

Effect of lactose concentration on the grow kinetics of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* and production of β -D-galactosidase (E.C. 3.2.1.23)

Karelen Araujo, Gisela Páez, Zulay Mármol, José Ferrer, Eduardo Ramones, Cateryna Aiello Mazzarri y Marisela Rincón

Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela de Ingeniería Química,
Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo 1001-A, Venezuela.
karaujo@luz.edu.ve

Abstract

The effect of lactose concentration on the kinetics of growth of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 and production of enzyme β -D-galactosidase in cheese whey previously deproteinized was studied. The assays were carried out to lactose concentrations of 4.72%, 8.5%, 12.6% and to pH of 5 and temperature of 35°C, in a bioreactor Bioflo 4000 with a volume work of 3 liters. The enzymatic activity was determined evaluating hydrolysis of o-nitrophenil- β -D-galactopiranoside (ONPG) and the extraction of the enzyme from the cell was realized through ultrasound treatment. The maximum activity, $384.42 \pm 13.11 \mu\text{mol ONP/L/5minutos}$ was obtained in the non concentrated cheese whey (4.72%). The greater concentration of biomass and the highest specific speeds of growth were obtained in the non concentrated cheese whey (4.72%), and were $19.68 \pm 0.004 \text{ kg/m}^3$ and $0.29 \text{ h}^{-1} \pm 0,006$ respectively. The results showed a decrease in enzyme activity at high concentration of lactose, despite the fact that this carbohydrate is normally used for induction of β -D-galactosidase activity.

Key words: Lactose, β -D-galactosidase, grow kinetics of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*

Efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* y la producción de β -D-galactosidasa (E.C. 3.2.1.23)

Resumen

Se estudió el efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 y la producción de la enzima β -D-galactosidasa en lactosuero previamente desproteinizado. Se llevaron a cabo 3 bioprocesos por triplicado a diferentes concentraciones de lactosa (4,72%; 8,50% y 12,60%), pH de 5 y temperatura de 35°C en un biorreactor Bioflo 4000 con un volumen de trabajo de 3 litros. La actividad enzimática se determinó evaluando la hidrólisis del o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) y la extracción de la enzima de las células se realizó a través de la técnica de ultrasonido. La mayor concentración de biomasa y las más altas velocidades específicas de crecimiento se obtuvieron en el suero sin concentrar (4,72%) siendo de $19,68 \pm 0,004 \text{ kg/m}^3$ y $0,29 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$ respectivamente. La máxima actividad se obtuvo en el suero sin concentrar (4,72%) y fue $384,42 \pm 13,11 \mu\text{moles de ONP/L/5minutos}$. Los resultados demostraron una disminución en la actividad de la enzima a

elevadas concentraciones de lactosa, a pesar de que este carbohidrato es normalmente utilizado para inducir la β -D-galactosidasa.

Palabras clave: Lactosa, β -D-galactosidasa, cinética de crecimiento *Kluyveromyces marxianus*.

Introducción

La enzima β -D-galactosidasa, también llamada lactasa (E.C. 3.2.1.23) es ampliamente utilizada en la industria láctea para la hidrólisis de la molécula de lactosa en sus correspondientes monosacáridos, glucosa y galactosa. Esto permite la preparación de diversos productos lácteos, especialmente para el consumo por individuos intolerantes al disacárido. La hidrólisis de la lactosa modifica sus propiedades funcionales y previene la cristalización, aumentando la vida útil de los productos lácteos así como la disponibilidad de azúcares fácilmente fermentables [1].

La hidrólisis enzimática de la lactosa utilizando suero de leche como medio de cultivo permite el aprovechamiento de este abundante subproducto de la industria láctea, el cual se produce en Venezuela en grandes cantidades 835.370.739 kg/año [2] y se ha convertido en un problema de contaminación ambiental debido a que generalmente es descargado en cuerpos de agua [3]. Por tal motivo, es conveniente tratar el suero mediante técnicas que permitan la separación y/o concentración de sus componentes más valiosos: lactosa y proteínas. La ultrafiltración y la nanofiltración son tecnologías de membranas adecuadas para ello. Estas técnicas son relativamente económicas si se comparan con otros procesos que utilizan membranas para separar las fases de los fluidos, como la ósmosis inversa [4].

