

Producción y caracterización parcial de β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche desproteínizado

Alejandra O. Ramírez Matheus y Nilo Rivas R.

Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.

RESUMEN. El objetivo de ésta investigación fue el optimizar la producción de β -galactosidasa por *Kluyveromyces lactis*, a través de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), utilizando el suero lácteo desproteínizado como medio de fermentación. Se empleó un Diseño Compuesto Central Ortogonal (DCCO) sin repetición, con cuatro factores: temperatura, pH, velocidad de agitación y tiempo de la fermentación, y como variable respuesta la actividad enzimática (U/ml). Treinta pruebas, fueron realizadas de acuerdo al DCCO, desglosadas en veinte y cinco tratamientos, con seis repeticiones del punto central, en un fermentador New Brunswick BioFlo 2000 con un volumen de trabajo de 2 litros. El suero desproteínizado por termocoagulación fue analizado químicamente, obteniendo los siguientes resultados: humedad 93,83%, sólidos totales 6,17%, proteína 0,44%, lactosa 4,85%, acidez 0,43% y pH 4,58. Para establecer los valores óptimos de cada factor en la producción de la enzima, se realizó el análisis estadístico, obteniendo las siguientes condiciones de operación: temperatura 30,3 °C, pH 4,68, velocidad de agitación 191 r.p.m. y tiempo de fermentación 18,5 horas, logrando una producción de enzima de 8,3 U/ml. Se realizó la purificación parcial de la enzima con acetona, logrando un rendimiento de 50,8% y una purificación de 7,4 veces. La enzima purificada tuvo una temperatura óptima de 60°C y un pH de 6,2. En conclusión es posible producir la enzima β -galactosidasa con la levadura *Kluyveromyces lactis* propagada en suero desproteínizado, y además la MSR puede ser utilizada en la optimización de condiciones de operación en procesos microbiológicos.

Palabras clave: Suero, β -galactosidasa, *Kluyveromyces lactis*, metodología de superficie de respuesta.

SUMMARY. Production and partial characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* grown in deproteinized whey. The purpose of this work was to optimize the β -galactosidase production by *Kluyveromyces lactis*, applying the Surface Response Methodology (SRM) and using deproteinized whey as fermentation medium. An Orthogonal Central Compound Design (OCCD) was used without repetition, with four factors: temperature, pH, agitation speed and fermentation time. Then, enzyme activity (U/ml) as response variable was used. Thirty trials in twenty-five treatments, with six repetitions at the central point, were carried out, in a New Brunswick Bioflo 2000 fermentor with a volume of 2 liters. The deproteinized whey obtained by thermocoagulation was chemically analyzed. The results were: moisture 93,83%, total solids 6,17%, protein 0,44%, lactose 4,85%, acidity 0,43% and pH 4,58. The best conditions in the enzyme production were: temperature 30,3 °C, pH 4,68, agitation speed 191 r.p.m. and fermentation time 18,5 h. with an enzyme production of 8,3 U/ml. The degree of purification obtained was 7,4 times and the yield was 50,8%. The purified enzyme had an optimum temperature of 60 °C and a pH of 6,2. This work shows that the yeast *Kluyveromyces lactis* grown in deproteinized whey is able to produce the enzyme β -galactosidase and SRM can be used in the fermentology processes, specifically in determining the best suitable operation conditions.

Keys word: Whey, β -galactosidase, *Kluyveromyces lactis*, surface response methodology.

INTRODUCCION

La producción de β -galactosidasa o lactasa (EC.3.2.1.23), a partir de microorganismos como hongos, bacterias o levaduras utilizando suero lácteo como medio de fermentación, ha despertado gran interés, así como también el uso de esta enzima en la industria de alimentos (1-5). La lactasa causa la hidrólisis de la lactosa, hasta sus componentes principales glucosa y galactosa, produciéndose un producto de mayor dulzor, debido a las propiedades de los

monosacáridos formados, lo que permite usar la lactosa como edulcorante. Los jarabes obtenidos de esta hidrólisis han servido de sustitutos del jarabe de maíz o sacarosa en las industrias de repostería, panadería, heladería y otras (6); además se ha comprobado que la adición de lactasa a productos lácteos como leche, yoghurt, crema agria y mantequilla, mejora el sabor sin que ocurra un incremento calórico significativo, incrementa el poder edulcorante, y favorece el consumo humano en individuos con intolerancia a la lactosa (4,6). La hidrólisis enzimática de la lactosa del

