



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA LACTASA A
PARTIR DE *Kluyveromyces marxianus* PARA APROVECHAMIENTO DE
RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Autores

Steven André León Acosta
Sebastián Rolando Mármol Burbano

Año
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA LACTASA
A PARTIR DE *Kluyveromyces marxianus* PARA APROVECHAMIENTO DE
RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Trabajo De Titulación presentado en conformidad con los
requisitos establecidos para optar por el título de Ingenieros
Agroindustrial y de Alimentos

Profesor Guía

MSc. Valeria Clara Almeida Streitwieser

Autores

Steven André León Acosta

Sebastián Rolando Mármol Burbano

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación del proceso de extracción de la enzima lactasa a partir de *Kluyveromyces marxianus* para aprovechamiento de residuos agroindustriales, a través de reuniones periódicas con los estudiantes Steven André León Acosta y Sebastián Rolando Mármol Burbano, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Valeria Clara Almeida Streitwieser

Master of Science

C.I. 1709603078

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Evaluación del proceso de extracción de la enzima lactasa a partir de *Kluyveromyces marxianus* para aprovechamiento de residuos agroindustriales, de los estudiantes Steven André León Acosta y Sebastián Rolando Mármol Burbano, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

María Elizabeth Mosquera Quelal

Doctora en Ingeniería Industrial

C.I. 1715044192

DECLARACIÓN DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

Declaramos que este trabajo es original, de nuestra autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

Steven André León Acosta
C.I: 1717729469

Sebastián Rolando Mármol Burbano
C.I: 1726765645

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a nuestros padres y hermanas, por haber sido la fortaleza, apoyo, inspiración y motivación. Durante mis estudios universitarios estuvieron acompañándome en cada paso que di y no hay menor duda que soy quien soy gracias a ellos.

A Valeria Almeida por sus frases asertivas que encaminaron a realizar este trabajo de titulación, por orientarme acorde a lo que necesitado y por confiar en mis habilidades durante mi proceso de formación.

A nuestros amigos, por brindarnos su amistad, confianza y apoyo en todo momento, por formar parte de este proyecto de titulación. Anhelando que podamos compartir nuevas y grandes cosas juntos (Sebastián Mármol).

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por ser la felicidad de mis días, por su amor, cariño y sabiduría que me brinda a cada instante, a mi padre y hermana por ser la guía y motivación que me permiten crecer como ser humano. A Dios que guía mi camino y me bendice con la oportunidad de poder compartir mis días con sus seres amados, mi familia.

A mis amigos por todos los momentos compartidos durante esta maravillosa etapa de la vida.

A Sebastián por su admirable dedicación y compromiso para el desarrollo de esta investigación, pero sobre todo por su invaluable amistad y apoyo que me ha permitido vivenciar de la mejor manera la bendición de formarnos como profesionales (Steven León).

DEDICATORIA

Queremos dedicar este trabajo de titulación a Dios, el motor que día a día nos ha dado una oportunidad de desarrollar nuestras habilidades y capacidades, iluminando nuestro camino.

Una especial dedicatoria a Armando Burbano quien desde pequeño me llenó de motivación, me enseñó valores y me ayudó a formar mi carácter y cualidades características mías. Afirmándome siempre que voy a poder alcanzar diversas metas y superar obstáculos a lo largo de mi vida (Sebastián Mármol).

DEDICATORIA

A Dios por iluminar mi camino con su palabra y bendición, a mis padres y hermana por su amor que me han permitido alcanzar cada vez más grandes metas (Steven León).

RESUMEN

Kluyveromyces marxianus es una levadura que presenta aplicación en el campo de la agroindustria principalmente por su capacidad de sintetizar la enzima β -galactosidasa, misma que es responsable de la ruptura de la molécula de lactosa en moléculas de glucosa y galactosa.

La presente investigación tuvo como finalidad evaluar el proceso de extracción de la enzima lactasa a partir de *Kluyveromyces marxianus*. La cepa de levadura LAF-4 CHR Hansen® fue llevado a prueba en medios que emplearon como sustrato al suero de leche descartado por la industria láctea Pronafil. Para lo cual, se puso en evaluación diferentes composiciones químicas del medio de cultivo, la cuales tuvieron como base la utilización del suero de leche. La variable en análisis fue la velocidad de crecimiento.

Una vez realizado el análisis de varianza y posterior análisis funcional de los resultados con diferencias significativas se determinó que las condiciones óptimas a las que *Kluyveromyces marxianus* genera mayor cantidad de biomasa es a un pH de 6,5 y 100% de concentración de suero, seleccionando al tratamiento T9 como el que obtuvo mejores resultados con una producción de 608,43 mg/ml durante 24 horas y una velocidad de crecimiento de 25,35 mg/h.

Finalmente se realizó la extracción de la enzima producida bajo las condiciones correspondientes al tratamiento T9 mediante sonicación. La actividad enzimática se evaluó a través de un método indirecto con el uso de un glucómetro, donde se adicionó la enzima extraída en una dosis de 0,8 g/L a una muestra de leche, al cabo de 40 minutos y a una temperatura de 50°C se evidenció la finalización de la hidrólisis al estabilizarse los niveles de glucosa generados.

ABSTRACT

Kluyveromyces marxianus is a yeast that has application in the field of agribusiness, mainly for its ability to synthesize the enzyme β -galactosidase, which is responsible for the breakdown of the lactose molecule into glucose and galactose molecules.

The purpose of this research was to evaluate the extraction process of lactase enzyme from *Kluyveromyces marxianus*. The yeast strain LAF-4 CHR Hansen® was tested in different culture media, that used whey discarded from the dairy industry as its main component. For this purpose, different chemical compositions of the culture medium were evaluated, which were based on the use of whey. The variable under analysis was the growth rate.

Once the Analysis of Variance (ANOVA) and subsequent Functional Analysis of the results with significant difference was performed, the optimum conditions to which *Kluyveromyces marxianus* generates the greatest amount of biomass was determined, which corresponds a pH of 6.5 and 100% of whey concentration, selecting the treatment T9 as the one that obtained the best results: with a biomass generation equivalent to 608.43 mg / ml for 24 hours and with a growth rate of 25.35 mg / h.

Finally, the extraction of the enzyme produced under the conditions corresponding to treatment T9 was carried out by sonication. The enzymatic activity was evaluated through an indirect method with a glucometer, where the extracted enzyme was added in to a milk sample in a dose of 0.8 g / L, after 40 minutes of maintaining a temperature of 50 °C, the end of the hydrolysis was evidenced, since the glucose levels got stabilized.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo General.....	5
2.2. Objetivos Específicos	5
3. MARCO TEÓRICO.....	5
3.1. Enzimas: Definición y clasificación.....	5
3.1.1. Hidrolasas, tipo de enzimas de interés para el estudio:.....	6
3.1.2. Cinética de Michaelis Menten.....	7
3.2. La lactasa, su importancia en la industria y su obtención:	7
3.2.1. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	9
3.3. Extracción enzimática.....	12
3.4. El suero como medio de cultivo, importancia e impacto ambiental.....	13
3.5. La lactosa y su implicación en la salud del consumidor.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1 Materiales	19
4.1.1. Biológicos	19
4.1.2. Laboratorio.....	19
4.1.3. Equipos.....	19
4.2. Metodología	20
4.2.1. Ubicación del experimento.....	20
4.2.2. Estadística	20

4.2.2.1. Hipótesis	20
4.2.2.2. Factores en estudio	21
4.2.2.3. Esquema del Análisis de Varianza.....	22
4.2.2.4. Análisis funcional	23
4.2.2.5. Unidad experimental.....	23
4.2.2.6. Variable.....	24
4.2.3.1 Preparación del medio de cultivo	24
4.2.3.2 Cuantificación de biomasa en soluciones	25
4.2.3.3 Cálculo de velocidad de crecimiento de la levadura.....	26
4.2.3.4 Extracción de enzima lactasa	27
4.2.3.5 Evaluación de actividad enzimática.....	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1. Evaluación del suero	28
5.2. Preparación y evaluación de los tratamientos	31
5.3. Análisis Estadístico de los resultados de Velocidad de Crecimiento.....	36
5.3.1. Análisis funcional por prueba Duncan 0,01%	37
5.4. Evaluación de la actividad enzimática.....	39
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	41
6.1. Conclusiones.....	41
6.2. Recomendaciones.....	42
REFERENCIAS	43
ANEXOS	52

1. INTRODUCCIÓN

La levadura *Kluyveromyces marxianus* es un microorganismo que presenta aplicación en la industria por su capacidad de sintetizar una amplia variedad de biocompuestos, que incluye: enzimas (β -galactosidasa, β -glucosidasa e inulinasa), proteína unicelular, compuestos aromáticos y etanol (Fonseca, Witmann, Heinzle, & Gombert, 2008). Específicamente, la enzima β -galactosidasa cuenta con la funcionalidad de generar una hidrólisis en la molécula de lactosa, carbohidrato mayoritario de la leche; mediante esta hidrólisis se consigue separar la molécula en glucosa y galactosa. La funcionalidad de esta enzima ha conducido al desarrollo de nuevos productos alimenticios con bajos niveles de lactosa, donde se destacan: leche ultrapasteurizada (UHT), quesos y leches fermentadas con bajos contenidos de lactosa residual, menor al 1% (Herrera, 2013) (Fonseca, Witmann, Heinzle, & Gombert, 2008).

La producción de alimentos constituidos a base de leche con bajos niveles de lactosa residual, está íntimamente relacionado con la presencia del trastorno digestivo conocido como intolerancia a la lactosa, que es la incapacidad que tiene una persona para digerir la lactosa que ingiere a través de la alimentación. Este trastorno no es considerado mortal, pero sí ocasiona malestares gastrointestinales que resultan en la limitación del consumo de alimentos que contengan lactosa (Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud, 2014). La intolerancia a la lactosa afecta principalmente a la población adulta (23 a 68 años de edad), puesto que se ha considerado a el deterioro de la velocidad intestinal como el principal causante de la intolerancia, misma que se expresa con varios síntomas que resultan molestos para quien lo padece, como son: dolor abdominal, náusea, flatulencias o diarrea (Rosado J. L., 2016).

La intolerancia a la lactosa se refiere a la incapacidad del cuerpo para sintetizar suficiente cantidad de enzima lactasa, la cual es responsable de provocar una ruptura de la molécula de lactosa a través de una reacción de hidrólisis. Esta reacción facilita la digestión en el organismo, ya que las moléculas que son generadas como resultado de la hidrólisis constituyen moléculas simples, monosacáridos (Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud, 2014)

En el Ecuador las industrias del sector lácteo han aumentado sus ventas en un 28% a partir del año 2017 en sus productos semi descremados, descremados y deslactosados (FEPALE, 2017), lo que pone en evidencia la tendencia del consumo de alimentos con bajo contenido de lactosa. Por lo tanto, para poder producir alimentos deslactosados, la industria alimenticia requiere tener a su disposición la enzima lactasa (β -galactosidasa); generando así la necesidad de desarrollar nuevas y mejores técnicas para la obtención de esta enzima (Varghes, 2019).

La lactosa es un carbohidrato que está presente de forma inherente en la leche independientemente de su origen animal, es así que la leche procedente de vaca puede presentar un porcentaje de lactosa correspondiente al 5%, mientras que en otras especies su presencia tiende a disminuir (FAO, Portal Lácteo, 2018). Químicamente hablando la lactosa está compuesta por una molécula de glucosa y una de galactosa; esta complejidad en su composición provoca que sea de difícil digestión en ciertas personas, que resultan en la generación de malestares a nivel del aparato digestivo (Varghes, 2019).

La producción de leche en el Ecuador fluctúa alrededor de 5,3 millones de litros diarios (CIL, 2018), los cuales son destinados principalmente a producción de derivados lácteos en cuyo proceso se genera el lactosuero. El lactosuero es un subproducto que se genera principalmente durante la fabricación de quesos,

específicamente al momento de la precipitación de la caseína de la leche. Además, es considerado uno de los materiales más contaminantes dentro de los desechos emitidos por los centros de procesamiento de alimentos, debido a su elevado contenido en materia orgánica, atribuido principalmente a la lactosa; carbohidrato presente en la leche en concentraciones desde 42 a 52 gramos por litro (Padín & Díaz, 2009).

Sin embargo, es conocido que la molécula de lactosa es la responsable de inducir a la producción de β -galactosidasa en la etapa de crecimiento in vitro de *K. marxianus* cuando se hace uso de medios de cultivo compuestos por suero de leche (Barragán, Quicaña, Flores, & Obeso, 2012) (Castillo, Jordán, Abellán, Laencina, & López, 1996). Por ello, se deriva la oportunidad de utilizar el suero de leche como ingrediente principal en la preparación de medios de cultivo orientados al crecimiento in vitro de la levadura, ya que constituye un componente de muy bajo costo, por el hecho de que es catalogado como un desperdicio contaminante dentro de la industria láctea.

