
Extracción de la β -D-galactosidasa de Kluyveromyces marxianus var. marxianus ATCC 8554 en lactosuero diluido

Araujo Karelén*, Chávez Ángel, Chávez Sujaila, Páez Gisela, Mármol Zulay, Rincón Marisela
Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería,
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. Apartado 526. Maracaibo 1001-A

Extraction the β -D-galactosidase from Kluyveromyces marxianus var. marxianus ATCC 8554 in diluted whey

Extracció de la β -D-galactosidasa de Kluyveromyces marxianus var. marxianus ATCC 8554 en lactosèrum diluït

Recibido: 28 de octubre de 2009; revisado: 5 de marzo de 2010; aceptado: 16 de marzo de 2010

RESUMEN

Se evaluó el efecto del uso de solventes orgánicos y de ultrasonidos en la extracción de la β -D-galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 en cultivo por carga en lactosuero diluido. Los bioprocesos se realizaron por triplicado con una concentración de lactosa de 2,695 %, a pH 5,0, temperatura de 35°C y una velocidad de agitación de 200 rpm en un Bioreactor Bioflo 4000 New Brunswick Scientific con volumen de trabajo de 3 litros y controles automáticos de temperatura, pH y velocidad de agitación. Se caracterizó el lactosuero, determinando su contenido de lactosa, nitrógeno, proteínas, pH, fósforo, cenizas y humedad. Se midió la concentración de biomasa en el medio de cultivo por medición de la densidad óptica a 650 nm y la cantidad de lactosa mediante el método de Dubois y col. La actividad enzimática se determinó en extractos libres de células, evaluando la hidrólisis del *orto*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) y la extracción de la enzima de las células se realizó a través de la técnica de los ultrasonidos y de solventes orgánicos (tolueno y cloroformo). Se determinó la cantidad de proteínas totales por el método de Lowry, que permitió la valoración de la actividad específica. La mayor concentración de biomasa fue de $15,696 \pm 0,152$ Kg/m³. Los resultados de tasa específica de crecimiento (μ) y rendimiento (γ) fueron $0,261 \pm 0,003$ h⁻¹ y $0,616 \pm 0,009$ Kg de biomasa/Kg de sustrato, respectivamente. El sustrato se consumió totalmente. La máxima actividad específica fue $15,564 \pm 0,318$ U β -gal/mg de proteínas.

Palabras clave: lactosuero, *Kluyveromyces marxianus*, β -D-galactosidasa, ultrasonidos disolventes orgánicos

SUMMARY

There was evaluated the effect of the use of organic solvents and ultrasound in the extraction of the β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 in growing burden on diluted whey. The bioprocesses were performed in triplicate with a lactose concentration of 2,695 %, at pH 5,0, temperature of 35 °C and a speed of agitation of 200 rpm in a Bioreactor Bioflo 4000 New Brunswick Scientific workload with 3 liter and automatic controls of temperature, pH and speed of agitation. Whey was characterized, determining their lactose content, nitrogen, protein, pH, phosphorus, ash and dampness. Biomass concentration was measured in the culture medium by measuring the optical density at 650 nm and the amount of lactose by the method of Dubois et al. The enzyme activity was determined in cell-free extracts, evaluating hydrolysis of *orto*-nitrophenil β -D-galactopiranoside (ONPG) and the extraction of the enzyme cells was performed using the technique of ultrasound and organic solvents (toluene and chloroform). It was determined the amount of total protein by the method of Lowry, enabling the measurement of the specific activity. The largest concentration of biomass was 15.696 ± 0.152 Kg/m³. The results of specific growth rate (μ) and performance were 0.261 ± 0.003 h⁻¹ and 0.616 ± 0.009 kg biomass/kg substrate, respectively. The substrate was totally consumed. The highest specific activity was 15.564 ± 0.318 U β -gal/mg proteins.

