

# Producción y aislamiento de $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces sp*

Production and isolation of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces sp*

Marino Olivares de la Cruz<sup>1</sup>, Steban Ilich Zerpa<sup>2</sup>,  
José Novoa Vásquez<sup>3</sup>

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue la producción y el aislamiento de  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces sp* cultivada en suero de leche desproteínizado. Se indujo la producción de  $\beta$ -galactosidasa adaptando lactosa a la cepa de *Kluyveromyces sp*, como única fuente carbonada. El suero desproteínizado por termocoagulación fue analizado químicamente, obteniendo 94,5% de humedad, 0,3% de proteína, 4,8% de lactosa y pH 4,6. La producción de  $\beta$ -galactosidasa se realizó en un fermentador de 2 L, el cual contuvo 1350 mL de medio de producción y 150 mL de inóculo, ambos preparados con suero desproteínizado suplementado con 0,15% de extracto de levadura y 0,10% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , ajustado a pH 5,0 y esterilizado en autoclave por 10 minutos a 120 °C. Ambos medios fueron incubados a 30 °C por 19 horas, a 190 rpm y con aireación suave y constante. La extracción de la  $\beta$ -galactosidasa se hizo, primero, separando las células por centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos, y luego, adicionando tolueno a razón del 2% (V/V) y centrifugando a 6 000 rpm por 20 minutos, para obtener el sobrenadante que contuvo a la  $\beta$ -galactosidasa. La  $\beta$ -galactosidasa fue aislada precipitándola con acetona a 0 °C, a razón de 50% (V/V), y separándola por centrifugación a 6 000 rpm por 30 minutos. Se determinó la concentración de proteínas según el método de Lowry et al. y se ensayó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa con O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido como sustrato. Se observó mayor producción de  $\beta$ -galactosidasa al cabo de varias generaciones de adaptación de la levadura a la lactosa, obteniéndose 6,5 U/mL de  $\beta$ -galactosidasa cruda. Se logró aislar  $\beta$ -galactosidasa con un rendimiento del 37,23% y 6,8 veces de purificación. Se concluyó que es posible producir buena cantidad de  $\beta$ -galactosidasa cultivando *Kluyveromyces sp* en suero de leche desproteínizado.

**Palabras clave:** Producción y aislamiento, beta-galactosidasa, *Kluyveromyces sp*.

- 
- <sup>1</sup> Biólogo, Maestro en Ciencias con mención en Bioquímica. Doctorando en Ciencias Biológicas. Profesor de la Universidad Privada Antenor Orrego.
  - <sup>2</sup> Doctor en Ciencias-Área Bioquímica. (Université Catholique de Louvain-UCL, Bélgica, 1988-1993). Profesor de la Universidad Nacional de Trujillo.
  - <sup>3</sup> Biólogo Microbiólogo, Maestro en Ciencias con mención en Biotecnología.

## ABSTRACT

The goal of this research was the production and isolation of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces sp* grown in deproteinized whey. First,  $\beta$ -galactosidase production was induced adapting lactose to the strain *Kluyveromyces sp* as the only carbon source. The deproteinized whey obtained by thermocoagulation was chemically analyzed, obtained 94,5% moisture, 0,3% protein, 4,8% lactose, and pH 4,6. The  $\beta$ -galactosidase production was performed in a 2 L fermentor, which contained 1350 mL of production medium and 150 mL of inoculum, both prepared with deproteinized whey supplemented with 0,15% yeast extract and 0,10%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , adjusted to pH 5,0 and autoclaved for 10 minutes at 120 °C. Both media were incubated at 30 °C for 19 hours, at 190 rpm agitation and aeration smooth and steady. Removal of the  $\beta$ -galactosidase was, first, separating the cells by centrifugation at 6000 rpm for 10 minutes, and, then, adding toluene at a rate of 2% (V/V) and centrifuged at 6 000 rpm for 20 minutes to obtain the supernatant which contained the  $\beta$ -galactosidase. The  $\beta$ -galactosidase was isolated precipitating with acetone at 0 °C at a rate of 50% (V/V), and separated by centrifugation at 6 000 rpm for 30 minutes. We determined protein concentration by the method of Lowry et al. and were tested for  $\beta$ -galactosidase activity with O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside as substrate. A higher  $\beta$ -galactosidase production after several generations of yeast adaptation to lactose was observed, yielding 6,5 U/mL of crude  $\beta$ -galactosidase. Was isolated  $\beta$ -galactosidase with a yield of 37,23% and 6,8 times of purification. In conclusion it is possible to produce good amount of  $\beta$ -galactosidase growing *Kluyveromyces sp*, in deproteinized whey.