La contaminación ambiental a causa del mal manejo de los residuos lácteos ha sido motivo de experimentación de varias técnicas que buscan minimizar dicho impacto, en las que se encuentran el fraccionamiento, la deshidratación y la fermentación; siendo esta última la de mayor aplicación cuando se busca generar un segundo aprovechamiento del lactosuero como componente en la realización de abonos, pesticidas y balanceado animal (Ramírez, 2012). Desafortunadamente, a nivel de América Latina el suero de leche generado como subproducto en la industria es limitado a ser desechado en ríos y fuentes de agua, lo que significa un manejo irresponsable que ciertamente ocasiona contaminación ambiental (Rodríguez, Gómez, Ramírez, & Rosas, 2016). Por lo tanto, se busca generar conciencia en todos los actores de la industria láctea, con el propósito de ampliar el alcance de su sistema de gestión ambiental y que pueda expandirse a generar una mayor eficiencia en sus actividades

productivas, que incluya, el manejo responsable de sus desperdicios y el aprovechamiento de los mismos para la generación de nuevos productos con valor agregado (Giannasi, 2018).

En el Ecuador no se encuentra constituido un sistema industrial para la producción de enzimas principalmente debido a los altos costos que abarca (Epicore, 2017), lo que conlleva a que todo el mercado local adquiera este insumo alimenticio a través de la importación, ya que las enzimas son parte importante en las técnicas y procesos llevados a cabo en la industria para elaborar alimentos (MIPRO, 2018), solo en el año 2018 se realizaron importaciones correspondientes a enzimas y preparaciones enzimáticas por 14,7 millones de dólares, siendo el principal país proveedor Estados Unidos, por un valor de 1,7 millones de dólares, por último el dato global de los últimos 5 años en la importación de enzimas y preparaciones enzimáticas fue de 64,1 millones de dólares (COMEX, 2019).

La presente investigación busca integrar dos aspectos importantes relacionados a la industria láctea, en donde claramente se puede explicar la aplicación del suero de leche como sustrato para la propagación de la levadura *Kluyveromyces marxianus*, además del estudio para determinar las condiciones físicas y químicas para el crecimiento y propagación óptima de la levadura, que incluya la generación de la enzima β -galactosidasa.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar el proceso de extracción de la enzima lactasa a partir de *Kluyveromyces marxianus*.

2.2. Objetivos Específicos

- Demostrar el uso del suero de leche como medio de cultivo para el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus*.
- Identificar las condiciones químicas óptimas para el crecimiento de la levadura.
- Efectuar un análisis de actividad enzimática de la lactasa obtenida.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Enzimas: Definición y clasificación

Una enzima es una sustancia generada a partir de un conjunto de aminoácidos al igual que las proteínas. Principalmente tienen la función de acelerar procesos metabólicos con un nivel de especificidad bastante alto, es decir, que tienen acción sobre un elemento en concreto al que se le conoce como sustrato, el mismo que al ser metabolizado por la enzima da lugar a un producto. El principio del funcionamiento de las enzimas está en catalizar procesos que son llevados a nivel celular, por lo que se encargan de reducir o acelerar la energía contenida en una reacción química, sin generar un desequilibrio. Durante la reacción química la enzima está presente y no pierde su estructura o se modifica y si bien es cierto pueden desarrollarse en diferentes reacciones y procesos hay que tomar en cuenta que la efectividad y eficiencia del proceso metabólico generado por la enzima va a depender

mucho del entorno y condiciones como pH, temperatura, concentración del sustrato y cantidad de enzima involucrada (Vénica C. , Perotti, Wolf, Bergamini, & Zalazar, 2011).

Al igual que las proteínas, las enzimas pueden sufrir de desnaturalización dependiendo de factores como pH o temperatura. Se ha podido determinar que su cambio de fase se da en medios muy ácidos o muy alcalinos y/o también a temperaturas por encima de los 60°C (Cotrino & Gaviria, 2004).

Para la clasificación de las enzimas se han definido el tipo de acción que tienen en la reacción química, principalmente se han definido seis tipos de enzimas los cuales abarcan a un grupo de sustancias con acciones similares pero específicas, dentro las cuales tenemos:

- Oxireductasas
- Transferasas
- Hidrolasas
- Isomerasas
- Liasas
- Ligasas

(WISEMAN, 1985)

3.1.1. Hidrolasas, tipo de enzimas de interés para el estudio

Este tipo de enzimas son de importancia en este estudio puesto que es la clasificación a la que pertenece la enzima lactasa. Las enzimas de hidrólisis se

encargan de la ruptura o degradación de un compuesto a una forma más sencilla del mismo (WISEMAN, 1985).

3.1.2. Cinética de Michaelis Menten

Este principio busca explicar el modo en que actúa una enzima dentro de una reacción en donde están involucrados la enzima y un sustrato. La explicación está en que la reacción de la enzima depende directamente de la cantidad de sustrato presente. Es decir que mientras concentración de sustrato exista mayor será a velocidad de acción de la enzima, tomando en cuenta un aumento lineal de este factor y considerando que las enzimas pueden saturarse (Lee, 2000).

3.2. La lactasa, su importancia en la industria y su obtención

La lactasa es una enzima que se encarga de la hidrólisis de la lactosa. Es decir, se encarga de romper la estructura de la lactosa que emplea como sustrato en glucosa y galactosa entendiéndose como productos. Este proceso de ruptura del carbohidrato genera cambios físicos químicos en las características como solubilidad, digestibilidad, poder edulcorante, viscosidad, textura y reacción de Maillard. Para poder explicar esto se debe conocer que la glucosa y galactosa tienen un mayor poder edulcorante que la lactosa, aproximadamente de 3 veces más, en cuanto a la digestibilidad como antes se mencionó, el organismo humano está preparado para asimilar carbohidratos simples por lo que al romper al disacárido aumenta esta propiedad y finalmente la solubilidad ya que a condiciones normales de 25°C la lactosa tiene un porcentaje de solubilidad en agua del 18% frente al 50% de glucosa y el 25%

de la galactosa; donde se ha podido determinar bajo estudios que su acción oscila en un rango de pH entre 4 y 7 (WISEMAN, 1985).

Las otras tres funciones son denominadas como tecnológicas debido a la influencia en los procesos industriales, en donde se puede aclarar que los carbohidratos simples tienen una viscosidad menor lo que se traduce en un menor efecto de cristalización durante el proceso, también la textura y sabor se ven influenciados gracias a la desencapsulación de la galactosa lo que intensifica estas condiciones y finalmente la reacción de Maillard ya que se ha podido determinar una mayor reacción con proteínas por parte de los carbohidratos simples (HANSEN, 2015).

Se ha visto un aumento a escala del interés de estudiar y aplicar a la enzima lactasa en procesos industriales de mejora y disminución de residuos por parte de la industria láctea. Llevando el proceso de hidrólisis al suero de leche lo que genera un aprovechamiento de este abundante subproducto de la industria (Garbayo, 2018).

Los estudios han posicionado a la lactasa como un sustituto y muy eficiente aditivo para uso en el procesamiento de lácteos. Al realizar el proceso de ruptura se generan unas soluciones que se los conoce como jarabes que puede ser aplicado como sustitutos del jarabe de maíz o también conocido como glucosa (Montiel, Carruyo, Marcano, & Marvárez, 2005).

Gracias a su funcionalidad en la industria se ha visto importante la producción y generación de esta enzima para uso en la elaboración de productos lácteos. Para su producción se han evaluado levaduras que se encargan de fermentar y producir dicha enzima, entre las cuales tenemos *Kluyveromyces marxianus* y

Kluyveromyces lactis. Debido al gran interés en la producción de la enzima no solo tecnológico sino con influencia económica se han planteado estudios que ayuden a definir medios de cultivos, sustratos, condiciones y metodologías adecuadas para optimizar este proceso y obtener resultados favorables, eficientes y rentables (Manera et al., 2008).

La producción de la enzima va a estar medida bajo condiciones favorables del proceso. Es decir que va a tener que ser seleccionado un medio de cultivo con sustrato y nutrientes que favorezcan y potencialicen al crecimiento de la levadura productora de la enzima. Hay que tener en cuenta que el microorganismo va a tener requerimientos específicos, condiciones de desarrollo y etapas de producción. Para lo cual va a ser indispensable realizar un seguimiento del proceso durante las etapas de crecimiento y latencia (Perinia et al., 2013).

3.2.1. *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces marxianus es una levadura aerobia, presente en los productos lácteos, con la capacidad de fermentar, además de su gran importancia biotecnológica para poder desarrollarse en condiciones de temperaturas (42°C) y a concentraciones de soluciones bastante altas (Pozo, Díaz, Ratón, & Pérez, 2011).

Esta levadura fue caracterizada por Hansen en 1888, en donde se la nombro primero como *Saccharomyces marxianus* y fue aislada a partir de un cultivo de uvas, sin embargo, este microorganismo con importancia industrial puede estar presente en derivados lácteos como kéfir y el pulque. Los estudios demuestran que posee la capacidad de desarrollarse en distintos sustratos sin problema,

siempre y cuanto el pH se encuentre en un rango 6 y 7 como preferencia (Gardeazábal, 2013). Sin embargo, se ha podido evaluar su respuesta de propagación en medios más ácidos similares al pH estomacal, en donde se pudo concluir que si bien su biomasa es más limitada no se inhibe por completo su desarrollo a pH de hasta 1.5 (Fonseca, Witmann, Heinzle, & Gombert, 2008)

Tabla 1.

Crecimiento de K. marxianus en pH ácidos

pH	K. Marxianus (UFC/ml)
1,5	1.1×10^3
2	3.2×10^4
2,5	4.1×10^4
3	4.6×10^5
3,5	5.1×10^5
4	3.1×10^6

Tomado de Gardeazábal, 2013.

Dentro de su aplicación se ha visto buenos resultados en la producción de proteína unicelular usando como sustrato al lactosuero, además de la formación de derivados del benceno, alcoholes, ésteres y ácidos carboxílicos.

Generalmente las levaduras pueden fermentar compuestos como glúcidos, donde tenemos hexosas y disacáridos. *Kluyveromyces marxianus* ha tenido estudios para evaluar su actividad en la fermentación de lactosa, fermentación alcohólica y en la producción de enzimas (Kendrick, 2008).

El proceso de fermentación generado por una levadura se ve influida directamente por las condiciones de temperatura, pH, y concentración de azúcares en el medio de crecimiento. En general, levaduras del género *Kluyveromyces* son conocidas como termotolerantes, con adaptabilidad y capacidad de desarrollarse a temperaturas sobre 52°C, se han demostrado por estudios su eficiencia en la producción de etanol a los 50°C, pero específicamente *Kluyveromyces marxianus* tiene sus condiciones favorables localizadas en 49°C con una producción de etanol a 40°C (Arevalo, 1998).

También se ha podido fijar que *Kluyveromyces marxianus* es una levadura con propagación exponencial que tiende a aumentar con el transcurso de tiempo en incubación. Las referencias muestran que la fase logarítmica del microorganismo está dada a partir de la 3 hora en incubación, entra en la fase estacionaria entre las 27 y 36 horas y empieza su descenso a las 39 horas (Gardeazábal, 2013).

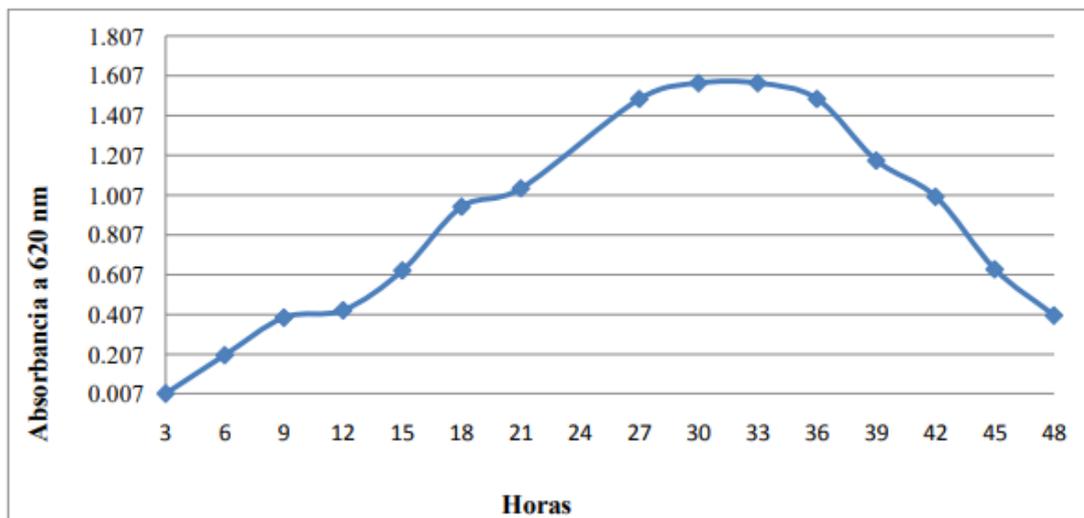


Figura 1. Ciclo de vida de la levadura *K. marxianus*

Tomado de Gardeazábal, 2013.

3.3. Extracción enzimática

Actualmente gracias a la cantidad de estudios que se han realizado en el tema se han determinado que uno de los mejores métodos para realizar la extracción de la enzima lactasa es por medio de solventes orgánicos, dentro de los cuales tenemos tolueno, cloroformo y alcohol isoamílico. La función de los solventes orgánicos en la extracción enzimática favorece a la introducción dentro de la membrana de la célula, logrando llegar al citoplasma sin generar mayor daño de la pared celular (Montiel, Carruyo, Marcano, & Marvárez, 2005).