Keywords: whey, *Kluyveromyces marxianus*, β -D-galactosidase, ultrasound, organic solvents

*Autor de correspondencia: karelenaraujo@gmail.com

RESUM

S'avalua l'efecte de l'ús de solvents orgànics i d'ultrasons en l'extracció de la β -D-galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 en cultiu per càrrega en lactosèrum diluït. Els bioprocessos es realitzen per triplicat amb una concentració de lactosa de 2,695 %, a pH 5,0, temperatura de 35°C i una velocitat d'agitació de 200 rpm en un Bioreactor Bioflo 4000 New Brunswick Scientific amb volum de treball de 3 litres i controls automàtics de temperatura, pH i velocitat d'agitació. Es caracteritza el lactosèrum, determinant el seu contingut de lactosa, nitrogen, proteïnes, pH, fòsfor, cendres i humitat. Es mesura la concentració de biomassa en el medi de cultiu per medició de la densitat òptica a 650 nm, i la quantitat de lactosa mitjançant el mètode de Dubois i col. L'activitat enzimàtica es determina en extractes lliures de cèl·lules, avaluant la hidròlisi de l'orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosid (ONPG), i l'extracció de l'enzim de les cèl·lules es realitza emprant la tècnica dels ultrasons i amb solvents orgànics (toluè i cloroform). Es determina la quantitat de proteïnes totals pel mètode de Lowry, que permet la valoració de l'activitat específica. La major concentració de biomassa és de 15,696 \pm 0,152 Kg/m³. Els resultats de taxa específica de creixement (μ) i rendiment (γ) són 0,261 \pm 0,003 h⁻¹ i 0,616 \pm 0,009 Kg de biomassa/Kg de substrat, respectivament. El substrat es consumeix totalment. La màxima activitat específica és 15,564 \pm 0,318 U β -gal/mg de proteïnes.

Mots clau: lactosèrum, *Kluyveromyces marxianus*, β -D-galactosidasa, ultrasons, dissolvents orgànics

INTRODUCCIÓ

La β -D-galactosidasa (EC.3.2.1.23) o lactasa, es una enzima que ha despertado gran interés biotecnológico ya que es ampliamente utilizada en la industria de alimentos en la elaboración de productos para sectores de la población que no toleran la lactosa, debido a que la enzima es capaz de hidrolizar este disacárido en sus monómeros glucosa y galactosa. Este proceso de hidrólisis cuando se lleva a cabo en el suero de leche permite el aprovechamiento de este abundante subproducto de la industria láctea, el cual generalmente es descargado en los cuerpos de agua representando un grave problema de contaminación. ⁽¹⁾

Actualmente se cuenta con amplia información sobre la β -D-galactosidasa obtenida de diversas fuentes y donde se ha considerado aspectos como condiciones de cultivo, pH, temperatura, concentración, procedimientos de extracción y recuperación de esta enzima; la cual es intra y extracelular, pero exclusivamente intracelular en *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* y su actividad se determina sobre el sustrato inductor o bien con análogos; entre estos los que mas se utilizan son, el XGAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) para la determinación cualitativa in vivo y el ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) para la determinación cuantitativa y ésta puede visualizarse mediante el desarrollo de un color amarillo debido a la hidrólisis del ONPG en la que se produce galactosa y ortonitrofenil. ⁽²⁾

Los métodos que se utilizan para extraer esta enzima son: los físicos, los cuales se emplean a gran escala, pero son considerables los costos operacionales y de in-

versión, además el extracto obtenido contiene fragmentos celulares que dificultan el proceso de purificación y el método químico el cual es muy utilizado para recuperar la enzima a partir de microorganismos, esto implica el uso de solventes orgánicos como el tolueno, cloroformo, acetona y alcohol isoamílico, los cuales son capaces de penetrar la pared celular y alcanzar la membrana citoplasmática (3). Por otro lado, el empleo de solventes orgánicos pueden generar problemas de salud al analista debido a su toxicidad y por lo tanto deben manejarse con extremo cuidado.

