

Actividad de la β -galactosidasa en células de *Kluyveromyces* sp. permeabilizadas con etanol a diferentes concentraciones, temperaturas y tiempos.

Activity of the β -galactosidase in cells of kluyveromyces sp. permeabilized with ethanol in different concentrations, temperatures and times.

Arellano- Barragán, Julio¹; Quicaña-Rodríguez, María²; Flores-Abad, Mariana²; Obeso-Villazón, Cinthya²

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la permeabilización de la membrana de *Kluyveromyces* sp. para determinar la actividad de la β - galactosidasa presente en esta levadura. La permeabilización se llevó a cabo en tubos de ensayo conteniendo la masa celular fresca de *Kluyveromyces* sp. y agregando diferentes concentraciones de etanol a respectivos tiempos y temperaturas. Las concentraciones de etanol fueron de 30, 50 y 70%; las temperaturas de 20, 40 y 60 ° C; y los tiempos de 5, 15 y 30 minutos, obteniéndose 27 combinaciones con las cuales se realizó la permeabilización de la membrana de *Kluyveromyces* sp.. Se centrifugaron los contenidos de cada tubo, colocando el sedimento celular en placas de vidrio para su desecación en frío y finalmente, las placas fueron dejadas en una campana de vidrio conteniendo cloruro de calcio para completar la desecación. La actividad de β - galactosidasa fue determinada usando una solución de buffer fosfato citrato con pH 6.5 suplementado con lactosa 5%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0.12%; $MnSO_4$ al 0.02%. La glucosa fue cuantificada por el método de la glucosa oxidasa. Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento de la levaduras desecadas a concentraciones de 30% de alcohol, 20°C y 5 min de exposición presentaron mayor actividad enzimática, con un valor de 2.9642 μ mol de glucosa /min. seguida de las combinaciones de 30% de alcohol, 20°C y 15 min, 30% de alcohol, 20°C y 30 min con valores de 2.863 y 1.4815 μ mol de glucosa /min. respectivamente. Las concentraciones de 50 y 70% de alcohol a las diferentes temperaturas y tiempos de exposición ensayados demuestran una nula o casi nula actividad enzimática.

Palabras clave: *Kluyveromyces* sp, β – galactosidasa, permeabilización,

ABSTRACT

The present work was focused on making the permeabilization of the membrane of *Kluyveromyces* sp. to determine the activity of the β -galactosidase present in this yeast. The permeabilization was carried out in test tubes containing the cell mass of *Kluyveromyces* sp. and adding different concentrations of ethanol to their respective times and temperatures. The concentrations of ethanol were 30, 50 and 70 %; temperatures of 20, 40 and 60 °C; and times of 5, 15 and 30 minutes, yielding 27 combinations in which was carried out the permeabilization of the membrane of *Kluyveromyces* sp. The content of each tube was then centrifuged, placing the cell pellet in glass plates for its drying in cold and eventually the plaques were placed in a bell jar containing calcium chloride to complete the drying. The activity of β -galactosidase was determined by using a solution of phosphate buffer with citrate pH 6.5 supplemented with lactose 5 %; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ to the 0.12 %; $MnSO_4$ to 0.02 %. Glucose was measured by the method of the glucose oxidase. The results showed that the treatment of the yeast dried at concentrations of 30% alcohol, 20 °C and 5 min of exposure presented higher enzymatic activity, with a value of 2.9642 μ mol of glucose /min. followed by combinations of 30% alcohol, 20 °C and 15 min, 30% alcohol, 20 °C and 30 min with values of 2,863 and 1.4815 μ mol of glucose /min, respectively. Concentrations of 50 and 70% of alcohol to the different temperatures and exposure times tested show a zero or near zero enzymatic activity.

Key words: *Kluyveromyces* sp, β -galactosidase, permeabilization.

1 Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.
2 Egresados de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo.