Según (Montiel, Carruyo, Marcano, & Marvárez, 2005) es importante tener en cuenta no solo el método que se emplea para realizar la extracción sino también las condiciones a las que se expone el proceso. Estas condiciones van a ser directamente relacionados con la eficiencia de la extracción por lo cual es importante tener en cuenta y evaluar el efecto generado por pH, temperatura y tiempos del bioproceso (Kyamuhangire W, 2002).

Para entender un proceso de extracción es importante tener en cuenta algunos factores previos al proceso que determinan los parámetros como el aislamiento enzimático, las propiedades de la enzima, la especificidad del medio y condiciones favorables como temperatura y pH. Hay que considerar también que existen dos tipos de enzimas según su método para extracción, así tenemos las intracelulares y extracelulares. La diferencia está en que las intracelulares requieren de una separación dentro de la célula, en el que se debe penetrar la pared celular a diferencia de las extracelulares que tan solo requieren de un desfase del sobrenadante y biomasa (Feijoo, González, Lema, & Moreira, 2017).

La extracción como tal es un proceso que consiste en remover las partes de la muestra que no son de interés, mediante un conjunto de solventes o químicos que ayuden a degradar las fases que no se necesitan hasta obtener el producto o enzima como tal. A estos procesos se los puede también llamar purificación, mediante los cuales se logra equilibrar al producto biológico de interés (Vazquez, 2013).

Es importante tener claro que en este proceso se encuentran interactuando dos fases, la fase proteica o enzima y la fase líquida o sobrenadante, la segunda es la que después de estos procesos de purificación se degrada gracias a la especificidad con la que actúa el solvente, por eso es importante emplear el específico para el producto biológico que se busca obtener. Finalmente, estos ensayos son llevados a un biorreactor que ayuda a expandir la biomasa generada, a la vez de evaluar la actividad catalítica de la enzima de interés (Vazquez, 2013).

3.4. El suero como medio de cultivo, importancia e impacto ambiental

Se denomina suero o lactosuero a la sustancia con características acuosas que se desprende de la fase orgánica cuando esta inicia un proceso de coagulación. El suero de leche es un líquido con tonalidad amarillenta verdosa, sin embargo, esta característica va a depender mucho de la calidad en la que se encuentre el suero (Navas, 2012).

Se forma a partir de la precipitación de la proteína de la leche conocida como caseína durante la tecnología y transformación de la leche en productos lácteos, en este caso el suero es un subproducto obtenido por el procesamiento de la leche, dicho procesamiento es llevado a cabo debido a la

poca vida útil que se le atribuye al producto en su estado natural además de generar derivados y productos alternos, principalmente en la obtención de quesos. En donde en términos generales se puede hablar de una generación de 9kg de suero por cada kg de queso procesado partiendo de 10L de leche (Badui, 1999).

Como se explicó anteriormente el suero se desprende durante el procesamiento de la leche por lo que la relación de contenido nutricional es alta, aproximadamente del 55% de nutrientes encapsulados. Se podría decir que en el están presentes la mayoría de los nutrientes de la leche y estudios han podido aportar en que podría tener propiedades importantes de desintoxicación y regeneración de la flora intestinal, así como acción sobre el sistema inmune (Navas, 2012).

El suero principalmente está compuesto por agua, aproximadamente un 95% de este componente, 4.8% de lactosa y minerales y un 0.5% de proteína. A diferencia de la proteína de la leche como tal, la proteína del suero es globular, podemos enmarcar a la Beta lactoglobulina y alfa lactoalbúmina, es soluble a condiciones amplias de pH, estudios han podido verificar que en presencia de pH muy ácido también puede mantener su característica de solubilidad siempre y cuando no haya sufrido una desnaturalización (Farfán, 2013). Se podría decir que es sensible a la temperatura y levemente influida por el pH ácido, debido a que su mecanismo para estabilización es por hidratación a diferencia de la caseína que requiere de carga eléctrica.

La Beta lactoglobulina no está presente en la composición de la leche materna por lo que estudios han demostrado que puede producir tendencia a alergias en recién nacidos, por lo que se ha buscado la forma tecnológica de aislar este compuesto en las leches de ingesta para bebés. La alfa lactoalbúmina es parte

del sistema enzimático de la proteína del suero y es la responsable de la síntesis de la lactosa (Badui, 1999).

Existen dos clasificaciones, las cuales han sido divididas por el origen de su obtención:

- Suero de leche dulce: se denomina lactosuero dulce al que se ha obtenido por la hidrólisis de la caseína sin que existan cambios en la cantidad de minerales inicial por lo que el pH en el proceso de coagulación enzimática no ha sufrido mayor cambio (Navas, 2012).
- Suero de leche ácido: se lo conoce así al que durante el proceso de coagulación enzimática genera ácido láctico dando como resultado un pH aproximado de 4.5, además existe un aumento considerado en la composición de minerales en comparación a la inicial de la leche (Navas, 2012).

Como se mencionó anteriormente el lactosuero tiene un alto valor nutricional, por lo que cada vez aumentan las técnicas para el aprovechamiento de este un subproducto de la industria láctea.

Lastimosamente en las industrias lácteas de Latinoamérica no existe una correcta gestión del suero generado. Una parte del suero es destinado a la alimentación del ganado como cerdos o vacas, pero la mayoría es enviada afluentes de agua generando una contaminación ambiental muy marcada.

Se han estudiado técnicas para manejar el lactosuero generado por la industria, en las que se puede destacar el fraccionamiento, la deshidratación y la fermentación; siendo la fermentación la más importante porque le ha

permitido brindarle un valor agregado al suero en la generación de biomasa, proteína celular, insecticidas y solventes (Ramirez, 2012).

Según El Instituto Nacional de Argentina para la tecnología industrial (2010) supone que una industria que reporta 400.00 litros de suero diarios podría contaminar a una población de 1'250.000 habitantes.

Al realizar una caracterización de las aguas residuales mediante DBO y DQO, estudios que ayudan a evaluar la demanda biológica de oxígeno y demanda química de oxígeno, se puede apreciar claramente un aumento en los valores de estos efluentes en zonas donde existe presencia de industrias destinadas al procesamiento de lácteos, considerando que el suero es eliminado sin un tratamiento previo muchas de las veces, lo que ocasiona un notable impacto y da como resultado valores de 60000 mg/L en un DQO (Rodríguez, 2016), lo que claramente es preocupante porque se han fijado estadísticas en donde se explica que una industria promedio debería generar valores de 500-1000 mg/L en sus aguas residuales (INTEMAN, 2012).

3.5. La lactosa y su implicación en la salud del consumidor

La lactosa es el carbohidrato con mayor presencia en la leche, también podemos encontrar en pequeñas cantidades glucosa, galactosa y sacarosa. La lactosa influye directamente junto con los otros carbohidratos en la estabilidad de la leche principalmente cuando es sometida a un tratamiento térmico (FAO, 2018). La lactosa se genera en la glándula mamaria gracias a procesos enzimáticos, en el que tiene actividad la alfa lactoalbúmina, proteína antes mencionada y que está presente en el suero de leche (Badui, 1999).

La lactosa está presente en la leche en un 4.8% aproximadamente, por lo que no se le denomina como una solución saturada, sin embargo, suele usarse como técnica a la concentración de este componente para la elaboración de ciertos derivados lácteos como leche evaporada o condensada (FAO, 2018). Principalmente la lactosa está conformada por dos carbohidratos simples, glucosa y galactosa. Los cuales dependiendo de la forma isométrica en la que han sido acoplados generarán dos tipos de lactosa (Badui, 1999).

La lactosa principalmente se puede clasificar en alfa hidratada y beta anhidra. Las cuales van a variar en sus propiedades como solubilidad, punto de cristalización, temperatura de fusión y poder rotatorio. Dentro de la leche como solución podemos encontrar ambos tipos de lactosa y su vez tanto alfa como beta pueden encontrarse hidratadas o en estado anhidra; sin embargo, se ha podido determinar que son más estables cuando se encuentran como alfa hidratada y beta anhidra (Ling, 2008).

En la leche siempre se van a encontrar ambos tipos de lactosa, pero van a variar en la cantidad presente, debido a que beta anhidra es más soluble en agua esta se encontrará en mayor proporción. Además de esto tiene un poder edulcorante un poco más elevado (Badui, 1999).

En términos generales la lactosa es un carbohidrato complejo que por sí solo no puede ser asimilado en el organismo humano. Es decir, que debe ser sometida a cambios estructurales para que el cuerpo pueda aprovecharlo (Montoya & Sarabia, 2017).

El metabolismo de una persona está preparado para asimilar carbohidratos simples, por lo cual es necesario que la lactosa se hidrolice en sus dos componentes principales: glucosa y galactosa. La intolerancia es conocida por presentar síntomas como dolor abdominal, náuseas, flatulencias y/o diarrea. En términos médicos, se puede explicar que es un desequilibrio entre la cantidad de enzima requerida para la ruptura de la lactosa presente en la mucosa intestinal y la cantidad de lactosa ingerida (Rosado, 2016).

Al no poder ser metabolizada la lactosa presente se fermenta por las bacterias presentes en flora intestinal de forma natural, lo cual genera un desorden a lo que se denomina intolerancia a la lactosa. El problema está influenciado por la cantidad de lactosa que el individuo ingirió, así como la sensibilidad que pueda tener a este carbohidrato y factores metabólicos propios de cada persona como el tiempo de tránsito gastrointestinal. Sin embargo, cabe recalcar que el problema no acaba en la poca o nula asimilación de la lactosa, sino en que puede desencadenar la ineficiencia en la absorción de ciertos minerales, específicamente del calcio (Vénica, Perotti, Wolf, Bergamini, & Zalazar, 2011).

Se ha visto una tendencia al aumento de la intolerancia a la lactosa alrededor del mundo. En donde se ha podido determinar mediante estadísticas que aproximadamente el 70% de la población mundial tiene este problema. Se ha colocado con mayor afectación en países como Japón y China donde el porcentaje es de casi la totalidad de la población, en Latino América, África y el resto de Asia está alrededor del 50% y se ha visto una incidencia directa de esta patología en el tipo de raza, siendo en la raza negra la más afectada frente a la raza blanca (Vénica, Perotti, Wolf, Bergamini, & Zalazar, 2011).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1. Biológicos

- Levadura *Kluyveromyces marxianus* LAF4 Swing de CHR Hansen ®.

4.1.2. Laboratorio

- Matraces
- Embudos
- Vasos de precipitación
- Cubetas de espectrofotometría
- Cajas petri
- Asas microbiológicas
- Caldo PDB
- Extracto de levadura
- Sulfato de amonio
- Sulfato de magnesio
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de sodio

4.1.3. Equipos

- Potenciómetro
- Termómetro
- Planchas de calentamiento
- Micropipetas
- Espectrofotómetro
- Incubadora
- Autoclave

4.2. Metodología

4.2.1. Ubicación del experimento

El experimento se realizó en los laboratorios de microbiología de la Universidad de las Américas sede Qerri ($0^{\circ}10'10.2''S$ $78^{\circ}28'14.5''O$). Los laboratorios presentan una temperatura promedio de entre 16° - $22^{\circ}C$ y una humedad relativa alrededor del 45%.

4.2.2. Estadística

4.2.2.1. Hipótesis

Previo a la ejecución de la experimentación en laboratorio se pretende obtener diferencias significativas al realizar el Análisis de Varianza, por lo que se busca aceptar la hipótesis alternativa y rechazar la hipótesis nula.

- **Hipótesis alternativa (Ha)**

Existe efecto de la composición química del medio de cultivo en el crecimiento in vitro de *Kluyveromyces marxianus*.

- **Hipótesis nula (Ho)**

No existe efecto de la composición química del medio de cultivo en el crecimiento in vitro de *Kluyveromyces marxianus*.

4.2.2.2. Factores en estudio

- **Concentración de Suero de leche (S):** se trabajará con tres concentraciones de suero de leche para cada medio de cultivo.
- **Acidez del medio de cultivo (P):** se evaluarán tres niveles de pH en cada uno de los medios de cultivo.

La descripción de los factores en estudio, sus valores y códigos asignados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2.

Detalle de los factores en estudio

FACTOR	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO	NIVELES
F1	Concentración suero de leche en medio de cultivo	S1	➤ 55%
		S2	➤ 80%
		S3	➤ 100%
F2	Acidez del medio de cultivo	P1	➤ 4,5
		P2	➤ 5,5
		P3	➤ 6,5

Para el estudio estadístico y determinación de la influencia de los factores mencionados se realizaron las combinaciones con el fin de obtener un diseño

con 9 tratamientos, los mismos que están descritos con su composición y nomenclatura en la Tabla 3.

Tabla 3.

Descripción de los tratamientos

No. Tratamiento	Nomenclatura	Descripción
1	S1P1	55% Suero + 4,5 pH
2	S1P2	55% Suero + 5,5 pH
3	S1P3	55% Suero + 6,5 pH
4	S2P1	80% Suero + 4,5 pH
5	S2P2	80% Suero + 5,5 pH
6	S2P3	80% Suero + 6,5 pH
7	S3P1	100% Suero + 4,5 pH
8	S3P2	100% Suero + 5,5 pH
9	S3P3	100% Suero + 6,5 pH

4.2.2.3. Esquema del Análisis de Varianza

A continuación, en la tabla 4, se describe el esquema del Análisis de Varianza utilizando un Diseño Completamente al Azar en arreglo factorial 2 x 3

Tabla 4.