La bioconversión de la lactosa del suero de leche en proteína unicelular, etanol o enzimas reduce en más del 75% la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) que exhibe el suero de leche [5]. El lactosuero desproteínizado puede utilizarse como medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos capaces de generar productos de utilidad. La enzima β -D-galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 es una enzima intracelular inducible por carbohidratos como la lactosa [1]. Además, posee estatus GRAS, es decir, se considera segura para su aplicación en la industria alimenticia [6].

El pH, la temperatura, las condiciones de crecimiento, la calidad y la cantidad de sustrato influyen significativamente sobre la tasa específica de crecimiento de la levadura y en la actividad enzimática de la β -D-galactosidasa. Estudios realizados por Montiel y col. [7] y por Barberis S; Segovia R [1] han determinado las condiciones de pH y temperatura para optimizar la producción de esta enzima a partir de la levadura *Kluyveromyces marxianus*, aunque no han reflejado el efecto inductor de la lactosa en organismos con células eucariotas como las levaduras.

El objetivo principal del trabajo es determinar el efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de crecimiento del microorganismo y la producción de β -D-galactosidasa en cultivo por carga utilizando suero de leche.

Metodología Experimental

Microorganismo

Se utilizó la levadura *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA). La levadura se cultivó una vez por semana en tubos de cultivo de 25 x 150 mm con medio agar YM (Merck, Darmstadt, Alemania) en forma de cuña. Los tubos se incubaron aeróbicamente, durante un lapso de 3 días a 28°C y luego se almacenaron bajo refrigeración a 4°C [7].

Caracterización del suero de leche

El porcentaje de nitrógeno se determinó por el método de KJELDAHL y el porcentaje de proteínas se obtuvo multiplicando el porcentaje de nitrógeno por 6,38 [8]. La concentración de lactosa se obtuvo mediante el método de Dubois y col. [9]. El pH se obtuvo utilizando un potenciómetro Metrohm modelo 744 (Suiza).

Medio de cultivo

Se utilizó como medio de cultivo suero de leche (pH 6,43), proveniente de la producción de

queso prensado en la empresa Venelácteos, ubicada en el sector Santa Rosa de Agua en Maracaibo, Estado Zulia.

Preparación del medio de cultivo

El suero se filtró para separar los grumos de grasa en suspensión y los restos de caseína y evitar la obstrucción de los orificios de los platos y los canales de salida de la desnatadora durante el proceso de centrifugación, empleando una malla de dril con poros de 0,1 mm de diámetro. Luego, el suero se centrifugó en una desnatadora WETSFALIA tipo MTA-500-104 con una velocidad máxima de 9.000 rpm, para separar la grasa remanente en el suero. Posteriormente, el suero fue sometido a un proceso de ultrafiltración tangencial (FILMTEC FT 30, DOW CHEMICAL COMPANY) para separar las proteínas del suero mediante su paso a través de una membrana porosa con una capa interna de polisulfona con microporos, una capa de poliamida y una de poliéster como refuerzo en el tope de la superficie de la membrana. Este proceso se realizó a temperaturas por debajo de 30°C y a una presión de 310,26 kPa [4]. Se obtuvieron dos corrientes de salida, una corriente proteica que se hizo recircular para retirar la mayor cantidad de proteína posible y otra corriente rica en lactosa y pobre en proteínas, la cual fue utilizada para los procesos de fermentación. Después de la ultrafiltración, se aplicó el tratamiento termoácido, para lo cual se ajustó el pH del suero a 4,5 con HCl (6N), se calentó a 90°C por 10 minutos [7] y después se dejó enfriar hasta una temperatura por debajo de 35°C para someterlo nuevamente al proceso de ultrafiltración y de esta forma garantizar una eficiente desproteínización. Una vez desproteínizado, se apartó un volumen suficiente (10 litros) para realizar la fermentación de suero fresco (4,76% de lactosa). Se utilizaron 90 litros de suero desproteínizado para obtener las concentraciones deseadas de lactosa (8,5%: nanofiltrado 1 y 12,6%: nanofiltrado 2), el cual se pasó por la membrana de nanofiltración, utilizando un módulo con membrana de poliamida (4040-TS40-TSA, TRISEP CORPORATION) donde se separaron las sales y se obtuvo un recirculado concentrado en lactosa. La temperatura de operación fue 30°C y la presión de operación 1120,40 kPa. Finalmente se procedió a filtrar con papel filtro

WHATMAN N° 42 (Meidstone, Inglaterra) en un embudo de porcelana y se almacenó bajo refrigeración (4°C-10°C).