Presentado el 29/11/2011 aceptado el 08/08/2012

INTRODUCCIÓN

Las levaduras tienen una amplia aplicación en la biotecnología tradicional y moderna. Desde la antigüedad se han reconocido como protagonistas en la producción de alimentos y bebidas por fermentación y actualmente son utilizadas como fuentes de obtención de vitaminas del complejo B, pigmentos, cofactores, proteínas de organismos unicelulares, biomasa y otros productos con valor añadido. En las últimas décadas se han venido utilizando como hospederos para la obtención de proteínas heterólogas de organismos eucariontes por vías de la ingeniería genética. Sin embargo, en sus actividades dañinas pueden ocasionar importantes pérdidas económicas en la conservación y producción comercial y manufacturada de alimentos y bebidas, y algunas son causantes de enfermedades en el hombre. Aunque son variadas las aplicaciones en el campo de la biotecnología que se atribuye a las levaduras, aún quedan muchos hábitats naturales por explorar en busca de nuevas especies, de forma tal que puedan diseñarse tecnologías novedosas protagonizadas por estos microorganismos^{1,2}.

Las levaduras del género *Kluyveromyces* pertenecen a la división *Ascomycotina*, este género se reproduce por gemación multilateral, liberándose las esporas al llegar a su madurez (sus esporas son esféricas). En la actualidad, *K. marxianus* incluye las especies *K. fragilis*, *K. lactis*, *K. bulgaricus*, *Saccharomyces lactis* y *S. fragilis*. Las especies pertenecientes al género *Kluyveromyces* producen β - galactosidasa y son potentes fermentadoras de la lactosa.

La especie *K. marxianus* es una de las levaduras que más abunda en los productos lácteos; además, contiene la coenzima Q-6 e interviene en la fermentación del kumis (bebida láctea). Asimismo, se utiliza para obtener células de levadura a partir del suero lácteo.² La

especie *K. lactis* en su proceso de fermentación presenta como resultado lactosa positiva, por poseer la enzima β -galactosidasa, mientras que las otras especies pueden ser positivas o no^{3,4}.

La enzima β -D-galactosidasa, también llamada lactasa, es la enzima responsable de la hidrólisis de la lactosa en sus monómeros galactosa y glucosa teniendo esta última más poder edulcorante que la lactosa, la enzima es ampliamente utilizada en la industria láctea. Esto permite la preparación de diversos productos lácteos, especialmente para el consumo por individuos intolerantes al disacárido.³ 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^{5,6}.

Las levaduras lactosa fermentativas, tales como *K. fragilis*, *K. lactis* y *Candida pseudotropicalis* son las principales fuentes de enzima y las más usadas comúnmente para su preparación³. La enzima β -D-galactosidasa de *K. marxianus* es una enzima intracelular inducible por carbohidratos como la lactosa. Además este género es uno de los pocos aprobados como Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS) por la United States Food y Drug Administration (USFDA), es decir, se considera seguro para su aplicación en la industria alimenticia. Asimismo ha sido utilizado en diferentes trabajos ya que es la única levadura completamente inocua al ser humano a diferencia de otros hongos y bacterias.^{6,7}

El pH, la temperatura, la calidad y la cantidad de sustrato influyen significativamente sobre la actividad enzimática de β - D-galactosidasa. Estudios realizados por Montiel y col. y por Barberis S; Segovia R. han determinado las condiciones de pH y temperatura para optimizar la producción de esta enzima a partir de la levadura *K. marxianus*, aunque no han reflejado el efecto inductor de la lactosa en organismos con células eucariotas como las levaduras.^{3,8}

La lactosa, el principal carbohidrato presente en la leche, es un disacárido con un bajo dulzor y solubilidad relativos, que no es fácilmente digerible por una fracción importante de la población mundial.⁹

La insuficiencia de lactasa significa que la enzima β -galactosidasa presente en el intestino grueso no es suficiente para degradar la lactosa. Con excepción de la población de Europa Central y del Norte y sus descendientes en América y Australia, más del 70% de los adultos en todo el mundo son mal absorbedores de lactosa. La prevalencia de mala digestión de lactosa primaria en Sudamérica es 65-75%. La hipolactasia y mala digestión de lactosa acompañada por síntomas clínicos tales como hinchazón, flatulencia, náusea, diarrea y dolor abdominal se conocen como intolerancia a la lactosa¹⁰.

