidado que demostró tener una notable capacidad de carga enzimática y una eficiencia, por sobre el 24 %, y que igual al quitosano tiene cualidades de biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja toxicidad en contraste con el glutaraldehído, además sus propiedades químicas pueden mejorarse en el proceso de oxidación a fin de favorecer sus cualidades como agente funcionalizante del quitosano.

Capítulo 6: Recomendaciones

Siendo nuestro país consumidor de producto extranjero, la primera recomendación se orienta al desarrollo de la investigación que permita producir de forma recombinante la β -galactosidasa con el objetivo de disponer de enzima para el desarrollo de más experimentos que complementen y mejoren los resultados ya obtenidos y así llegar a una real solución industrial en la aplicación de la lactasa.

Habiendo conseguido resultados muy prometedores con la investigación hecha aún queda mucho trabajo por realizar. La investigación inicial puede ser potenciada con la caracterización más profunda del soporte mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para confirmar la formación de las bases de Schiff entre el soporte y el reticulante, y entre el reticulante y la enzima. Adicionalmente para optimizar el uso del quitosano funcionalizado es recomendable realizar estudios de carga para averiguar la real capacidad de retención del catalizador.

Al igual que con el soporte, la enzima libre e inmovilizada debe ser caracterizada y para esto se deben realizar estudios enzimáticos, los cálculos del K_m y V_{max} son importantes para comprender la cinética del biocatalizador y para su empleo en procesos de operación continua y de mayor volumen son necesarios los estudios de optimización de las condiciones de trabajo, pH y temperatura. En las investigaciones con sistemas de inmovilización son muy recomendados los estudios de estabilidad en condiciones desnaturalizantes para la enzima soluble contrastando con la enzima inmovilizada a fin de determinar la resistencia del sistema, en función de la actividad mantenida, al transcurrir un tiempo en almacenamiento.

En esta clase de investigaciones, la proyección del trabajo se direcciona a determinar la eficacia de la enzima inmovilizada cuando es sometida a condiciones de flujo continuo o discontinuo con mayores volúmenes de sustrato e incluso entre

diferentes sustratos, siendo por tanto un trabajo bastante largo pero muy útil debido a la aplicabilidad de los resultados y a la importancia que tiene la β -galactosidasa a nivel de industria y producción.

Apéndices

Apéndice 1

Diseño experimental del proyecto de investigación.

Ensayos realizados en la investigación, las corridas corresponden a un total de 3 réplicas aleatorizadas para los 4 tratamientos incluidas 2 réplicas para los controles de cada tratamiento, en estos últimos se evaluó la concentración de glucosa producida cuando no existe enzima retenida en la perla o diluida en el buffer residual del sobrenadante y las fracciones de lavado.

Tabla A1

Corridas del diseño experimental.

Tanda	Estándar	Identificación	Corrida	TipoRet	ConcRet (%)
1	4	Rep1	1	Almidón oxidado	1
	13	ControlG3	2	Glutaraldehído	3
	15	ControlG1	3	Glutaraldehído	1
	5	Rep1	4	Almidón oxidado	1
2	16	ControlA3	5	Almidón oxidado	3
	2	Rep1	6	Glutaraldehído	1
	11	Rep1	7	Almidón oxidado	3
	8	Rep2	8	Glutaraldehído	3
3	17	ControlG1	9	Glutaraldehído	1
	18	ControlA1	10	Almidón oxidado	1
	12	Rep2	11	Almidón oxidado	3
	6	Rep2	12	Almidón oxidado	1
4	9	Rep2	13	Glutaraldehído	3
	3	Rep3	14	Glutaraldehído	1
	19	ControlA3	15	Almidón oxidado	3
	20	ControlG3	16	Glutaraldehído	3
5	10	Rep3	17	Almidón oxidado	3
	1	Rep3	18	Glutaraldehído	1
	14	ControlA1	19	Almidón oxidado	1
	7	Rep3	20	Glutaraldehído	3

Nota: obtenido con el programa Design-Expert 11

Apéndice 2

Análisis estadístico de los indicadores de eficacia de la inmovilización.

Apéndice 2.1

Análisis de la actividad retenida

Resumen

Tratamiento	Cuenta	Media	Des Estand	Min	Max
Glut:1%	3	9.96	0.98	9.08	6.41
Glut:3%	3	5.91	1.20	4.78	6.58
AlmOxid:1%	3	5.62	1.13	4.32	11.01
AlmOxid:3%	3	5.40	1.21	4.16	7.17

ANOVA

Fuente de variabilidad	gl	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor F	Valor p (p<0.05)
TipoRet	1	17.690	17.690	13.755	0.006*
ConcRet	1	13.680	13.675	10.632	0.012*
TipoRet:ConcRet	1	11.000	11.002	8.554	0.019*
Error	8	10.290	1.286		

Prueba de Tukey HSD

Parámetro	Valor
Valor crítico del rango estudentizado	4.529
Diferencia mínima significativa	2.965
Alfa	0.05

Factor	Niveles	Diferencia	Inferior	Superior	Valor p ajustado
TipoRet	Glut-AlmOxid	2.428	0.918	3.938	0.006
ConcRet	3%-1%	-2.135	-3.645	-0.625	0.012

Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes

Tratamientos	Media	Grupos
Glut:1%	9.96	a
Glut:3%	5.91	b
AlmOxid:1%	5.62	b
AlmOxid:3%	5.40	b

Apéndice 2.2

Análisis del rendimiento de la inmovilización

Resumen

Tratamiento	Cuenta	Media	Des Estand	Min	Max
Glut:1%	3	90.79	15.95	72.38	100.00
Glut:3%	3	100.00	0.00	100.00	100.00
AlmOxid:1%	3	24.22	6.76	17.07	30.50
AlmOxid:3%	3	26.81	14.67	16.59	43.62

ANOVA

Fuente de variabilidad	gl	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor F	Valor p (p<0.05)
TipoRet	1	14650.0	14650.0	113.734	5.24E-06*
ConcRet	1	104.0	104.0	0.809	0.395
TipoRet:ConcRet	1	33.0	33.0	0.255	0.627
Error	8	1030.0	129.0		

Prueba de Tukey HSD

Parámetro	Valor
Valor crítico del rango estudentizado	4.529
Diferencia mínima significativa	29.676
Alfa	0.05

