

## Artículo original

# Efecto de la concentración de lactosa sobre la producción de $\beta$ -D-galactosidasa a partir de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8554 en cultivo por lote alimentado

Gisela Páez, Aracelys Pérez, Karelen Araujo\*, Zulay Mármol, Marisela Rincón

Laboratorios de Tecnología de Alimentos y Fermentaciones Industriales, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Recibido 22 de septiembre de 2011; aceptado 12 de marzo de 2012

**Resumen:** Se estudió el efecto de la concentración de lactosa sobre la producción de  $\beta$ -D-galactosidasa, a partir de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 en cultivo por lote alimentado, utilizando suero de leche como sustrato. Los bioprocesos se llevaron a cabo por triplicado a dos concentraciones de lactosa: 2,3% y 4,7%, pH 5 y temperatura de 35 °C en un biorreactor Bioflo 4000. La extracción de la enzima de las células se realizó empleando tolueno al 2%. La actividad enzimática se determinó evaluando la hidrólisis del o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG). En el cultivo por lote alimentado y suero de leche sin diluir (4,7% de lactosa) se logró obtener una alta densidad celular. Sin embargo, con el suero de leche diluido (2,3% de lactosa) se obtuvo un rendimiento superior en biomasa ( $Y_{x/s}$ ). El cultivo por lote alimentado permitió prolongar la fase de producción de la enzima y mantener la producción (509  $\mu\text{mol/L/10 min}$ ) por un período de tiempo superior al referenciado en el cultivo por carga.

**Palabras clave:** lote alimentado,  $\beta$ -D-galactosidasa, lactosa, *Kluyveromyces marxianus*, suero.

## Effect of lactose concentration over $\beta$ -D-galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8554 in fed batch cultures

**Abstract:** The effect of lactose concentration over  $\beta$ -D-galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8554 in fed batch cultures was studied using milk serum as substrate. The bioprocesses were carried out in triplicate at two lactose concentrations: 2.3% and 4.7%, pH 5 and a 35°C temperature in a Bioflo 4000 bioreactor. The enzyme extraction from the cells was done using 2% toluene. Enzymatic activity was determined evaluating the hydrolysis of o-nitrophenil- $\beta$ -D-galactopiranoside (ONPG). With fed batch cultures and undiluted milk serum (4.7% lactose) we were able to obtain a higher biomass yield ( $Y_{x/s}$ ). The fed batch cultures allowed prolonging the production phase of the enzyme (509  $\mu\text{mol/L/10min}$ ) and maintain production for a longer period of time, higher than that mentioned for load cultures.

**Keywords:** fed batch lot,  $\beta$ -D-galactosidase, lactose, *Kluyveromyces marxianus*, serum.

\* Correspondencia:

E-mail: karelenaraujo@gmail.com

### Introducción

La industria láctea genera grandes cantidades de suero de leche, estimándose una producción mundial mayor a  $10^8$  toneladas por año. Debido a los elevados contenidos de carbohidratos, proteínas y lípidos que exhibe [1], y una Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) entre 30.000 y 40.000 ppm [2], es considerado un subproducto potencialmente contaminante. Sin embargo, el suero de leche es la fuente principal de lactosa y otros nutrientes esenciales y puede ser utilizado como un sustrato económico, fácilmente

disponible para el cultivo de células de microorganismos industriales capaces de producir diferentes metabolitos y proteína unicelular [1-6].

*Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554, es una levadura respiro- fermentativa, debido a que puede generar energía a través del ciclo del ácido tricarbóxico, por fosforilación oxidativa o por fermentación a etanol. Es homotálica y filogenéticamente relacionada con *Saccharomyces cerevisiae* [5,7]. Su principal característica es la capacidad de asimilar lactosa y el empleo de este azúcar como fuente de carbono. Por esta razón, es frecuentemente

aislada de productos lácteos como leche, queso, yogurt y suero [5]. Posee estatus GRAS (Generally Recognized As Safe) y QPS (Qualified Presumption of Safety), es decir, se considera segura para su uso en la industria de alimentos. Esto significa que *K. marxianus* puede utilizarse en diversas aplicaciones biotecnológicas con muy pocas restricciones. Otros aspectos relevantes de esta levadura es que presenta altas velocidades de crecimiento, capacidad de producir enzimas intra y extracelulares y habilidad de crecer a temperaturas de hasta 52 °C [5,8].