suero, es una técnica sencilla que 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 a ríos y desagües (7). Se estima que cada kg de queso producido genera 9 kg de suero y que anualmente se producen a nivel mundial 9.000.000 t de queso; esto representaría aproximadamente 85 millones de t de suero, considerado como producto de desecho (8). En consecuencia la necesidad de reducir esta contaminación, prohibiendo la práctica de verter el suero a ríos y desagües, aunado al alto potencial nutritivo de este subproducto, han conducido a la realización de estudios tecnológicos para un mejor aprovechamiento del mismo, y dada la importancia que tiene la enzima lactasa en la industria de alimentos, en esta investigación se plantea la optimización del proceso de producción de β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* crecida en suero de leche desproteínizado, a través de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR).

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó el suero proveniente de la Planta de Lácteos de la Facultad de Ciencias Veterinarias UCV, ubicada en la ciudad de Maracay-Edo. Aragua. El cultivo usado en la fermentación fue la levadura *Kluyveromyces lactis*, cepa N° 30.841, donada por el cepario del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Las células de esta levadura fueron mantenidas en cuñas de 2% de agar y 1% de extracto de malta a 4°C, con transferencias mensuales.

Preparación del suero desproteínizado

Para lograr separar las proteínas del suero se aplicó un tratamiento termoácido, el cual consistió en ajustar el pH a 4,6 con ácido acético y posteriormente aplicar calor (90°C por 15 minutos), para así precipitar las proteínas y además pasteurizar el medio. El suero se dejó reposar, luego se realizó una filtración al vacío utilizando papel de filtro (Wathman N°1) y se conservó refrigerado.

Análisis químicos del suero desproteínizado

Al suero desproteínizado se le determinó la humedad, acidez, pH y nitrógeno total, según los métodos descritos en el A.O.A.C (9). La lactosa se determinó mediante el método de Somogy (10).

Producción de la enzima

.- Suplementación del medio de cultivo:

El suero fue suplementado con la adición de 0,15% de extracto de levadura y 0,1% de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, según lo recomendado por Sánchez y Castillo (3).

.- Inóculo:

El medio usado para preparar el inóculo fue el suero

desproteínizado y suplementado. Se colocaron 140 ml de este suero en fiolas de 500 ml, se le ajustó el pH a 5 y se esterilizó a 120°C x 10 min. Una vez enfriado se le agregó el contenido celular crecido, durante 24 horas a 30°C en cuña de agar/extracto de malta, arrastrado con 10 ml de caldo extracto de malta; las fiolas se incubaron a 30°C por 18 horas, con agitación, esto garantizó una población microbiana alrededor de 10^7 células/ml.

.- Condiciones del cultivo:

En el proceso de producción de la lactasa, se utilizó un fermentador marca New Brunswick modelo BioFlo 2000 modular con una capacidad de 2 l. Para lo cual 1350 ml de suero desproteínizado y suplementado se esterizaron a 120°C x 10 min., en el mismo recipiente del fermentador, posteriormente se le agregó 150 ml de inóculo, obteniendo un volumen total de trabajo de 1,5 l. Las variables a considerar fueron: pH, temperatura, velocidad de agitación y tiempo de fermentación a una tasa de aireación de 0,5 vvm. Se utilizó un diseño factorial de dos niveles, para los cuatro factores antes mencionados, es decir un factorial 2^4 . Con la finalidad de describir la naturaleza de la superficie de respuesta en la región del óptimo, se utilizó un diseño compuesto central ortogonal empleando cinco niveles de cada factor ($-\alpha, -1, 0, 1$ y α), como lo describe la literatura revisada (11); el cual básicamente consistió en un diseño factorial 2^k , donde $k=4$ ($2^4=16$), con ocho puntos estrellas $2k$ ($2 \times 4=8$) y seis (6) repeticiones de los puntos centrales ($N^\circ=6$), dando un total de treinta (30) tratamientos, los cuales siguieron el orden establecido en la matriz de diseño codificada que se muestra en la Tabla 1. En la Tabla 2 se muestran los valores reales de pH, temperatura (°C), velocidad de agitación (r.p.m.) y tiempo de fermentación (horas), para poder establecer las condiciones de trabajo para cada tratamiento, los rangos de las variables empleadas, se establecieron de acuerdo a la literatura revisada siendo los siguientes: temperatura: 27 - 35°C, pH: 4 - 7, velocidad de agitación: 100 - 200 r.p.m y tiempo de fermentación: 12 - 24 horas.