**Key words:** Production and isolation,  $\beta$ -galactosidase, *Kluyveromyces sp*.

## I. INTRODUCCIÓN

La producción de enzimas se refiere a los procesos agrupados en varias etapas, siendo las básicas la generación o “producción” celular de la enzima, la recuperación o aislamiento de la enzima (incluye la separación sólido-líquido o clarificación, extracción y concentración) y la purificación en sí de la enzima (Olivares, 1996). La producción de enzimas depende del origen o fuente de la enzima y del fin de su uso o aplicación. En general, todos los seres vivos son fuentes naturales de enzimas; por ello, primero se debe encontrar una fuente apropiada de la enzima de interés, luego, y paralelamente, se debe seleccionar y utilizar los métodos y técnicas más adecuadas para obtener enzima de calidad, con un buen rendimiento y con el menor costo posible de producción. (Olivares, 1996; Todorova y otros, 2006)

La enzima producida es aislada del organismo productor. Las operaciones de recuperación, que a diferencia de la “producción”, no dependen del origen de la enzima sino de su localización extracelular o intracelular, permiten obtener un extracto enzimático crudo capaz de ser purificado. La extracción de una enzima intracelular involucra la disrupción o permeabilización de las membranas celulares. Para ello, existen diversos métodos; como el uso del tolueno. Obtenido el extracto crudo, se procede, por lo general, a

liberarlo de contaminantes principalmente proteicos, es decir, a purificarlo (Olivares, 1996).

La  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -D-Galactósido-galactohidrolasa, EC 3.2.1.23) está bastante distribuida en la naturaleza (Fisher, 1995); se encuentra en plantas (El-Tanboly, 2001), animales y microorganismos (Chitunda, 2001). *Kluyveromyces sp* (Golubev y Golubev, 2004), *K. lactis* (Becerra, 1998; Becerra y otros, 2004; Bridiau y otros, 2006; Chockchaisawasdee y otros, 2005; Ramírez y Rivas, 2003; Rodríguez y otros, 2006), *K. fragilis* (Ladero y otros, 2002) y *K. marxianus* (Lukondeh y otros, 2005; O'Connell y Walsh, 2007) destacan como buenos productores  $\beta$ -galactosidasa extracelular e intracelular, y, según la Administración Estadounidense de Alimentos y Medicamentos (FDA), son organismos GRAS (Generalmente reconocido como seguro), siendo, además, su fuente comercial más usual e importante (Barberis y Segovia, 2002; Rodríguez y otros, 2006).

La  $\beta$ -galactosidasa hidroliza la lactosa hasta glucosa y galactosa, lo cual es de interés nutricional, tecnológico y ambiental. Nutricional, porque un porcentaje alto de la población mundial, en torno al 70% (Chitunda, 2001) o más del 70% (Ladero y otros, 2002) presenta problemas para metabolizar la lactosa de la leche y de los productos lácteos, ello debido a las deficiencias de lactasa intestinal (Berka y otros, 2004), lo cual finalmente provoca una mala absorción e intolerancia.

rancia a la lactosa (Montalto y otros, 2005). Es en el campo tecnológico en donde está más extendido el uso de la  $\beta$ -galactosidasa; su uso en la hidrólisis de la lactosa en la leche, en el suero de leche y en sus respectivos filtrados sigue siendo una de sus más prometedoras aplicaciones en la industria alimenticia (Barberis y Segovia, 2002; Rodríguez y otros, 2006).