Comercialmente la aplicación más importante de *K. marxianus* es la producción de enzimas nativas: inulasa, pectinasa y  $\beta$ -D-galactosidasa [8], enzima utilizada en las industrias de alimentos y del sector farmacéutico [5,7,8]. Es capaz de hidrolizar la molécula de lactosa en glucosa y galactosa, obteniéndose un producto de mayor dulzor, utilizado como edulcorante en repostería y panadería, entre otros. Su incorporación a la leche y otros productos lácteos incrementa la calidad de los mismos al mejorar el sabor, previene los problemas por cristalización de la lactosa y permite el consumo de éstos por individuos intolerantes a la misma [9,10]. Sin embargo, los altos costos para la obtención de esta enzima han limitado su producción. Adicionalmente, altas concentraciones de lactosa en el medio de cultivo producen inhibición del crecimiento y disminución de la cantidad de enzima producida en procesos por carga [3,11]. El cultivo por lote alimentado ha sido utilizado con éxito para obtener cultivos de una alta densidad celular, con el propósito de mejorar la productividad de las enzimas y otros metabolitos [12]; permite obtener un alto rendimiento en biomasa, previniendo la inhibición por sustrato, ya que el medio concentrado se puede agregar continuamente al biorreactor que contiene el medio parcialmente fermentado, favoreciendo de este modo la dilución del mismo [13].

Con la finalidad de proponer una alternativa al problema de contaminación ambiental generado por el lactosuero, además de obtener un producto de interés para la industria de alimentos, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto de la concentración de lactosa sobre la producción de  $\beta$ -D-galactosidasa, a partir de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 en cultivos por lote alimentado, utilizando suero de leche como sustrato.

## Materiales y métodos

*Descripción del medio de cultivo:* Suero de leche dulce, proveniente de la producción de queso prensado, proporcionado por la empresa Lácteos Pacomela C.A., ubicada en La Concepción, estado Zulia.

*Preparación del medio de cultivo:*

*Tratamiento termoácido:* El pH del suero de leche se ajustó a 4,5 con HCl al 20%, se calentó hasta 90 °C, manteniendo la temperatura por 10 minutos, y se dejó enfriar hasta una temperatura por debajo de 35 °C para que precipitaran las proteínas. Posteriormente el suero se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 min, se separó la fase acuosa y se filtró al vacío

con tierra Diatomea para eliminar el resto de las proteínas presentes [14,15].

*Dilución:* El suero fresco desproteinizado se diluyó con agua destilada estéril, en proporción 1:1, para obtener la concentración de lactosa deseada de 2,3% (suero diluido). Mediante la determinación de Brix, con un Refractómetro Bausch & Lomb (USA), se corroboró la concentración del suero.

*Suplementación de nutrientes:* El medio de cultivo, con la concentración deseada de lactosa, se suplementó con extracto de levadura 0,7%, sulfato de amonio 0,8% y sulfato de magnesio 0,05% [3].

*Esterilización:* Se ajustó el pH del medio de cultivo a 5 y se esterilizó en un autoclave Felisa (Ciudad de México, DF, México) a 115 °C y 24,5 psi durante 20 minutos, para su posterior almacenamiento en refrigeración.

*Caracterización del medio de cultivo:*

*Lactosa:* La concentración de lactosa se obtuvo mediante el método de Dubois *et al.* [16].

*pH:* se obtuvo empleando un potenciómetro Metrohm modelo 744 (Herisau, Suiza).

*Nitrógeno:* El porcentaje de nitrógeno se determinó por el método de Kjeldahl [17].