Ensayo de actividad enzimática y determinación de proteína

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron según la metodología indicada por Sánchez y Castillo (3), utilizando ONPG como sustrato. La actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir un μmol de ONP en 1 min., bajo las condiciones descritas. El contenido proteico del extracto enzimático se llevó a cabo mediante el método colorimétrico de Lowry *et al.*, (12), utilizando albúmina de suero de bovino.

Extracción de la enzima

Las células cosechadas por centrifugación (10.000 r.p.m por 10 min.) y lavadas con agua destilada, fueron

resuspendidas en buffer fosfato de potasio 0,1 M pH 7, suplementado con 0,5 mM MgSO₄ y 0,1 mM MnCl₂. a esta suspensión se le adicionó tolueno al 2% (v/v) como solvente orgánico, durante 16 horas a 37 °C para causar la permeabilización de las células (13).

Purificación de la enzima

Se realizó una purificación parcial de la enzima, como lo describen Goncalves y Castillo (1) una vez incubada la suspensión con tolueno 2% (v/v), ésta se centrifugó a 10.000 r.p.m. x 20 min., descartándose el precipitado. Un volumen igual de acetona se adicionó al sobrenadante a 4°C, el precipitado formado se colectó por centrifugación a 10.000 r.p.m. x 20 min., y luego de la evaporación de la acetona residual fue disuelto en el buffer fosfato de potasio 0,1 M utilizado en la extracción. A esto se le denominó extracto purificado.

TABLA 1

Matriz del Diseño Compuesto Central Ortogonal a utilizar en la optimización del proceso de producción de lactasa por *Kluyveromyces lactis* en suero desproteínizado

Tratamiento	X1	X2	X3	X4
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	-1	1	-1
4	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1
8	-1	1	1	1
9	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1
11	1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1
13	1	1	-1	-1
14	1	1	-1	1
15	1	1	1	-1
16	1	1	1	1
17	-α	0	0	0
18	α	0	0	0
19	0	-α	0	0
20	0	α	0	0
21	0	0	-α	0
22	0	0	α	0
23	0	0	0	-α
24	0	0	0	α
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

X1= Temperatura de fermentación. 1er. Factor

X2= pH. 2do. Factor

X3= Velocidad de agitación del medio. 3er. Factor

X4= Tiempo de fermentación. 4to. Factor.

α = 1,7178

TABLA 2

Tratamientos utilizados en el establecimiento del Diseño Compuesto Central Ortogonal para la optimización del proceso de producción de lactasa por *Kluyveromyces lactis* en suero desproteínizado

Tratamiento	Temperatura (° C)	pH	Velocidad de agitación (r.p.m)	Tiempo (h)
1	28,7	4,6	121	14,5
2	28,7	4,6	121	21,5
3	28,7	4,6	179	14,5
4	28,7	4,6	179	21,5
5	28,7	6,4	121	14,5
6	28,7	6,4	121	21,5
7	28,7	6,4	179	14,5
8	28,7	6,4	179	21,5
9	33,3	4,6	121	14,5
10	33,3	4,6	121	21,5
11	33,3	4,6	179	14,5
12	33,3	4,6	179	21,5
13	33,3	6,4	121	14,5
14	33,3	6,4	121	21,5
15	33,3	6,4	179	14,5
16	33,3	6,4	179	21,5
17	27,0	5,5	150	18,0
18	35,0	5,5	150	18,0
19	31,0	4,0	150	18,0
20	31,0	7,0	150	18,0
21	31,0	5,5	100	18,0
22	31,0	5,5	200	18,0
23	31,0	5,5	150	12,0
24	31,0	5,5	150	24,0
25	31,0	5,5	150	18,0
26	31,0	5,5	150	18,0
27	31,0	5,5	150	18,0
28	31,0	5,5	150	18,0
29	31,0	5,5	150	18,0
30	31,0	5,5	150	18,0

Efecto de la temperatura y el pH sobre la enzima

Se estudió el efecto del pH en un rango de 5 a 8 y de la temperatura en un rango de 30 a 60°C, sobre la actividad enzimática, a través de la metodología descrita por Sánchez y Castillo (3), utilizando también ONPG como sustrato.

