

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LA LACTASA DE *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8554, PARA SU APLICABILIDAD EN LA INDUSTRIA LÁCTEA

Optimization of the Process of Extraction of Lactase From *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8554, for their Applicability in the Dairy Industry

Xiomara Montiel, Ingrid Carruyo, Letty Marcano y Marcel Mavárez

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526.
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. E-mail: xyo_mon@hotmail.com; xyo_mon@cantv.net.

RESUMEN

La lactasa o β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) es una enzima exclusivamente intracelular en *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8554, por lo que para su liberación existen diversos métodos de extracción. El objetivo del presente trabajo consistió en optimizar el proceso de extracción de esta enzima para su uso en la industria láctea. La producción de la enzima fue inducida mediante el crecimiento de la levadura en un medio con lactosa como única fuente de carbono por 9 horas, donde alcanzó la fase logarítmica final de crecimiento. Se evaluó la combinación de los parámetros fisicoquímicos: temperaturas 30; 37 y 42°C; pH 6,5; 8,5 y 10 y tiempo 5; 10 y 20 horas con el método de extracción con tolueno al 2% en buffer fosfato 0,1M. Se determinó la actividad enzimática de la lactasa a través del uso de un sustrato cromógeno el o-nitrophenyl- β -D-galactopyranosido (ONPG) sobre los extractos libres de células. Se determinó la cantidad de proteínas totales por el método de Lowry, que permitió la valoración de la actividad específica. Los resultados fueron analizados empleando el paquete estadístico Statgraf versión 7,0, aplicando análisis de varianza trifactorial, LSD y prueba de Tukey. El análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET) de las células de *K. marxianus* reveló que el tolueno ejerce un efecto permeabilizante, liberando la enzima sin ruptura de la integridad celular. Se encontró un acortamiento significativo ($P \leq 0,01$) en el tiempo necesario para la extracción de la lactasa, siendo la mejor combinación: 37°C, pH 6,5 y 5 horas, generando en este tiempo la mayor cantidad de ONP: 0,4937 μ moles/mL/10 min. y la mayor actividad específica 34,2095 U β -gal/mg proteínas.

Palabras clave: Lactasa, *Kluyveromyces marxianus*, extracción.

ABSTRACT

The lactase or β -galactosidase (EC 3.2.1.23) it is an exclusively intracellular enzyme in *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8554, so that, to obtain it, there are several methods to the extraction. The objective of this work consisted on optimizing the process of extraction of this enzyme, and it can be its used in the dairy industry. The enzyme production was induced while yeast growth in a means with lactose as the one carbon source for 9 hours, where it reached the phase logarithmic end of growth. The physiochemical parameters combination was evaluated: temperatures 30; 37 and 42°C; pH 6.5; 8.5 and 10 and time 5; 10 and 20 hours using the extraction method with toluene to 2% in buffer phosphate 0.1M. The enzymatic activity of the lactase was determined with the use of chromogen substrate the or-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) on the extracts free of cells. The quantity of total proteins was determined by the method of Lowry that allowed the valuation of the specific activity. The results were analyzed using the statistical package Statgraf version 7.0, applying variance trifactorial analysis with a single effect, LSD, Tukey test. The analysis for TEM of the cells of *K. marxianus* revealed that the toluene produced a permeabilizant effect, liberating the enzyme without rupture of the cellular integrity. It was found that there was a significant reduction in the necessary time to the extraction of the β -D galactosidase of the cells of *K. marxianus*, being the best combination: 37°C, pH 6.5 and 5 hours, generating in this time the biggest quantity in ONP: 0.4937 μ moles/mL/10 min. and the biggest specific activity 34.2095 U β -gal/mg proteins.

Key words: Lactase, *Kluyveromyces marxianus*, extraction.