Es necesario mejorar el proceso de extracción de la enzima β -D-galactosidasa de *K. marxianus* debido a que estudios basados en la producción de la misma, haciendo uso del método físico o del método químico, han resultado contradictorios, tanto en lo que concierne a parámetros físico-químicos, como a la concentración de sustrato. ⁽²⁾

Se ha demostrado en estudios antes realizados que se puede obtener biomasa y lactasa de *K. marxianus* a bajas concentraciones de lactosa, con rendimientos satisfactorios. Sin embargo, no se ha realizado una investigación que determine el método que proporcione la mayor extracción de esta enzima, utilizando como sustrato lactosuero diluido.

El objetivo de éste trabajo fué evaluar el efecto del uso de solventes orgánicos y del ultrasonido en la extracción de la enzima β -D-galactosidasa de *Kluyveromyces* var. *marxianus* ATCC 8554 en cultivo por carga utilizando lactosuero diluido

MÉTODOS

Microorganismo

Se utilizó la levadura *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554, cultivada dos veces por semana y almacenada bajo refrigeración a 4 °C. La levadura se mantuvo en tubos de cultivos de 25x150 mm con medio agar YM (Merck, Darmstadt, Alemania) en forma de cuña el cual se compone de extracto de levadura 0,3%, extracto de malta 0,3%, peptona 0,5%, dextrosa 1%, agar 2%. Los tubos se incubaron aeróbicamente, durante un lapso de 3 días a 28 °C y luego se almacenaron bajo refrigeración. ⁽²⁾

Medio de Cultivo

Suero de leche ácido, proveniente de la producción de queso prensado, proporcionado por la empresa Pacomeida C.A., ubicada en La Concepción, Estado Zulia.

Preparación del medio de cultivo

Tratamiento Termoácido

El suero de leche se trató con HCl concentrado ajustando el pH a 4,5 y calentándolo a 90°C por 10 minutos, para desproteínilarlo ^(2,4), luego se dejó enfriar hasta una temperatura por debajo de 35°C para someterlo a un proceso de filtración y así garantizar un eficiente desproteínilado.

Filtrado

Se filtró al vacío con tierra diatomea (compuesto de sílice) para eliminar la proteína que precipitó.

Dilución

Se diluyó con agua destilada, a una proporción aproximada de 1:1,1 de tal forma de obtener la concentración deseada de 2,695% de lactosa y se utilizó un Refractómetro BAUSCH & LOMB (made in USA) para corroborar esta dilución.

Suplementación

Se suplementó con extracto de levadura 0,75% (Merck), sulfato de amonio 0,84% (Merck y Bian Chemical) y sulfato de magnesio 0,05% (Fisher).⁽²⁾

Esterilización

El pH se ajustó a 5 y se esterilizó en el autoclave Felisa (Ciudad de México, DF, México) a 115 °C y 24,52 psi durante 20 minutos.

Caracterización del Lactosuero

Nitrógeno: El porcentaje de nitrógeno se determinó por el método de KJELDAH (AOAC, 1990).⁽⁵⁾

Proteínas: Se obtendrá multiplicando el porcentaje de nitrógeno por el factor 6,38 (AOAC, 1990).⁽⁵⁾

pH: Se utilizó un potenciómetro Metrohom modelo 744 (Herisau, Suiza).

Lactosa: Se obtuvo mediante el método de Dubois y Col., 1956.⁽⁶⁾

Fósforo: Se determinó siguiendo el método propuesto por la AOAC, (1990).⁽⁵⁾

Humedad: Se determinó siguiendo el método de la AOAC, (1990).⁽⁵⁾

Cenizas: Se determinó mediante la Norma Venezolana COVENIN 368:1997, (1997).⁽⁷⁾

Preparación del Inóculo

Se obtuvo añadiendo a cada 100 ml de suero de leche desproteínizado y diluido el contenido de una cuña de microorganismo activador (10 ml). Luego se incubó a 30°C y 200 rpm durante 8 horas en una incubadora INNNOVA 4300 New Brunswick Scientific (New Jersey, USA).⁽²⁾

El volumen del inóculo corresponde al 10% del volumen total de trabajo para la fermentación (3 litros).