Preparación del inóculo

El inóculo se preparó añadiendo a 100 mL de medio el contenido de una cuña de microorganismo activado (10 mL). Posteriormente se incubó a 30°C y 200 rpm durante 8 horas en una incubadora INNOVA 4300 New Brunswick Scientific (New Jersey, USA) [10]. Se determinó la absorbancia del inóculo con un espectrofotómetro VARIAN UV-50-10 (Victoria, Australia) a una longitud de onda de 650 nm y se realizó un recuento directo de células para estandarizar la concentración de biomasa inicial, empleando un microscopio Will-Wetzlar GmbH D 6330 Wetzlar 21 (Netzstecker, Alemania) y la cámara de Neubauer Propper (Long Island City, NY, USA). El volumen del inóculo correspondió al 10% del volumen total de trabajo para la fermentación. La cantidad de células/mL en promedio fue $1,785 \times 10^8$, y la absorbancia $0,937 \pm 0,111$.

Proceso de fermentación

Se realizaron 3 cultivos por carga, cada uno por triplicado, a pH de 5 y temperatura de 35°C y a diferentes concentraciones de lactosa: 4,76%; 8,50% y 12,6%. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 150 rpm en un bioreactor Bioflo 4000 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA). El pH se controló automáticamente a través de la consola de control del bioreactor con adición de HCl 6N y NaOH 10N. El suero se suplementó con extracto de levadura 0,75% (Merck), sulfato de amonio 0,84% (Merck) y sulfato de magnesio 0,05% (Merck) [7]. Finalmente, se esterilizó en un autoclave Felisa (Ciudad de México, DF, México) a 115°C por 20 minutos. Las condiciones de pH, temperatura y agitación se mantuvieron constantes durante las 16 horas de fermentación.

Análisis de las muestras

Durante el periodo de fermentación, se tomaron muestras cada hora y se le realizaron los siguientes análisis:

Densidad celular: la concentración de biomasa (kg/m^3) se determinó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro VARIAN

UV-50-W a una longitud de onda de 650 nm. Se relacionó la absorbancia con el peso de la biomasa por unidad de volumen a través de una curva de calibración construida previamente [11]. Se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ), el rendimiento (Y), el cociente metabólico (q) y la constante de saturación (Ks) para cada una de las condiciones estudiadas.

Concentración de lactosa: la concentración de lactosa se determinó empleando el método de Dubois y col. [9].

Actividad enzimática: la actividad de la enzima se determinó sobre el sustrato cromogénico ONPG Sigma (St. Louis, Missouri). En cada tiempo, la biomasa obtenida por centrifugación a 8.000 rpm por 15 minutos se resuspendió en buffer fosfato (pH:6,6) 0,1 M y se sometió a un tratamiento con ultrasonido por 30 minutos en un baño a 4°C. La actividad sobre el ONPG se determinó al incubar 0,1 mL de extracto libre de células con 0,1 mL de ONPG 0,015 M y diluidos hasta 3 mL con buffer a 37°C por 5 minutos, posteriormente se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 410 nm y se obtuvo la cantidad de ONP liberado a través de una curva de calibración elaborada previamente. La actividad se expresó en μ moles ONP/L/5min y representa la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de ONP al incubar a 37°C durante 5 minutos [12].

Análisis estadístico

Se aplicó una prueba *F* de análisis de varianza (ANOVA) para establecer el efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de la

fermentación de la levadura *K. marxianus*, con un nivel de significación de $\alpha = 0,05$. Con el objetivo de determinar si existe o no diferencia significativa entre las parejas de medias de los tratamientos, se utilizó el método de la mínima diferencia significativa (LDS) [13].