*Proteínas:* Se obtuvo multiplicando el porcentaje de nitrógeno por el factor 6,38 [17].

*Humedad:* Se determinó el porcentaje de humedad siguiendo el método oficial validado por la AOAC (Association of Analytical Communities) [17].

*Cenizas:* Se determinó siguiendo la norma venezolana COVENIN 368:1997 [18].

*Fósforo:* Se determinó siguiendo el método oficial validado por la AOAC [17].

*Microorganismo:* Se utilizó la levadura *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA). La cepa se adquirió liofilizada y se reconstituyó en caldo YM [19]. La ATCC la recibió de Laboratorios Laffer con el nombre de *Kluyveromyces fragilis*, y la mantuvieron con el código N.C Laffer 15, Tipo E; puede encontrarse en otras colecciones como ATCC 34439, CBS 5795 y NRRL Y-1109. En nuestro laboratorio (Tecnología de Alimentos y Fermentaciones Industriales de LUZ) fue cultivada dos veces por semana y almacenada bajo refrigeración a 4 °C. La levadura se mantuvo en tubos de cultivos de 25×150 mm con agar malta levadura (agar YM por sus siglas en inglés) (Merck, Darmstadt, Alemania) en forma de cuña. Los tubos se incubaron aeróbicamente, durante un lapso de 3 días a 25 °C antes de ser utilizados.

*Preparación del inóculo:* El inóculo se preparó a partir de 300 mL (10% del volumen de trabajo) de lactosuero tratado y suplementado; se tomaron 30 mL (10% del volumen utilizado) para preparar la suspensión de *K. marxianus* en 3 tubos previamente sembrados, y se agregaron a los 270 mL del volumen de medio de cultivo restante. Este

inóculo se incubó a 30 °C y 200 rpm, durante 7 horas en una incubadora New Brunswick Scientific INNOVA 4300 (New Jersey, USA).

**Cultivo por lote alimentado:** se utilizó un Bioflo 4000 de 5L (New Brunswick Scientific Co. Inc.). Se comenzó con una operación por carga con 1.500 mL del medio de cultivo (1.200 mL de lactosuero tratado y suplementado y 300 mL de inóculo) durante 7 horas con aireación y agitación constante a 200 rpm, para luego iniciar la alimentación de medio de cultivo fresco durante 7 horas, hasta completar 3L. El volumen restante de 1.500 mL del lactosuero tratado y suplementado se mantuvo refrigerado a 4 °C hasta el momento de la alimentación. La alimentación se adicionó al reactor bajo condiciones asépticas con un flujo de 0,21 L/h utilizando una bomba peristáltica (Watson-Marlow, modelo 323). Se tomaron muestras cada hora y se analizaron determinando su contenido de biomasa, lactosa y actividad enzimática. Esta fermentación se llevó a cabo por triplicado tanto para medio concentrado como diluido.

**Determinaciones analíticas:** se realizaron cada hora, durante todo el proceso de fermentación.

**Densidad celular:** se midió como densidad óptica en un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Varian Cary 50, a una longitud de onda de 580 nm. La densidad óptica se relacionó con la cantidad de biomasa por unidad de volumen a través de una curva de calibración construida previamente [4]. A partir de estos datos, en la etapa inicial por carga se calculó la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_m$ ), la constante de saturación (Ks) y el rendimiento ( $Y_{X/S}$ ) [20].

**Concentración de lactosa:** se determinó empleando el método de Dubois *et al* [16]. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta el momento de ser analizadas.