Análisis estadísticos

La variable respuesta analizada fue la actividad enzimática de los extractos crudos obtenidos en los distintos tratamientos; esta variable se analizó siguiendo los pasos de la Metodología de Superficie de Respuesta:

.-Análisis de varianza:

Se utilizó para establecer si existen diferencias o no entre los tratamientos y también para determinar la variabilidad debida al error experimental.

.-Análisis de la regresión:

Para los efectos lineales, cuadráticos y cruzados de los factores que tuvieron influencia sobre la variable respuesta.

.-Establecimiento del modelo de regresión:

Para establecer el modelo de regresión de la variable respuesta, se consideraron los coeficientes de regresión estimados en el análisis de regresión.

.-Análisis canónico de la superficie de respuesta:

Para caracterizar la superficie en la vecindad inmediata del punto estacionario, es decir determinar si éste es un punto de respuesta máxima, mínima o punto de silla.

.-Análisis de Ridge:

En caso tal que el punto estacionario resultó ser un punto de silla, este análisis permitió estimar los niveles de cada factor para obtener la respuesta óptima.

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización química del suero desproteínizado

El suero desproteínizado empleado como sustrato de la fermentación fue analizado para determinar su composición (Tabla 3); se encontró que presenta un 93,83% de humedad, 6,17% de sólidos totales, 0,44% de proteína, 4,85% de lactosa, 0,43% de acidez y un pH de 4,58. El contenido de humedad fue inferior y el de sólidos totales y proteína mayor, a los encontrados por otros autores en permeado de suero dulce (14,15) y en suero desproteínizado (5). No obstante el contenido de lactosa aunque es similar al indicado en permeado de suero dulce (14), es inferior al reportado en suero desproteínizado (5). Estas diferencias pueden deberse tanto a la técnica utilizada en la separación de proteínas, como a la materia prima, ya que autores utilizan la ultrafiltración y permeado de suero dulce (14) mientras que otros la termocoagulación y suero reconstituido en una proporción de 60 g/L (5). Con respecto al pH, se observan valores similares a los reportados por la literatura revisada (5,15), no así la acidez, la cual tuvo un valor intermedio a lo informado en la mencionada literatura (5,15) quizás esta diferencia es debida a la acidificación sufrida por el suero durante el proceso de separación proteica.

TABLA 3
Caracterización química del suero desproteínizado

Característica	X	Valor Mínimo	Valor máximo	σ	C.V
%Humedad	93,83	92,62	96,56	1,05	1,12
%Sólidos totales	6,17	3,44	7,38	1,05	17,01
%Proteína	0,44	0,37	0,49	0,03	6,81
%Lactosa	4,85	3,80	5,65	0,59	12,16
%Acidez	0,43	0,30	0,58	0,09	20,93
pH	4,58	4,50	4,62	0,04	0,87

Optimización del proceso de producción de β -galactosidasa por *Kluyveromyces lactis*, aplicando la metodología de Superficie Respuesta y utilizando un Diseño Compuesto Central Ortogonal