INTRODUCCIÓN

La lactasa o β -galactosidasa (EC3.2.1.23), es una enzima que ha despertado gran interés biotecnológico por razones básicamente nutricionales e industriales. La enzima causa la hidrólisis del enlace β -1,4 de la lactosa hasta sus monómeros glucosa y galactosa, originando un producto con mayor poder edulcorante. Los jarabes obtenidos de esta hidrólisis sirven como sustituto del jarabe de maíz o sacarosa en las industrias de heladerías, reposterías y panaderías; además su adición a productos lácteos como leche, yogurt, crema agria y mantequilla mejora el sabor sin que ocurra un incremento calórico, beneficiando el consumo en individuos con intolerancia a la lactosa [2, 9]. La hidrólisis enzimática de la lactosa del suero permite el aprovechamiento de este subproducto de la industria láctea, el cual se ha convertido en un grave problema de contaminación ambiental, debido a que generalmente se descarga en cuerpos de aguas [9], esto ha conllevado a que actualmente existe una amplia información sobre la β -galactosidasa obtenida de diferentes fuentes y donde se han considerado aspectos como selección de géneros, condiciones de cultivo, procedimientos de extracción, purificación, estabilidad, obtención de plásmidos y mutantes, entre otras [3, 8, 10-12, 17, 20-22]. Su aplicabilidad involucra mayoritariamente sistemas alimenticios, por lo que resulta idóneo trabajar con enzimas generalmente reconocidas como seguras (GRAS) y aceptadas por agencias de control de alimentos y drogas como la Food and Drug Administration (FDA). Actualmente el estatus GRAS es validado sólo para las lactasas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus* [9]. La lactasa más conveniente para utilizar en leche, productos lácteos y sueros dulces es la proveniente del género *Kluyveromyces*, donde representa un producto estrictamente intracelular [1]. Varios métodos han sido usados para solubilizar este tipo de enzimas, dependiendo de su localización dentro de la célula, intenciones de uso y estabilidad; los métodos mecánicos son predilectos en aplicaciones a gran escala, pero requieren alta inversión, costos operacionales y además el extracto obtenido resulta cargado de fragmentos celulares, sumando así mayor grado de dificultad al momento de purificar la enzima. La autólisis no es un método apropiado, porque requiere de temperaturas que comprometen la estabilidad de la enzima y los detergentes son difíciles de remover de las preparaciones enzimáticas [4, 5, 6, 13].

Uno de los métodos más utilizados para la extracción de la β -D-galactosidasa a partir de levaduras es el uso de solventes orgánicos como el tolueno, cloroformo y alcohol isoamílico [4]. La selección del solvente debe considerar el hecho de que el efecto sólo puede ser obtenido si el agente es capaz de penetrar la pared celular y alcanzar la membrana citoplasmática [6]. Entre los solventes orgánicos, el tolueno es el agente más frecuentemente usado ya que remueve considerablemente material celular sin ruptura de la pared [4, 6, 12].

Con el fin de optimizar el proceso para la extracción de la enzima β -D-galactosidasa inducida en *K. marxianus* ATCC 8554, en esta investigación se valoró el efecto combinado del pH, temperatura y tiempo de exposición, en la capacidad de extracción del método con tolueno como solvente orgánico, sobre la actividad enzimática de los extractos crudos libre de células.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

La levadura *K. marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 fue obtenida del Centro de Cultivo Internacional American Type Culture Collection (1231 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 USA) en forma deshidratada. Luego de su activación en caldo YM (extracto levadura-malta; Difco 0711), incubada aeróbicamente a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, la cepa fue mantenida en tubos de cultivo con agar PDY (papa dextrosa agar + 0,5% de extracto de levadura) en forma de cuña, incubada en las mismas condiciones y posteriormente almacenada en nevera (4°C) con transferencias mensuales.

Medio de Inducción Enzimática (MIE)

La inducción se logró a través de la siembra de la cepa creciendo aeróbicamente a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 9 horas, en un medio que contenía 30g/L de lactosa, 8,4 g/L de sulfato de amonio, 7,5g/L de extracto de levadura, 1g/L de sulfato de manganeso en agua destilada, esterilizada en autoclave a $15\text{lb}/\text{pulg}^2$ 121°C por 15 min [7].

Bioprocesos

Los biorreactores estuvieron representados por matraces de 125 mL de capacidad nominal, provistos de tapones de algodón y operados con un volumen de trabajo de 10 mL (9 mL de MIE + 1mL del inóculo). El inóculo (4,7989 1,8084 mg/mL), correspondió al contenido celular de tubos de PDY crecidos durante 24 horas a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, arrastrado con 1 mL de MIE estéril. Esta biomasa fue vertida en los biorreactores y colocados en un baño recíprocante o shaker (Lab-Line Instruments, INC® Des-288-600 modelo 3540) a 200 rpm por 9 horas. Las células cultivadas fueron cosechadas por centrifugación a 9000g por 6 min., y el pellet recuperado fue lavado dos veces con agua destilada.