La hidrólisis enzimática de la lactosa constituye la base de los procesos biotecnológicos más prometedores que están siendo desarrollados actualmente para aprovechar el azúcar del suero de leche. La mayor limitación al desarrollo de estos procesos deriva de los elevados costos asociados a la extracción, separación, aislamiento y recuperación de β -galactosidasa de levaduras por ser intracelular. Asimismo el desarrollo de estas nuevas tecnologías encarece la producción de la enzima para fines de suplemento alimentario en pacientes deficientes de β -galactosidasa^{7, 8}.

Este trabajo permite obtener β -galactosidasa barata y de fácil disponibilidad por cuanto se va a utilizar a la misma célula de *Kluyveromyces* como fuente directa de β -galactosidasa.

Por ser un organismo GRAS, el consumo de esta levadura va a servir también como fuente de vitaminas del complejo B y micro elementos de gran importancia fisiológica como el zinc y el cromo.

Según G. Gamarra B., Woolcott H.⁶, las levaduras del género *Kluyveromyces*, poseen

un sistema lactosa-permeasa. El transporte de lactosa al interior de la célula constituye una etapa limitante en la velocidad de hidrólisis del disacárido. Tratamientos con agentes tensoactivos que afecten la permeabilidad de la membrana celular a la lactosa, podrían incrementar la producción de la enzima⁶.

Lee y col. permeabilizaron células de *K. lactis* utilizando etanol, con la finalidad de permitir el paso de lactosa y fructosa, sin el control del sistema lactosa permeasa para producir lactulosa en una forma catalizada por β -galactosidasa¹¹; asimismo Ruiz A. y col. pudieron purificar lactulosa mezclada con lactosa a diferentes concentraciones de etanol y temperatura¹².

Las células permeabilizadas de la levadura *K. lactis* con etanol pueden mantener su actividad intacta. Lee YJ, Kim CS, Oh DK sometieron a células de *Kluyveromyces* β -galactosidasa positivas al efecto del alcohol a 50%, a una concentración de 10⁻⁴ g/L de levadura y a 60°C de temperatura y demostraron que la actividad de β -galactosidasa se mantiene intacta para producir lactulosa a partir de lactosa al 40% y fructosa al 20%; este es el primer reporte de este tipo de trabajos utilizando diferentes concentraciones de etanol¹¹.

Los trabajos referidos, han investigado el efecto del alcohol a 50 % y temperatura de 60° C sobre la actividad sintetizante de β -galactosidasa de *K. lactis* en la producción de lactulosa usando lactosa y fructosa como sustratos. En el presente trabajo se investigó el efecto del alcohol a concentraciones de 30, 50 y 70% y temperaturas de 20, 40 y 60° C en tiempos de 5, 15 y 30 minutos sobre la actividad hidrolítica de β -galactosidasa de *Kluyveromyces* sp. aisladas de queso fresco.

Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que es posible permeabilizar las células de *Kluyveromyces* sp. utilizando alcohol comercial sin afectar en la actividad hidrolítica de la β -galactosidasa.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

Material Biológico

- Queso fresco y leche fresca que se expendieron en el mercado local de la ciudad de Trujillo durante el mes de abril del 2008.

MÉTODOS

a. Aislamiento de *Kluyveromyces* sp.