Esquema del Análisis de Varianza

Fuentes de Variación (F de V)	Grados de Libertad (gL)
Total	9
Concentración de suero de leche	2
Acidez del medio de cultivo	2
(Concentración de suero de leche x Acidez del medio de cultivo)	2
Error Experimental	3

4.2.2.4. Análisis funcional

Una vez concluido el análisis de varianza se realizará el análisis funcional a través de la prueba Duncan, en caso de existir diferencias significativas en los resultados.

La prueba de Duncan es un test estadístico que ayuda a realizar una comparación de los valores obtenidos en las medias para definir la aceptación o negación de una hipótesis. Por lo tanto, se eligió esta prueba al resultar apropiada y efectiva cuando se poseen mediciones y variables combinadas en rangos múltiples (Delgado, 2001).

4.2.2.5. Unidad experimental

Estará representada por un matraz que contengan los tratamientos indicados en la Tabla 4.

4.2.2.6. Variable

- Biomasa de *Kluyveromyces marxianus* (g/ml)
- Velocidad de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* (mg/h)

4.2.3 Metodología del experimento

4.2.3.1 Preparación del medio de cultivo

Siguiendo el diseño experimental con dos factores y 3 niveles se elaboraron 9 tratamientos correspondientes a los medios de cultivo.

Para esto, se colocaron 9 matraces de 100ml con 20ml de medio de cultivo, 10% del inóculo y se nutrieron con 0,75% de extracto de levadura, 0,84% de sulfato de amonio y 0,05% de sulfato de magnesio.

Cada medio de cultivo se acondicionó a pH y concentración de suero acorde a lo que planteaba evaluar en el estudio.

Los 9 matraces fueron llevados a agitación con el fin de generar una mezcla uniforme de los insumos incluidos en el medio de cultivo.

4.2.3.2 Cuantificación de biomasa en soluciones

Los tratamientos fueron incubados a 37°C durante 80 horas. Se tomaron muestras periódicas de cada uno con intervalos de una a dos horas y se registró su absorbancia utilizando un espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm; con el fin de establecer una relación entre el valor de la absorbancia y la cantidad de biomasa presente, utilizando como base una curva de calibración realizada con anterioridad en el equipo, en concordancia a la técnica descrita por Montiel, Carruyo, Marcano, Marvárez (2005).

La curva de calibración se realizó en base a 10 diluciones secuenciales del inóculo en agua destilada, en tubos de ensayo donde se agregó 1ml de inóculo y se aforó con 9ml de agua destilada, hasta que la dilución 10 corresponda a 10ml del inóculo puro, como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5.

Preparación de la curva de calibración

Solución madre			
Kluyveromyces			
Soluto:	marxianus	Solvente: Caldo PDB	
Diluciones:	Concentración (mg/ml)	Soluto (ml)	Solvente (ml)
1	0,1	1	9
2	0,2	2	8
3	0,3	3	7
4	0,4	4	6
5	0,5	5	5
6	0,6	6	4
7	0,7	7	3
8	0,8	8	2
9	0,9	9	1
10	1	10	0

Las mediciones se realizaron por triplicado, por un periodo de 80 horas con el fin de establecer el punto máximo de producción de biomasa y el ciclo de vida de la levadura *Kluyveromyces marxianus*.

4.2.3.3 Cálculo de velocidad de crecimiento de la levadura

Una vez obtenidos los datos de absorbancia por cada tratamiento se realizó el cálculo de velocidad de crecimiento de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$V. \text{ crecimiento } \left(\frac{mg}{h} \right) = \frac{\text{Biomasa máxima (mg)} - \text{Biomasa inicial (mg)}}{\text{Tiempo de incubación (h)}}$$

(Ecuación 1)

4.2.3.4 Extracción de enzima lactasa

Una vez definido que las condiciones óptimas de concentración de suero y acidez del medio de cultivo correspondían a el tratamiento 9 (100% de suero; pH 6,5), ya que éste fue el tratamiento que demostró mayor velocidad de crecimiento, se procedió a incubar el inóculo por 24 horas a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo se tomó 13ml del inóculo y se colocó en tubos falcom; acción que se hizo por triplicado.

Las muestras se llevaron a la centrifugadora a 8500rpm durante 15 minutos, y se procedió a desechar el sobrenadante con el fin de aislar el pellet. Seguido, se aforó cada tubo a 3ml con agua destilada y se homogenizó la muestra. Posteriormente, se llevaron las muestras al sonicador, mismo que se encontraba previamente configurado a una amplitud de 40%, con duración de 4 minutos y con pausas de 1 minuto.

En el sonicador cada muestra (un tubo falcom) se colocó dentro de vaso de precipitación de 250 ml con hielo, sal y 125ml de alcohol al 70%. Procurando conservar el resto de muestras en un fuente con hielo para conseguir un ambiente con temperatura estable alrededor de 4°C.

Posterior a esto los tubos falcom fueron llevados nuevamente a centrifugación 10000rpm durante 10 minutos con el fin de separar la enzima contenida en el sobrenadante del residuo sólido correspondiente a la pared celular de la levadura.

4.2.3.5 Evaluación de actividad enzimática

Para determinar la actividad enzimática se tomó como referencia un método indirecto correspondiente a la medición de glucosa. Se utilizó una muestra de leche entera comercial para evaluar la variación de glucosa en la muestra.

Se empleó un equipo medidor de glucosa marca PRODIGY, siguiendo la técnica descrita por Amamcharla & Metzger (2011). La técnica antes mencionada consiste en colocar una muestra de leche en una tira reactiva que al introducirla en el equipo es detectada por el sensor arrojando un dato de nivel de glucosa en mg/dl, la aplicación de esta técnica al estudio se enfoca en ir realizando mediciones progresivas de la muestra de leche con enzima para ir tomando los datos del aumento de la glucosa concentrada.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Evaluación del suero

El procedimiento descrito en el Anexo 7 hace referencia a la metodología empleada para el pre-tratamiento realizado al suero de leche a ser destinado como base para la preparación del medio de cultivo. La información obtenida al

realizar dicho pre-tratamiento se encuentra descrita a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6.

Valoración del suero

Valoración suero		Tratamiento térmico		Filtrado	
Muestra (ml)	300	Muestra (ml)	300	Muestra inicial (ml)	100
pH inicial	5.45	Calentado (°C)	90	Tiempo (min)	9
H2SO4 3.5M (ml)	35	Tiempo (min)	12	Muestral final (ml)	20
pH ajustado	4.5	Enfriado (°C)	35	Sólidos solubles (%)	7
Sólidos solubles (%)	7.3	Tiempo (min)	62		

El suero recolectado de la empresa Pronafil se encontraba a un pH de 5.45 a temperatura de 13°C y una concentración de sólidos solubles igual a 7.3%. Con base a la referencia consultada (Manera, Ores, Ribeiro, & André, 2007) el suero de leche debería tener un pH de 5.5; lo que comprueba que el suero empleado en el laboratorio para el estudio se encontraba dentro del rango recomendado por la técnica guía.

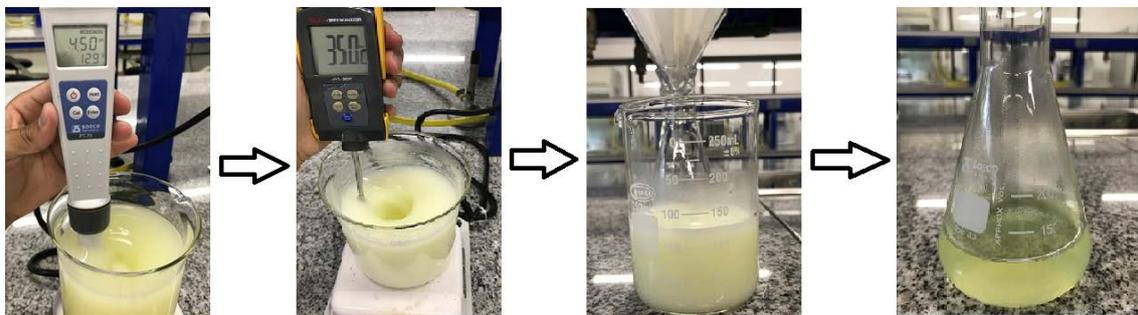


Figura 2. Esquema del tratamiento térmico al suero

La metodología descrita por Araujo et al. (2010), indica que para el proceso de valoración del suero se requiere un ajuste del pH a 4.5, para lo cual se adicionó H₂SO₄ 3.5M a la muestra de 300ml de suero, el H₂SO₄ fue adicionado con pipeta a temperatura ambiente y constante agitación, que por consiguiente se pudo llevar a un tratamiento térmico en el cual se logró desproteínizar al medio después de mantener en una plancha térmica durante 12 min a 90°C y agitación. La bibliografía explica que el procedimiento se debe efectuar durante 10 minutos a 90°C; sin embargo, se adicionaron 2 minutos considerando variaciones leves de la temperatura en la plancha que no se podían estabilizar a un valor fijo (Araujo, 2010)

Una vez concluido el tratamiento térmico, se mantuvo en agitación constante con el fin de enfriar la muestra a 35°C, dicho proceso tuvo una duración de 62 minutos. De esta forma se retiró la muestra de la plancha y se separó en tres vasos de precipitación para poder hacer un filtrado por triplicado, cada uno con 20 ml de suero desproteínizado.

Siguiendo, la metodología de Araujo et al. (2010), se filtró en matraces preparados con embudos, papel filtro y 2 gramos de tierra de diatomeas, al transcurrir 9 minutos concluyó el goteo de la separación de fases obteniendo un cambio notorio en la mezcla inicial. Se pudo observar que el papel filtro contenía una sustancia con una tonalidad blanquecina y que el líquido recolectado en los matraces, tenía una coloración verdosa y más transparente que el original.

Considerando que el proceso de filtrado retiene hasta un 51.5% de las proteínas presentes en el suero (Páez, Pérez, Araujo, Mármol, & Rincón, 2012), se tomó el líquido recolectada en el matraz y se desechó el papel filtro

con el excedente de muestra correspondiente a las proteínas retenidas. En cada uno de los matraces se obtuvieron 20 ml de suero.

5.2. Preparación y evaluación de los tratamientos

Una vez realizado el tratamiento térmico y desproteinizado del suero, se procedió a preparar los tratamientos de experimentación para la determinación de las condiciones para el crecimiento óptimo de la levadura *Kluyveromyces marxianus*, de la siguiente forma:

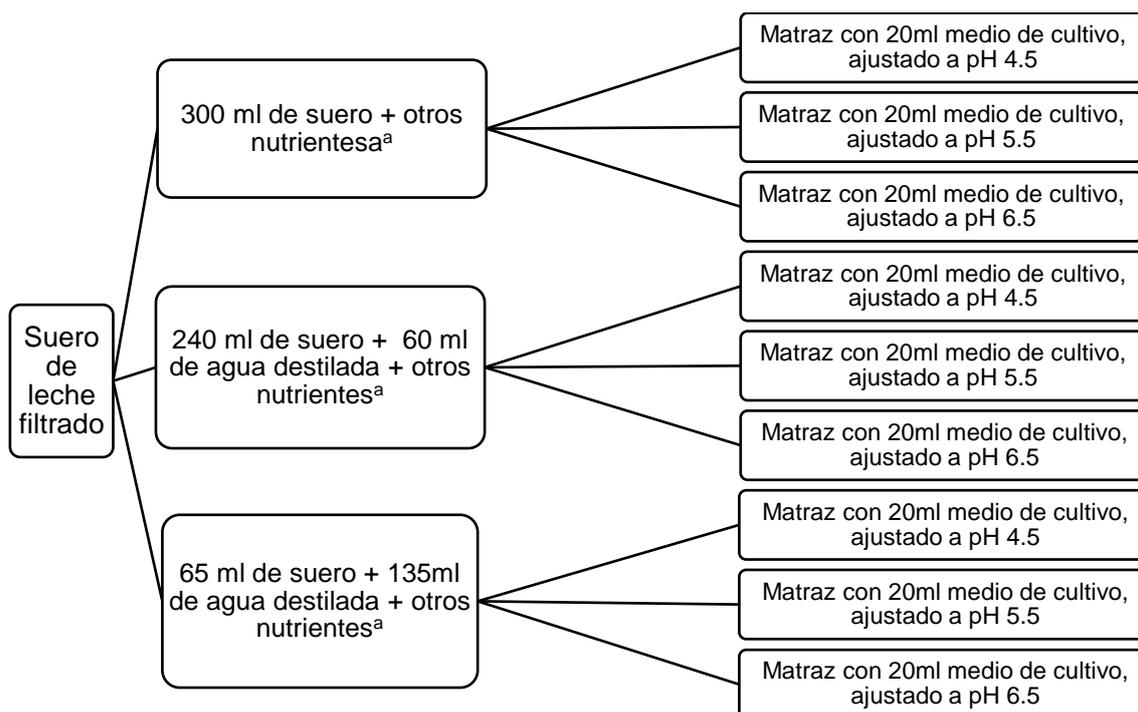


Figura 3. Composición de los tratamientos

^a Otros nutrientes: 2.25g de extracto de levadura + 2.52g de sulfato de amonio y 0.15g de sulfato de magnesio

Con el fin de poder medir la cantidad de biomasa, se utilizó como referencia el estudio efectuado por Montiel, Carruyo, Marcano & Marvez (2005), en el mismo que se empleó una curva de calibración para evaluar la biomasa en relación de los miligramos producidos por mililitros de solución. Por subsecuente se prepararon los estándares para construir la curva de calibración a ser medida en una longitud de onda de 600nm.