Determinación de la biomasa

La biomasa de *K. marxianus* se determinó por espectrofotometría, en un espectrofotómetro Milton Roy 21 D a 620 nm; la densidad óptica (DO), fue relacionada con el peso seco de la biomasa por unidad de volumen (mg/mL), con el uso de una curva de calibración. Para los ensayos de extracción enzimática, la biomasa de *K. marxianus* considerada estuvo en el orden de $50,37 \pm 1,84$ mg/mL.

Ensayo de toluenización

Obtenidos los pellets fueron resuspendidos en 9,8 mL de solución de buffer fosfato 0,1 M, en fioles debidamente rotuladas y agregándole 2% v/v de tolueno. El experimento de combinación de parámetros fisicoquímicos se realizó para los pH de 6,5; 8,5 y 10, temperatura de 30°C, 37°C, 42°C y tiempos de extracción de 5 h, 10 h y 20 h. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado y para cada combinación, se realizó un control correspondiente a la 0 hora de tratamiento.

Actividad enzimática

Una vez realizadas las pruebas establecidas en el diseño experimental con sus respectivos duplicados, se obtuvo el extracto enzimático correspondiente a cada tratamiento y a los cuales se procedió a determinar la actividad enzimática y actividad específica.

La actividad enzimática, definida como la cantidad requerida para producir un μmol de o-nitrophenol (ONP) utilizando or-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) como sustrato, fue determinada en los extractos crudos libres de células, según la metodología descrita por Montiel y col. [16], utilizando un espectrofotómetro Milton Roy 21 D a 420 nm. La concentración molar de o-nitrofenol expresada en $\mu\text{mol/mL/10 min.}$, fue determinada extrapolando los valores obtenidos en una curva estándar construida previamente.

La actividad enzimática específica valorada en unidades $\beta\text{Gal./mg}$ proteína se determinó según la fórmula propuesta por Figueroa [7].

$$U\beta\text{Gal/mg proteína} = (D.O._{420} \times K) / T \text{ (mg de prot.)}$$

donde:

D.O. : significa la absorbancia del ONP a 420nm

K : Constante cuyo valor es 380.

T : Tiempo de la reacción (10 min)

mg de : miligramos de proteínas totales
proteínas:

La valoración de proteínas totales se determinó por el método de Lowry [14], a través del kit de Sigma Chemical Co. 690-1 (St. Louis, MO).

Análisis ultraestructural

Con el propósito de evidenciar el efecto del tolueno sobre la estructura celular de *K. marxianus*, fue realizado una Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) por la técnica convencional, para ello células control y células tratadas a pH 6,5; 37°C por 5 horas y lavadas con agua destilada fueron sometidas a una fijación primaria con glutaraldehído al 2,5% en solución buferada de cacodilato 0,025 M, pH 7 y postfijadas con tetróxido de osmio al 1% en el mismo buffer, lavadas y

deshidratadas en alcoholes crecientes (50, 70, 95 y 100%) y óxido de propileno puro; infiltradas en una solución de óxido de propileno-resina araldita 502 (1:1) y posteriormente incluidas en araldita. Se realizaron cortes ultrafinos de 100 a 200 Å y tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo. La observación se realizó en un microscopio electrónico Hitachi 500, operando a 100 KV.

Análisis estadístico

Los resultados de la actividad enzimática de los extractos crudos obtenidos en las distintas combinaciones, se analizaron utilizando el paquete estadístico Statgraft Version 7,0 aplicando a los mismos un análisis de varianza trifactorial con un solo efecto, el método LSD y la Prueba de Tukey, con la finalidad de detectar la combinación óptima de los parámetros para la extracción de la enzima.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis por MET de las células de *K. marxianus* reveló que el tolueno ejerce un efecto permeabilizante, ya que ninguna célula mostró rompimiento de la pared celular. En la FIG. 1 se observa el efecto plasmolizante producto del tratamiento con el solvente, manifestado por la formación de pliegues de la membrana ($\downarrow$), vesícula en el espacio intra y extracelular ($\Rightarrow$), lo cual puede explicarse por la salida de compuestos marcadores del espacio intracelular y corroborado por la valoración de la actividad de la enzima. También se observa una desorganización de los organelos citoplasmáticos con ausencia de núcleo y mitocondrias y la presencia de fragmentos de membrana ($\blacktriangleright$) que podrían ser considerados como restos de organelos dentro de un citoplasma que se observa muy denso.