La  $\beta$ -galactosidasa también es de interés ambiental porque puede ser utilizada en la eliminación de la lactosa del suero de leche y sus filtrados, residuos de la industria quesera, que, generalmente, son descargados a ríos y desagües (Ramírez y Rivas, 2003), causando problemas ambientales debido a que presentan una alta demanda de oxígeno (Chitunda, 2001).

La  $\beta$ -galactosidasa también es de interés médico y químico-analítico, siendo importante en toxicología debido a que libera metabolitos nocivos de los glicósidos no tóxicos, prolongando así la vida de éstos en el cuerpo, y, también, porque durante los procesos de hidrólisis de la lactosa genera galacto-oligosacáridos (Boon y otros, 2000; Bridiau y otros, 2006; Chockchaisawasdee y otros, 2005).

En consecuencia, conociendo las aplicaciones y el gran potencial de la  $\beta$ -galactosidasa, y lo que significa la disposición de enzimas que permitan rentabilizar sus diversas aplicaciones; y al hecho de no contar en nuestro medio con mayores trabajos alusivos al tema, es que se pretendió evaluar, en base a la reproducibilidad del proceso, la producción y aislamiento de  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces sp* cultivada en suero de leche desproteínizado.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Material biológico

$\beta$ -galactosidasa aislada de *Kluyveromyces sp*, cepa procedente del laboratorio de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

### 2.2. Cultivo stock de *Kluyveromyces sp*

Los cultivos stock de *Kluyveromyces sp* fueron mantenidos a 4 °C y con transferencias mensuales, en agar Saboraud. A partir de estos cultivos stock se indujo la producción de  $\beta$ -galactosidasa en medios lactosados.

### 2.3 Inducción de $\beta$ -galactosidasa

La inducción o estimulación de la producción de

$\beta$ -Galactosidasa por *Kluyveromyces sp* se realizó según lo descrito por Olivares (1998).

### 2.4. Preparación del suero desproteínizado

Para separar las proteínas del suero, se aplicó un tratamiento termoácido. Se ajustó el pH a 4,6 con ácido láctico y, luego, se sometió a 90 °C por 15 minutos para precipitar las proteínas. El suero fue dejado en reposo, luego, filtrado a través de gasa, después, al vacío a través de papel filtro Wathman N° 1. Fue conservado en congelación a 0 °C.

### 2.5. Análisis químico del suero desproteínizado

Al suero desproteínizado se le determinó la humedad (Olivares, 2000), el pH, las proteínas según el método de Lowry y otros (1951), y la lactosa (Ramírez y Rivas, 2003).

### 2.6. Producción de $\beta$ -galactosidasa

#### 2.6.1. Preparación del inóculo

Se obtuvo 150 mL de inóculo, colocando en matraces de 500 mL de capacidad 140 mL de suero desproteínizado y suplementado con 0,15% de extracto de levadura y 0,10% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , el pH ajustado a 5,0, y se esterilizó a 120 °C por 10 minutos. Una vez enfriado, se le adicionó 10 mL del suero desproteínizado-suplementado el cual contuvo un lavado de células crecidas durante 24 horas a 30 °C en un medio de cultivo stock, y se incubó a 30 °C por 19 horas con agitación de 190 rpm (Ramírez y Rivas, 2003).

#### 2.6.2. Fermentación

La  $\beta$ -galactosidasa se obtuvo cultivando *Kluyveromyces sp* en un fermentador de 2 L, el cual contuvo 1,5 L de medio de producción. Para ello, se adicionó los 150 mL del inóculo anterior a 1350 mL del mismo suero desproteínizado utilizado para el inóculo, y se incubó a 30 °C por 19 horas, a 190 rpm y con aireación suave y constante (Ramírez y Rivas, 2003).