- Una muestra de queso fresco (2g), fue homogenizada con 3 mL de solución salina fisiológica estéril (SSFE).
- Una azada de cada muestra es sembrada en placa con Agar Sabouraud Lactosado conteniendo 40 µg/ mL de cloranfenicol, y se incubó a temperatura ambiente por 48 h^{1,13}.

b. Identificación macroscópica y microscópica:

b.1. Macroscópica:

- La identificación macroscópica se determinó mediante la observación de las colonias de *Kluyveromyces* sp. las que son de textura pastosa, color crema-amarillo, estructura de las colonias: granulosa^{2,13}.

b.2. Microscópica

- Se tomó una muestra de *Kluyveromyces* sp. incubadas en una solución azucarada y se colocó en un portaobjetos, se fijó el preparado suavemente a llama.
- Se tiñó con azul de metileno (Fórmula de Loeffler) durante 15 min, se lavó con agua corriente y se secó cuidadosamente a temperatura ambiente¹.
- Luego se procedió a observar al microscopio, presentando forma ovoide alargada, con gemación multipolar^{1,2}.

c. Cultivo puro

- Se aisló una colonia de esta placa para obtener un cultivo puro de *Kluyveromyces* sp. en el medio Agar Lactosado más fosfato de amonio en frascos estériles.

d. Producción de *Kluyveromyces* sp.

- El contenido de un cultivo puro de *Kluyveromyces* sp. fue removido en caldo lactosado y sembrado en 400 mL de caldo lactosado más fosfato de amonio, el que fue cultivado en aireación por 24 h hasta obtener una población de 1×10^7 células /mL confirmada, utilizando la cámara de Neubauer¹⁴.

- 400 mL de este cultivo se agregó a 3 L de caldo lactosado más fosfato de amonio, en un biorreactor de 5 L de capacidad aireado y agitado por 48 h¹⁴.

e. Cosecha:

- Terminado el tiempo de crecimiento, las levaduras fueron separadas por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min. El sedimento fue lavado con agua destilada y nuevamente centrifugado, este procedimiento fue realizado tres veces.

- El sedimento obtenido finalmente fue pesado para así obtener el peso húmedo.

- La masa celular fue distribuida por paquetes de 2 g (peso húmedo).

f. Permeabilización de la membrana de *Kluyveromyces* sp.

- La masa celular *Kluyveromyces* sp. (2g) obtenida del paso anterior fue sometida a la acción de las diferentes concentraciones de etanol, tiempos y temperaturas. Se mantuvo una relación de 3:1 (v/p) de etanol a diferentes concentraciones. La masa celular fue homogenizada en el volumen de alcohol a diferentes tiempos y temperaturas^{11,12}.

- Después de este proceso se centrifugó por 5 min a 3000 rpm.

g. Desecación de *Kluyveromyces* sp.

- El sedimento obtenido de la permeabilización de la membrana fue extendido en placas para luego ser llevadas a desecación en frío en una refrigeradora a 8° C por 24 h.

- Transcurrido este tiempo las placas fueron llevadas en condiciones de asepsia a una campana de vidrio con Ca Cl₂ como desecante

para secado al vacío por 36 h.

- La levadura seca fue homogeneizada en un mortero hasta polvo fino.
- La levadura así tratada fue pesada y colocada en frascos de vidrio estériles.

h. Determinación de la actividad enzimática:

- 20 mg. de polvo de levadura fueron agregados a 2 mL de Buffer sustrato suplementado, e incubados a 37° C por 30 min. En seguida la reacción fue detenida con 1 mL de H₂SO₄ 2/3N y se dejó reposar por 2 min, transcurrido ese tiempo se agregó 1 mL de Na₂WO₄ al 10%. El precipitado fue eliminado por centrifugación y la glucosa fue cuantificada por el método de glucosa oxidasa^{7, 15, 16, 17}.

RESULTADOS

En la **Tabla 1**; se muestra los resultados de la cuantificación de la actividad de β -galactosidasa de *Kluyveromyces* sp. tratada con agua destilada a temperaturas de 20, 40, 60°C y exposición de 5, 15 y 30 min; donde la actividad enzimática es nula o casi nula en estas células no permeabilizadas.