El análisis de los resultados para optimizar el proceso de extracción, reveló una diferencia significativa ($P \leq 0,01$) para todos los tratamientos evaluados entre sí y con respecto a sus controles, en cuanto a la actividad enzimática y contenido proteico.

Los resultados del análisis de varianza demuestran que el pH ($F = 1459,36$), temperatura ($F = 2795,32$) y tiempo ($F = 14,67$) afectan significativamente ($P \leq 0,01$) el nivel de extracción de la enzima lactasa, sin embargo analizándolos individualmente, el factor temperatura fue 6,87 veces mayor que el pH y 190,54 veces mayor que el tiempo de extracción. Así mismo la combinación entre dos de los factores establece el siguiente orden: pH x temperatura ($F = 385,43$) > temperatura x tiempo de extracción ($F = 159,14$) > pH x tiempo de extracción ($F = 27,75$); al combinar los tres factores se observa que el efecto es menor en comparación a los anteriores ($F = 74,46$), lo cual puede ser debido a que el análisis involucra los promedios totales de todos los factores, incluyendo aquellos que pueden considerarse como extremos para la actividad enzimática.

Con la finalidad de facilitar el análisis de los diferentes tratamientos se asignó un número a cada interacción estableciendo un orden entre los mismos (TABLA I), en la que se aprecia las interacciones versus el ONP liberado expresado en $\mu\text{mol/mL/10 min}$.

Los resultados de la prueba de medias de Tukey para establecer cual interacción permite obtener mayor actividad enzimática se presentan en la TABLA II, donde claramente se observa como la interacción número 10, es decir, el pH 6,5 a

37°C por 5 h, que representa la mayor actividad enzimática registrada, no se asemeja al que le sigue, que corresponde a la interacción número 14, debido a que la I está superpuesta sobre un punto y no sobre otra I, pero esta si se puede agrupar como semejante con las dos interacciones siguientes, las número 12 y 11.

En la FIG. 2, se presenta el comportamiento en bloque asociado a la temperatura, observándose que las interacciones 10 a 18, que pertenecen al ensayo a 37°C, representan