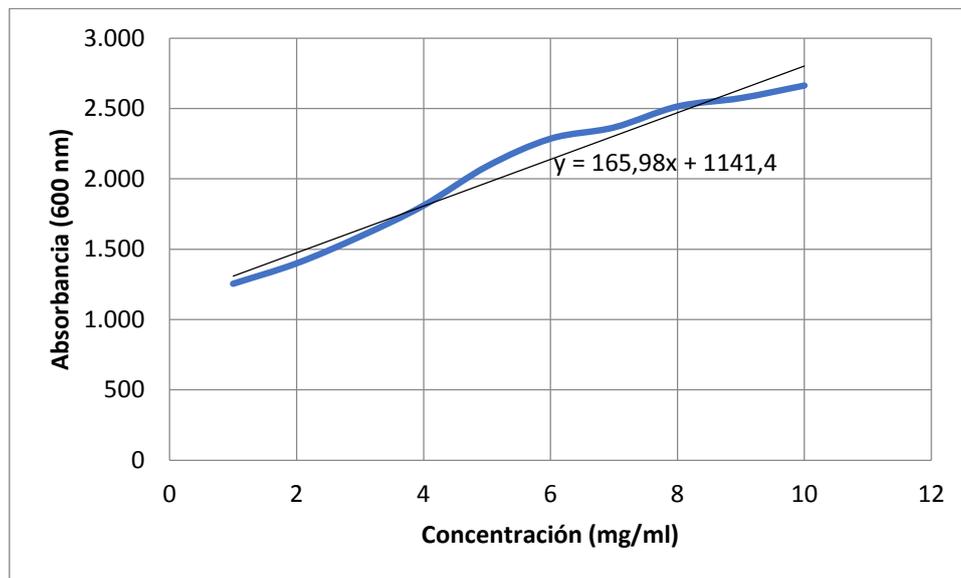
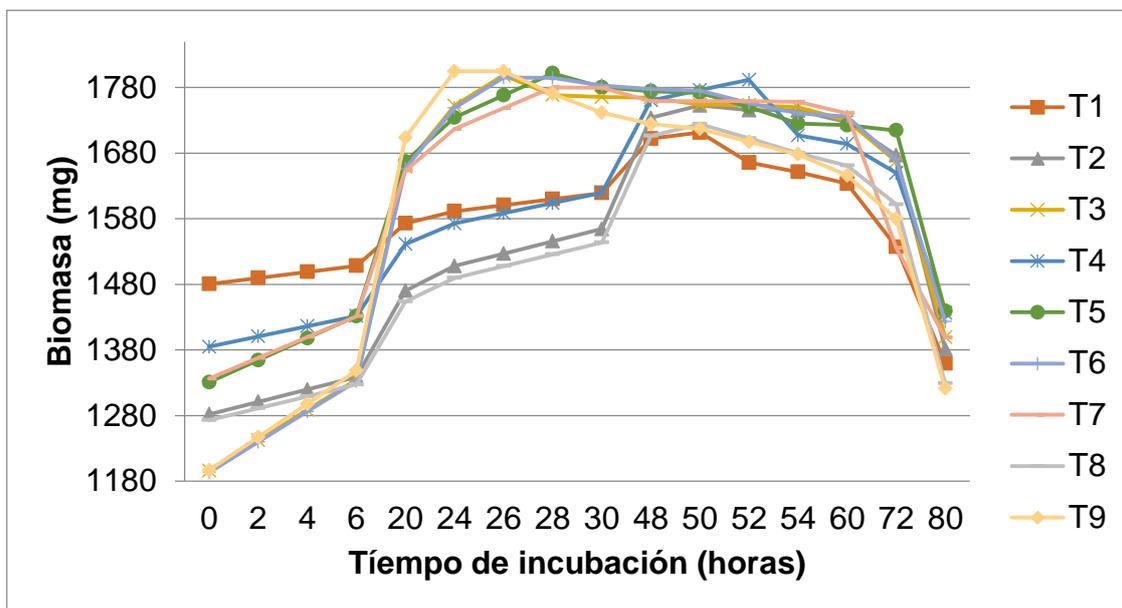


Figura 4. Curva de calibración de biomasa



- T1 - 55% Suero + 4,5 pH
- ▲— T2 - 55% Suero + 5,5 pH
- ✱— T3 - 55% Suero + 6,5 pH
- ✱— T4 - 80% Suero + 4,5 pH
- T5 - 80% Suero + 5,5 pH
- ✱— T6 - 80% Suero + 6,5 pH
- T7 - 100% Suero + 4,5 pH
- T8 - 100% Suero + 5,5 pH
- ◆— T9 - 100% Suero + 6,5 pH

Figura 5. Curva de producción de biomasa

Después de evaluar los tratamientos por un periodo de 80 horas se realizó un análisis matemático mediante la determinación de la velocidad de crecimiento para definir el tratamiento que generó la mayor cantidad de biomasa en el menor tiempo. Teniendo como resultados que el tratamiento T9 fue el de mayor producción de biomasa de 608,43 mg/ml durante 24 horas, seguido del tratamiento T3 con una producción de biomasa de 602,94 mg/ml durante 26 horas y el tratamiento T6 con una producción de biomasa de 601,86 mg/ml

durante 26 horas; mientras que el tratamiento T1 fue el de menor producción de biomasa generando durante 50 horas 230,96 mg/ml.

Una vez realizados los cálculos de velocidad de crecimiento para cada uno de los tratamientos se identificó los tratamientos con mayor velocidad de crecimiento, los cuales fueron: tratamiento T9 con una velocidad de crecimiento de 25,35 mg/h, seguido del tratamiento T3 con 23,19 mg/h y el T6 con 23,15 mg/h, como se muestra en la Tabla 7.

En la siguiente tabla se muestran los valores obtenidos al transformar los datos de densidad óptica medidos en espectrofotómetro a biomasa con la ecuación de la curva de calibración propuesta. Adicional a esto se hace referencia a la cantidad de biomasa máxima producida en relación al tiempo necesario para generarla según el tratamiento. La biomasa generada como su nombre lo indica, viene a ser la cantidad de biomasa que se produjo en esa cantidad de tiempo entre la biomasa inicial y la biomasa máxima que se registró por cada tratamiento.

Cuando se somete a una levadura a estrés, se inhibe o disminuye el crecimiento, desarrollo y demás procesos metabólicos que pueden influir en su funcionamiento normal. Los factores que pueden estar directamente relacionados con la generación de estrés son pH, temperatura, actividad de agua y oxígeno (Folch, Arroyo, Lledías, & Robles, 2004); en donde el microorganismo se verá en la necesidad de generar una respuesta que le ayude a combatir su estado actual. Frente a estas situaciones desfavorables las levaduras se encargan de producir moléculas y compuestos que compensan al estrés (Alba, 2015), por lo tanto, al analizar los resultados obtenidos en el presente estudio se puede corroborar que el pH tuvo influencia directa en el crecimiento de la levadura para la producción de biomasa, ya que

los tratamientos con pH ácido generaron estrés en las células, al demostrarse niveles inferiores de generación de biomasa.

De igual manera, sucede con los tratamientos con baja concentración de suero de leche que, al encontrarse en un ambiente de estrés debido a una limitada fuente de carbono, su tasa de crecimiento resultó afectada a pesar de su respuesta metabólica a situaciones desfavorables para su desarrollo, en este caso el suero de leche viene a ser la fuente de lactosa que la levadura utiliza para obtener energía, lactosa es la fuente de carbono, por lo tanto, es un compuesto limitante para el crecimiento de las células, ya que dentro del metabolismo de *K. marxianus* la lactosa es hidrolizada en moléculas de D-galactosa y D-glucosa; esta última constituye un compuesto esencial para la formación de moléculas que participan en reacciones anabólicas y catabólicas (NADPH) ya que la molécula de glucosa es fosforilizada por el ATP y la enzima hexoquinasa en D-glucosa-6-fosfato, misma que posteriormente es oxidada por el ATP dando como resultado la formación del NADP y subsecuente el NADPH (Mannheim, 2017). Es por esto que, el tratamiento 9 al componerse de 100% de suero concentrado a un pH 6,5 (valor cercano al neutro) la levadura fue capaz de generar mayor cantidad de biomasa al no estar sometido a estrés.

Tabla 7.

Crecimiento in vitro de Kluyveromyces marxianus

N° de Tratamiento	Biomasa			Tiempo de incubación (horas)
	Inicial	Máxima	Biomasa generada (mg/ml)	
T1	1480,53	1711,5	230,96	50
T2	1282,00	1752,7	470,72	50
T3	1195,65	1798,6	602,94	26
T4	1384,89	1791,7	406,77	52
T5	1330,72	1801,7	470,99	28
T6	1193,41	1795,3	601,86	26
T7	1336,12	1780,2	444,08	28
T8	1273,18	1724,3	451,11	50
T9	1196,41	1804,8	608,43	24

5.3. Análisis Estadístico de los resultados de Velocidad de Crecimiento.

El análisis de varianza se realizó bajo el programa Infostat con el objetivo de determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos. En la siguiente tabla se muestran los valores obtenidos una vez concluido el análisis de varianza, el cual determinó diferencias significativas al 1% entre los tratamientos.

Tabla 8.

Análisis de la varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	Significancia
Tratamientos	1412,78	8	176,6	253,86	<0,0001
Concentración suero	95,59	2	47,8	68,71	<0,0001
pH	1086,26	2	543,13	780,76	<0,0001
Concentración suero * pH	230,93	4	57,73	82,99	<0,0001
Error	12,52	18			
Total	1425,31	26			

5.3.1. Análisis funcional por prueba Duncan 0,01%

Una vez evidenciada la existencia de diferencias significativas, se realizó el análisis funcional a través de la prueba de Duncan al 0,01%.

Tabla 9.

Test Duncan Alfa=0,01 Error: 0,6956 gl: 18

Concentración suero	pH	Medias	n		E.E
55	4,5	4,62	3	A	
80	4,5	7,82	3		B
100	5,5	9,02	3		B
55	5,5	9,42	3		B
100	4,5	15,86	3		C
80	5,5	16,82	3		C
80	6,5	23,15	3		D
55	6,5	23,19	3		D
100	6,5	25,35	3		E

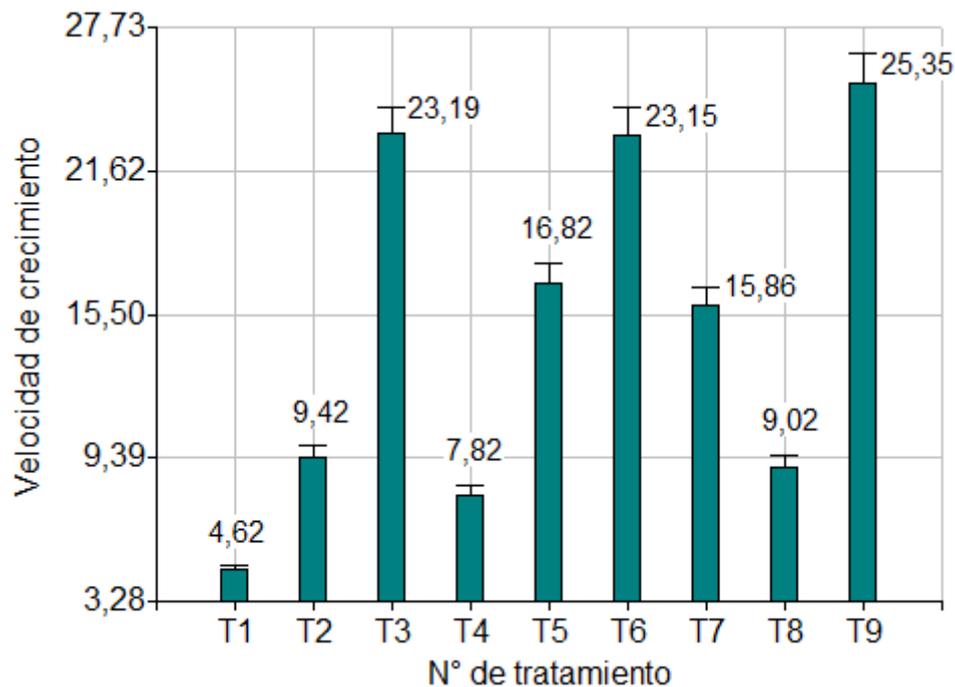


Figura 6. Velocidad de crecimiento por tratamiento

Al observar el resultado de la prueba de análisis funcional, se evidencia que el tratamiento T9 (100% Suero + pH 6,5) demuestra diferencia significativa sobre el grupo de los tratamientos T6 (80% Suero + pH 6,5) y T3 (55% Suero + pH 6,5), lo cual respalda la proposición que establece al tratamiento T9 como el óptimo para el crecimiento in viro de *Kluyveromyces marxianus* al ser el que demostró la cifra mayor en velocidad de crecimiento.