En la **Tabla 2**; se muestran los promedios de la actividad de β - galactosidasa en células de *Kluyveromyces* sp. tratadas con etanol al 30%, 20°C y tiempos de exposición de 5, 15 y 30 min. Los resultados muestran que si bien es cierto que en la exposición a 5 min en alcohol de 30% y a 20°C hay mayor actividad enzimática expresada en unidades de enzima, que en la exposición a 15 min, la diferencia de promedios no es significativa ($p > 0.05$), sin embargo la exposición a 30 min disminuye significativamente ($p < 0.05$) la actividad enzimática, comparada con los tiempos de 5 y 15 min.

En la **Fig. 1**; se muestra los rendimientos promedio por combinación de tratamientos para permeabilizar la membrana de *Kluyveromyces* sp. a diferentes porcentajes de alcohol,

temperaturas y tiempos de exposición; puede observarse que solo el tratamiento con alcohol al 30%, 20 °C y a tiempos de exposición de 5, 15 y 30 min dió resultados significativos de actividad de β - galactosidasa, a diferencia de los otros tratamientos donde la actividad enzimática fue nula o casi nula.

En la **Fig. 2**; se muestra los valores promedio de la actividad de β - galactosidasa de *Kluyveromyces* sp. tratada con agua destilada y etanol al 30% ,20 °C y 5 min de exposición. La actividad de la β - galactosidasa es mucho mayor en las células permeabilizadas con alcohol que en aquellas tratadas con agua destilada.

TABLA 1. Actividad de β - galactosidasa expresada en unidades de enzima (μ mol de glucosa/min.) de *Kluyveromyces* sp. tratada con agua destilada a diferentes temperaturas y tiempos.

Tratamiento	Actividad de β - galactosidasa (μ mol de glucosa/min.)
H ₂ O dest. 20°C 5 min	0.0494
H ₂ O dest. 20°C 15 min	0.0494
H ₂ O dest. 20°C 30 min	0.0000
H ₂ O dest. 40°C 5 min	0.0494
H ₂ O dest. 40°C 15 min	0.0000
H ₂ O dest. 40°C 30 min	0.0000
H ₂ O dest. 60°C 5 min	0.0494
H ₂ O dest. 60°C 15 min	0.0000
H ₂ O dest. 60°C 30 min	0.0000

TABLA 2. Valores promedio de actividad de β - galactosidasa en células de *Kluyveromyces* sp. tratadas con etanol al 30%, 20°C y tiempos de exposición de 5, 15, 30 min. (Los valores representan los promedios de cinco repeticiones).

Etanol	T°	t(min.)	Unidades de enzima	Diferencia entre los promedio	Significancia
30%	20°C	5	2.6341(a)	(5min.- 15min.) 0.1983	a y 0.05
30%	20°C	15	2.4358 (b)	(5min.- 30min.) 1.0867	a y c < 0.05
30%	20°C	30	1.5473(c)	(15min.- 30min.) 0.8885	b y c < 0.05