Factor	Niveles	Diferencia	Inferior	Superior	Valor p ajustado
TipoRet	Glut-AlmOxid	69.882	54.771	84.992	5.20E-06
ConcRet	3%-1%	5.895	-9.215	21.005	0.395

Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes

Tratamientos	Media	Grupos
Glut:3%	100.00	a
Glut:1%	90.79	a
AlmOxid:3%	26.81	b
AlmOxid:1%	24.22	b

Apéndice 2.3

Análisis de la retención del soporte

Resumen

Tratamiento	Cuenta	Media	Des Estand	Min	Max
Glut:1%	3	98.08	3.32	94.25	100.00
Glut:3%	3	97.98	3.50	93.93	100.00
AlmOxid:1%	3	24.11	4.14	21.10	28.83
AlmOxid:3%	3	23.57	3.04	21.07	26.96

ANOVA

Fuente de variabilidad	gl	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor F	Valor p (p<0.05)
TipoRet	1	16511.0	16511.0	1329.522	3.51E-10*
ConcRet	1	0.0	0.0	0.025	0.878
TipoRet:ConcRet	1	0.0	0.0	0.011	0.918
Error	8	99.0	12.0		

Prueba de Tukey HSD

Parámetro	Valor
Valor crítico del rango estudentizado	4.529
Diferencia mínima significativa	9.214
Alfa	0.05

Factor	Niveles	Diferencia	Inferior	Superior	Valor p ajustado
TipoRet	Glut-AlmOxid	74.187	69.495	78.878	0.000
ConcRet	3%-1%	-0.323	-5.015	4.368	0.878

Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes

Tratamientos	Media	Grupos
Glut:1%	98.08	a
Glut:3%	97.98	a
AlmOxid:1%	24.11	b
AlmOxid:3%	23.57	b

Apéndice 2.4

Análisis de la eficiencia de la inmovilización

Resumen

Tratamiento	Cuenta	Media	Des Estand	Min	Max
Glut:1%	3	24.70	3.07	9.08	15.21
Glut:3%	3	22.87	1.20	4.78	7.17
AlmOxid:1%	3	12.29	9.87	17.21	35.89
AlmOxid:3%	3	5.91	9.13	15.09	32.93

ANOVA

Fuente de variabilidad	gl	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor F	Valor p ($p < 0.05$)
TipoRet	1	14650.0	14650.0	113.734	5.24E-06*
ConcRet	1	104.0	104.0	0.809	0.395
TipoRet:ConcRet	1	33.0	33.0	0.255	0.627
Error	8	1030.0	129.0		

Prueba de Tukey HSD

Parámetro	Valor
Valor crítico del rango estudentizado	4.529
Diferencia mínima significativa	18.106
Alfa	0.05

Factor	Niveles	Diferencia	Inferior	Superior	Valor p ajustado
TipoRet	Glut-AlmOxid	-14.688	-23.908	-5.469	0.006
ConcRet	3%-1%	-4.102	-13.321	5.118	0.335

Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes

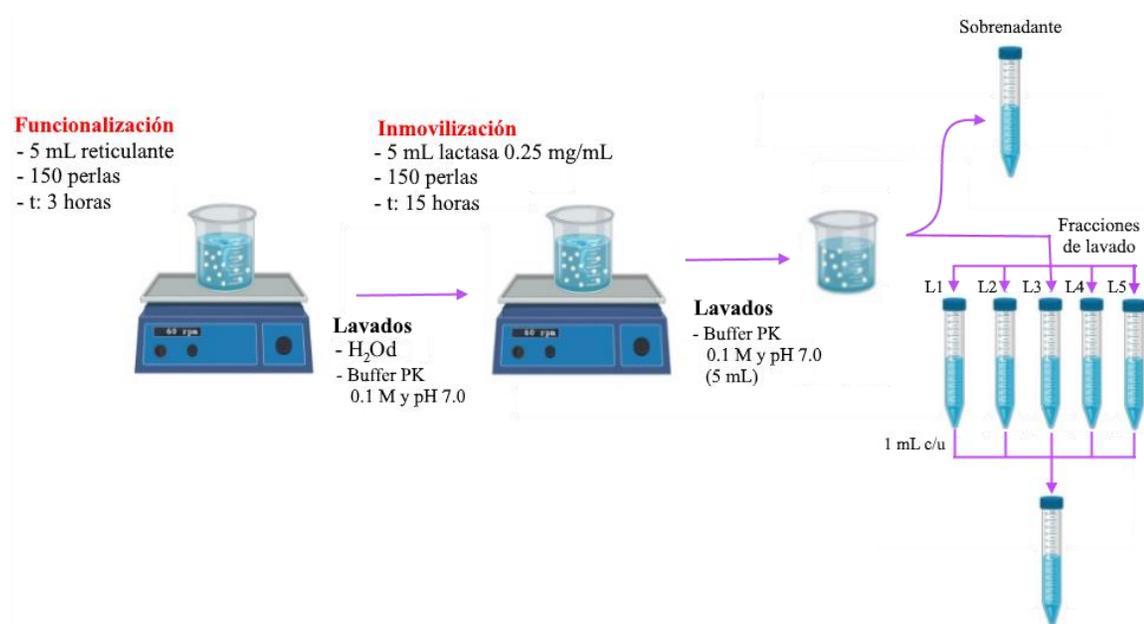
Tratamientos	Media	Grupos
AlmOxid:1%	24.70	a
AlmOxid:3%	22.87	ab
Glut:1%	12.29	ab
Glut:3%	5.91	b

Apéndice 3

Esquemas de referencia para la metodología.