Resultados y Discusión

En las Tablas 1 y 2 se presenta la composición del suero de leche fresco, ultrafiltrado y nanofiltrado. Los valores de pH ($6,43 \pm 0,21$) y concentración de lactosa ($4,76\% \pm 0,04$), coinciden con los valores reportados para suero dulce por Badui [14]. El suero ultrafiltrado, presentó una concentración de lactosa mayor que el suero fresco ($6,41\% \pm 0,05$), mientras que la cantidad de nitrógeno y proteínas se redujo notoriamente, evidenciando la eficiencia de los procesos de desproteínización aplicados.

En la Tabla 2 se presenta la caracterización del suero nanofiltrado, los valores obtenidos son muy similares en relación al contenido de nitrógeno y proteínas, a excepción de la concentración de lactosa que fue de $8,50\% \pm 0,02$ y de $12,6\% \pm 0,01$, indicando la eficiencia de la membrana de nanofiltración.

La Figura 1 muestra el crecimiento de la *K.marxianus* a diferentes concentraciones de lactosa. La máxima cantidad de biomasa obtenida ($19,68 \pm 0,004 \text{ kg/m}^3$) en las fermentaciones con el suero sin concentrar ($4,72\%$) supera el valor reportado por Montiel y col. (7 kg/m^3) [7]. Por otro lado, los resultados coinciden con los obtenidos

Tabla 1
Caracterización del suero de leche sin concentrar

	pH	Lactosa (%)	Nitrógeno (%)	Proteínas (%)
Fresco	$6,43 \pm 0,21$	$4,76 \pm 0,04$	$0,09 \pm 0,03$	$0,57 \pm 0,09$
Ultrafiltrado	$4,72 \pm 0,12$	$6,41 \pm 0,05$	$0,04 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,03$

Tabla 2
Caracterización del suero de leche concentrado en lactosa

	pH	Lactosa (%)	Nitrógeno (%)	Proteínas (%)
Nanofiltrado 1	$5,23 \pm 0,15$	$8,50 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,16$	$0,23 \pm 0,16$
Nanofiltrado 2	$5,20 \pm 0,13$	$12,60 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,16$	$0,25 \pm 0,20$

por Espinel y Montiel [15] y por Sanchez y Castillo [16] quienes estudiaron el efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento de la *K. marxianus*, estableciendo valores óptimos de pH entre 4,5 y 5,7 y la temperatura optima en 35°C. Se observa que el crecimiento fue más lento cuando se utilizó suero concentrado (8,5% y 12,6%). Esto puede indicar que a altas concentraciones de lactosa, las células tienen menor capacidad de asimilar esta fuente de carbono probablemente por la alteración del sistema lactosa-permeasa, el cual se encarga de facilitar el transporte de la lactosa al interior de la célula [17].

La Tabla 3 muestra los valores obtenidos para la velocidad específica de crecimiento, el rendimiento en biomasa, el cociente metabólico y la constante de saturación de sustrato para las condiciones del estudio. Se observa que la mayor

velocidad (μ) ($0,29 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$) se obtiene en el suero sin concentrar, siendo superior al encontrado por Quintero y col. [10] ($0,23 \text{ h}^{-1}$), quienes trabajaron con una temperatura de 29°C y sin control de pH. El resultado obtenido coincide con el reportado por Montiel y col. [7] ($0,29 \text{ h}^{-1}$) quienes emplearon 30°C y pH de 5. Del análisis de varianza, se obtuvo que el porcentaje de lactosa afectó significativamente ($\alpha = 0,05$) las velocidades específicas de crecimiento de la *K. marxianus*. De acuerdo con la prueba de comparación de parejas de medias de tratamientos (LDS), la velocidad específica de crecimiento en el suero sin concentrar fue significativamente diferente ($\alpha = 0,05$) a las obtenidas en el suero concentrado, las cuales no presentan entre sí diferencia significativa.