Parrondo, García, & Díaz (2009) sugieren que el nivel de lactosa en el medio de cultivo constituye un factor de gran influencia en el crecimiento de la levadura, ya que una concentración de lactosa mayor a la encontrada de forma natural en el suero de leche podría generar una inhibición en el crecimiento celular a causa de estrés osmótico, mientras que niveles muy bajos de lactosa podrían resultar en la limitación del crecimiento de la levadura a través del tiempo. Sustento que es corroborado en el presente estudio al proponer al

tratamiento con 100% suero de leche como el de mayor velocidad de crecimiento.

Por otro lado, la prueba de análisis funcional también establece diferencias significativas de los tratamientos con pH 6,5 (T9, T6 y T3) sobre los demás grupos de tratamientos, lo cual comprueba que el pH del medio de cultivo es otro de los factores de implicación directa en el crecimiento de *K. marxianus*, siendo el pH cercano a un valor neutro el que facilita el crecimiento y desarrollo de la levadura. Argumento que es confirmado por Montiel, Carruyo, Marcano & Marvález (2005), en su estudio del crecimiento de *K. marxianus*, donde se asegura que a medida que el pH del medio se encuentre entre 6 a 7, se observará un crecimiento mayor al que puede generarse a un pH más alcalino o ácido. Además, Páez, Pérez, Araujo, Mármol, & Rincón (2012), en su estudio de valoración del crecimiento de la levadura, presentan mejores resultados de generación de biomasa al evaluar medios con pH cercano al neutro.

5.4. Evaluación de la actividad enzimática

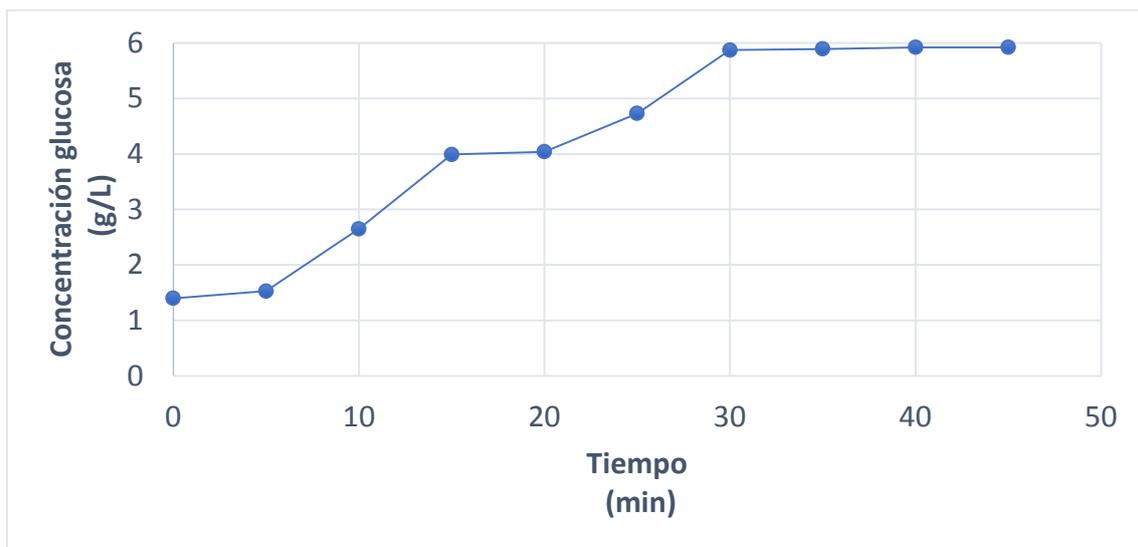


Figura 7. Actividad enzimática en lactosa.

Para evaluar la actividad enzimática de la enzima extraída, se tomaron como referencia las condiciones establecidas por HANSEN (2014), mismo que afirma que con una dosis de 0,8 g/L y a una temperatura de 50°C se obtiene cerca del 100% de actividad por parte de la enzima en un periodo máximo de una hora (PROZYN, 2016).

En la evaluación enzimática realizada se pudo evidenciar el aumento de la cantidad de glucosa en la muestra, la cual partió desde una concentración de 1,4 g/L antes de colocar la enzima y alcanzando una concentración máxima de 5,92 g/L.

Los resultados muestran que la enzima extraída alcanzó su actividad máxima e hidrólisis total de lactosa en el minuto 45, ya que el nivel de glucosa demostró estabilidad desde el minuto 30 hasta la finalización del análisis en el minuto 45. Adicional se puede evidenciar que en los últimos 15 minutos solo existió un incremento de 0,05 g de glucosa, por lo que demuestra que la enzima alcanzó su punto máximo de hidrólisis.

Según Ohlsson et al. (2017) en su estudio de caracterización de la leche deslactosada, establece un valor de 5,9 g/L de glucosa, lo cual sustenta el resultado durante el análisis de actividad enzimática anteriormente presentado, donde se obtuvo una concentración final de glucosa de 5,92 g/L al concluir el periodo de hidrólisis de la enzima en leche.

Para validar los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad enzimática se comparó con un estudio realizado por Sánchez, Rosales, & Bustamante (2015) para determinar los factores que influían el proceso de hidrólisis en donde estaba considerados la temperatura, tiempo y cantidad de

enzima empleados. En este estudio se logró una hidrólisis del 93,9% siendo el más efectivo del estudio a condiciones de 50°C en 30 minutos, datos muy similares a los obtenidos en nuestro estudio a las mismas condiciones. De esta manera se puede aclarar que la levadura *K. marxianus* puede adaptarse a temperaturas altas tal como lo explica la bibliografía la misma que es requerida en la hidrólisis para acelerar el proceso que en contraste al uso de una temperatura baja puede ocasionar que se postergue hasta 12 horas y consiguiendo una hidrólisis máxima del 79% tal como lo indican en su estudio.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

Una vez realizado el análisis funcional de la velocidad de crecimiento in vitro de *Kluyveromyces marxianus*, misma que fue calculada estableciendo una relación entre la cantidad de biomasa generada y tiempo de incubación, se concluyó que las condiciones óptimas para la producción de biomasa son a un pH de 6.5 y 100% de suero concentrado, correspondiente al Tratamiento 9 (T9), obteniendo en 24 horas una biomasa generada de 608,43 mg/ml y una velocidad de crecimiento de 25,35 mg/hora. Se identificó que el factor pH fue el de mayor influencia en la generación de biomasa y que en combinación con un ambiente de alta disponibilidad de alimento (suero de leche como fuente de lactosa) conformaron las condiciones apropiadas para la producción de biomasa, sin inducir a la generación de estrés durante el metabolismo de las células.

La enzima extraída demostró tener capacidad de hidrólisis de lactosa, ya que al ser sometida a reaccionar con una muestra de leche con una concentración inicial de glucosa de 1,4 g/L, logró incrementar el nivel de glucosa a 5,92 g/L al cabo de 40 minutos manteniendo una temperatura de 50°C, determinando así

de forma indirecta la disminución de la concentración de lactosa a través del incremento de glucosa.

6.2. Recomendaciones

Realizar futuros estudios sobre la producción de la enzima empleando condiciones de pH neutral en el medio de cultivo para el crecimiento de la levadura con el fin de validar los niveles de pH óptimos tomando en consideración que este estudio obtuvo el mejor resultado a un pH de 6.5

Establecer comparaciones entre diferentes métodos de extracción para contrastar la efectividad de la obtención de la enzima, mediante una evaluación enzimática por un método directo empleando un ONPG.

Experimentar con la adición de otros nutrientes al medio de cultivo que puedan compensar el ambiente de estrés al que puede estar expuesta la levadura y que induzca al funcionamiento correcto del metabolismo celular para la obtención de energía y así evaluar su influencia sobre la generación de biomasa con el fin de optimizar el proceso de extracción.

Se recomienda experimentar con la adición de otros nutrientes al medio de cultivo para evaluar su influencia sobre la generación de biomasa con el fin de optimizar el proceso de extracción.

REFERENCIAS

- Alba, M. G. (2015). Respuesta de las Levaduras al Estrés Osmótico Causado por Elevadas Concentraciones de Glucosa. Recuperado el 11 de abril del 2019 de <https://core.ac.uk/download/pdf/71046760.pdf>
- Amamcharla, J., & Metzger. (2011). *Development of a rapid method for the measurement of lactose in milk using a blood glucose biosensor*. Recuperado el 18 de marzo del 2019 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030211005017>
- Araujo, K., Chávez, Á., Chávez, S., Páez, G., Mármol, Z., & Rincón, M. (2010). Extracción de la β -D-galactosidasa de *K. marxianus* ATCC 8554 en lactosuero diluido. Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería,.
- Arevalo, S. (1998). OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE UN AGENTE DE CONTROL. Recuperado el 11 de marzo del 2019 de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8389/TSMAC1de3.pdf?sequence=1>
- Badui, S. (1999). Química de los Alimentos. Ciudad de México: Pearson Education.
- Barragán, J., Quicaña, M., Flores, M., & Obeso, C. (2012). Actividad de la β -galactosidasa en células de *Kluyveromyces*. SCIENDO, 43-51.
- Castillo, M., Jordán, J., Abellán, A., Laencina, J., & López, M. (1996). Tecnología de aprovechamiento de lactosuero. Revista Española de Lechería, 24-30. Recuperado el 24 de marzo del 2019 Obtenido de Revista Española de Lechería.
- Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud. (2014). Diagnóstico y tratamiento de la intolerancia a a lacctosa en niños. Recuperado el 22 de mayo del 2019 de

http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/IMSS-733-14-Intolerancia_a_la_lactosa_en_ninos/733GRR.pdf

- CIL. (2018). Producción de Leche en el Ecuador: Recuperado el 4 de marzo del 2019 de <https://cilecuador.org/index.php/2018/04/08/produccionleche/>
- COMEX. (2019). Nosis Trade. - Evolución - NCE: enzimas - enzimas; preparaciones enzimáticas. Recuperado el 26 de abril del 2019 de <https://trade.nosis.com/es/Comex/Importacion-Exportacion/Ecuador/enzimas--enzimas-preparaciones-enzimaticas-no-expresadas-ni-comprendidas-en-otra-parte/EC/3507>
- Cotrino, V., & Gaviria, B. (2004). Cómo se Determina la Calidad Microbiológica de la Leche. Recuperado el 5 de marzo del 2019 de <http://lmvltida.com/programas/ar05.html>.
- Delgado, G. (2001). PRUEBAS DE DIFERENCIA DE MEDIAS O DE COMPARACIONES MÚLTIPLES. Obtenido de PRUEBA DEL RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN. Recuperado el 23 de abril del 2019 de <http://colposfesz.galeon.com/disenos/teoria/cap13bmj/cap13bmj.htm>
- Epicore. (2017). Epicore BioNetworks. Obtenido de Epicore *BioNetworks Inc. Reports Quarter Three Results* for Fiscal Year 2017. Recuperado el 11 de febrero del 2019 de <http://epicorebionetworks.com/pdf/prq3-17.pdf>
- FAO. (2018). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Recuperado el 6 de marzo del 2019 de <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>
- FAO. (2018). Portal Lácteo. Organización de las Naciones Unidas para alimentación y agricultura. Recuperado el 4 de marzo del 2019 de <http://www.fao.org/dairy-production-products/resources/glosario/es/?index=l>
- Farfán, D. J. (2013). Valoración de impactos ambientales generados en la industria láctea y cárnica de la ciudad de Cuenca. Obtenido de

Universidad del Azuay: Escuela de Ingeniería en Alimentos. Recuperado el 26 de mayo del 2019 <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/3265/1/10039.pdf>

Feijoo, S., González, S., Lema, J., & Moreira, M. (2017). *Journal o Cleaner Production*. Elsevier. Obtenido de Elsevier.

FEPALE. (Junio de 2017). Obtenido de Ecuador: la industria láctea se dinamizó este 2017. Recuperado el 11 de febrero del 2019 de <http://fepale.org/infoleche/2017/06/28/ecuador-la-industria-lactea-se-dinamizo-este-2017/>

Folch, J. L., Arroyo, A., Lledías, F., & Robles, A. C. (2004). La respuesta a estrés en la levadura. Recuperado el 24 de abril del 2019 de https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2004/mi04-1_2d.pdf

Fonseca, G., Witmann, C., Heinzle, E., & Gombert, A. (2008). *The yeast Kluyveromyces marxianus and its biotechnological potential. Applied Microbiology and Biotechnology*, 339-354. Recuperado el 11 de abril del 2019 de *Appl Microbiol Biotechnol*.