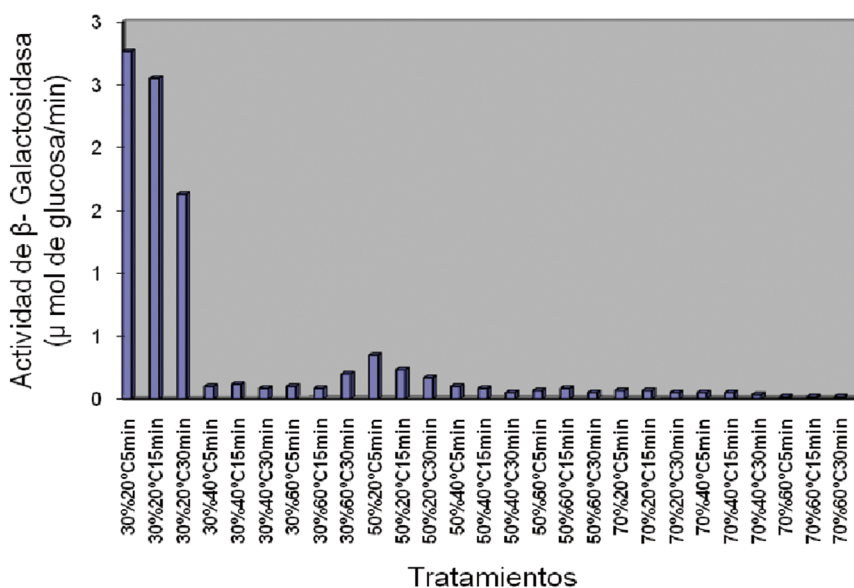


Fig. 1. Rendimiento promedio por combinación de tratamientos para permeabilizar la membrana de *Kluyveromyces* sp. a diferentes porcentajes de alcohol, temperaturas y tiempos de exposición.

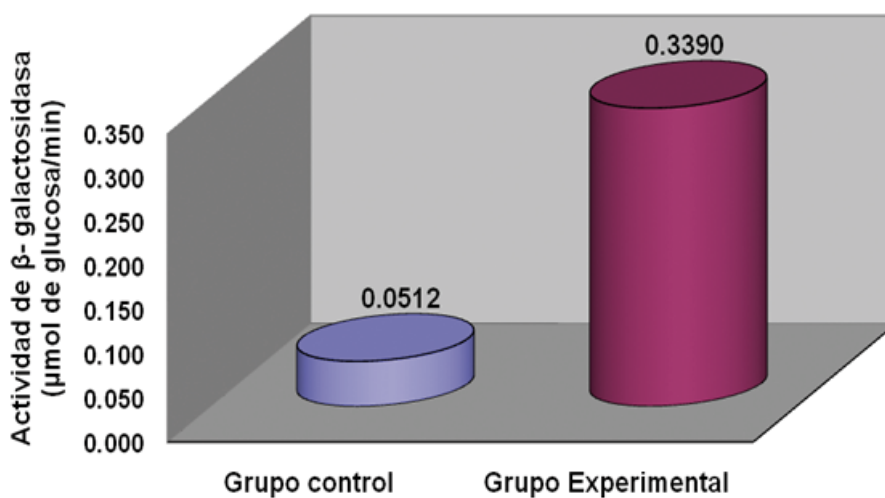


Fig. 2. Valores promedio de la actividad de β - galactosidasa de *Kluyveromyces* sp. tratada con agua destilada y etanol al 30%, 20°C y 5 min. de exposición.

DISCUSIÓN

El término producción de una enzima está referido tanto a la síntesis de la enzima por parte del hongo como a la actividad de la enzima en el medio una vez que ha sido producida. La permeabilización de la membrana de *Kluyveromyces* sp. a diferentes concentraciones de etanol, tiempo y temperatura fue usada en este experimento como un criterio para determinar la capacidad de la β - galactosidasa en la degradación de la lactosa¹¹.

La β - galactosidasa obtenida de *Kluyveromyces* sp. fue activa en el desdoblamiento de la lactosa, esto demuestra el uso que se le puede dar a esta levadura en el campo industrial y/o farmacéutico¹⁸.

Según los resultados, la actividad de β - galactosidasa obtenida de *Kluyveromyces* sp. fue de mayor cantidad a 30% de etanol, 20°C y 5 min con un valor promedio de 2.9642 μ mol de glucosa /min. seguida de las combinaciones de 30%, 20°C y 15 min, 30%, 20°C y 30 min con valores de 2.863 y 1.4815 μ mol de glucosa /min. respectivamente; mucho mayor a las demás combinaciones de etanol, temperatura y tiempo, los cuales muestran valores de actividad enzimáticas nulas o casi nulas. Es decir, la β - galactosidasa de *Kluyveromyces* sp. es sensible a concentraciones de alcohol mayores del 30%, a temperaturas de 40 y 60 °C y a tiempos de 30 min de exposición.