**Actividad enzimática:** para la extracción de la enzima, la biomasa obtenida de la centrifugación durante 15 minutos en cada hora de toma de muestra, se resuspendió en buffer fosfato 0,1M y pH 6,6 con 2% de tolueno. Se incubó a 37 °C y 200 rpm anaeróticamente durante 5 horas, después de las cuales se centrifugó a 8.500 rpm por 10 min, recuperando el sobrenadante para el ensayo. La actividad enzimática se determinó sobre el sustrato cromogénico ONPG Sigma (St. Louis, Missouri). La actividad sobre el ONPG se obtuvo al incubar 0,1 mL de extracto libre de células con 0,1 mL de ONPG 0,015M y diluidos hasta 3 mL con buffer fosfato a 37 °C por 10 minutos; posteriormente se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 420 nm y se obtuvo la cantidad de ONPG liberado a través de una curva de calibración previamente elaborada. La actividad fue expresada en  $\mu$ moles de ONPG/L/10min, definiéndose como la cantidad de enzima requerida para liberar 1  $\mu$ mol de ONPG al ser incubado a 37 °C durante 10 minutos [21].

**Análisis estadístico:** se aplicó la prueba *t* de Student y

análisis de varianza (ANOVA), para establecer el efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de crecimiento microbiano en cada proceso de fermentación, con un nivel de significancia de  $p < 0,05$  [22].

## Resultados y discusión

En la tabla 1 se presenta la composición del lactosuero fresco, desproteínizado y diluido. Los valores de pH obtenidos para el suero fresco ( $6,5 \pm 0,2$ ) indican que se utilizó un suero dulce [22]. Los valores de pH para el suero desproteínizado ( $5,0 \pm 0,1$ ) y el suero diluido ( $4,9 \pm 0,1$ ) disminuyeron debido al tratamiento termoácido aplicado. El suero desproteínizado presentó una concentración de lactosa (4,7%) ligeramente superior a la del suero fresco (4,6%), debido a la eliminación de sólidos proteicos precipitados. El contenido de proteína presente en el suero fresco ( $0,90\% \pm 0,1$ ), disminuyó en un 51,5% al desproteínizarlo. Los contenidos de cenizas (0,4%) obtenidos del suero fresco fueron menores que los valores reportados [14,23], sin embargo son comparables con los valores reportados por Araujo y col. [3]. Un comportamiento similar se observó para el suero desproteínizado y para el suero diluido.

En la tabla 2 se muestran los parámetros cinéticos del crecimiento ( $\mu_m$  y Ks) de *Kluyveromyces marxianus* en lactosuero a las condiciones de cultivo estudiadas, determinados en la etapa inicial por carga. Las velocidades específicas máximas de crecimiento estuvieron entre 0,6 h<sup>-1</sup> y 0,8 h<sup>-1</sup>; estos valores superaron a los encontrados por Lukondeh *et al* [24] en cultivo por carga (0,37 h<sup>-1</sup>) y lote

Tabla 1. Composición del suero de leche.

	Suero fresco*	Suero desproteínizado*	Suero diluido* (1:1)
pH	6,50 $\pm$ 0,20	5,01 $\pm$ 0,01	4,90 $\pm$ 0,06
Lactosa (%)	4,60 $\pm$ 0,03	4,70 $\pm$ 0,05	2,35 $\pm$ 0,06
Proteínas (%)	0,88 $\pm$ 0,10	0,43 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01
Cenizas (%)	0,42 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,004	0,23 $\pm$ 0,01

\*Valores promedios de tres repeticiones.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de cada bioproceso.

Parámetros cinéticos	Lote alimentado		Carga	
	4,70%	2,35%	4,70%	2,35%
$\mu_m$ (h <sup>-1</sup> )	0,6	0,7	0,7	0,8
Ks (KgS/m <sup>3</sup> )	76,4	38,9	109,5	53,1
X (Kg/m <sup>3</sup> )	8,6	7,4	8,3	6,6
$Y_{X/S}$ (KgX/KgS)	0,2	0,4	0,2	0,3
$Y_{P/S}$ (mmoles ONPG/KgS)	21,8	26,5	14,9	17,8

$\mu_m$ : velocidad específica de crecimiento; Ks: constante de saturación de sustrato; X: concentración de biomasa;  $Y_{X/S}$ : rendimiento de biomasa;  $Y_{P/S}$ : rendimiento de la enzima.

alimentado ( $0,35 \text{ h}^{-1}$ ) y a los determinados por Araujo y col. ( $0,29 \text{ h}^{-1}$ ) [3] en cultivo por carga y a los de Soto y col. ( $0,31 \text{ h}^{-1}$ ) [14] en cultivo continuo y concentraciones similares de lactosa (4%). Estas diferencias podrían explicarse por la estrategia de cultivo empleada, la influencia de las condiciones de ensayo y el tipo de microorganismo empleado.