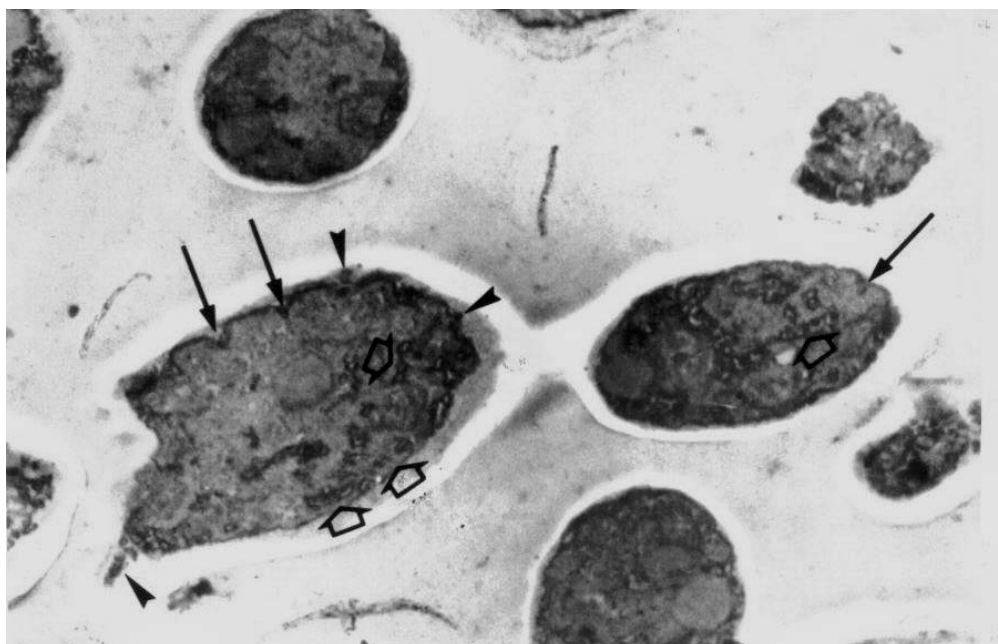


FIGURA 1. MUESTRA DE CÉLULAS DE *K. marxianus* TRATADA CON TOLUENO. SE OBSERVA EL EFECTO PLASMOLIZANTE PRODUCTO DEL TRATAMIENTO CON EL SOLVENTE, MANIFESTADO POR LA FORMACIÓN DE PLIEGUES DE LA MEMBRANA (↓), FRAGMENTOS DE MEMBRANAS (➤) Y VESÍCULA (⇐) 24.000 X.

TABLA I
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DETERMINADA POR EL ONP LIBERADO EXPRESADO EN $\mu\text{moles/mL/10 min}$, EN LAS INTERACCIONES EVALUADAS

Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Combinación de tratamientos		
		Actividad enzimática ($\mu\text{moles/mL/10 min}$)		
		pH 6,5	pH 8,5	pH 10
30	5	0,0622 (1)	0,1033 (4)	0,1316 (7)
	10	0,2132 (2)	0,2195 (5)	0,1323 (8)
	20	0,2548 (3)	0,1841 (6)	0,1588 (9)
37	5	0,4937 (10)	0,3916 (13)	0,2348 (16)
	10	0,3991 (11)	0,4181 (14)	0,3166 (17)
	20	0,4113 (12)	0,3963 (15)	0,3135 (18)
42	5	0,3568 (19)	0,2835 (22)	0,0008 (25)
	10	0,3639 (20)	0,1491 (23)	0,0000 (26)
	20	0,3016 (21)	0,0672 (24)	0,0000 (27)

Los números entre paréntesis representan la interacción entre los parámetros reportada en el texto. Los valores representan la media $\pm$ DE de la actividad enzimática.

TABLA II
COMPARACIÓN DE PAREJAS MEDIAS DE LAS
DIFERENTES COMBINACIONES DE TRATAMIENTOS
ANALIZADOS PARA DETERMINAR LA MAYOR ACTIVIDAD
ENZIMÁTICA

Interacción	Media (μ /mL/10 min de ONP)	Grupos
10	0,4937	I
14	0,4181	.I
12	0,4113	.II
11	0,3991	.II
15	0,3963	.I
13	0,3916	.I
20	0,3639	...I
19	0,3568	...I
17	0,3166	I
18	0,3135	I
21	0,3016	II
22	0,2835	I
3	0,2548	I
16	0,2348	I
5	0,2195	II
2	0,2132	I
6	0,1841	I
9	0,1588	I
23	0,1491	II
8	0,1323	I
7	0,1316	I
4	0,1033	I
24	0,0672	I
1	0,0622	I
25	0,0008	I
26	0,0000	I
27	0,0000	I

La superposición de la letra I señala como cada ensayo se semeja o no al que lo precede con respecto al ONP liberado y los ordena de mayor a menor.

los picos más altos de actividad enzimática registrados, seguidos por el bloque representado por las interacciones 19 hasta 22 que corresponden a los ensayos a 42°C y finalmente los picos de las interacciones 3 hasta 5, pertenecientes a los ensayos a 30°C.

Se han reportado diversos rangos de tiempo de extracción buscando obtener la mayor cantidad de la enzima galactosidasa. Montiel y col [16], y Ramírez y Rivas [18], reportaron que el mejor método de extracción de esta enzima se obtuvo con el empleo de tolueno al 2% v/v a 37°C en buffer fosfato 0,1 M pH 7, sin embargo, los tiempos empleados para dichos parámetros fueron de 20 y 16 horas, respectivamente. En un ensayo conducido para extraer proteínas intracelulares de *K. lactis* por Becerra y col. [4], los autores señalan que con el uso de 1% v/v de cloroformo, buffer fosfato 0,5 M y las condiciones de pH 9,5 a 37°C, la máxima actividad se alcanzó a las 3 horas, pero en este caso, el porcentaje de actividad resultó bajo en comparación con otros reportes, por lo que utilizando otros solventes los mejores resultados se lograron con metanol después de 21 horas y con etanol-butanol luego de 5 horas.