La concentración de etanol, temperatura y tiempo influyen mucho en la permeabilización de la membrana de *Kluyveromyces*. Lee Y y cols. sometieron a células de *Kluyveromyces* β - galactosidasa positivos al efecto del etanol al 50% y a 60° C de temperatura y demostraron que la actividad de betagalactosidasa se mantiene intacta para la producción de lactulosa a partir de lactosa al 40% y fructosa al 20%¹¹; este es el primer reporte de este tipo de trabajos utilizando diferentes

concentraciones de etanol. Asimismo, Ruiz A y cols. pudieron purificar lactulosa mezclada con lactosa a diferentes concentraciones de etanol y temperaturas¹². Estos resultados difieren de los nuestros (30% y 20 %) pero debemos tener en cuenta que la actividad de β - galactosidasa está investigada en el sentido sintetizante (formación de lactulosa a partir de lactosa y fructosa) por los autores referidos, y no en el sentido hidrolítico, investigado por nosotros. Muchas enzimas con doble actividad enzimática, demuestran comportamientos diferentes en relación a la temperatura, en este caso podemos inferir que también lo muestran en relación a las diferentes concentraciones de alcohol^{18,19}.

Según Gamarra G. y Woolcott J, las levaduras del género *Kluyveromyces* poseen un sistema lactosa permeasa⁶. El transporte de lactosa al interior de la célula constituye una etapa limitante en la velocidad de hidrólisis del disacárido. Tratamientos con agentes tensoactivos que afecten la permeabilidad de la membrana celular a la lactosa, podrían incrementar la actividad de la enzima. La β – galactosidasa, a diferencia de otras proteínas como la tioredoxina²⁰, se encuentra ligada a las subestructuras de *Kluyveromyces* sp.; esto lo hemos comprobado evaluando la actividad de esta enzima en los sobrenadantes después de los tratamientos de permeabilización, por lo que se impone un estudio comparativo de esta enzima ligada a la estructura celular con la enzima purificada.

El alcohol interviene modificando la estructura de la membrana celular de la levadura haciendo que la lactosa pueda pasar libremente y no que la enzima salga ya que se encuentra inmovilizada dentro de la propia estructura de *Kluyveromyces*. A medida que se incrementa el tiempo de exposición de la levadura en el etanol la actividad enzimática disminuye conforme se puede observar en la

Tabla 2.

Por otro lado, concordante con este razonamiento, el aumento de las concentraciones de alcohol es decir mayor del 30% hace que la actividad de β - galactosidasa disminuya significativamente como puede verse en la Fig. 2.

Por lo tanto, esto es concordante con el efecto desnaturizante del etanol a temperaturas por encima de los 0°C.