El cultivo por lote alimentado se inició a la hora 7 (Figuras 1 y 2), tiempo en el cual la concentración de lactosa en el medio fue menor a  $5 \text{ Kg/m}^3$ , tal como se aprecia en la figura 2. Esta estrategia de alimentación ha sido propuesta en otros estudios [24,25] donde se comienza la alimentación al agotarse el sustrato del medio. En la figura 1 se observa que la concentración máxima de biomasa ( $8,60 \text{ Kg/m}^3$ ) se obtuvo con suero sin diluir y superó ligeramente al valor obtenido en la etapa por carga, como se muestra en la tabla 2. Se logró prolongar la producción durante las siguientes 7 horas, hasta

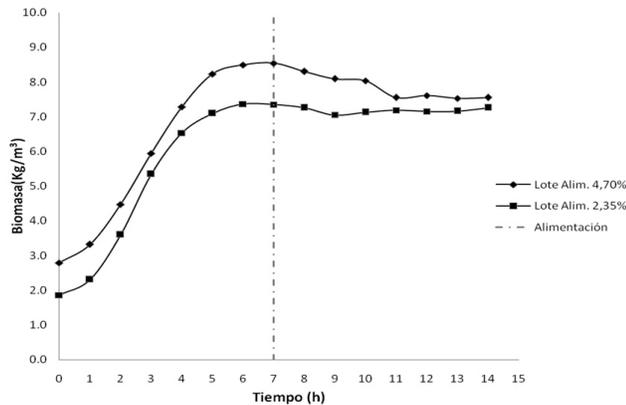


Figura 1. Cinética de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 en cultivo por lote alimentado.

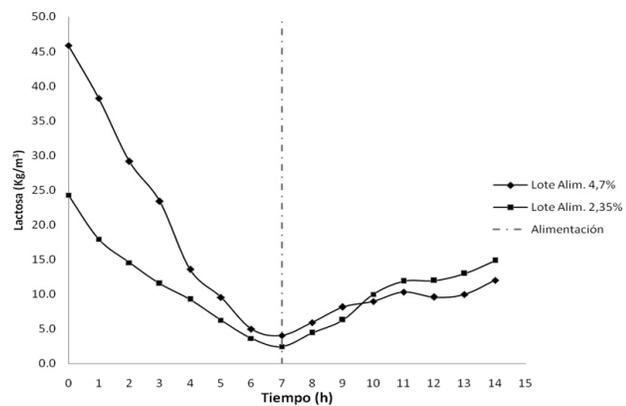


Figura 2. Cinética de consumo de lactosa por *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 en cultivo por lote alimentado.

completar el volumen de trabajo del biorreactor. Barba et al [2] reportan un comportamiento similar para la cinética de la fermentación por lote alimentado de *Kluyveromyces lactis* en suero. La disminución de la concentración celular se explica como producto de la dilución al alimentar el medio fresco durante el proceso por lote alimentado.

El menor valor de  $K_s$  ( $38,9 \text{ KgS/m}^3$ ) se obtuvo con suero diluido. Un menor  $K_s$  indica una mayor afinidad del

microorganismo por el sustrato; a una menor concentración de lactosa (2,35%) se disminuye inhibición por represión catabólica del sustrato [3,26].