Se observó que el rendimiento (Y) disminuyó cuando se incrementó la concentración de lac-

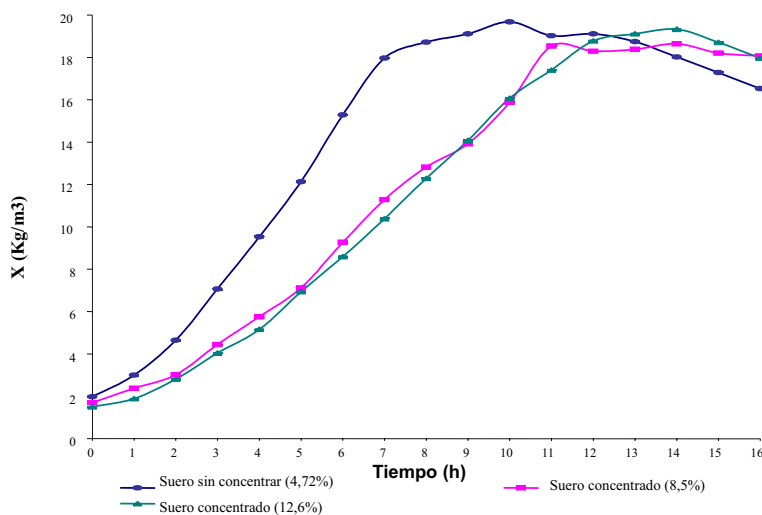


Figura 1. Crecimiento de la *K.marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 a diferentes concentraciones de lactosa.

Tabla 3

Valores promedios de Velocidad Específica de Crecimiento (μ), Rendimiento (Y), Cociente Metabólico (q) y Constante de Saturación de Sustrato (Ks) a diferentes concentraciones de lactosa

Lactosa (%)	μ (h^{-1})	Y (kg Biomasa/kg lactosa)	q (h^{-1})	Ks ($\text{m}^3/\text{kg h}$)
4,72	$0,29^a \pm 0,01$	$0,36^a \pm 0,04$	$1,04^a \pm 0,28$	$0,04^a \pm 0,08$
8,50	$0,22^b \pm 0,01$	$0,32^b \pm 0,01$	$0,42^b \pm 0,14$	$0,01^b \pm 0,02$
12,60	$0,22^b \pm 0,02$	$0,31^b \pm 0,03$	$0,48^b \pm 0,19$	$0,01^b \pm 0,04$

Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha = 0,05$).

tosa. El mayor rendimiento se obtuvo en el suero sin concentrar ($0,362 \pm 0,043$ kg de biomasa/kg de sustrato). De la prueba de comparación de medias de tratamientos (LDS) se determinó que existen diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) entre los rendimientos del suero sin concentrar y el suero concentrado. Estos resultados coinciden como lo reportado por Castillo [18], quien encontró que los rendimientos decaen por debajo del 40% en suero con concentración de lactosa mayor al 6%. Ozilgen y col. [11], reportan que el rendimiento del microorganismo puede disminuir con el incremento de la concentración de sustrato, debido a subproductos del metabolismo o intermediarios en la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa, el cual, sería mayor si hay una conversión completa de sustrato.

En la Figura 2 se muestra como el contenido de lactosa del medio disminuye en función del tiempo. Para el suero sin concentrar (4,72%) se consumió el 100% de sustrato, resultado que coincide con Espinel y Montiel [15], mientras que para el concentrado con 8,5% y 12,6% de lactosa se consumió el 73,17% y 59,60%, respectivamente.

Del análisis de varianza y la prueba de comparación de media LDS aplicado se determinó que la concentración de lactosa afecta significativamente el cociente metabólico (q) y que existen diferencias significativas entre los ensayos con 4,72% y 8,50% de lactosa y entre 4,72% y 12,60%. El suero sin concentrar (4,72%) produce

un cociente metabólico de manera significativamente mayor que el resto de las concentraciones estudiadas.

En la Figura 3 se muestra el comportamiento de la actividad enzimática en función de la concentración de lactosa. En todos los casos se produce un aumento de la actividad enzimática a medida que transcurre el crecimiento hasta alcanzar la fase estacionaria. La mayor producción de la enzima β -D-galactosidasa se obtuvo con suero sin concentrar ($384,42 \pm 13,11$ μ moles ONP/L/5min), la cual se alcanzó a la hora 11, posteriormente se observó una disminución en la actividad enzimática que correspondió con la disminución en el crecimiento del microorganismo.

En el lactosuero concentrado al 8,50% y al 12,60%, la mayor actividad enzimática que se obtuvo fue de $186,53 \pm 5,46$ y de $168,20 \pm 10,47$ μ moles ONP/L/5min, respectivamente. Del análisis estadístico se infiere que la concentración de lactosa en el medio afecta significativamente la actividad enzimática. Al aplicar la prueba de comparación de medias de la mínima diferencia significativa (LDS), se consiguieron diferencias significativas entre el suero sin concentrar y el concentrado, tal como se observa en la Tabla 4.