CONCLUSIONES

- La mayor actividad de β - galactosidasa obtenida de *Kluyveromyces* sp. se presentó en la concentración de 30% de etanol, 20°C y 5 min con un valor promedio de 2.9642 μ mol de glucosa /min comparándola con las demás unidades de enzima de los demás combinaciones.
- La diferencia entre los resultados de las demás variables experimentales no fue significativa.
- A concentraciones crecientes de etanol y a tiempos crecientes, la actividad de β -galactosidasa disminuye hasta la inactivación completa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Petrenko O. Estudio de algunas características de las cepas de levaduras y de su rendimiento celular utilizando un medio de cultivo a base de suero lácteo. Proyecto de tesis. Universidad de Belgrano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Carrera de Licenciatura en Farmacia. Buenos aires, Argentina. Agosto 2005.
2. Kreger-van Rij. The yeasts a taxonomic study. 1984. Editorial. Pág. 241-242.
3. Trevisan C, Bergamo E, Contiero J, Hojo O, Monti. Inmovilización de betagalactosidasa en silicón de poro controlado. Braz. J. Microbiol. (Revista en línea).14 (1): 185-200.
4. Ben-Hassan R, Ghaly, A. Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. Applied Biochemistry and Biotechnology; 47(5): 89-105, 1994
5. Suarez F, Savaiano D, Levitt M. Review article: The treatment of lactose intolerance. Alimentary Pharmacology and Therapeutics (Revista en línea); 9(6): 589-597, 1995.
6. Gamarra G, Woolcott J. Optimización de las condiciones fermentativas para la producción y extracción de β -galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus*. Revista peruana de química e ingeniería química (Revista en línea). 3(1): 227-235, 2000.
7. Santiago P, Marquez L, Cardoso V, Ribeiro E. Synthesis of beta-galactosidase by fermentation of cheese whey by *Kluyveromyces marxianus*. Ciênc.Tecnol.Aliment. (Revista en línea) 2004; 24(4): 226-238. Disponible en: <http://www.scielo.br/cgi-bin/wxis.exe/iah/>. Consultado el 35 de junio de 2005.
8. Padín G, Díaz F. Efecto de la concentración inicial del lactosuero sobre la fermentación alcohólica con *Kluyveromyces fragilis*. Rev. Soc. Ven. Microbiol (Revista en línea), 2006; 26(1): 196-209. Disponible en: <http://medlineplus.gov/spanish/022235601>. Consultado el 02 de diciembre de 2010.
9. Becerra F. Secreción de beta-galactosidasa de *kluyveromyces lactis*. Revista Científica, (Revista en línea), 1998; 44(2): 418- 425. Disponible en: www.cibernetia.com/bioquimicamolecular/44/2_xci1179.htm. Consultado el 11 de enero de 2009.
10. Ferreira L, Trierweiler J, De Souza M, Folly O. A lactose fia-biosensor system for monitoring and process control. Brazilian Journal of Chemical Engineering (Revista en línea), 2004; 21(2): 307 – 315.
11. Lee Y, Kim C, Oh D. Lactulose production by beta-galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. (Revista en línea), 2004; 64(6):787-93.

12. Ruiz A, Sanz M, Corzo N, Martín P, Ibañez E, Martínez I, Olano A. Purification of lactulose from mixtures with lactose using pressurized liquid extraction with ethanol-water at different temperatures. *J. Agric. Food Chem. (Revista en línea)*, 2007; 55(9): 3346-50.
13. Barreto E., Silva D., Lopes Passos F. A practical method for screening for β -galactosidase secreting microbial colonies. *Rev. microbial. (Revista en línea)*, 2000.
14. Grba S, Stehlik-Tomas V, Stanzer D, Vaheie N, Skrlin A. Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for Alcohol and Biomass production on Whey. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly (Revista en línea)*; 16(1): 13-25, 2002
15. Improvement of SCP production and BOD removal of whey with mixed yeast culture. *Electron. J. Biotechnol (Revista en línea)*, 7(3): 717-728, 2004.
16. Da Silva M, Teixeira T. Purification of microbial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. *Revista de Microbiología. Revista en línea*, 1999; 30(5): 324 -331. Disponible en: <http://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/199.pdf> Consultado el 13 de junio de 2010.
17. Cruz R, Arcádia V, Belote J, De Oliveira M, Dorta C, Dos Santos L. Properties of a new fungal β -galactosidase with potential application in the dairy industry. *Rev. Microbiol. (Revista en línea)*, 1999; 30(3): 522-535
18. Inchaurreondo V., Flores M., Voget C. Growth and beta-galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (Revista en línea)*; 20(5): 291-298.
19. Madrid R, Salama Benarroch H, Moran Sánchez, F. Gallardo Sánchez, A. Mal absorción de lactosa en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal inactiva: ¿está justificado excluir los productos lácteos a todos los pacientes? *An. Med. Interna (Madrid) (Revista en línea)*; 21(5): 212-214, 2004. Consultado el 20 de abril de 2009.
20. Figueroa L, Heluane H, Rintoul M, Córdoba P. Beta-galactosidase activity of strains of *Kluyveromyces* spp. and production of ethanol from lactose. *Revista Argentina de Microbiología (Revista en Internet)*, 22(4): 175-181.

Correspondencia:

Julio César Arellano Barragán

Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal. Universidad Nacional de Trujillo

Telefono: 948244621

E-mail: azul_1901@hotmail.com