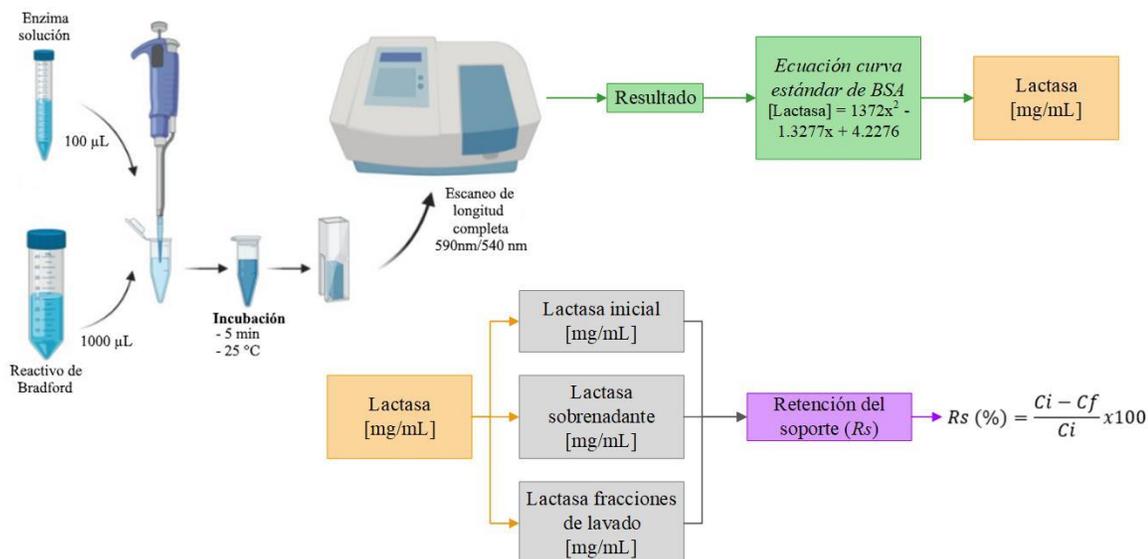
Apéndice 3.1

Diagrama de funcionalización e inmovilización de las perlas de quitosano.



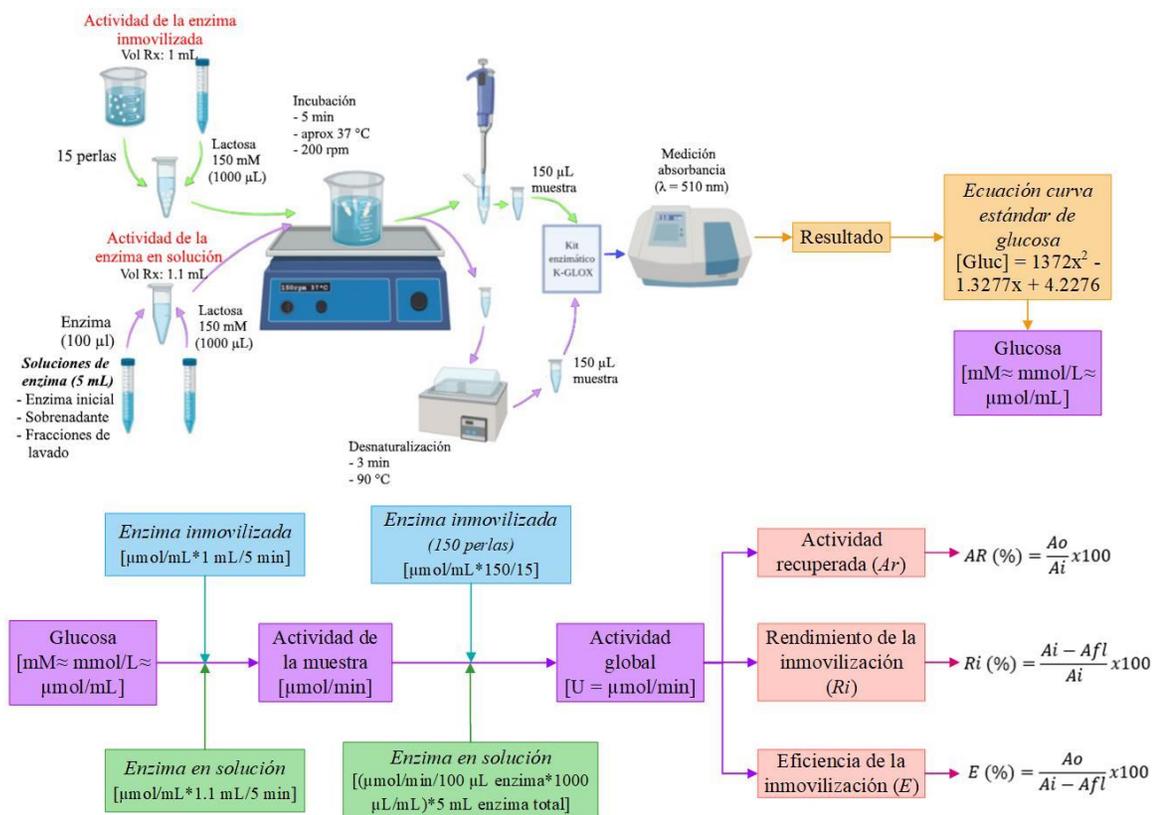
Apéndice 3.2

Diagrama de determinación de la concentración de proteína



Apéndice 3.3

Diagrama de los ensayos para la determinación y cálculos de la actividad.



Referencias

- Alshanberi, A. M., Satar, R., & Ansari, S. A. (2021). Stabilization of β -Galactosidase on Modified Gold Nanoparticles: A Preliminary Biochemical Study to Obtain Lactose-Free Dairy Products for Lactose-Intolerant Individuals. *Molecules*, *26*(5), 1226. <https://doi.org/10.3390/molecules26051226>
- Anisha, G. S. (2017). β -Galactosidases. In A. Pandey, S. Negi, & C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products* (pp. 395–421). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00017-8>
- Annu, Ahmed, S., & Ikram, S. (2017). Chitin and Chitosan: History, Composition and Properties. In S. Ahmed & S. Ikram (Eds.), *Chitosan: Derivatives, Composites and Applications* (pp. 3–24). Scrivener Publishing.
- Ansari, S. A., & Husain, Q. (2010). Lactose hydrolysis by β galactosidase immobilized on concanavalin A-cellulose in batch and continuous mode. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *63*(1–2), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.12.010>
- Antony, R., Arun, T., & Manickam, S. T. D. (2019). A review on applications of chitosan-based Schiff bases. *International Journal of Biological Macromolecules*, *129*, 615–633. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.047>
- Arfin, T. (2017). Chitosan and Its Derivatives: Overview of Commercial Applications in Diverse Fields. In S. Ahmed & S. Ikram (Eds.), *Chitosan: Derivatives, Composites and Applications* (pp. 115–149). Scrivener Publishing.
- Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical Biochemist Reviews*, *29 Suppl 1*(August), S49-52.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852857>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2556583>

Audic, J.-L., Chaufer, B., & Daufin, G. (2003). Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. *Le Lait*, 83(6), 417–438.