Una vez realizadas las 30 pruebas establecidas en el diseño experimental que se mostró en la Tabla 2, se obtuvo el extracto enzimático correspondiente a cada tratamiento, al cual se le procedió a determinar la actividad enzimática (U/ml), concentración proteica y actividad enzimática específica (U/mg), los resultados se muestran en la Tabla 4. Los valores de actividad enzimática, concentración proteica y actividad enzimática específica de los extractos en los diferentes tratamientos, estuvieron comprendidos entre 1,29 y 7,43 (U/ml), 0,68 y 1,84 (mg/ml) y entre 0,82 y 7,72 (U/mg), respectivamente; siendo estos valores similares a los encontrados por otros autores (17) con esta misma levadura, pero inferiores a los reportados con las levaduras *Kluyveromyces fragilis* (3,13) y *Kluyveromyces marxianus* (1). Al parecer la producción de lactasa, utilizando suero de leche desproteínizado como medio de fermentación, es mayor por las levaduras *K. fragilis* y *K. marxianus*, que por la levadura bajo estudio, por supuesto esto está vinculado a las condiciones de temperatura, velocidad de agitación del medio y tiempo de fermentación, utilizadas en cada investigación.

Análisis estadísticos

.- Análisis de varianza

De acuerdo al análisis de varianza, se observa que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos, es decir los cambios observados en la cantidad de enzima producida, se deben a los tratamientos, por lo cual se justifica la optimización de las condiciones del proceso a través de esta variable respuesta. Además los valores de la respuesta presentaron una moderada variabilidad con un coeficiente de variación de 25,2%, lo cual es de esperarse en este tipo de ensayo donde son muchos los factores a controlar. En cuanto a la regresión, ésta también es altamente significativa así como los efectos lineales de temperatura, pH, velocidad de agitación y tiempo de fermentación; sin embargo se aprecia que los efectos cuadráticos puros y cuadráticos cruzados son significativos, es decir que todos o algunos de estos factores considerados están relacionados con la variable respuesta. El coeficiente de regresión (R^2) fue de 0,8715 lo cual indica confiabilidad en la respuesta estimada, debido a que el 87,15% de los valores se ajustan al modelo de regresión planteado. La falta de ajuste resultó altamente significativa, lo que indica un sesgo en la respuesta estimada, es decir que algunos efectos importantes pudieron no haber sido considerados en el modelo polinomial cuadrático y/o que otras variables independientes necesitan ser incluidas en el modelo. Esto puede estudiarse a futuro.

TABLA 4
Actividad enzimática, concentración proteica y actividad enzimática específica
de los extractos enzimáticos

Tratamiento	Temperatura (°C)	pH	Velocidad de agitación (r.p.m)	Tiempo (h) (U/ml)	Actividad enzimática. (U/mg)	Proteína (mg/ml)	Actividad enz específica.
1	28,7	4,6	121	14,5	5,74	1,26	4,55
2	28,7	4,6	121	21,5	2,24	0,73	3,07
3	28,7	4,6	179	14,5	8,50	1,10	7,72
4	28,7	4,6	179	21,5	7,37	1,44	5,12
5	28,7	6,4	121	14,5	1,99	1,65	1,21
6	28,7	6,4	121	21,5	3,59	0,68	5,28
7	28,7	6,4	179	14,5	1,29	1,57	0,82
8	28,7	6,4	179	21,5	3,09	1,42	2,18
9	33,3	4,6	121	14,5	3,64	0,70	5,20
10	33,3	4,6	121	21,5	1,93	0,86	2,24
11	33,3	4,6	179	14,5	3,66	1,46	2,51
12	33,3	4,6	179	21,5	5,65	1,52	3,72
13	33,3	6,4	121	14,5	2,87	1,10	2,61
14	33,3	6,4	121	21,5	2,48	0,69	3,59
15	33,3	6,4	179	14,5	2,15	1,84	1,17
16	33,3	6,4	179	21,5	2,65	0,97	2,73
17	27,0	5,5	150	18,0	1,31	0,92	1,42
18	35,0	5,5	150	18,0	1,34	0,78	1,72
19	31,0	4,0	150	18,0	5,83	1,04	5,61
20	31,0	7,0	150	18,0	1,27	1,15	1,10
21	31,0	5,5	100	18,0	7,43	1,15	6,46
22	31,0	5,5	200	18,0	4,87	1,28	3,80
23	31,0	5,5	150	12,0	5,66	1,09	5,19
24	31,0	5,5	150	24,0	6,18	1,18	5,24
25	31,0	5,5	150	18,0	6,45	1,09	5,92
25	31,0	5,5	150	18,0	5,83	1,16	5,03
25	31,0	5,5	150	18,0	6,66	1,44	4,63
25	31,0	5,5	150	18,0	6,67	1,12	5,96
25	31,0	5,5	150	18,0	5,85	1,22	4,80
25	31,0	5,5	150	18,0	6,45	1,37	4,70