Por otra parte, también se puede observar que la actividad enzimática disminuye en el suero concentrado. Estos resultados son consistentes con los mencionados por Brunezka y col. [19], quienes demostraron que la actividad de la enzi-

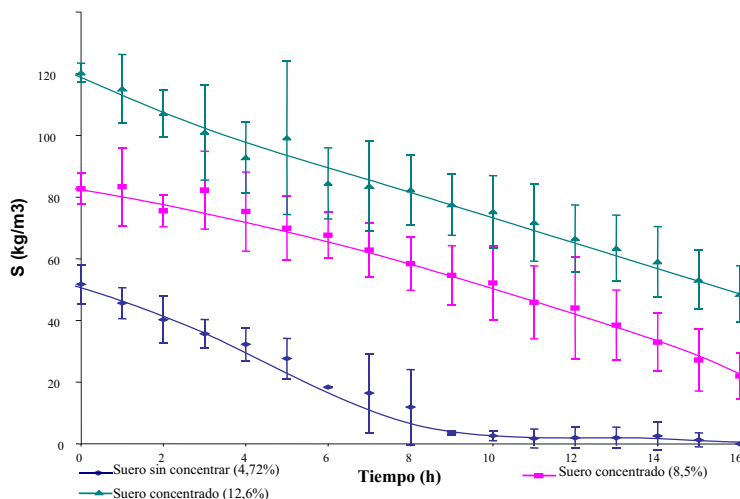


Figura 2. Lactosa remanente en el medio de cultivo durante el bioproceso a pH 5 y temperatura de 35°C (± 1 desviación estándar).

Tabla 4
Valores máximos de la actividad enzimática

Lactosa (%)	Actividad Enzimática ($\mu\text{moles ONP/L/5min}$)
4,72	$384,42^a \pm 13,11$
8,50	$186,53^b \pm 5,46$
12,60	$168,20^b \pm 10,47$

Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha = 0,05$).

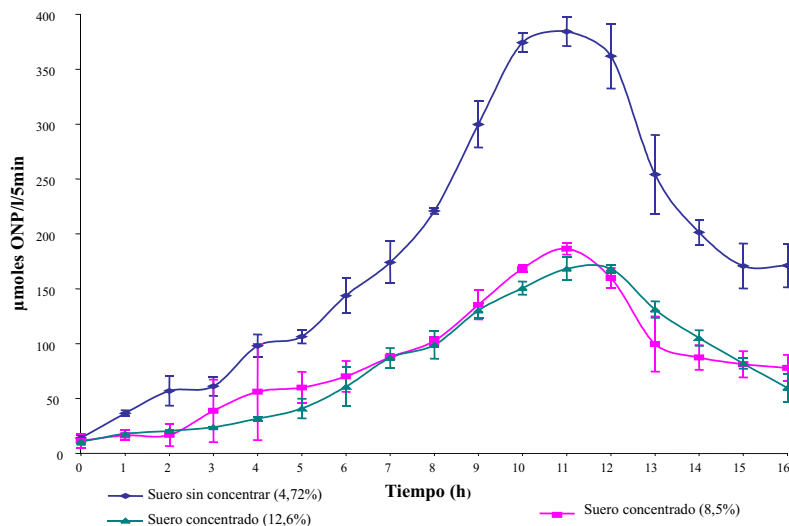


Figura 3. Efecto de la concentración de lactosa sobre la actividad enzimática de la β -D-galactosidasa.

ma decrece durante el cultivo a altas concentraciones de lactosa o galactosa, obteniendo una máxima inducción del carbohidrato a la hora 4 del estudio. Aunque la síntesis de la β -D-galactosidasa es inducida por lactosa y galactosa [5] los resultados sugieren que cuando las células de la *K. marxianus* son cultivadas a elevadas concentraciones de lactosa se impone un mecanismo de represión catabólica al efecto inductor del sustrato, debido a la acumulación de metabolitos intermedios de la glucólisis [19].