<https://doi.org/10.1051/lait:2003027>

Baran, E. T., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2004). Starch-chitosan hydrogels prepared by reductive alkylation cross-linking. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15(7), 759–765. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000032815.86972.5e>

Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479(September), 110607.

<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>

Beauchamp, R. O., Clair, M. B., Fennell, T. R., Clarke, D. O., Morgan, K. T., & Kair, F. W. (1993). A critical review of the toxicology of glutaraldehyde. *Gastroenterology Nursing*, 16(1), 42–43. <https://doi.org/10.1097/00001610-199308000-00018>

Becerra, M., Baroli, B., Fadda, A. M., Blanco Méndez, J., & González Siso, M. I. (2001). Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(8–9), 506–512.

[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00409-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00409-4)

Belho, K., & Ambasht, P. K. (2021). Immobilization of Phytase from Rice Bean (*Vigna umbellata* Thunb.) on Glutaraldehyde Activated Chitosan Microspheres. *Journal of Scientific Research*, 65(01), 111–119. <https://doi.org/10.37398/jsr.2021.650115>

Bender, D. A., Botham, K. M., Weil, P. A., Y, P. J. K., & Rodwell, V. W. (2016). Harper Bioquímica ilustrada. In *Ejercicios de Core en la incontinencia urinaria del adulto mayor* (30a ed., Issue 1). McGraw-Hill.

<http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1381/1/UNACH-EC-AGR-2016-0002.pdf>

- Bergthaller, W. (2004). Starch World Markets and Isolation of Starch. In P. Tomasik (Ed.), *Chemical and Functional Properties of Food Saccharides* (pp. 110–129). CRC Press.
- Biró, E., Németh, A. S., Sisak, C., Feczko, T., & Gyenis, J. (2008). Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(6), 1240–1246. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2007.11.005>
- Bissett, F., & Sternberg, D. (1978). Immobilization of *Aspergillus* beta-glucosidase on chitosan. *American Society for Microbiology Journals*, 35(4), 750–755.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brena, B., & Batista-Viera, F. (2006). Immobilization of Enzymes. In J. Guisan (Ed.), *Immobilization of Enzymes and Cells* (Second, pp. 15–30). Humana Press. <https://books.google.com.ec/books?id=886ew0R-0loC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Cacicedo, M. L., Manzo, R. M., Mucicoy, S., Bonazza, H. L., Islan, G. A., Desimone, M., Bellino, M., Mammarella, E. J., & Castro, G. R. (2019). Immobilized Enzymes and Their Applications. In R. S. Singh, R. R. Singhanian, A. Pandey, & C. Larroche (Eds.), *Advances in Enzyme Technology* (pp. 169–200). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64114-4.00007-8>
- Chen, He, Zhang, Q., Dang, Y., & Shu, G. (2013). The effect of glutaraldehyde cross-linking on the enzyme activity of immobilized β -galactosidase on chitosan bead.

Advance Journal of Food Science and Technology, 5(7), 932–935.

<https://doi.org/10.19026/ajfst.5.3185>

Chen, Hongge, Liu, L., Lv, S., Liu, X., Wang, M., Song, A., & Jia, X. (2010).

Immobilization of aspergillus niger xylanase on chitosan using dialdehyde starch as a coupling agent. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(1), 24–32.

<https://doi.org/10.1007/s12010-009-8790-x>

CILEcuador. (2018). *Datos Sector Lácteo*. Centro de la Industria Láctea del Ecuador.

www.cilecuador.org

Corzo, N., Olano, A., & Martínez-Castro, I. (2010). Carbohydrates. In L. Nollet & F.

Toldrá (Eds.), *Handbook of Dairy Foods Analysis* (pp. 139–162). CRC Press.

Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan - A versatile

semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 36(8), 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>

DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A. J., & Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6437.

<https://doi.org/10.1039/c3cs35506c>

Domalik-Pyzik, P., Chłopek, J., & Pielichowska, K. (2019). Chitosan-Based Hydrogels:

Preparation, Properties, and Applications. In M. I. H. Mondal (Ed.), *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels* (1st ed., pp. 1665–1693). Springer, Cham.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-77830-3_55

Dotto, G., & Pinto, L. A. (2017). General Considerations about Chitosan. In G. Dotto, S.

Campana-Filho, & L. A. Pinto (Eds.), *Frontiers in Biomaterials Vol. 3: Chitosan Based Materials and its Applications* (pp. 3–33). Bentham Science Publishers.

Duarte, L. S., Schöffner, J. da N., Lorenzoni, A. S. G., Rodrigues, R. C., Rodrigues, E., &

- Hertz, P. F. (2017). A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized β -galactosidase. *Process Biochemistry*, 55, 96–103.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.015>
- Dudek, G., & Turczyn, R. (2017). Application of Chitosan Membranes for Permeation and Pervaporation. In G. Dotto, S. P. Campana-Filho, & L. A. Pinto (Eds.), *Frontiers in Biomaterials Vol. 3: Chitosan Based Materials and its Applications* (pp. 272–313). Bentham Science Publishers.
- Dutra Rosolen, M., Gennari, A., Volpato, G., & Volken De Souza, C. F. (2015). Lactose Hydrolysis in Milk and Dairy Whey Using Microbial β -Galactosidases. *Enzyme Research*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/806240>
- Dwevedi, A. (2016). Enzyme immobilization: Advances in industry, agriculture, medicine, and the environment. In *Enzyme Immobilization: Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment*. Springer International Publishing.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-41418-8>
- Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C., & Yáñez, E. (2011). *Bioquímica: Conceptos esenciales* (1a.). Médica Panamericana.
- Finocchiaro, T., Olson, N. F., & Richardson, T. (1980). Use of immobilized lactase in milk systems. *Advances in Biochemical Engineering*, 15, 71–88.
https://doi.org/10.1007/3540096868_3
- Fox, P. F. (2009). Lactose: Chemistry and Properties. In P. L. H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry* (3rd ed., pp. 1–15). Springer New York.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5_1
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015). Dairy chemistry and biochemistry. In *Dairy Chemistry and Biochemistry, Second Edition*

(2nd ed.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>

Gänzle, M. G., Haase, G., & Jelen, P. (2008). Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal*, *18*(7), 685–694.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.003>

Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, *353*(16), 2885–2904.
<https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>

Gonawan, F. N. (2019). *Immobilized β -Galactosidase-Mediated Conversion of Lactose : Process , Kinetics and Modeling Studies* [Springer Theses].
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-13-3468-9>

Guerrero, C., Vera, C., Plou, F., & Illanes, A. (2011). Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial β -galactosidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *72*(3–4), 206–212.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.007>

Guidini, C. Z., Fischer, J., Santana, L. N. S., Cardoso, V. L., & Ribeiro, E. J. (2010). Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. *Biochemical Engineering Journal*, *52*(2–3), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.07.013>

Han, B. (2016). Properties of Oxidized Starch Prepared by Hydrogen Peroxide, Chlorine Dioxide and Sodium Hypochlorite. *International Conference on Biomedical and Biological Engineering*, 447–451. <https://doi.org/10.2991/bbe-16.2016.69>

Harju, M., Kallioinen, H., & Tossavainen, O. (2012). Lactose hydrolysis and other

- conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*, 22(2), 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.09.011>
- Harper, W. J. (1992). Lactose and lactose derivatives. In J. G. Zadow (Ed.), *Whey and Lactose Processing* (pp. 317–360). Elsevier Science Publishers.
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: An update. *Journal of Chemical Biology*, 6(4), 185–205. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>
- Husain, Q. (2010). β Galactosidases and their potential applications: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(1), 41–62. <https://doi.org/10.3109/07388550903330497>
- Illanes, A. (2016). Lactose: Production and Upgrading. In A. Illanes, C. Guerrero, C. Vera, L. Wilson, R. Conejeros, & F. Scott (Eds.), *Lactose-Derived Prebiotics* (pp. 1–33). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00001-9>
- Jin, X., Wang, J., & Bai, J. (2009). Synthesis and antimicrobial activity of the Schiff base from chitosan and citral. *Carbohydrate Research*, 344(6), 825–829. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.01.022>
- Jiugao, Y., Ruchuan, T., & Xinnei, L. (1994). A study of starch as a supporter in the enzyme immobilization. *Stärke*, 46(2), 49–51. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DE94S0068>
- Joseph, J. E., Mary, P. R., Haritha, K. V., Panwar, D., & Kapoor, M. (2021). Soluble and Cross-Linked Aggregated Forms of α -Galactosidase from *Vigna mungo* Immobilized on Magnetic Nanocomposites: Improved Stability and Reusability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(1), 238–256. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03408-5>

- Juang, R. S., Wu, F. C., & Tseng, R. L. (2001). Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes. *Bioresource Technology*, *80*(3), 187–193. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00090-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00090-6)
- Kamoun, E. A. (2016). N-succinyl chitosan-dialdehyde starch hybrid hydrogels for biomedical applications. *Journal of Advanced Research*, *7*(1), 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.002>
- Karaki, N., Aljawish, A., Humeau, C., Muniglia, L., & Jasniewski, J. (2016). Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, Properties, And potential applications: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, *90*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.004>
- Kayukawa, C. T. M., Oliveira, M. A. S., Kaspchak, E., Sanchuki, H. B. S., Igarashi-Mafra, L., & Mafra, M. R. (2020). Quillaja bark saponin effects on *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase activity and structure. *Food Chemistry*, *303*, 125388. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125388>
- Klein, M. P., Fallavena, L. P., Schöffner, J. D. N., Ayub, M. A. Z., Rodrigues, R. C., Ninow, J. L., & Hertz, P. F. (2013). High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers*, *95*(1), 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.044>
- Klein, M. P., Hackenhaar, C. R., Lorenzoni, A. S. G., Rodrigues, R. C., Costa, T. M. H., Ninow, J. L., & Hertz, P. F. (2016). Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process : Support characterization and β -D-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, *137*, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.069>
- Klein, M. P., Nunes, M. R., Rodrigues, R. C., Benvenuto, E. V., Costa, T. M. H., Hertz, P.

- F., & Ninow, J. L. (2012). Effect of the support size on the properties of β -galactosidase immobilized on chitosan: Advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. *Biomacromolecules*, *13*(8), 2456–2464.
<https://doi.org/10.1021/bm3006984>
- Kosaric, N., & Asher, Y. J. (2005). The utilization of cheese whey and its components. In *Agricultural Feedstock and Waste Treatment and Engineering* (pp. 25–60). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BFb0009524>
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, *35*(2–3), 126–139.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.013>
- Kumar, I., Ramaraju, P., Mir, N. A., & Singh, A. (2015). Linear dialdehydes as promising substrates for aminocatalyzed transformations. *Organic and Biomolecular Chemistry*, *13*(5), 1280–1293. <https://doi.org/10.1039/c4ob01805b>
- Ladero, M., Santos, A., García, J. L., & García-Ochoa, F. (2001). Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: Kinetic modelling. *Enzyme and Microbial Technology*, *29*(2–3), 181–193. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00366-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00366-0)
- Lee, Y. J., Kim, C. S., & Oh, D. K. (2004). Lactulose production by β -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *64*(6), 787–793. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1506-1>
- Leuba, J. L., & Widmer, F. (1977). Immobilization of the β -galactosidase from *Aspergillus niger* on chitosan. *Journal of Solid-Phase Biochemistry*, *2*(3), 257–271.
<https://doi.org/10.1007/BF02996747>
- Lewicka, K., Siemion, P., & Kurcok, P. (2015). Chemical modifications of starch:

Microwave effect. *International Journal of Polymer Science*, 2015, 1–10.

<https://doi.org/10.1155/2015/867697>

Li, H., Cao, Y., Li, S., Jiang, Y., Chen, J., & Wu, Z. (2018). Optimization of a dual-functional biocatalytic system for continuous hydrolysis of lactose in milk. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(1), 38–44.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.07.009>

Li, H., Li, S., Tian, P., Wu, Z., & Li, Z. (2017). Prevention of bacterial contamination of a silica matrix containing entrapped-galactosidase through the action of covalently bound lysozymes. *Molecules*, 22(3). <https://doi.org/10.3390/molecules22030377>

Liese, A., & Hilterhaus, L. (2013). Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6236–6249.