-Análisis de regresión:

A través de este análisis se observa que el efecto lineal de la temperatura es altamente significativo, mientras el resto no son estadísticamente significativos en la variable respuesta. En los efectos cuadráticos se aprecia que la temperatura y el pH son altamente significativos no así la velocidad de agitación y el tiempo de fermentación. Los efectos cuadráticos cruzados no son estadísticamente significativos, a excepción del efecto cruzado de la velocidad de agitación y pH, que sí es altamente significativo, esto debido a que la velocidad de agitación está relacionada con la velocidad de transferencia de oxígeno, la cual afecta el metabolismo celular, alterándose el pH.

- Establecimiento del modelo de regresión:

De acuerdo a los coeficientes de regresión estimados, el modelo de regresión completa sería:

$$\text{Act. Enzimática} = -271,56 + 17,37 X_1 + 4,87 X_2 + 0,21 X_3 - 1,65 X_4 - 0,30 X_1^2 - 1,16 X_2^2 - 0,00001 X_3^2 - 0,007 X_4^2 + 0,28 X_1 X_2 - 0,0033 X_1 X_3 + 0,0126 X_1 X_4 - 0,032 X_2 X_3 + 0,156 X_2 X_4 + 0,0044 X_3 X_4$$

- Análisis Canónico de la Superficie de Respuesta:

En la Tabla 5 se presentan los valores críticos de los factores con los cuales se obtiene el valor de la actividad enzimática en el punto estacionario o crítico, siendo este de 8,61 U/ml, que se logra bajo las condiciones de 28,67°C, pH 2,53, 181,08 r.p.m., las cuales se encuentran dentro de los rangos estimados en el diseño experimental, a excepción del tiempo, el cual se sale del rango estimado. Los autovalores muestran que el punto estacionario es un punto de silla o de máximo-mínimo ya que dichos valores fueron de diferentes signos. Debido a esto se realizó seguidamente el análisis de

Ridge para la respuesta máxima y mínima, este análisis permitir estimar la respuesta óptima de la actividad enzimática y los niveles de los factores considerados para lograr esa respuesta.

TABLA 5

Valores críticos obtenidos mediante el análisis canónico de la Superficie de Respuesta para la variable actividad enzimática de los extractos enzimáticos

Factor	Valor crítico	Rango utilizado
T	28,67	27-35
p	2,53	4,0-7,0
V	181,08	150-200
t	-7,09	12-24

Punto estacionario: 8,61 U/ml

T = temperatura (°C) p = pH

V = velocidad de agitación (r.p.m.)

t = tiempo (h)

- Análisis de Ridge:

El análisis de Ridge conlleva a la optimización del proceso con respecto a la actividad enzimática, cuando se obtiene un punto silla o de máximo y mínimo. En este caso el interés es encontrar los niveles de los factores en los cuales se obtiene una mayor actividad enzimática (8,25 U/ml), siendo estos: temperatura 30,3°C, pH 4,68, velocidad de agitación 190,76 r.p.m y tiempo de fermentación 18,55 h, sin embargo para efectos de operación del equipo y trabajo en el laboratorio, la velocidad se ajustó a 191 r.p.m y el tiempo a 18,5 h, lo cual no afectó la variable respuesta. Los valores de temperatura y pH encontrados a través de este análisis coinciden con los señalados en la bibliografía en la producción de esta enzima por levaduras (1,3,16-18), sin embargo no hay concordancia entre la velocidad de agitación y el tiempo de fermentación indicado entre estos autores. En este sentido autores han señalado con la misma levadura bajo estudio, el uso de 80 r.p.m. por un tiempo de 56 a 70 h (17) hasta 200 r.p.m. x 10 h (19). Otros autores con la levadura *K. fragilis* han indicado la utilización de 120 r.p.m. x 24 h (3), hasta 175 r.p.m. x 18 h (13,16). Con *K. marxianus* algunos autores reportan 400 r.p.m., sin considerar el tiempo de agitación utilizado (1) y otros señalan 200 r.p.m. x 10 h (18); es de hacer notar que esta variabilidad entre la velocidad de agitación y el tiempo de fermentación utilizado depende de la geometría del equipo empleado. Así mismo cabe resaltar que se ha logrado optimizar a través de la MSR, la composición de un medio de cultivo, para *Kluyveromyces fragilis*, utilizando en la fermentación una temperatura de

30°C y 130 r.p.m. durante un tiempo de 14 h, reportándose una actividad enzimática de 6,51 U/ml (20).