En la tabla 2 se presentan los rendimientos en biomasa y producto obtenidos en cada bioproceso, calculados según la metodología propuesta por Ozmihci y Kargi [20]. Existe una marcada diferencia entre los rendimientos de la enzima obtenidos por carga y por lote alimentado. Los mayores valores de rendimientos de producción de la enzima ( $Y_{p/S}$ ) fueron obtenidos en los bioprocesos por lote alimentado, siendo mayor con el suero diluido, ( $26,5 \text{ mmoles ONPG/KgS}$ ). Estos resultados confirman que una baja concentración de lactosa reduce el efecto de inhibición por sustrato.

En la figura 3 se muestra la cinética de producción de la enzima a las diferentes concentraciones de lactosa en cultivo por lote alimentado. Se observa que se incrementó la actividad enzimática durante las primeras horas del cultivo por lote alimentado; la mayor producción se logró con el suero fresco y 4,70% de lactosa, demostrando que esta estrategia de cultivo permite adicionar un medio más concentrado, lo que garantiza una mayor de cantidad de lactosa pero no toda disponible a la vez. Los valores de actividad enzimática a 4,7% y 2,3% de lactosa, mostraron diferencias significativas al aplicar la prueba de  $t$  de Student ( $p < 0,05$ ), lo cual verifica el efecto de la concentración inicial de lactosa sobre la actividad enzimática. Estos resultados concuerdan con los reportados por otros autores [3,11,14].

En la tabla 3 se observan los parámetros analíticos: límite de detección ( $L_{DD}$ ) estimado del método, rango lineal, y factor de correlación ( $R^2$ ), referentes a las curvas de

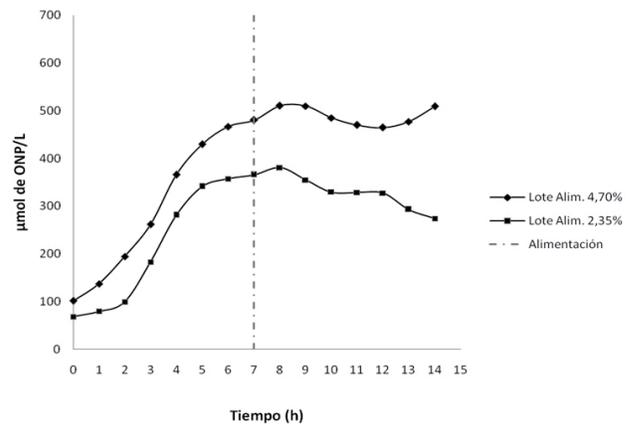


Figura 3. Cinética de producción de la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa por *Kluyveromyces marxianus* en cultivo por lote alimentado.

Tabla 3. Parámetros analíticos de las curvas de calibración: biomasa, lactosa y actividad.

	$L_{DD}$	Rango lineal	$R^2$
Biomasa ( $\text{Kg/m}^3$ )	0,245	0,59 – 5,86	0,997
Lactosa ( $\text{Kg/m}^3$ )	0,009	0 – 70	0,999
Actividad Enzimática ( $\mu\text{moles ONPG/L/10min}$ )	0,038	50 – 600	0,998

$L_{DD}$ : límite de detección del método,  $R^2$ : coeficiente de correlación.

calibración para la determinación de las concentraciones de biomasa, lactosa y actividad enzimática.

## Conclusiones

El cultivo por lote alimentado representa una alternativa biotecnológica para incrementar la producción de la  $\beta$ -D-galactosidasa a partir de suero de leche. La concentración de lactosa en el suero tuvo un efecto significativo sobre la cantidad de enzima obtenida y el rendimiento, alcanzándose una mayor producción con 4,7% de lactosa. El proceso por lote alimentado también favoreció el crecimiento, aunque el rendimiento celular fue mayor con el suero de leche diluido (2,3% de lactosa).

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia, por el financiamiento de esta investigación.