<https://doi.org/10.1039/c3cs35511j>

Lima, A. F., Cavalcante, K. F., Freitas, M. D. F. M., Rodrigues, T. H. S., Rocha, M. V. P., & Gonçalves, L. R. B. (2010). Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. *Process Biochemistry*, 48(3), 443–452.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.002>

Lopes, P. P., Tanabe, E. H., & Bertuol, D. A. (2020). Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. In S. Gopi, S. Thomas, & A. Pius (Eds.), *Handbook of Chitin and Chitosan* (Vol. 3, pp. 407–431). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817966-6.00013-3>

Lu, D. R., Xiao, C. M., & Xu, S. J. (2009). Starch-based completely biodegradable polymer materials. *Express Polymer Letters*, 3(6), 366–375.

<https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2009.46>

- Luo, Z., & Fu, X. (2010). Immobilization of urease on dialdehyde porous starch. *Starch - Stärke*, 62(12), 652–657. <https://doi.org/10.1002/star.201000067>
- Majore, K., & Ciproviča, I. (2020). Optimisation of Lactose Hydrolysis by Combining Solids and β -Galactosidase Concentrations in Whey Permeates. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences.*, 74(4), 263–269. <https://doi.org/10.2478/prolas-2020-0041>
- Marcial, S. (2012). *Reducción del impacto de la contaminación provocada por el deficiente tratamiento en el evacuado del suero de leche en la quesería rural asociativa Abelito del cantón Ambato* [Universidad Técnica De Ambato]. <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/handle/123456789/5301/Mg.DCEv.Ed.1859.pdf?sequence=3>
- Mariotti, M. P., Yamanaka, H., Araujo, A. R., & Trevisan, H. C. (2008). Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -galactosidase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(6), 1233–1240. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000600019>
- Martínez-Mejía, G., Vázquez-Torres, N. A., Castell-Rodríguez, A., del Río, J. M., Corea, M., & Jiménez-Juárez, R. (2019). Synthesis of new chitosan-glutaraldehyde scaffolds for tissue engineering using Schiff reactions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 579. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123658>
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. In *Enzyme and Microbial Technology* (Vol. 40, Issue 6, pp. 1451–1463). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- Mawson, A. J. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement.

Bioresource Technology, 47(3), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90180-5](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90180-5)

Mckee, T., & Mckee., J. R. (2014). Bioquímica. Las bases moleculares de la vida. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (5a ed., Vol. 53, Issue 9). McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES.

Mendoza, M., & González, P. (2018, November 26). Industria usa el 10% del suero de la leche que se produce en el país | El Comercio. *El Comercio*.
<https://www.elcomercio.com/actualidad/industria-suero-leche-produccion-ecuador.html>

Monteiro, O. A. C., & Airoidi, C. (1999). Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26(2–3), 119–128. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00068-9)

Moorthy, S. N. (2004). Tropical sources of starch. In A. C. Eliasson (Ed.), *Starch in food: structure, function and applications* (pp. 321–359). Woodhead Publishing Ltd.

Morelli, L., Amrani, N., Goulet, O., & Lukito, W. (2019). Lactose Intolerance: Clinical Symptoms, Diagnosis and Treatment. *Global Diabetes*, 1(1), 1–10.
<https://scienceworldpublishing.org/journals/global-diabetes-open-access-journal-/GDOAJ>

Moss, G. (2020, August 11). EC 3.2.1.23. IUBMB Enzyme Nomenclature.
<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/2/1/23.html>

MPCEIP, MAG, & MSP. (2019). *Acuerdo Interministerial Nro. 177* (p. 13).
<https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2019/10/ACUERDO-MINISTERIAL->

177_SOSTENIBILIDAD_CADENA_LÁCTEA.pdf

- Muzzarelli, R. A. A. (1980). Immobilization of enzymes on chitin and chitosan. *Enzyme and Microbial Technology*, 2(3), 177–184. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(80\)90044-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(80)90044-7)
- Nath, A., Mondal, S., Chakraborty, S., Bhattacharjee, C., & Chowdhury, R. (2014). Production, purification, characterization, immobilization, and application of β -galactosidase: a review. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 9(3), 330–348. <https://doi.org/10.1002/apj.1801>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principios de Bioquímica* (4a ed.). OMEGA.
- Nu, W. Le, Win, K. C., Win, K. C., Aung, S. P. S., Aung, S. P. S., Inzali, H., Inzali, H., Furuike, T., Tamura, H., & Nwe, N. (2017). Production of Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharide from Shrimp and Crab Shells Using Green Technology and Applications of Their Composite Materials. In S. Ahmed & S. Ikram (Eds.), *Chitosan: Derivatives, Composites and Applications* (pp. 89–113). Scrivener Publishing. <https://doi.org/10.1002/9781119364849.ch4>
- Ouellette, R. J., & Rawn, J. D. (2018). *Organic Chemistry: Structure, Mechanism and Synthesis* (2nd ed.). Academic Press.
- Pan, C., Hu, B., Li, W., Sun, Y., Ye, H., & Zeng, X. (2009). Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -d-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61(3–4), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.07.003>
- Pavinatto, A., Fiamingo, A., de Lacerda Bukzem, A., de Souza e Silva, D., dos Santos, D. M., Domiciano Senra, T. A., Facchinatto, W. M., & Campana-Filho, S. P. (2017).

- Chemically Modified Chitosan Derivatives. In G. L. Dotto, S. P. Campana-Filho, & L. A. de Almeida Pinto (Eds.), *Frontiers in Biomaterials Vol. 3: Chitosan Based Materials and its Applications* (26th ed., Vol. 3, pp. 107–132). Bentham Science Publishers. <https://doi.org/10.2174/9781681084855117030008>
- Paz y Miño, C. (2016). ¿Mala leche? *El Telégrafo*.
<https://www.letelegrafo.com.ec/noticias/columnistas/1/mala-leche>
- Pereira-Rodríguez, Á., Fernández-Leiro, R., González-Siso, M. I., Cerdán, M. E., Becerra, M., & Sanz-Aparicio, J. (2012). Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Journal of Structural Biology*, *177*(2), 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.031>
- Playne, M. J., & Crittenden, R. G. (2009). Galacto-oligosaccharides and Other Products Derived from Lactose. In P. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry* (pp. 121–201). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5_5
- Plou, F. J., Polaina, J., Sanz-Aparicio, J., & Fernández-Lobato, M. (2017). β -Galactosidases for Lactose Hydrolysis and Galactooligosaccharide Synthesis. In R. C. Ray & C. M. Rosell (Eds.), *Microbial Enzyme Technology in Food Applications* (1st ed., pp. 121–144). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315368405-9>
- Punekar, N. S. (2018). Enzymes: Catalysis, kinetics and mechanisms. In *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 433, Issue 3). Springer, Singapore.
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-13-0785-0_6
- Qiu, X., Wang, Y., Xue, Y., Li, W., & Hu, Y. (2020). Laccase immobilized on magnetic nanoparticles modified by amino-functionalized ionic liquid via dialdehyde starch for phenolic compounds biodegradation. *Chemical Engineering Journal*, *391*.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123564>

Raafat, D., & Sahl, H. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 186–201.