### 2.7. Extracción de la $\beta$ -galactosidasa

Luego de la incubación, se centrifugó a 6 000 rpm por 10 minutos para obtener la masa celular, la cual fue lavada con agua destilada para disolver y remover remanentes del medio de producción, y, luego de secarla al vacío, una parte fue refrigerada y otra, congelada.

La masa celular fue resuspendida a razón de 5 a 15% en buffer fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,0 suplementado con  $MgSO_4$  0,5 mM y  $MnCl_2$  0,1 mM (Ramírez y Rivas, 2003). A esta suspensión, se le adicionó tolueno a razón de 2% (V/V), permaneciendo así por espacio de 48 horas a 2-4 °C para la permeabilización de las células.

Luego, se centrifugó a 6 000 rpm por 20 minutos para obtener el sobrenadante que contuvo a la enzima, el cual fue colocado en frío, a 4 °C. La enzima fue precipitada adicionando al sobrenadante acetona a 0 °C hasta una concentración de 50% (V/V). Finalmente, la enzima precipitada fue separada por centrifugación a 6 000 rpm por 30 minutos y conservada a 4 °C.

## 2.8. Determinación de proteínas totales

La concentración de proteínas totales fue determinada por el método de Lowry y otros (1951).

## 2.9. Ensayo de la actividad de la $\beta$ -galactosidasa

La actividad de la  $\beta$ -galactosidasa fue ensayada usando O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) como sustrato. La mezcla reaccionante contuvo 0,9 mL de ONPG 1,7 mM en buffer fosfato de potasio 0,075 M, pH 6,2 conteniendo  $MgSO_4$  2,0 mM y 0,1 mL de preparado enzimático convenientemente diluido. Se incubó por 10 minutos a 37 °C, luego, se detuvo la reacción por adición de 1,0 mL de  $Na_2CO_3$  0,1 M. La liberación de O-nitrofenol fue medido a 420 nm (Ramírez y Rivas, 2003; Olivares, 1998).

Una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1,0  $\mu$ mol de O-nitrofenol en 1 minuto a 37 °C y pH 6,2. Con estos valores de U y de los miligramos de proteínas totales determinados en el paso anterior se calculó la actividad específica (Olivares, 1998).

## 2.10. Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron analizados estadísticamente para evaluar su significancia. Para ello, en sus respectivos casos, se calcularon los promedios, las desviaciones estándar, los coeficientes de variación y se aplicó la "t" de Student para la comparación de promedios.

Para la inducción de la producción de  $\beta$ -galactosidasa, los datos experimentales se obtuvieron

aplicando por separado tres repeticiones de la respectiva generación de la levadura sobre tres unidades experimentales de la variable dependiente (actividad enzimática de la respectiva generación).

Para el suero desproteínizado, los datos experimentales se obtuvieron aplicando por separado tres repeticiones del análisis químico sobre tres unidades experimentales de cada variable dependiente (% humedad, % proteína, % lactosa y pH).

Para la producción y aislamiento de la enzima, los datos experimentales se obtuvieron aplicando por separado tres repeticiones del proceso de producción del extracto enzimático crudo, así como del aislamiento de la enzima con acetona, sobre tres unidades experimentales de cada variable dependiente (actividad específica, tanto del extracto enzimático crudo como de la fracción acetónica).

## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Inducción de b-galactosidasa

Los valores de actividad enzimática del Cuadro 1 muestran que hubo mayor producción de  $\beta$ -galactosidasa al cabo de varias generaciones o cultivos de adaptación de la levadura a la lactosa. Se encontró que la producción de  $\beta$ -galactosidasa es mayor (de 5,00 a 5,20 U) a partir del séptimo cultivo; luego no se observa un significativo aumento. Este fenómeno de inducción coincide con lo señalado por otros autores (Becerra, 1998; Lukondeh y otros, 2005; Olivares, 1998) y reafirma el hecho de que puede inducirse producciones aun mayores de  $\beta$ -galactosidasa, tal como el 152% de mejora en el rendimiento de producción logrado por Becerra (1998).