Garbayo, L. (03 de 2018). CEAC. Obtenido de INTOLERANCIA A LA LACTOSA: REALIDAD O MODA. Recuperado el 30 de abril del 2019 <https://www.ceac.es/blog/intolerancia-la-lactosa-realidad-o-moda>

Gardeazábal, A. M. (2013). CARACTERIZACIÓN DE LA LEVADURA KLUYVEROMYCES MARXIANUS COMO PROBIÓTICO. Obtenido de UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO. Recuperado el 11 de febrero del 2019 <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/1862/TESIS%20SEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Giannasi, E. (2018). Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Obtenido de Desperdicios en la producción. Recuperado el 18 de marzo del 2019 <http://www.uic.org.ar/Archivos/Revista/File/Desperdicios%20de%20la%20producci%C3%B3n-%20Ef.%20Em..pdf>

- Gil, K., Najul, M. V., & Pacheco, C. (2012). MANEJO DE DESPERDICIOS EN INDUSTRIAS DE DERIVADOS LÁCTEOS . Universidad Central de Venezuela.
- GUILLARD, R. (1973). Handbook of Phycological Methods. Cambridge University Press - Division rates.
- HANSEN. (2014). Ha-Lactase 5200. Recuperado el 11 de febrero del 2019 de https://hjemmeriet.com/da/uploads/dokumenter/PI_GLOB_Ha-Lactase5200_450804_EN.pdf
- HANSEN. (2015). LACTASA EN LA INDUSTRIA LÁCTEA. FOOD INGREDIENTS BRASIL. Recuperado el 24 de abril del 2019 de <https://drive.google.com/drive/u/0/folders/1unswSoLtDN5yLd9dZzTTjD8h65D-jUVU>
- Herrera, M. (2013). Revista Alimentaria Cámara Costarricense de la Industria Alimentaria . Recuperado el 8 de abril del 2019 de <http://alimentaria.cacia.org/153-setiembre2017/productos-deslactosados-la-nueva-gran-tendencia-lacteos/>
- INTEMAN, L. (2012). Limpieza y ecología segura. Recuperado el 11 de junio del 2019 de http://www.kenbi.eu/kenbipedia_3.php
- Jiménez Montoya, M. S. (2017). LACTASA NO PERSISTENTE: CAUSAS, EFECTOS, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO. Recuperado el 21 de abril del 2019 de <http://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/viewFile/55219/50285>
- Kendrick, B. (2008). Levaduras. Obtenido de Manual de Microbiología de los Alimentos - capítulo 4. Recuperado el 16 de abril del 2019 de <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/4%20levaduras.pdf>
- Kyamuhangire W, M. H. (2002). *Yield, characteristics and composition of banana juice extracted by the enzymatic and mechanical methods. Journal of the Science of Food and Agriculture 82: 478-482.*
- Lee, B. H. (2000). Fundamentos de biotecnología de los alimentos. Acribia.

- Ling, C. (2008). Whey to Ethanol: A Biofuel Role for Dairy Cooperatives?
- Manera, A. P., Ores, J. d., Ribeiro, V. A., & André, C. (13 de Julio de 2007). Optimization of the Culture Medium for the Production of β -Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. Recuperado el 11 de abril del 2019 de Department of Chemistry, Federal University Foundation of Rio Grande.
- Manera, A. P., Ores, J. d., Ribeiro, V. A., André, C., Burkert, V., & Kalil, S. J. (2008). Optimization of the Culture Medium for the Production of β -Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. Department of Chemistry, Federal University Foundation of Rio Grande.
- Mannheim, B. (2017). *Lactose/D-Glucose*. Obtenido de R-BIOPHARM Enzymatic BioAnalysis. Recuperado el 6 de marzo del 2019 de https://www.azmax.co.jp/wp-content/uploads/2015/11/Lactose-Glucose_EN_10986119035_2014-02.pdf
- MIPRO (2018). La industria lechera busca generar mayor valor agregado para sumarse al Cambio de la Matriz Productiva. Ministerio de Industrias y Productividad. Recuperado el 6 de abril del 2019 de <https://www.industrias.gob.ec/bp-072-la-industria-lechera-busca-generar-mayor-valor-agregado-para-sumarse-al-cambio-de-la-matriz-productiva/>
- Montiel, X., Carruyo, I., Marcano, L., & Marvárez, M. (2005). Optimización del proceso de extracción de la lactasa de *kluyveromyces marxianus* attc 8554, para su aplicabilidad en la industria láctea. Revista Científica de la Universidad del Zulia.
- Montiel, Xiomara; Carruyo, Ingrid; Marcano, Letty; Mavárez, Marcel. (2005). OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LA LACTASA DE *Kluyveromyces marxianus* ATTC 8554, PARA SU APLICABILIDAD EN LA INDUSTRIA LÁCTEA. Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.
- Montoya, J., & Sarabia, M. (2017). LACTASA NO PERSISTENTE: CAUSAS, EFECTOS, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO. Facultad de Farmacia

- UCM. Recuperado el 6 de marzo del 2019 de <http://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/viewFile/55219/50285>
- Moreira, V., & López, A. (2006). Intolerancia a la lactosa. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 143.
- Navas, J. S. (Junio de 2012). Aprovechamiento Industrial de Lactosuero Mediante Procesos Fermentativos. Obtenido de Universidad del Valle - Colombia. Recuperado el 6 de marzo del 2019 de https://www.researchgate.net/publication/257890689_Aprovechamiento_Industrial_de_Lactosuero_Mediante_Procesos_Fermentativos
- Ohlsson, Johansson, Hansson, Abrahamson, Byberg, Smedman, . . . Lundh. (2017). Lactose, glucose and galactose content in milk, fermented milk and lactosefree milk products. *International Dairy Journal*. Obtenido de ResearchGate:
[Lactoseglucoseandgalactosecontentinmilkfermentedmilkandlactose-free milk products.pdf](#)
- Padín, C., & Díaz, M. (2009). Fermentación alcohólica del lactosuero por *Kluyveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes. Obtenido de *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*: Recuperado el 6 de marzo del 2019 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199414957008>
- Páez, G., Pérez, A., Araujo, K., Mármol, Z., & Rincón, M. (2012). Efecto de la concentración de lactosa sobre la producción B-galactosidasa a partir de *K. marxianus*, en cultivo por lote alimentado. *Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología*. Recuperado el 15 de mayo del 2019 de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562012000100010
- Parrondo, A., García, L., & Díaz, M. (2009). *Nutrient balance and metabolic analysis in a Kluyveromyces marxianus fermentation with lactose-added whey. Brazilian Journal of Chemical Engineering.*

- Perinia, B. L., Souzab, H. C., Kelberta, M., Apatia, G. P., Pezzina, A. P., S, A. L., & Schneider. (2013). *Production of beta-Galactosidase from Cheese Whey Using Kluyveromyces marxianus CBS 6556*. *Chemical Engineering Department, Process Engineering Program, University of Joinville Region*.
- Pozo, M. I., Díaz, M. d., Ratón, T. O., & Pérez, S. R. (2011). Evaluación de dos métodos de conservación para *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 en la Colección de Cultivos del CEBI. Obtenido de Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI). Recuperado el 24 de marzo del 2019 de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562014000200009
- PROZYN. (2016). Productos Lácteos Cero Lactosa. Recuperado el 6 de marzo del 2019 de <https://tlatca.sofexamericas.com/resumen/2016/p10.pdf>
- Ramirez, J. S. (2012). Aprovechamiento Industrial de Lactosuero Mediante Procesos Fermentativos. Obtenido de Universidad de Valle de Colombia: Recuperado el 9 de marzo del 2019 de https://www.researchgate.net/publication/257890689_Aprovechamiento_Industrial_de_Lactosuero_Mediante_Procesos_Fermentativos
- Rodríguez, G., Gómez, A., Ramírez, G., & Rosas, C. (2016). LACTOSUERO Y SU PROBLEMÁTICA EN EL MEDIO AMBIENTE. Centro de Investigaciones Químicas, ICBI, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Recuperado el 11 de marzo del 2019 de https://www.academia.edu/3743239/Lactosuero_y_su_problema_tica_en_el_medio_ambiente
- Rodriguez, L. (2016). PROPUESTA DE UN PLAN DE MANEJO AMBIENTAL PARA LA AGRO EMPRESA "LA QUESERA" EN LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO. Universidad Nacional de Chimborazo. Recuperado el 11 de mayo del 2019 de <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1361/1/UNACH-EC-IAMB-2016-0002.pdf>

Rodríguez, L. (2016). PROPUESTA DE UN PLAN DE MANEJO AMBIENTAL PARA LA AGRO EMPRESA "LA QUESERA" EN LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO. Universidad Nacional de Chimborazo. Recuperado el 7 de febrero del 2019 de <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1361/1/UNACH-EC-IAMB-2016-0002.pdf>

Rodríguez, L. (2016). PROPUESTA DE UN PLAN DE MANEJO AMBIENTAL PARA LA AGRO EMPRESA "LA QUESERA" DEL CANTÓN COLTA PROVINCIA DE CHIMBORAZO. UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO. Recuperado el 6 de abril del 2019 de <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1361/1/UNACH-EC-IAMB-2016-0002.pdf>

Rosado, J. (2016). Intolerancia a la lactosa PERMANYER: Recuperado el 6 de junio del 2019 de https://www.anmm.org.mx/GMM/2016/s1/GMM_152_2016_S1_067-073.pdf

Rosado, J. (2016). Intolerancia a la lactosa Pub Med: GACETA MÉDICA DE MÉXICO. Recuperado el 6 de junio del 2019 de https://www.anmm.org.mx/GMM/2016/s1/GMM_152_2016_S1_067-073.pdf

Rosado, J. L. (2016). Intolerancia a la lactosa. Gaceta Médica de México, 67-73.

Sánchez, C., Rosales, F., & Bustamante, A. (2015). Modelo de hidrólisis de lactosa para fermentación láctica en una base probiótica y simbiótica. Recuperado el 26 de junio del 2019 de: <file:///C:/Users/sebas/Downloads/399-1137-1-PB.pdf>

Varghes, S. (03 de 2019). Demand for Lactase Enzyme Market Continues to Grow, Finds Study. Obtenido de Westminster News. Recuperado el 6 de marzo del 2019 de <https://westminsternews.com/2664/demand-for-lactase-enzyme-market-continues-to-grow-finds-study>

- Vazquez, M. A. (2013). Obtención y purificación de preparados enzimáticos enriquecidos en Pepsina a partir de desechos de matadero y su empleo en estudios de Digestibilidad in Vitro. Recuperado el 26 de marzo del 2019 de https://www.researchgate.net/publication/324363441_Obtencion_y_purificacion_de_preparados_enzimaticos_enriquecidos_en_Pepsina
- Vénica, C., Perotti, M., Bergamin, C., Zalazar, C., & Wolf, I. (2011). Intolerancia a la lactosa. Productos lácteos modificados: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Recuperado el 6 de junio del 2019 de <https://www.researchgate.net/application.ClientValidation.html?origPath=%2F>
- Vénica, C., Perotti, M., Wolf, I., Bergamini, C., & Zalazar, C. (Mayo de 2011). Intolerancia a la lactosa. Productos lácteos modificados Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) - Universidad Nacional del Litoral (UNL): Recuperado el 15 de junio del 2019 de https://www.researchgate.net/publication/281589062_Intolerancia_a_la_lactosa_Productos_lacteos_modificados
- WISEMAN, A. (1985). Manual de biotecnología de las Enzimas. España: Acribia.

ANEXOS

Anexo 1: Ficha técnica *Kluyveromyces marxianus* LAF-4

CHR HANSEN

Improving food & health

SWING YEAST LAF-4

Información de Producto

Versión: 5 PI-EU-ES 09-01-2014

Descripción

Queso

Cepa de levaduras simple seleccionada con origen en la fabricación de queso tradicional Francés. Los cultivos SWING® LAF son una herramienta importante en la fabricación de queso ya que pueden ser utilizadas para afectar a la neutralización, la textura y el aroma de la cuajada. Las levaduras son comunes en la fabricación de queso con leche cruda pero raramente se encuentran en quesos producidos industrialmente. Por lo tanto, añadiendo cultivos de levaduras seleccionados y controlados al queso se puede mejorar la calidad.

Leche fermentada

El cultivo de levaduras puede ser utilizado para proporcionar un aroma equilibrado y niveles de formación medio-altos de CO₂ en productos tipo Kefir. El cultivo proporcionará aroma y una formación medio - alta de CO₂.

Taxonomía

Kluyveromyces marxianus subsp. *marxianus*

Envase

No Material:	Tamaño	Tipo
200865	10 U	Sobre (s) en caja

Propiedades Físicas

Color:	Blanco
Aspecto Físico:	Polvo

Aplicación

Uso

Los cultivos de levaduras pueden ser utilizados en quesos blandos con moho blanco y quesos con maduración en superficie y quesos con cortezas mixtas. La levadura crecerá en la leche, además de en la cuajada. Su función es

- dar aroma
- evitar el sabor amargo (por la actividad aminopeptidasa).

Para productos tipo Kefir, la levadura es utilizada en combinación con bacterias ácido lácticas mesófilas y termófilas y es ideal para productos batidos, líquidos y firmes.

Dosis recomendada

1U a 2U/1.000 l. de leche ó 100 Kg. de queso fresco.

1U para 1.000 l de leche para productos tipo Kefir.

CHR HANSEN

Improving food & health

SWING YEAST LAF-4

Información de Producto

Versión: 5 PI-EU-ES 09-01-2014

Directivas para su uso

Añadir el cultivo a la leche antes de cuajar y/o aplicar a la superficie del queso unas pocas horas después de salar, por lavado o aplicación con spray. Para la inoculación directa de la leche, no se requiere tomar especiales precauciones. Para la aplicación en superficie: :

- 1) Suspender el contenido del sobre en 1 litro de agua.
- 2) Agitar bien antes de usar.