La FIG. 3 muestra la actividad específica en U β -gal/mg de proteínas. Se aprecia la gran diferencia que ubica a los ensayos llevados a cabo a 37°C como el punto óptimo del experimento con respecto a las otras dos temperaturas evaluadas y donde los picos representativos se ubicaron a pH 6,5 y que de forma general se mantuvieron por encima de los ensayos a 42°C, que representó el grupo más cercano y donde hubo una resaltada actividad del pH; su combinación con el pH 10 en los distintos tiempos de extracción reflejó valores muy por debajo de los ensayos realizados a 30°C, en donde el efecto del pH fue menos pronunciado.

Al aumentar la temperatura, la velocidad de reacciones catalizadas por enzimas, aumenta de forma análoga al de otras reacciones, hasta un cierto valor (temperatura óptima); en este ensayo éste valor estuvo representado por 37°C, donde se observó la actividad específica más alta obteniéndose 39,21 U β -Galactosidasa/mg de proteínas. Los resultados coinciden con los reportes de Rech y col. [19], que establecen esta temperatura como el punto de máxima actividad. Más allá de una temperatura crítica, la actividad de la enzima disminuye rápidamente, así cuando la energía térmica se hace lo suficientemente grande, como para romper enlaces próximos, la molécula entera se debilita y desorganiza (desnaturalización) [15]. Presumiblemente a 42°C, más el prolongado tiempo de exposición afectó la actividad de la enzima, independientemente de la cantidad extraída.

El análisis del comportamiento enzimático, después de valorar el efecto de la combinación de los tres factores, señaló que estuvo fundamentalmente influenciado por el pH al que se sometieron las levaduras, donde a pH 6,5 se evidencia la mayor actividad enzimática para todas las combinaciones y que representa igualmente el valor de pH óptimo reportado por Santos y col. [20], Ipsita y col. [11] en sus respectivos ensayos

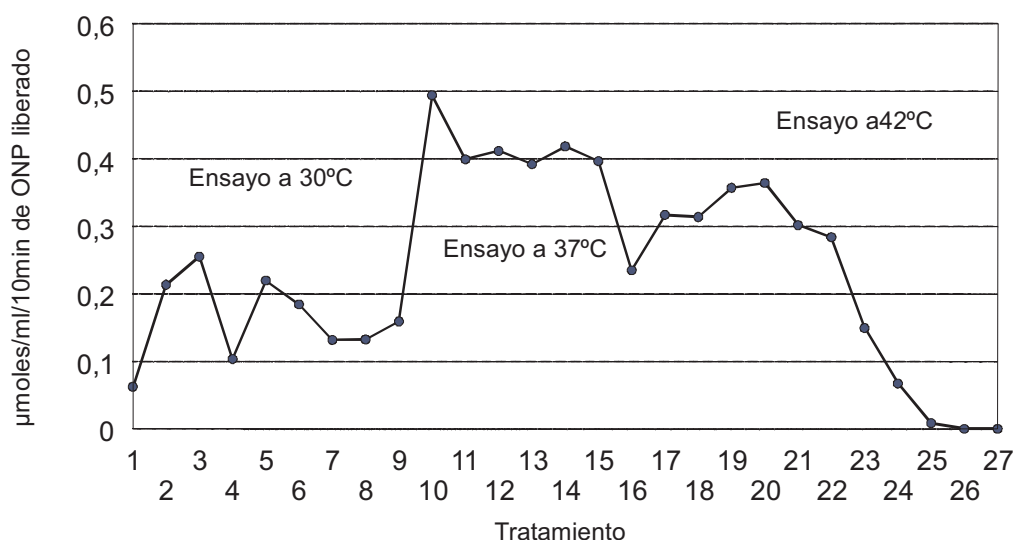


FIGURA 2. μmoles/mL/10min DE ONP LIBERADO vs. LOS NÚMEROS ASIGNADOS A LAS INTERACCIONES, MOSTRANDO EL COMPORTAMIENTO EN BLOQUE DE LOS ENSAYOS POR TEMPERATURA.