<https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x>

Ricardi, N. C., de Menezes, E. W., Valmir Benvenuto, E., da Natividade Schöffer, J., Hackenhaar, C. R., Hertz, P. F., & Costa, T. M. H. (2018). Highly stable novel silica/chitosan support for β -galactosidase immobilization for application in dairy technology. *Food Chemistry*, 246, 343–350.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.026>

Richmond, M. L., Gray, J. I., & Stine, C. M. (1980). Beta-Galactosidase: Review of Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns, and Immobilization. *Journal of Dairy Science*, 64(9), 1759–1771.

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(81\)82764-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(81)82764-6)

Rodrigues, A., & Emeje, M. (2012). Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 987–994.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.044>

Sangseethong, K., Termvejsayanon, N., & Sriroth, K. (2010). Characterization of physicochemical properties of hypochlorite- and peroxide-oxidized cassava starches. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 446–453.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.003>

Santacruz, S., Koch, K., Svensson, E., Ruales, J., & Eliasson, A. C. (2002). Three underutilised sources of starch from the Andean region in Ecuador Part I. Physico-chemical characterisation. *Carbohydrate Polymers*, 49(1), 63–70.

[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00305-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00305-8)

- Satar, R., Jafri, M. A., Rasool, M., & Ansari, S. A. (2017). Role of glutaraldehyde in imparting stability to immobilized β -galactosidase systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60(December), 1–12.
- Secundo, F. (2013). Conformational changes of enzymes upon immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6250. <https://doi.org/10.1039/c3cs35495d>
- Selvarajan, E., Nivetha, A., Subathra Devi, C., & Mohanasrinivasan, V. (2019). Nanoimmobilization of β -Galactosidase for Lactose-Free Product Development. In K. Gothandam, S. Ranjan, N. Dasgupta, & E. Lichtfouse (Eds.), *Nanoscience and Biotechnology for Environmental Applications* (pp. 199–223). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97922-9_7
- Serrero, A., Trombotto, S., Cassagnau, P., Bayon, Y., Gravagna, P., Montanari, S., & David, L. (2010). Polysaccharide gels based on chitosan and modified starch: Structural characterization and linear viscoelastic behavior. *Biomacromolecules*, 11(6), 1534–1543. <https://doi.org/10.1021/bm1001813>
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>
- Shukla, S. K., Mishra, A. K., Arotiba, O. A., & Mamba, B. B. (2013). Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.043>
- Shukla, T. P., & Wierzbicki, L. E. (1975). Beta-galactosidase technology: A solution to the lactose problem. *C R C Critical Reviews in Food Technology*, 5(3), 325–356. <https://doi.org/10.1080/10408397509527178>
- Silva, R. M., Silva, G. A., Coutinho, O. P., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2004). Preparation

- and characterisation in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15(10), 1105–1112. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000046392.44911.46>
- Singh, A. N., Singh, S., Suthar, N., & Dubey, V. K. (2011). Glutaraldehyde-activated chitosan matrix for immobilization of a novel cysteine protease, procerain B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 6256–6262. <https://doi.org/10.1021/jf200472x>
- Singh, J., Colussi, R., McCarthy, O. J., & Kaur, L. (2016). Potato Starch and Its Modification. In J. Singh & L. Kaur (Eds.), *Advances in Potato Chemistry and Technology: Second Edition* (2nd ed., pp. 195–247). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800002-1.00008-X>
- Siso, M. I. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, 57(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00036-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00036-3)
- Sung, H. W., Huang, R. N., Huang, L. H., & Tsai, C. C. (1999). In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10(1), 63–78. <https://doi.org/10.1163/156856299X00289>
- Szilagyi, A., Walker, C., & Thomas, M. G. (2019). Lactose intolerance and other related food sensitivities. In M. Paques & C. Lindner (Eds.), *Lactose: Evolutionary Role, Health Effects, and Applications* (pp. 113–153). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811720-0.00003-9>
- Takigawa, T., & Endo, Y. (2006). Effects of glutaraldehyde exposure on human health. *Journal of Occupational Health*, 48(2), 75–87. <https://doi.org/10.1539/joh.48.75>

- Tang, R., Du, Y., & Fan, L. (2003). Dialdehyde starch-crosslinked chitosan films and their antimicrobial effects. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 41(9), 993–997. <https://doi.org/10.1002/polb.10405>
- Tang, Z.-X., Shi, L.-E., & Guo, Q.-B. (2012). Chitosan nanoparticles and nanofibers: Preparation and application for enzyme immobilization. In R. G. Mackay & J. M. Tait (Eds.), *Handbook of Chitosan Research and Applications* (pp. 211–225). Nova Science Publishers.
- Teng, D. (2012). From Chitin to Chitosan. In K. Yao, J. Li, F. Yao, & Y. Yin (Eds.), *Chitosan-Based Hydrogels: Functions and Applications* (1st ed., pp. 1–38). CRC Press/Taylor & Francis Group.
- Thakur, V. K., & Thakur, M. K. (2014). Recent advances in graft copolymerization and applications of chitosan: A review. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2(12), 2637–2652. <https://doi.org/10.1021/sc500634p>
- Tharanathan, R. N. (2005). Starch - Value addition by modification. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(5), 371–384. <https://doi.org/10.1080/10408390590967702>
- Todea, A., Boeriu, C. G., Peter, F., & Biró, E. (2020). Immobilized β -d-Galactosidases for Improved Synthesis of Short-Chain Galacto-Oligosaccharides. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Biotechnological Progress and Beverage Consumption: The Science of Beverages* (Vol. 19, pp. 71–110). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816678-9.00003-5>
- Tomasik, P. (2004). Chemical Modifications of Polysaccharides. In P. Tomasik (Ed.), *Chemical and Functional Properties of Food Saccharides* (pp. 130–137). CRC Press.