Purificación del extracto enzimático

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en el proceso de purificación del extracto crudo de la enzima. Se puede apreciar que se obtuvo un menor rendimiento (50,8%), pero más pureza (7,4 veces), en comparación con lo encontrado con este mismo solvente, por otros autores con *Kluyveromyces fragilis*, (13) (97% y 2,74 veces de purificación), no obstante en nuestro trabajo se encontró mayor rendimiento y pureza a lo reportado con *K. marxianus* (1).

TABLA 6

Purificación del extracto enzimático

Fracción	Volumen (ml)	Actividad		Rendimiento (%)	Purificación (veces)
		enz. (U/ml)	Proteína (mg/ml)		
Extracto crudo	100	7,50	2,09	100	1
Precipitado con acetona	12	31,72	1,19	50,8	7,4

Temperatura y pH óptimos de la lactasa producida por *Kluyveromyces lactis*

Los resultados obtenidos en la determinación de la temperatura óptima de la enzima se muestran en la Figura 1. De acuerdo a estos resultados, la mayor actividad enzimática (46,6 U/ml) ocurre a la temperatura de 60°C. Este valor es similar al encontrado por otros autores con la misma levadura bajo estudio (17), pero es aproximadamente 10°C mayor a lo indicado en lactasa producida por otras levaduras (1,3,18). Con este valor de temperatura óptima se llevo a cabo la determinación de pH óptimo. Con respecto al pH se puede notar en la Figura 2, que el valor de mayor actividad enzimática (67,2 U/ml) ocurre a un pH de 6,2, lo cual coincide con la literatura revisada en lactasa producida por *Kluyveromyces fragilis* (3) y *Kluyveromyces marxianus* (1); aunque es menor al señalado por otros autores con esta última levadura (pH 7) (18). Estas diferencias entre las temperaturas y pH óptimos, parecieran intrínseco a la cepa utilizada en la producción de la enzima.

FIGURA 1

Efecto de la temperatura sobre la actividad de la β -galactosidasa producida por *Kluyveromyces lactis*

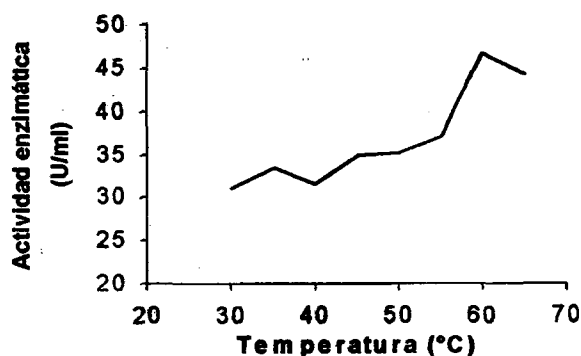
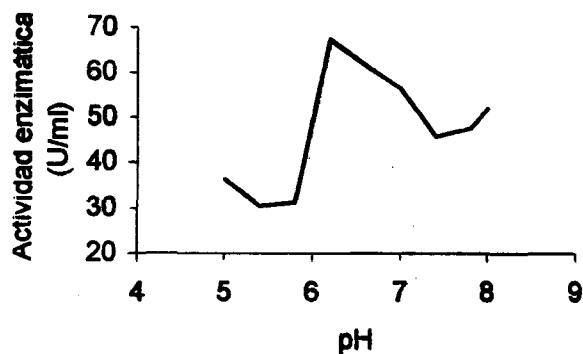


FIGURA 2

Efecto del pH sobre la actividad de la β -galactosidasa producida por *Kluyveromyces lactis*



CONCLUSIONES

El suero lácteo desproteinizado sirvió como base para la formulación de un medio de cultivo para levaduras capaces de hidrolizar la lactosa, debido a que presenta en promedio un contenido de lactosa de 4,85%.