Las levaduras del género *Kluyveromyces*, poseen un sistema lactosa-permeasa [20]. El transporte de lactosa al interior de la célula constituye una etapa limitante en la velocidad de hidrólisis del disacárido [17]. Tratamientos con agentes tensoactivos que afecten la permeabilidad de la membrana celular a la lactosa, podrían incrementar la producción de la enzima [21]. Además, la galactosa liberada mediante el proce-

so de hidrólisis actúa como inhibidor competitivo de la β -D-galactosidasa. Esta inhibición se incrementa durante el curso de la hidrólisis y reduce la actividad enzimática, ya que la galactosa ocupa el sitio activo de la enzima evitando que la lactosa se una al mismo [22].

Los datos experimentales de la producción de la enzima β -D-galactosidasa, se ajustan al modelo de formación de producto asociado al crecimiento, $dP/dt = \alpha\mu X$ [23]. En la Figura 4 se presenta el ajuste al modelo y las pendientes de las rectas permiten calcular la constante estequiométrica α y además plantear las ecuaciones de los modelos que se observan en la Tabla 5.

En la Tabla 6 se muestra los parámetros analíticos: límite de detección (LDD), rango lineal y factor de correlación (R^2) referentes a las curvas de calibración para la determinación de las concentraciones de biomasa, lactosa y actividad enzimática.

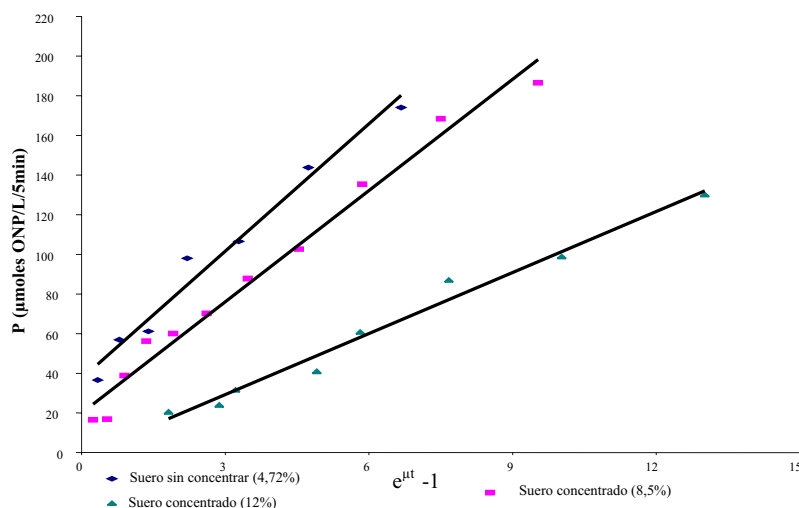


Figura 4. Ajuste del modelo de formación de producto asociado al crecimiento.

Tabla 5
Modelos de la formación de α -D-galactosidasa asociados al crecimiento

Lactosa (%)	Modelo	R ²
4,72	$P = 10,81 X_0 (e^{\mu t} - 1)$	0,98
8,50	$P = 8,99 X_0 (e^{\mu t} - 1)$	0,98
12,60	$P = 6,80 (e^{\mu t} - 1)$	0,98

Tabla 6
Parámetros analíticos de las curvas de calibración: biomasa, lactosa y actividad enzimática

	LDD	Rango Lineal	R ²
Biomasa (Kg/m ³)	0,53	1,87-20,68	0,99
Lactosa (Kg/m ³)	4,77	10-70	0,99
Actividad enzimática (μmoles ONP/L/5min)	42,87	50-500	0,98

LDD (3σ).

Conclusiones

La concentración de lactosa en el medio de crecimiento de la levadura *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, afecta significativamente ($\alpha = 0,05$) la producción de la enzima α -D-galactosidasa y los parámetros de crecimiento celular.

Los máximos valores de los parámetros cinéticos (μ , Y, q y Ks) se obtienen mediante el culti-

vo de la levadura *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* en lactosuero con una concentración de lactosa de 4,72%.

La mayor producción de la enzima α -D-galactosidasa por el microorganismo *Kluyveromyces marxianus* se obtiene utilizando el suero sin concentrar, hecho evidenciado por el modelo de formación del producto asociado al crecimiento.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento que permitió el desarrollo de esta investigación. (CC-068704).