### 3.2. Análisis químico del suero desproteínizado

El análisis químico del suero desproteínizado (Cuadro 2) muestra valores relativamente parecidos a lo reportado por Becerra (1998), Golubev y Golubev (2004), y Ramírez y Rivas (2003). El 94,5% de humedad, 4,80% de lactosa y pH 4,6 son algo similares a lo encontrado en permeado de suero dulce y en suero desproteínizado (Ramírez y Rivas, 2003). Sin embargo, la proteína (0,30%) es menor a lo encontrado por Ramírez y Rivas (2003), quien determinó un 0,44%. Lo importante y resaltante de esta mayor desproteínización es

que conllevará a mejores determinaciones analíticas de la  $\beta$ -galactosidasa producida por la levadura.

### 3.3. Producción, extracción y aislamiento de la $\beta$ -galactosidasa

En el Cuadro 3 se presentan los valores de la actividad enzimática, concentración de proteínas y actividad enzimática específica, correspondientes al promedio de tres repeticiones para cada una de las dos etapas del proceso de producción y aislamiento de la enzima. Se observa que son menores en comparación a lo obtenido por Ramírez y Rivas (2003) al cultivar *Kluyveromyces lactis* casi en las mismas condiciones que en el presente trabajo. Ello podría deberse a la falta de un mayor tiempo de inducción, a la constitución genética de la levadura no tan favorable para una buena producción de enzima (Becerra, 1998), o, en todo caso, a las características propias de la metodología empleada en este trabajo, como por ejemplo, el no trabajar con un buen sistema de enfriamiento para preservar la naturaleza química de la enzima. Sin embargo, se ha logrado aislar la enzima con 6,8 veces de pureza en un solo paso de precipitación con acetona, lo cual es mayor a las 1,4 veces logrado por Fisher y otros (1995) al cultivar *Thermomyces lanuginosus* y precipitar la

enzima con sulfato de amonio, y a las 2,76 veces logrado por El-Tanboly (2001) al precipitar la enzima de *Durio zibethinus* con sulfato de amonio y emplear luego filtración en gel, y casi igual a las 6,2 veces logrado por Olivares (1998) al precipitar la enzima de *Aspergillus niger* con alcohol etílico comercial. Si bien es cierto, Cho y otros (2003) lograron aislar 96,00 veces  $\beta$ -galactosidasa pura de *Bullera singularis*, no obtuvieron un mayor rendimiento (16%) respecto al 37,23 logrado en este trabajo. En el mismo sentido, El-Gindy (2003) logró mayor pureza (59,2 veces) para la  $\beta$ -galactosidasa de *A. carbonarius*, más no un significativo mayor rendimiento (45,3%).

### 3.4. Análisis estadístico

Con excepción de los valores para la tercera repetición, el Cuadro 4 muestra claramente que no existen diferencias significativas entre los promedios de la actividad específica en cada repetición, tanto en la etapa de producción como en la de aislamiento. Esto significa que ambas etapas muestran la reproducibilidad del caso. Esto es sumamente importante toda vez que existen muchas variables externas que constantemente atentan contra la reproducibilidad de los fenómenos naturales y experimentales.

Cuadro 1

#### ACTIVIDAD DE $\beta$ -GALACTOSIDASA EN CULTIVOS SUCESIVOS DE UNA CEPA DE *Kluyveromyces sp* CULTIVADA EN SUERO DE LECHE DESPROTEINIZADO

| Cultivo (Generación) | r <sub>1</sub> | r <sub>2</sub> | r <sub>3</sub> |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|
| 1                    | 0,00           | 0,00           | 0,00           |
| 2                    | 0,02           | 0,03           | 0,01           |
| 3                    | 0,04           | 0,04           | 0,03           |
| 4                    | 0,08           | 0,07           | 0,07           |
| 5                    | 0,90           | 0,95           | 1,09           |
| 6                    | 2,50           | 2,50           | 2,70           |
| 7                    | 5,00           | 5,20           | 5,10           |
| 8                    | 5,20           | 5,40           | 5,30           |
| 9                    | 5,50           | 5,60           | 5,70           |
| 10                   | 5,80           | 5,90           | 6,09           |

r<sub>1</sub>, r<sub>2</sub>, r<sub>3</sub>: repeticiones de los cultivos de levadura sobre tres unidades experimentales de la variable dependiente (actividad enzimática de la respectiva generación: U =  $\mu$ mol O-nitrofenol/minuto/mL de extracto crudo)