Se determinó la absorbancia del inóculo con un espectrofotómetro Varian UV-50-W a 650 nm y se realizó un conteo directo de células para estandarizar la concentración de biomasa inicial, para ello se empleó un microscopio Hill-Wetzlar GMBH D 6330 Wetzlar 21 (Netzstecker, Alemania) y la cámara de Neubauer Propper (Long Island City, NY, USA).

Bioprocesos

Se realizaron 3 cultivos por carga, cada uno por triplicado a pH 5 y temperatura de 35°C. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 200 rpm en un biorreactor modelo Bioflo 4000 New Brunswick Scientific (New Jersey, USA). El pH se controló automáticamente a través de la consola de pH, temperatura y agitación permanecieron constantes durante las 13 horas del ensayo.

Determinaciones analíticas

Fueron realizadas cada hora durante las 13 horas que se mantuvo el proceso de fermentación.

Densidad Celular: La concentración de biomasa se monitoreó por la densidad óptica medida en un espectrofotómetro Varian UV-50-W a 650nm. Se relacionó la densidad óptica con el peso de la biomasa por unidad de volumen a través de una curva de calibración que se construyó previamente⁽²⁾, además se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ), el rendimiento (Y) y la constante de saturación (Ks).

Concentración de Lactosa: La concentración de lactosa se determinó empleando el método de Dubois y col., 1956.⁽⁶⁾

Las muestras se mantuvieron congeladas hasta el momento de ser analizadas.

Extracción de la enzima

Ultrasonido: La biomasa que se obtuvo en cada tiempo por centrifugación a 8500 rpm por 15 minutos se resuspendió a tampón fosfato (pH: 6,6) 0,1 M y se sometió a la acción del ultrasonido modelo GE-50 Marca PROCESOR (St. Louis, Missouri) por 30 minutos en un baño a 4 °C. (8)

Solventes orgánicos

Tolueno: La biomasa se resuspendió a tampón fosfato 0.1 M pH 6.6 con 2% de este disolvente, se agitó a 200 rpm a 37°C por 5 horas, después de las cuales se centrifugó a 8500 rpm por 10 min. recuperando el sobrenadante para el ensayo. (8)

Cloroformo: La biomasa se resuspendió a tampón fosfato 0.1 M pH 6,6 con 2% de este disolvente a 25°C por 10 horas, después de las cuales se centrifugó a 8500 rpm por 10 min. recuperando el sobrenadante para el ensayo. (9)

Actividad Enzimática

Se determinó sobre el sustrato cromogénico ONPG Sigma (St. Louis, Missouri). Se incubó 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 10 minutos, posteriormente se midió la densidad óptica a 420 nm. Se obtuvo la cantidad de ONP liberado a través de una curva de calibración que se elaboró previamente. La actividad fue expresada en μ moles ONP/l/10min y se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de ONP al incubar a 37 °C durante 10 minutos.⁽⁸⁾

La actividad enzimática específica valorada en unidades β Gal./mg proteína se determinó según la ecuación propuesta por Figueroa (1997) citado por Montiel y col.⁽³⁾ $U\beta Gal./mg\ proteína\ (D.O.420\ x\ K) / T(mg\ de\ prot.)$

Donde :

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

K: constante cuyo valor es 380

T: tiempo de reacción (10 min.)

mg de proteínas: miligramos de proteínas totales.

La estimación de proteínas totales se determinó por el método de Lowry y col.,1951. (10)

Análisis Estadístico

Se aplicó una prueba F de análisis de varianza (ANOVA) para establecer el efecto de los solventes orgánicos y del

ultrasonido sobre las actividades de la β -D-galactosidasa de *K. marxianus*, con un nivel de significancia 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 la prueba de intervalos múltiples de Duncan. (11)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestra la caracterización química del suero de leche fresco, desproteínizado y diluido. Como se puede observar los valores de pH y proteínas para suero fresco coinciden con los reportados por Badui (12) indicando que es de tipo ácido, mientras que para el suero desproteínizado y diluido los valores obtenidos tanto de pH y proteínas se deben a la acidificación y al calentamiento sometido durante el tratamiento termoácido aplicado. El contenido de proteínas del suero fresco disminuyó un 33% al desproteínizarlo y un 73% al diluirlo, evidenciándose la eficiencia de los procesos de desproteínización aplicados en esta investigación.