Referencias Bibliográficas

1. Barberis S., Segovia R.: "Maximun volumetric production of α -galactosidase by *Kluyveromyces fragilis*". J. Chem. Tech. Biotech., Vol.77, (2002) 706-710.
2. Montiel X., Carruyo I., Marcano L. y Mavárez M. "Optimización del proceso de extracción de la lactasa de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8554, para su aplicabilidad en la industria láctea". Revista Científica, FCV-LUZ, Vol XV, No 5 (2005) 476-482.
3. Anuario Estadístico de Venezuela, 2003.
4. Muñi A., Paez G., Faría J., Ferrer J. y Ramones E. "Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero". Revista Científica, FCV. LUZ, Vol XV, No 4 (2005) 361-367.
5. González Sisso, M. "The biotechnological utilization of cheese whey: a review". Bioresource Technol., Vol. 57, (1996) 1-11.
6. Santos A., Ladero M., García F. "Kinetic modeling of lactose hydrolysis by α -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*". J. Enzyme Microbiol. Technol. Vol. 22, No 7. (1998) 558-567.
7. Montiel, X; Carruyo, I; Ferrer, J; Marcano, L; Mármol, Z y Paez, G. "Producción de α -D-galactosidasa por *Kluyveromyces fragilis* en cultivo por carga, con lactosuero como sustrato". Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia, Vol. 23, No 2 (2000) 134-140.
8. AOAC. Official Methods of Analysis 15th Edition. Arlington. 1990.
9. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. y Smith, F. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". Anal. Chem., Vol. 28, No 3, (1956) 350-356.
10. Quintero H., Rodríguez M., Páez G., Mármol Z. y Rincón M. "Producción de proteína unicelular (*Kluyveromyces fragilis*) a partir de suero de leche". Revista Científica, FCV-LUZ, Vol. IX, No 2 (2001) 87-94.
11. Özilgen M., Ollis D. F. y Ogrydziak D. "Kinetic of batch fermentations with *Kluyveromyces fragilis*". J. Enzyme Microbiol. Technol., Vol. 10, (1998) 165-172.
12. Mahoney R. y Whikerson, T. "Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum productions of lactose from *Kluyveromyces fragilis*". J. Dairy Sci., Vol 58, (1975) 1620-1629
13. Montgomery D. C. "Design and Analysis of Experiments". Editorial John Wiley & Sons, NY, USA, 1997.
14. Badui Salvador. "Química de los Alimentos". Editorial Pearson Education, Mexico, 1999.
15. Espinel K. y Montiel J. "Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la *Kluyveromyces fragilis* y la producción de α -galactosidasa". Trabajo especial de grado. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela (2003). 64 pp.
16. Sánchez S. y Castillo F. "Effect of pH on the growth of *Kluyveromyces fragilis* on desproteinized whey. Acta Cient. Venezolana". Vol. 31. (1998) 165-172.
17. Joshi M.S., Gowda L. R y Bhat S.G. "Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by cetyltrimethylammonium bromide". Biotechnol. Lett. Vol. 9, (1987) 549-554.
18. Castillo F.J. "Lactose metabolism by yeast. Interest Biotechnology and Biocatalysis". Eitorial Marcel Dekker, New York, 1990.
19. Brunezka D., De Souza C., Ardaillon D. y Morais M. "The α -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decrease by high concentrations of galactose". J. Current Microbiol., Vol. 44 No 5, (2002).
20. Dickson, R. C y Barr, K. Characterization of lactase transport in *Kluyveromyces lactis*. J. Bacteriol., 154, 1245-1251. 1983.
21. Declaire M., De Cat W. y Van Huyn N. "Comparison of various permeabilization treat-

- ments on *Kluyveromyces* by determining in situ β -galactosidase activity". Enzyme Microbiol. Technol., Vol. 9, (1987) 300-302.
22. Woychik J. H y Wondolowski M. V. "Lactose hydrolysis in milk and milk products by bound fungal beta-galactosidase". J. Milk Food Technol. Vol. 30 (1973) 31-33.
23. Shuler M. y Kargi F. "Bioprocess engineering. Basic concepts". Editorial Prentice Hall, New Jersey, 2001.

Recibido el 11 de Septiembre de 2006

En forma revisada el 26 de Febrero de 2007