- Tomasik, P., & Schilling, C. H. (2004). CHEMICAL MODIFICATION OF STARCH. In D. Horton (Ed.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (1st ed., pp. 175–403). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(04\)59005-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(04)59005-4)
- Uragami, T., Matsuda, T., Okuno, H., & Miyata, T. (1994). Structure of chemically modified chitosan membranes and their characteristics of permeation and separation of aqueous ethanol solutions. *Journal of Membrane Science*, *88*(2–3), 243–251. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(94\)87010-1](https://doi.org/10.1016/0376-7388(94)87010-1)
- Urrutia, P., Bernal, C., Wilson, L., & Illanes, A. (2018). Use of chitosan heterofunctionality for enzyme immobilization: β -galactosidase immobilization for galacto-oligosaccharide synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *116*(2017), 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.112>
- Vanier, N. L., El Halal, S. L. M., Dias, A. R. G., & da Rosa Zavareze, E. (2017). Molecular structure, functionality and applications of oxidized starches: A review. In *Food Chemistry* (Vol. 221, pp. 1546–1559). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.138>
- Venugopal, V. (2019). Applications of marine polysaccharides in food processing. In A. Trincone (Ed.), *Enzymatic Technologies for Marine Polysaccharides* (pp. 25–40). CRC Press. <https://books.google.com.ec/books?id=1p6RDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Vera, C., Guerrero, C., Aburto, C., Cordova, A., & Illanes, A. (2020). Conventional and non-conventional applications of β -galactosidases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1868*(1), 140271.

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140271>

- Vera, C., & Illanes, A. (2016). Lactose-derived nondigestible oligosaccharides and other high added-value products. In A. Illanes, C. Guerrero, C. Vera, L. Wilson, R. Conejeros, & F. Scott (Eds.), *Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective* (pp. 87–110). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00003-2>
- Viteri Narváez, D. A. (2018). *Development of a Film Based on Oxidized Ipomea Batatas L. Starch with Protein Encapsulation for Potential Skin Tissue Engineering Applications*. Universidad San Francisco de Quito.
- Walker, C., & Thomas, M. G. (2019). The evolution of lactose digestion. In M. Paques & C. Lindner (Eds.), *Lactose: Evolutionary Role, Health Effects, and Applications* (pp. 1–48). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811720-0.00001-5>
- Wang, K. (2012). Enzyme Immobilization on Chitosan-Based Supports. In K. Yao, J. Li, F. Yao, & Y. Yin (Eds.), *Chitosan-Based Hydrogels: Functions and Applications* (pp. 339–406). CRC Press.
- Ways, T. M. M., Lau, W. M., & Khutoryanskiy, V. V. (2018). Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems. *Polymers*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/polym10030267>
- Wegrzynowska-Drzymalska, K., Grebicka, P., Mlynarczyk, D. T., Chelminiak-Dudkiewicz, D., Kaczmarek, H., Goslinski, T., & Ziegler-Borowska, M. (2020). Crosslinking of chitosan with dialdehyde chitosan as a new approach for biomedical applications. *Materials*, *13*(15), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ma13153413>
- Wolf, M., Tambourgi, E. B., & Paulino, A. T. (2021). Stability of β -D-galactosidase immobilized in polysaccharide-based hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *609*, 125679.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125679>

Xavier, J. R., Ramana, K. V., & Sharma, R. K. (2018). β -galactosidase: Biotechnological applications in food processing. *Journal of Food Biochemistry*, *42*(5).

<https://doi.org/10.1111/jfbc.12564>

Xiao, Y., Zhu, J., & Zheng, L. (2012). Application of Chitosan-Based Gels in Pharmaceuticals. In K. Yao, J. Li, F. Yao, & Y. Yin (Eds.), *Chitosan-Based Hydrogels: Functions and Applications* (pp. 315–338). CRC Press/Taylor & Francis Group.

Yang, C. H., Wang, C. Y., Huang, K. S., Kung, C. P., Chang, Y. C., & Shaw, J. F. (2014). Microfluidic one-step synthesis of Fe₃O₄-chitosan composite particles and their applications. *International Journal of Pharmaceutics*, *463*(2), 155–160.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.020>

Yang, X., Chen, Y., Yao, S., Qian, J., Guo, H., & Cai, X. (2019). Preparation of immobilized lipase on magnetic nanoparticles dialdehyde starch. *Carbohydrate Polymers*, *218*, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.012>

Yin, Y., & Li, J. (2012). Formation of Chitosan-Based Hydrogels Network. In K. Yao, J. Li, F. Yao, & Y. Yin (Eds.), *Chitosan-Based Hydrogels: Functions and Applications* (pp. 179–234). CRC Press/Taylor & Francis Group.

Zall, R. R. (1992). Sources and Composition of Whey and Permeate. In J. G. Zadow (Ed.), *Whey and Lactose Processing* (pp. 1–72). Elsevier Science Publishers.

Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015). A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Reviews*, *2*(3), 204–226. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>

Zeiger, E., Gollapudi, B., & Spencer, P. (2005). Genetic toxicity and carcinogenicity

- studies of glutaraldehyde - A review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 589(2), 136–151. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.01.001>
- Zhang, S. D., Zhang, Y. R., Wang, X. L., & Wang, Y. Z. (2009). High carbonyl content oxidized starch prepared by hydrogen peroxide and its thermoplastic application. *Starch/Staerke*, 61(11), 646–655. <https://doi.org/10.1002/star.200900130>
- Zhang, Y. R., Wang, X. L., Zhao, G. M., & Wang, Y. Z. (2012). Preparation and properties of oxidized starch with high degree of oxidation. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2554–2562. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.036>
- Ziegler-Borowska, M. (2019). Magnetic nanoparticles coated with aminated starch for HSA immobilization- simple and fast polymer surface functionalization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.044>
- Ziegler-Borowska, M., Wegrzynowska-Drzymalska, K., Chelminiak-Dudkiewicz, D., Kowalonek, J., & Kaczmarek, H. (2018). Photochemical reactions in dialdehyde starch. *Molecules*, 23(12), 87–100. <https://doi.org/10.3390/molecules23123358>
- Zor, T., & Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry*, 236(2), 302–308. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0171>