Tabla 1. Caracterización del suero de leche

	Suero Fresco	Suero Desproteínizado	Suero Diluido
pH	5,176 ± 0,244	4,500 ± 0,010	4,500 ± 0,010
Proteínas (%)	0,565 ± 0,015	0,378 ± 0,015	0,102 ± 0,010
Lactosa (%)	5,671 ± 0,047	5,921 ± 0,099	2,695 ± 0,139
Cenizas (%)	0,476 ± 0,051	0,563 ± 0,040	0,271 ± 0,013
Fósforo (%)	0,003 ± 0,0002	0,004 ± 0,0001	0,002 ± 0,001
Humedad (%)	94,050 ± 0,004	94,044 ± 0,018	97,465 ± 0,008

El contenido de lactosa para suero fresco (5,671 ± 0,047) y desproteínizado (5,921 ± 0,099) coinciden con Buitrago y col. (13) La concentración de lactosa en el suero diluido utilizado como sustrato se fijó en 2,695%. La concentración de ceniza en suero fresco coincide con el reportado por Badui (12) mientras que la de fósforo y humedad concuerdan con los reportados por Buitrago y col. (13)

En la Figura 1 se muestra el crecimiento de la *K. marxianus* en suero diluido al 2,695%, donde la máxima cantidad de biomasa obtenida (15,696 ± 0,152 Kg/m³) a la hora 7 del proceso (tal como se muestra en la Tabla 2), supera a los valores reportados por Buitrago y col. (13) (6,537 ± 0,344 Kg/m³), Chinappi y Sánchez (14) (6,5 Kg/m³) y Cori y col. (15) (4,65 Kg/m³). Las diferencias en las concentraciones puede deberse a las variaciones de la concentración inicial de sustrato, debido a que a altas concentraciones de lactosa, las células tienen menor capacidad de asimilar esa fuente de carbono probablemente por la alteración del sistema lactosa-permeasa. (16)

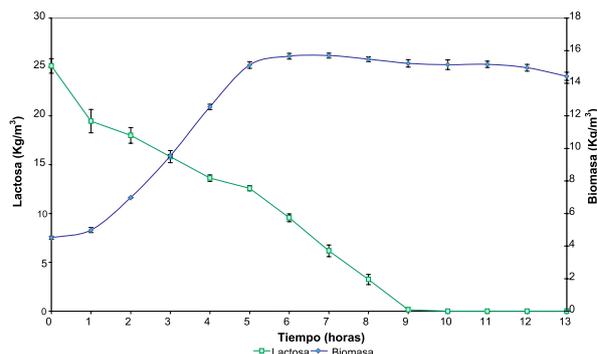


Figura 1. Cinética de crecimiento de *K. marxianus* y consumo de sustrato en lactosuero diluido

Se observa que el contenido de lactosa disminuye a medida que transcurre el tiempo y se consume en un 100%, resultado que coincide con Araujo y col. (17)

Tabla 2. Parámetros Cinéticos

Parámetros	Este estudio
Concentración de lactosa inicial (Kg/m ³)	26,95
X (Kg/m ³)	15,696 ± 0,152
% de lactosa utilizado	100
μ (h ⁻¹)	0,259 ± 0,038
YX/S	0,456 ± 0,030
q (h ⁻¹)	0,173 ± 0,047
Ks (m ³ /Kg . h)	0,012 ± 0,001

En la Tabla 2 se muestra la velocidad específica de crecimiento (μ) la cual es de 0,259 ± 0,038 h⁻¹, siendo similar al valor encontrado por Quintero y col. (4) (0,23 h⁻¹) e inferior al reportado por Buitrago y col. (13) (0,314 ± 0,013 h⁻¹). La velocidad específica de crecimiento se ve afectada por el rápido consumo de sustrato ya que ésta tiende a disminuir si el consumo de sustrato es acelerado. (18)