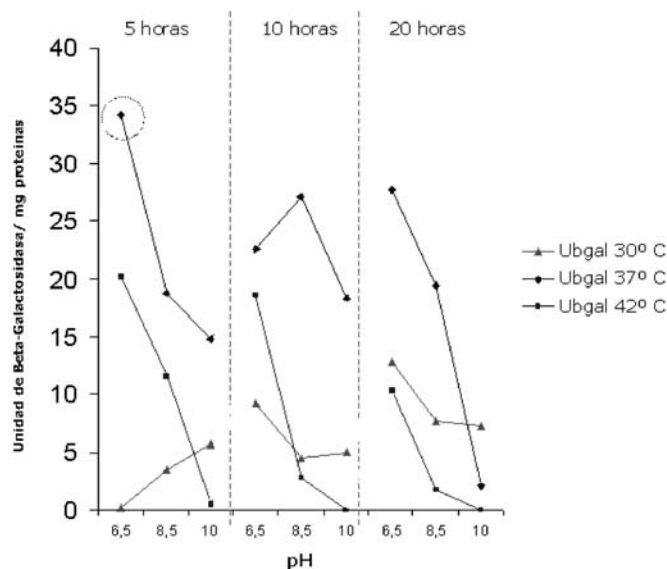


FIGURA 3. ACTIVIDAD ESPECÍFICA vs. EL pH, TEMPERATURA Y TIEMPO DE EXTRACCIÓN DE LA β-D-GALACTOSIDASA.

con Lactosym, lactasa comercial de *K. fragilis* y donde ambos señalan que el pH de la reacción afecta tanto a la V_{max} como a la K_m , ya que la velocidad de las reacciones que llevan consigo la catálisis ácido-base es dependiente de las concentraciones de las formas ácidas y básicas de los grupos en la enzima y el sustrato, dependiendo el equilibrio de la concentración de hidrogeniones (H^+) [15]. La conformación total de la molécula de enzima necesaria para la catálisis, depende entonces de la existencia de cargas electrostáticas, características bioquímicas que parecen distintas en cada tipo de lactasa según la cepa involucrada ya que las provenientes de mohos tienen pH óptimos entre 3,5-4,5 y las de levaduras entre 6 y 7 [20].

A pesar de que éstos parámetros fueron considerados en los cultivos en medios de crecimiento, los principios bioquímicos se aplican a la fase de extracción planteada en este trabajo, infiriendo así que los pH alcalinos han sido perjudiciales en la obtención de la enzima lactasa de *K. marxianus* ATCC 8554 así como las temperaturas por encima de los 37°C.

CONCLUSIONES

El método descrito resulta simple, efectivo y no costoso sin requerimiento de equipos sofisticados, sólo una centrifuga para remover las células de la solución enzimática.

Se establece un efecto permeabilizante del tolueno, ya que se obtuvo liberación de la lactasa sin ruptura celular.

Se concluye que una adecuada combinación de los parámetros: pH, temperatura y tiempo, bajo una adecuada concentración de sales de buffer, resulta en un acortamiento del tiempo requerido para la extracción de la lactasa de *K. marxianus* ATCC 8554 permeabilizadas con tolueno, reflejándose un tiempo óptimo de extracción para una máxima actividad enzimática sobre la hidrólisis de ONPG de 5 horas a 37°C y pH 6,5.