## Referencias

- Cristiani-Urbina E, Netzahuatl-Muñoz AR, Manriquez-Rojas FJ, Juarez-Ramirez C, Ruíz-Ordaz N, Galindez-Mayer J. Batch and fed-batch cultures for the treatment of whey with mixed yeast cultures. *Process Biochem.* 2000; 35:649-57.
- Barba D, Beolchini F, Del Re G, Di Giacomo G, Veglio F. Kinetic analysis of *Kluyveromyces lactis* fermentation on whey: batch and fed-batch operations. *Process Biochem.* 2001; 36:531-6.
- Araujo K, Páez G, Mármol Z, Ferrer J, Ramones E, Aiello C, Rincón M. Efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* y la producción de  $\beta$ -D-galactosidasa (EC. 3.2.1.23). *Rev Tec Ing Univ Zulia.* 2007; 30:64-73.
- Quintero H, Rodríguez M, Páez G, Mármol Z, Rincón M. Producción continua de proteína unicelular (*Kluyveromyces fragilis*) a partir del suero de leche. *Revista Científica FCV-LUZ.* 2001; 9:87-94.
- Lane M, Morrisey J. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fung Biol Rev.* 2010; 24:17-26.
- Gonzalez Siso MI. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores Technol.* 1996; 57:1-11.
- Llorente B, Malpertuy A, Blamdin G, Artiguenave F, Wincker P, Dujon B. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeast. *FEBS Lett.* 2000; 487:71-5.
- Fonseca G, Heinzele E, Wittmann C, Gombert A. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008; 79:339-54.
- Santos A, Ladero M, Gracia F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a  $\beta$ -D-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J Enzyme Microbiol Technol.* 1998; 22:558-67.
- Panesar P, Panesar R, Singh RS, John F Kenedy y Harish Kumar. Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase. *J Chem Technol Biotechnol.* 2006; 81:530-43.
- Montiel X, Carruyo I, Marcano L, Mavarez 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.* 2005; 5:476-82.
- Rech R, Záchia Ayub MA. Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. *Process Biochem.* 2007; 42:873-7.
- Marison IW. Cinética del crecimiento. En: Scragg AH, editor. *Biología para Ingenieros. Sistemas Biológicos en Procesos Tecnológicos.* 1<sup>era</sup> edición. México D.F: Editorial Limusa S.A.; 1996.
- Montiel X, Carruyo I, Ferrer J, Marcano L, Marmol Z, Paez G. Producción de  $\beta$ -D-galactosidasa por *Kluyveromyces fragilis* en cultivo por carga, con lactosuero como sustrato. *Rev Tec Ing Univ Zulia.* 2000; 23:134-40.
- Buitrago G, Soto L, Páez G, Araujo K, Marmol Z, Rincón M. Producción continua de proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* a partir de lactosuero diluido. *Rev Tec Fac Ing Univ Zulia.* 2008; 31:107-13.
- Dubois M, Pilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem.* 1956; 28:350-6.
- Association of Analytical Communities AOAC. *Official Method of Analysis.* Chapter 33. Dairy Products. 15<sup>th</sup> edition. Arlington: AOAC International; 1990. pp. 10-60.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN 368-97). *Leche y sus derivados. Determinación de Cenizas.* 2da revisión. Caracas: Fondonorma; 1997.
- American Type Culture Collection (ATCC). *Yeasts Catalogue.* 8th Edition. Rockville: Maryland; 1990.
- Serpil O, Fikret K. Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed batch operation. *Enzym Microb Technol.* 2007; 41:169-74.
- Mahoney RR, Nickerson TA, Whitaker JR. Selection of strain, growth conditions, and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J Dairy Sci.* 1975; 58:1620-9.
- Montgomery DC. *Diseño y análisis de experimentos.* 1<sup>st</sup> edition. New York: Limusa Wiley; 1997.
- Badui Jergal S. *Química de los Alimentos.* 3<sup>era</sup> edición. México: Editorial Pearson Education; 1999.
- Lukondeh T, Ashbolt NJ, Rogers PL. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2005; 32:284-8.
- Belem MAF, Lee BH. Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *Process Biochem.* 1999; 34:501-9.
- Brunezka D, De Souza C, Ardaillon D, Morais M. The  $\beta$ -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decrease by high concentrations of galactose. *J Current Microbiol.* 2002; 44:379-82.