También se observa que el valor de rendimiento del microorganismo (Y), (0,456 ± 0,030), superó al obtenido por Araujo y col. (17) quienes emplearon una mayor concentración inicial de lactosa. El cociente metabólico o tasa metabólica específica (q), que es una medida del metabolismo utilizado por el microorganismo para la utilización de un sustrato dado (0,173 ± 0,047 h⁻¹) es superior al valor referenciado por Buitrago y col. (13) (0,09 h⁻¹). Sin embargo la constante de saturación de sustrato (Ks) (0,012 ± 0,001 m³/Kg . h) coincide con el valor obtenido por estos autores (0,017 m³/Kg . h).

En la Figura 2 se observa el comportamiento de la actividad específica respectivamente en función del tratamiento empleado para la extracción de la lactasa (ultrasonido, tolueno y cloroformo) durante el período de fermentación. En todos los casos se aprecia que la actividad específica aumenta a medida que transcurre el crecimiento de la *K. marxianus* hasta alcanzar la fase estacionaria, notándose el decrecimiento de las actividades conforme disminuye el crecimiento del microorganismo.

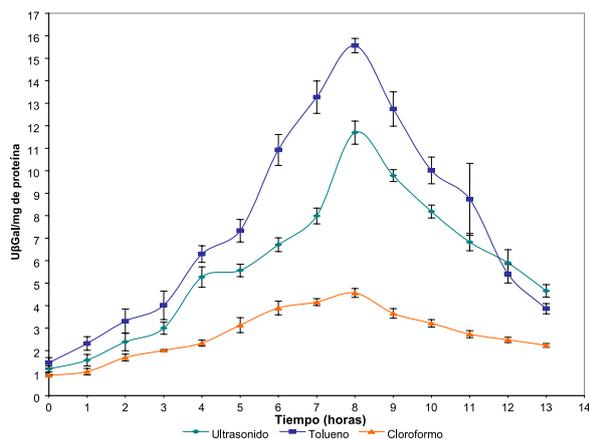


Figura 2. Efecto de los solventes orgánicos y del ultrasonido sobre la Actividad específica de la β-D-galactosidasa

Los máximos valores de la actividad enzimática se obtuvieron cuando las células fueron tratadas con tolueno ($489,03 \pm 10,205$) tal como se muestra en la Tabla 3. Además se muestran los correspondientes valores de actividad específica (UβGal/mg proteína). El efecto del tolueno puede ser interpretado por la digestión parcial de la pared celular que produce este solvente causando un enlazamiento de las células debido a una posible liberación de alguna sustancia adherente, sin ocasionar rompimiento celular, lo que permite inferir que la liberación de la lactasa ocurre por permeabilización. ^(19, 20)

Tabla 3. Valores máximos de actividad enzimática y actividad específica

Tratamiento	Actividad Enzimática μmoles ONP/L/10min	Actividad Específica UβGal/mg proteína
Ultrasonido	$420,100 \pm 3,111a$	$11,695 \pm 0,511a$
Tolueno	$489,030 \pm 10,205b$	$15,564 \pm 0,318b$
Cloroformo	$112,450 \pm 5,586c$	$4,565 \pm 0,198c$

Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

El método de extracción con cloroformo produjo una actividad específica de $4,565 \pm 0,198$ UβGal/mg proteína, este valor es superior al obtenido por Goncalves y Castillo ⁽⁹⁾ ($1,59$ UβGal/mg proteína). Sin embargo en ese estudio se purificó la enzima realizando repetidas centrifugaciones y diálisis a bajas temperaturas, obteniendo $17,4$ UβGal/mg proteína a pH 6,8 y 25°C . Por otro lado Becerra y col. ⁽²¹⁾ ensayaron extraer proteínas intracelulares de *K. lactis* con el uso de 1% (v/v) de cloroformo, pH de 9,5 a 37°C y obtuvieron actividades muy bajas, por lo que recomendaron emplear solventes como metanol y etanol-butanol.