Se recomienda evaluar otras concentraciones de sales de buffer y velocidades de agitación, con ésta y otras cepas productoras de la enzima, a objeto de establecer la eficiencia de las mismas.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia, Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BACCI, M.; SIQUIERA, C.; ANTONIAZI, S.; VETA, J. Location of the galactosidase of the yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 10022. **Antoine Van Leeuwenhoek**. 69: 375-361. 1996.
- [2] BANDUI, S. **Química de los Alimentos**. Addison Wesley Longman de México (Eds.) 648 pp. 1999.
- [3] BECERRA, M.; DÍAZ, S.; CERDÁN, E.; GONZÁLEZ, M. Heterologous *Kluyveromyces lactis* β galactosidase Secretion Saccharomyces cerevisial super secreting mutnts. **Biotechnol. Letters** 23(1): 33-40. 2001.
- [4] BECERRA, M.; RODRÍGUEZ, E.; CERDÁN, M. Extraction of intracellular proteins from *Kluyveromyces lactis*. **Food Technol. Biotechnol** 39(2): 135-139. 2001.
- [5] CHAMPLUVIER, B.; KAMP, B.; ROUXHERT, P. Preparation and Properties of β galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces sp.* **Enzyme Microb. Technol** 10: 611-617. 1988.
- [6] FENTON, D. Solvent treatment for β D galactosidase release from Yeast cells. **Enzyme Microb. Technol.** 4: 229-232. 1982.
- [7] FIGUEROA, M. Relación entre la velocidad de consumo de azúcar y actividad específica de β galactosidasa de *K. fragilis*. En: Resumen del curso avanzado sobre procesos biotecnológicos. Instituto de Biotecnología UAM. 12-23/Octubre México. 60-74. pp. 1992.
- [8] GANEVA, V.; GALLUTZOR, B.; EYNARD, N.; TEISSIE, J. Electroinduce Extraction of β galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56 (3-4): 411-413. 2001,
- [9] GARCÍA, G.; QUINTERO, R.; LÓPEZ, M. **Biotecnología Alimentaria**. 1ª Ed. Limusa, México 636 pp. 1998.
- [10] HOYOUX, A.; JENNES, I.; DUBOIS, P.; GENICOT, S.; DUBAIL, F.; FRANCOIS, J.; BAISE, E.; FELLER, G.; GERDAY, C. Cold – Adapted β galactosidase from the Antarctic Psychrophile *Pseudoalteromas haloplanktis*. **Appl. And Environ. Microbiol.** 7(4): 1529-1535. 2001.
- [11] IPSITA, R.; MUNISHWAR, G. Lactose hidrolisis by Lactozymtm immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. **Process Biochem.** 39(1): 325-332. 2003.
- [12] JORDAO, R.; BRANDI, I.; LÓPEZ, F. Stabilization of the activity of β galactosidase in Permeabilizad Immobilized cells for Hydrolysis of Lactose in Milk. **J. Food Biochem.** 25(3): 257-267. 2001.
- [13] KULA, M.; SHACLTE, H. Purification of Protein and the Disruption of Microbial Cell. **Biotechnol. Progr.** 3: 31-42. 1987.
- [14] LOWRY, O.; ROSEGROUOH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275. 1951.
- [15] MATHEUS, K.; VAN HOLDE, K. **Bioquímica**. Edit McGraw Hill Interamericana, 2ª Ed. Madrid, España. 1283 pp. 1998.
- [16] MONTIEL, X.; CARRUYO, I.; FERRER, J. MARCANO, L.; MÁRMOL, Z.; PAEZ, G.; Producción de β D galactosidasa por *Kluyveromyces fragilis* en cultivo por carga con lactosuero como sustrato. **Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia** 23(2): 134-140. 2000.
- [17] PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β galactosidase activity in cultures of *Kuyveromyces marxianus* under incresed air Pressure. **Appl Microbiol.** 37 (6): 438-443. 2003
- [18] RAMÍREZ, A.; RIVAS, N. Producción y Caracterización Parcial de β galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche desproteinizado. **ALAN** 53 (2): 27-32. 2003.
- [19] RECH, R.; CASSINI, C.; SECCHI, A.; AYUB, M. Utilization of Protein-hydrolyzed cheese whey for production of β galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **J. Indust. Microbiol. Biotechnol** 23: 91-96. 1999.
- [20] SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA, F. Kinetic Modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzime and Microbiol. Technol.** 22: 558-567.1998
- [21] SCHENEIDER, A; MERKLE, R.; CARVALHO, M.; JONAS, R.; BURLAN, S. Oxygen tranfer on β galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* using Sugar Cane molasses as Carbon Source. **Biotechnol. Letters.** 23 (7):547-550. 2001.
- [22] ZHOU, Q.; CHEN, X.; LI, X. Kinetics of lactose hydrolysis by β galactosidase of *Kluyveromyces lactis* immobilized on cotton fabric. **Biotechnol. and Bioenginn.** 81 (2): 127-133. 2003.