Cuadro 2  
ANÁLISIS QUÍMICO DEL SUERO DESPROTEINIZADO

| Característica | Valor Mínimo | Valor Máximo | X     | $\sigma$ | C.V.  |
|----------------|--------------|--------------|-------|----------|-------|
| Humedad (%)    | 93,20        | 97,20        | 94,50 | 1,06     | 1,14  |
| Proteína (%)   | 0,24         | 0,37         | 0,30  | 0,08     | 7,10  |
| Lactosa (%)    | 4,10         | 5,20         | 4,80  | 0,65     | 11,60 |
| pH             | 4,40         | 4,70         | 4,60  | 0,07     | 0,91  |

Cuadro 3  
PRODUCCIÓN Y AISLAMIENTO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASA  
DE *Kluyveromyces sp*

| Fracción              | Vol (mL) | Act.Enz. (U/mL) | Act.Tot (U) | Prot.Tot (mg) | Act.Esp (U/mg) | Rend. (%) | Pur. (vez) |
|-----------------------|----------|-----------------|-------------|---------------|----------------|-----------|------------|
| Extracto crudo        | 100,00   | 6,50            | 650,00      | 186,00        | 3,49           | 100,00    | 1,00       |
| Precipitado acetónico | 10,00    | 24,20           | 242,00      | 10,20         | 23,72          | 37,23     | 6,80       |

Cuadro 4  
PROBABILIDAD Y NIVEL DE SIGNIFICANCIA EN LA COMPARACIÓN DE  
PROMEDIOS DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA PARA LAS TRES  
REPETICIONES DE PRODUCCIÓN Y AISLAMIENTO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASA  
DE *Kluyveromyces sp* CULTIVADA EN SUERO DE LECHE DESPROTEINIZADO

| Fracción              | Estimador  | Actividad específica (U/mg) |                |                |
|-----------------------|------------|-----------------------------|----------------|----------------|
|                       |            | r <sub>1</sub>              | r <sub>2</sub> | r <sub>3</sub> |
| Extracto crudo        | X = 3,49*  | 3,39                        | 3,44           | 3,64           |
|                       | P          | >0,05                       | >0,05          | >0,05          |
|                       |            | >0,01                       | >0,01          | <0,01          |
| Precipitado acetónico | X = 23,72* | 23,30                       | 23,50          | 24,36          |
|                       | P          | >0,05                       | >0,05          | >0,05          |
|                       |            | >0,01                       | >0,01          | <0,01          |

\* Valor promedio con el que se comparan los valores promedio para cada repetición.

### III. CONCLUSIONES

La cepa de *Kluyveromyces sp* procedente del laboratorio de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo (Perú) induce la producción de  $\beta$ -galactosidasa en suero de leche desproteínizado.

El suero de leche desproteínizado constituye un buen sustrato para la producción de  $\beta$ -galactosidasa por *Kluyveromyces sp*.

La cepa de *Kluyveromyces sp* procedente del laboratorio de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo-Perú muestra estabilidad para la producción de  $\beta$ -galactosidasa en suero de leche desproteínizado.

La acetona presenta buena capacidad para aislar o purificar a la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces sp*.

### IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barberis S, Segovia R. 2002. Maximum volumetric production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces fragilis* in fed-batch culture with automatic control. J Chem Technol Biotechnol. 77:706-710.
- Becerra M. 1998. Secreción de la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*. Tesis Doctoral. Universidad de La Coruña. España.
- Becerra M, Rodríguez-Belmonte E, Esperanza M, González S. 2004. Engineered autolytic yeast strains secreting *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase for production of heterologous proteins in lactose media. J Biotechnol. 109(1-2):131-7.