En los métodos físicos o mecánicos (ultrasonido) de extracción enzimática el extracto crudo obtenido puede resultar cargado de fragmentos celulares dificultándose el proceso de purificación, además las altas temperaturas y tensiones mecánicas requeridas para liberar la lactasa

puede ocasionar bajos rendimientos de la enzima. ^(3, 22). La actividad enzimática obtenida con este método ($420,1 \pm 3,111$) superó el valor encontrado por Araujo y col. ⁽¹⁷⁾ ($384,42 \pm 13,11$) lo que evidencia lo determinante que es la concentración inicial de sustrato.

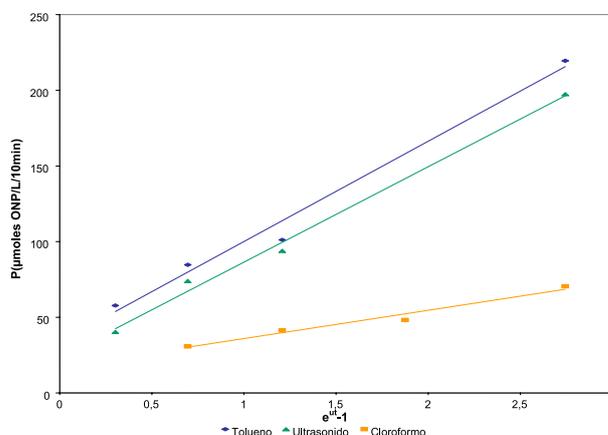


Figura 3. Ajuste del modelo de formación de productos asociados al crecimiento

Del análisis de varianza, se obtuvo que los tratamientos afectaron significativamente ($\alpha = 0.05$) las actividades enzimáticas y específicas. De acuerdo con la prueba de comparación de parejas de medias de tratamientos (Duncan), la actividad enzimática y la específica del tratamiento con cloroformo fue significativamente diferente a las obtenidas en los tratamientos con tolueno y ultrasonido, las cuales también presentan diferencia significativas entre sí.

Los datos experimentales de la producción de la enzima β-D-galactosidasa, se ajustan al modelo de formación de producto asociado al crecimiento; $dP/dt = \alpha \mu x$. La figura 3 presenta el ajuste al modelo y las pendientes de las rectas que permiten calcular la constante estequiométrica α y además plantear los modelos que se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Modelos de formación de β-D-galactosidasa asociados al crecimiento

Tratamiento	Modelo	R ²
Ultrasonido	$P = 13,966 X_0(e^{\mu t} - 1)$	0,99
Tolueno	$P = 14,670 X_0(e^{\mu t} - 1)$	0,98
Cloroformo	$P = 4,150 X_0(e^{\mu t} - 1)$	0,97

En la Tabla 5 se observan los parámetros analíticos: límite de detección (LDD), rango lineal y factor de correlación (R²) referentes a las curvas de calibración para la determinación de las concentraciones de biomasa, lactosa y actividad enzimática.

Tabla 5. Parámetros analíticos de las curvas de calibración: biomasa, lactosa y actividad enzimática

	LDD	Rango lineal	R2
Biomasa (Kg/m ³)	0,96	1,939-17,451	0,99
Lactosa (Kg/m ³)	5,95	0-70	0,99
Actividad Enzimática (µmolesONP/L/10min)	24,06	50-500	0,99