En la optimización del proceso de producción de la β -galactosidasa por *Kluyveromyces lactis*, a partir de éste sustrato se pudo establecer como condiciones óptimas las siguientes: temperatura 30,3°C; pH 4,68; velocidad de agitación 191 r.p.m. y un tiempo de fermentación 18,5 h., notándose a través del análisis de regresión, que la temperatura fue el factor que más influyó en la producción de enzima por la levadura *Kluyveromyces lactis*.

El análisis canónico detectó que el punto crítico era un punto de silla, y mediante el análisis Ridge se logró optimizar la variable respuesta, que era la actividad enzimática.

La purificación parcial de la enzima con acetona, condujo a un rendimiento de 50,8% y una purificación de 7,4 veces del extracto enzimático.

La temperatura óptima de la enzima purificada fue alta (60°C), por lo cual esta enzima puede ser usada en productos lácteos pasteurizados, debido a que se incrementaría la hidrólisis de la lactosa, igualmente el pH de la enzima purificada fue de 6,2, lo cual favorece el uso de esta enzima en la hidrólisis de la lactosa en leche y productos lácteos que tienen un pH similar.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su reconocimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (C.D.C.H), por el financiamiento de esta investigación (Proyecto N°01.37.4108.98).

REFERENCIAS

- Goncalves J y Castillo F. Partial Purification and Characterization of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. J. Dairy Sci. 1982; 65(9):2088-2094.
- Michel A, Jacob F, Perrier J y Poncet S. Yeast Production from Crude Sweet Whey. Biotechnology and Bioengineering. 1987; 30(6):780-783.
- Sánchez L y Castillo F. Producción, Extracción y Caracterización Parcial de β -D-galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* Crecida en Suero de Leche. Acta Cient Venez. 1980; 31:154-159.
- Ward O. Biotecnología de la Fermentación. Principios, Procesos y Productos. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza. España, 1989.
- Zambrano P. Producción de proteína unicelular a partir de suero desproteinizado. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía - UCV, 1997.
- Bigeles R. Carbohidrasas. Cap. 6. En: Enzymes in Food Processing. Ed. by T. Nagodawithana y G. Reed. 3rd. Edition. Academic Press, Inc., 1993
- Veisseyre R. Lactología Técnica. Cap. XVII. 2da. Edición. Editorial Acribia. Zaragoza. España, 1988.
- Zall R. Trends in whey fractionation and utilization, a global perspective. J Dairy Sci. 1984; 67(11):2621-2629.
- Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC. 15th. Edition. Washington D.C., 1990.
- Nelson N. Nelson-Somogy modification colorimetric method for determination reducing sugar. J Biol Chem. 1944; 153:375-380.
- Chacin F. Diseño y análisis de experimentos para generar superficie de respuesta. Trabajo de Ascenso. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela., 1993.
- Lowry C, Rosenbrough N, Farr R y Randell R. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193:265.
- Mahoney R y Whitaker J. Purification and Physicochemical Properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. J Food Sci. 1978; 43:584-591.
- Cotton S. The utilization of permeates from the ultrafiltration of whey and skim milk. J Soc Dairy Techn. 1980; 38 (4): 97-100.

15. Bertsch A. Elaboración de vino a partir de permeado obtenido por ultrafiltración de suero láctico. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 1995.
16. 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. 1975; 58(11):1620-1629.
17. Foda M, Mohammed S y Hussein L. Production of Lactase from *Kluyveromyces lactis* Propagated in Media with Different Sodium Chloride Concentrations. Zentralbl. Mikrobiol. 1988; 143:583-590.
18. Ku M y Hang Y. Production of Yeast Lactase from Sauerkraut Brine. Biotechnology Letters. 1992; 14(10):925-928.
19. Flores M, Voget C y Ertola R. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. Enzyme Microb Technol. 1994; 16: 340-346.
20. Chen K, Lee T y Hounng, J. Search method for the optimal medium for the production of lactase by *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme Microb Technol. 1992; 14: 659-664.

Recibido: 11-06-2002

Aceptado: 30-04-2003