- Berka R, Hucul J, Ward M. 2004. Producción intensificada de  $\beta$ -galactosidasa en *Aspergillus oryzae*. Traducción de Patente Europea ES 2 210 297 T3. España.
- Bridiau N, Taboubi S, Marzouki N, Legoy M, Maugard T. 2006.  $\beta$ -galactosidase catalyzed selective galactosylation of aromatic compounds. *Biotechnol Prog.* 22(1):326-30.
- Boon M, Janssen A, Van'Triet K. 2000. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology.* 26:271-281.
- Chitunda P. 2001. Ingeniería de biocatalizadores y bioprocesos:  $\beta$ -galactosidasa de *Thermus sp* Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. España.
- Chockchaisawasdee S, Athanasopoulos V, Niranjana K, Rastall R. 2005. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* 89(4):434-43.
- Cho Y, Shin H, Bucke C. 2003. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing  $\beta$ -galactosidase from *Bullera singularis*. *Biotechnol Lett.* 25(24):2107-11.
- El-Gindy A. 2003. Production, partial purification and some properties of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus carbonarius*. *Folia Microbiol (Praha).* 48(5):581-4.
- El-Tanboly E. 2001. The  $\beta$ -galactosidase system of a novel plant from durian seeds (*Durio zibethinus*). Isolation and partial characterization. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 4(12): 1531-1534.
- Fischer L, Schekkermann Ch, Wagner F. 1995. Purification and characterization of a thermotolerant  $\beta$ -galactosidase from *Thermomyces lanuginosus*. *App. and Env. Microb.* 61(4): 1497-1501.
- Golubev V, Golubev N. 2004. Selection and study of potent lactose-fermenting yeasts. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 40(3):332-6.
- Ladero M, Santos A, García J, Carrascosa A, Pessela B, García-Ochoa F. 2002. Studies on the activity and the stability of  $\beta$ -galactosidases from *Thermus sp* strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology.* 30:392-405.
- Lowry O, Rosenbraugh N, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurements with the phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry.* 193:265-275.
- Lukondeh T, Ashbolt N, Rogers P. 2005. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 32(7):284-8.
- Montalto M, Nucera G, Santoro L, Curigliano V, Vastola M, Covino M, Cuoco L, Manna R, Gasbarrini A, Gasbarrini G. 2005. Effect of exogenous  $\beta$ -galactosidase in patients with lactose malabsorption and intolerance: a crossover double-blind placebo-controlled study. *Eur J Clin Nutr.* 59(4):489-93.
- O'Connell S, Walsh G. 2007. Purification and properties of a  $\beta$ -galactosidase with potential application as a digestive supplement. *Appl Biochem Biotechnol.* 141(1):1-14.
- Olivares M. 1996. Ensayo: Procedimientos experimentales para la producción, aislamiento y purificación de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* MIT-12. Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú.
- Olivares M. 1998. Uso del alcohol etílico comercial a diferentes valores de pH en la purificación de  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus niger*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú.
- Olivares M. 2000. Análisis proximal bromatológico de seis plantas en estado silvestre. Resúmenes de la VI Jornadas de Investigación en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú.
- Ramírez A, Rivas N. 2003. Production and partial characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* grown in deproteinized whey. *Arch Latinoam Nutr.* 53(2):194-201.
- Rodríguez A, Leiro R, Trillo M, Cerdán M, Siso M, Becerra M. 2006. Secretion and properties of a hybrid *Kluyveromyces lactis-Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase. *Microb Cell Fact.* 5:41.
- Todorova-Balvay D, Stoilova I, Gargova S, Vijayalakshmi M. 2006. An efficient two step purification and molecular characterization of  $\beta$ -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *J Mol Recognit.* 19(4): 299-304.