CONCLUSIONES

La producción de β -D galactosidasa con lactosuero diluido y empleando el tolueno como solvente extractor resultó ser el tratamiento que generó la mayor actividad enzimática y los resultados fueron significativamente diferentes a los encontrados con el uso del cloroformo y del ultrasonido para la extracción de la enzima. La producción de la enzima β -D-galactosidasa estuvo asociada al crecimiento del microorganismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Ramírez A. y Rivas N.: «Producción y caracterización parcial de β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche». Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 53 (2). 2003.
- Montiel X., Carruyo I., Ferrer J, Marcano L, Mármol Z. y Páez G. «Producción de β -D-galactosidasa por *Kluyveromyces fragilis* en cultivo por carga con lactosuero como substrato». Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia. Vol. 23 (2): 134-140.2000.
- Montiel X., Carruyo I., Marcano L., y Mavárez M. «Optimización del proceso de extracción de la lactasa de *Kluyveromyces marxianus* ATTC 8554, para su aplicabilidad en la industria láctea». Rev. Científica, FCV-LUZ. Vol. XV (5): 476-482. 2005.
- Quintero H., Rodríguez M., Páez G., Mármol Z. y Rincón M. «Producción de proteína unicelular (*Kluyveromyces fragilis*) a partir del suero de leche». Rev. Científica FCV-LUZ. Vol. IX (2): 87-94. 2001.
- AOAC Oficial Method of Analysis. Dairy Products. Chapter 33: 10-60. 1990.
- Dubois M., Pilles K., Hamilton J., Rebers P. y Smith, F. «Colorimetric method for determination of sugar and related substances». Analytical Chemistry. Vol., 28 (3): 350-356. 1956.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales, (COVENIN 368-97). Leche y sus derivados. Determinación de Cenizas. 2da revisión. Fondonorma. 1997.
- Mahoney R., Nickerson T. y Whitaker J. «Selection of strain, growth conditions, and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*». J. Dairy Sci. Vol. 58 (11): 1620-1629. 1975.
- Goncalves J. y Castillo F. «Partial purification and caracterizacion of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*» J. Dairy Sci. Vol. 65 (11): 2088-2094. 1981»
- Lowry O., Rosegrough N., Farr A. y Randall R. «Protein Measurement with Folin Phenol Reagent». J. Biol. Chem. 193: 265-275. 1951.
- Montgomery, D. Design and analysis of experiments. Cuarta edición. Editorial John Wiley & Sons. NY, USA. 66-71. 1991.
- Badui S. Química de los alimentos. Longman de México Editores, S.A. de C.V. 125-130. 1999.
- Buitrago G., Soto L., Páez G., Araujo K., Mármol Z. y Rincón M. «Producción continua de proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* a partir de lactosuero diluido». Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia. Vol. 31, Edición Especial, 107-113. 2008.
- Chinappi I. y Sánchez J. «Producción de biomasa de *Kluyveromyces fragilis* en suero de leche desproteinizado». Acta Científica Venezolana. Vol. 51: 223-230. 2000.
- Cori M., Rivas N., Dorta B., Pacheco E. y Bertsch A. «Obtención y caracterización de dos concentrados proteicos a partir de biomasa de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* cultivada en suero lácteo desproteinizado». Rev. Científica, FCV- LUZ. Vol. XVI, N° 3, 315 – 324. 2006.
- Joshi M. S., Gowda L. R y Bath S. G. «Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by cetyltrimethyl-ammonium bromide». Biotechnol. Lett. Vol. 9: 549-554. 1987.
- Araujo K., Páez G., Mármol Z., Ferrer J., Ramones E., Aiello C. y Rincón M. «Efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* y la producción de β -D-galactosidasa (Ec. 3.2.1.23)». Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia. Vol. 30 (1): 64-73. 2007.
- Scragg. Biotecnología para Ingenieros. Sistemas Biológicos en proceso tecnológicos”. Editorial Limusa. México. 1996.
- Babayán T. y Bezrukov M. «Autolysis in yeast». Acta Biotechnol. Vol. 5:163-168. 1985.
- Amrane A. y Prigent Y. «Behaviour of the yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* during its autolysis». Antonie Van Leeuwenhoek. Vol. 69 (3): 267-272. 1996.
- Becerra M., Rodríguez E. y Cerdán M. «Extraction of intracellular proteins from *Kluyveromyces lactis*». Food Technol. Biotechnol. Vol. 39 (2): 135-139. 2001.
- Vivek F., Harrison S. y Pandit A. «Improved cavitation cell disruption following pH pre-treatment for the extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*». Biochem. J. Vol. 31: 25-30. 2006.