Una suspensión preparada utilizando un litro de agua es suficiente para aprox. 250 Kg. de queso, y debe ser utilizada el mismo día de la preparación.

Para productos tipo Kefir: Añadir la leche junto al cultivo DVS® de bacterias ácido lácticas mientras se llena el tanque.

Gama

Varias especies de levaduras (cepas puras o mezclas) con diferentes características pueden encontrarse en la gama SWING®. Por favor, contacte con su representante de ventas local para mayor información.

Almacenaje y manipulación

< -18 °C / < 0 °F

Vida útil

Como mínimo 12 meses desde la fecha de fabricación cuando se almacena siguiendo las recomendaciones.

Información técnica

www.chr-hansen.com

Página: 2 (5)

La información que aquí se incluye ha sido presentada de buena fe y, a nuestro leal saber y entender, es auténtica y fiable. Se la ofrecemos a Ud. únicamente para su consideración, comprobación y valoración, y puede ser modificada sin previo aviso. La garantía no incluye su exactitud, exhaustividad, actualización, no infracción, comercialización o idoneidad para un objetivo especial. A nuestro leal saber y entender, el/los producto(s) aquí mencionado(s) no infringe(n) los derechos de propiedad intelectual de ningún tercero. El/los producto(s) puede(n) estar cubierto(s) por patentes pendientes o concedidas, marcas comerciales registradas o no registradas, o derechos similares de propiedad intelectual. Copyright © Chr. Hansen A/S. Todos los derechos reservados.

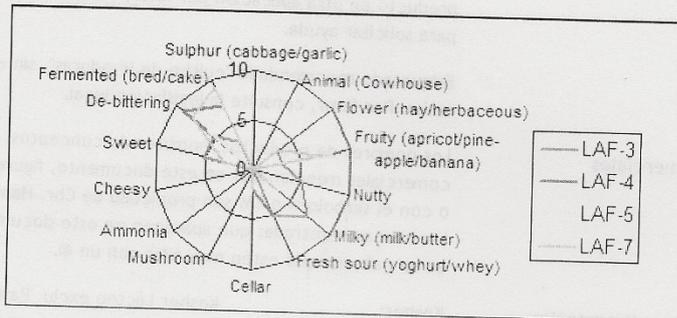
SWING YEAST LAF-4

Información de Producto

Versión: 5 PI-EU-ES 09-01-2014

Perfil de aroma

Tendencias de sabor y aroma de la cepa



Physiological Data

	LAF-3	LAF-4	LAF-5	LAF-7
Perfil de aroma	suave mantequilla	fuerte afrutado/	medio afrutado	ligeramente levadura /afrut
Formación de CO ₂	bajo	medio /alto	medio	medio /alto
Actividad Aminopeptidasa	medio	alto	medio	alto
Crecimiento a 12 °C	alto	alto	alto	medio
Tolerancia a NaCl	muy alto	bajo	bajo	medio
Temperatura	Min. 2-4 °C, max. 35 °C, opt. 20-30 °C			
Perfil de Fermentación	- lactosa - galactosa	+ lactosa - galactosa	+ lactosa - galactosa	- lactosa + galactosa

Métodos analíticos

Los métodos de referencia y analíticos están disponibles bajo petición.

Otra información

Dependiendo de la combinación del cultivo, el perfil de aroma del producto tipo Kefir se desarrolla durante el tiempo de vida.

Legislación

Los cultivos SWING® de Chr. Hansen cumplen con los requerimientos generales de seguridad alimentaria establecidos por el reglamento 178/2002. Los microorganismos de maduración son reconocidos de forma general como seguros.

El producto está destinado a ser utilizado en alimentos.

CHR HANSEN

improving food & health

SWING YEAST LAF-4

Información de Producto

Versión: 5 PI-EU-ES 09-01-2014

Seguridad alimentaria

No existe garantía de seguridad alimentaria implícita para aplicaciones de este producto distintas de las indicadas en la sección de utilización. Si desea utilizar este producto en otra aplicación por favor, contacte con su representante de Chr. Hansen para solicitar ayuda.

Etiquetado

Etiquetado recomendado "cultivo de levaduras", sin embargo, la legislación puede variar. Por favor, consulte la legislación local.

Marcas comerciales

Los nombres de productos, nombres de conceptos, logotipos, marcas y otras marcas comerciales mencionadas en este documento, figuren o no en mayúsculas, en negrita o con el símbolo ® o TM son propiedad de Chr. Hansen A/S o utilizados bajo licencia. Las marcas registradas que aparecen en este documento pueden no estar registradas en su país, aunque estén marcadas con un ®.

Certificados alimentarios

Kosher: Kasher Lácteo exclu. Pascua
Halal: Certificado

Servicio técnico

Personal de los Laboratorios de Aplicación y Desarrollo de Productos de Chr Hansen están a su disposición si necesita mas información.

Información adicional

El producto está disponible en cajas con 25 artículos

Información GMO

Con arreglo a la legislación de la Unión Europea*, podemos declarar que SWING YEAST LAF-4 no contiene OMG ni materias primas con la etiqueta MG.**. Con arreglo a la legislación europea sobre etiquetaje en producto alimentario acabado**, podemos informar de que el uso de SWING YEAST LAF-4 no requiere etiquetado MG del producto alimenticio final. La posición de Chr. Hansen sobre GMO puede encontrarse en: www.chr-hansen.com/About us/Policies and positions/Quality and product safety.

* Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 12 de marzo de 2001 sobre la liberación intencional en el medio de organismos modificados genéticamente y por la que se deroga la Directiva del Consejo 90/220/CEE.

** Reglamento (CE) 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de septiembre de 2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. Reglamento (CE) 1830/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de septiembre de 2003 relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de estos y por el que se modifica la Directiva 2001/18/CE.

SWING YEAST LAF-4

Información de Producto
Versión: 5 PI-EU-ES 09-01-2014

Información sobre Alergenos

Lista de alérgenos comunes de acuerdo con el Acto de 2004 sobre Protección a los Consumidores de la Autoridad sobre Alimentos y Etiquetado de Estados Unidos (FALCPA) y con la Directiva 2000/13/EC de la Unión Europea	Presente como ingrediente en el producto
Cereales que contengan gluten* y productos derivados	No
Crustáceos y productos a base de crustáceos	No
Huevos y productos a base de huevo	No
Pescado y productos a base de pescado	No
Cacahuets y productos a base de cacahuets	No
Soja y productos a base de soja	Sí
Leche y sus derivados (incluida la lactosa)	No
Frutos de cáscara* y productos derivados	
Lista de alérgenos de acuerdo con la Directiva sobre etiquetado 2000/13/EC de la UE, exclusivamente	
Apio y productos derivados	No
Mostaza y productos derivados	No
Granos de sésamo y productos a base de granos de sésamo	No
Altramuces y productos a base de altramuces	No
Moluscos y productos a base de moluscos	No
Anhídrido sulfuroso y sulfitos en concentraciones superiores a 10 mg/kg o 10 mg/litro expresado como SO ₂	No

* Por favor, consulte la Directiva de Etiquetado de la UE 2000/13 Anexo IIIa para una definición legal de los alérgenos comunes. Vea la legislación de la Unión Europea en: www.eur-lex.europa.eu.

(1) El alérgenos está presente en el medio de fermentación.

Anexo 2: Certificado de análisis *K. marxianus* LAF-4

CHR HANSEN

Improving food & health

LAF-4

Certificate of Analysis

Form: Swing
Material No: 200865
Batch no: 2827802
Date of Manufacture: 04.07.2018
Best Before Date: 04.07.2019

Performance	Result	Specification
Total cell count cfu/U	3.5E+9	$\geq 1.2E+9$

Purity	Result	Specification
Coagulase-positive staphylococci cfu/g	<1	<1
Enterobacteriaceae cfu/g	<1	<10
Enterococci cfu/g	<10	<10
Foreign moulds cfu/g	<10	<10
Foreign yeasts cfu/g	<10	<10
Listeria monocytogenes	Absent in 25 g	Absent in 25 g
Mesophilic aerobic total count cfu/g	<500	<500
Salmonella spp.	Absent in 25 g	Absent in 25 g
Listeria monocytogenes *	* See note below	Absent in 25 g
Salmonella spp. *	* See note below	Absent in 25 g

* Production is systematically tested on an ongoing basis - details can be supplied on request

Anexo 3: Factura de compra de la cepa

DESCALZI

RUC: 0990336792001
FACTURA
 NO: 002-001-000060003
 Número de Autorización
 06122018010990336792001200200100006000300
 00000111

DISTRIBUIDORA DESCALZI S.A.

DIR. MATRIZ: KM 11,5 VÍA DAULE, PARQUE CALIFORNIA
 1 EDIF.COMERCIAL 4 BODEGA 1
 TELEFONOS: 042103299 - 04210327
 DIR. ESTABLECIMIENTO: De las Avellanas E2-25 y Juncal, Bodega
 Comercial Avellanas B.#2 Telef. 023463283
 - 023463284
 CONTRIBUYENTE ESPECIAL: 141E
 OBLIGADO A LLEVAR CONTABILIDAD: SI

AMBIENTE: Producción
 EMISIÓN: Normal

CLAVE DE ACCESO:



RAZÓN SOCIAL/NOMBRES Y APELLIDOS: LEON ACOSTA STEVEN
 FECHA EMISIÓN: 06/12/2018

RUC/CI: 1717729469

GUIA REMISION: 002001-10339

CÓDIGO	DESCRIPCION	CANTIDAD	PRECIO	DESCUENTO	SUBTOTAL
CU-200865	SWING LAF-4 (10U) I. # 2827802	2.00	20.200000	0.00	40.40

INFORMACIÓN ADICIONAL

Dirección: Pichincha, Quito, CARCELEN
 Telefono: 0984003951
 Email: saaleon@udlanet.ec
 Comentario:
 Vendedor: S.Castro
 Dias Plazo: 0

SUBTOTAL 12%	US\$40.40
SUBTOTAL 0%	US\$0.00
DESCUENTO	US\$0.00
IVA 12%	US\$4.85
VALOR TOTAL	US\$45.25

FORMA DE PAGO

OTROS CON UTILIZACION DEL SISTEMA FINANCIERO

VALOR

US\$45.25

DESCALZI
CANCELADA
 QUITO

6-12-18

Anexo 4: Metodología del manejo del experimento

Determinación de lactosa en suero

Considerando que el suero de leche utilizado en el experimento fue proveído por la empresa Pronafil ubicada en la ciudad de Quito. La empresa se encargó de entregar un certificado de análisis físico químico del material, el cual se encuentra detallado en la figura 16.

		MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD	CÓDIGO: FMP - 007 Versión: 2 PÁGINA: 1 de 2
FICHA TÉCNICA DE MATERIA PRIMA			
ELABORADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:	
ING.DAVID CANDO ASISTENTE DE CALIDAD	SR. EFREN FIGUEROA BARBA JEFE DE PRODUCCION	SRA. NAYADE FIGUEROA GERENTE GENERAL	
FECHA:	FECHA:	FECHA:	
VIGENCIA A PARTIR DE:			

1. CONTROL DEL DOCUMENTO

Versión	Motivo Cambio ó Anulación	Fecha de Actualización
2	Colocación de control de documentos y actualización de materias primas críticas	Enero 2017
3	Parámetros Físico químicos	Octubre 2018

2. FICHA TECNICA

MATERIA PRIMA	SUERO DE LECHE
FORMA DE RECEPCIÓN	Tanques
TEMPERATURA	Max 10°C
PESO	N/A
CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS	COLOR: verde amarillento OLOR: a leche SABOR: a Leche TEXTURA: líquido homogéneo
PARAMETROS FISICO-QUIMICAS	Acidez máxima:18° Libre de antibióticos Grasa: mínimo 3% pH:5.5 - 6 Añadidura de Agua: no mayor al 5% Proteína: menor a 1%
CRÍTICAS	No recibir leche con olor a establo ni con antibiótico y acidez más de 19°C. En caso de tener una leche mayor de 19° se requiere la autorización de Gerencia General para recibirla
NO CRÍTICAS	
TRANSPORTE	Refrigerado, libre de olores extraños, libre de productos químicos
ALMACENAMIENTO	N/A
OBSERVACIONES	Los análisis físico-químicos se los realiza en un equipo específico para leche (Ekomiik)

Figura 8. Ficha técnica del suero de leche

Anexo 5: Preparación del inventario de levaduras

Para la generación de un stock de *Kluyveromyces marxianus* se realizó una propagación de la cepa en agar YM, específico para levaduras.

La preparación del medio del cultivo se realizó en un vaso con agitación, donde se adicionó 10g del sustrato y se aforo con 180ml de agua, según la técnica que explicaba que su preparación debía ser de 55g/1L.

El medio de cultivo se sometió a un aumento de temperatura en la plancha con agitación hasta que se genere el hervor y se mantuvo así por un minuto. Seguido a esto se llevó al autoclave a 121°C por 15 minutos.

De forma paralela se preparó la cámara, con una desinfección con alcohol y UV durante 15 minutos para poder realizar el paso del medio de cultivo a 8 cajas Petri, las cuales se dejaron reposar, se etiquetaron y se almacenaron.

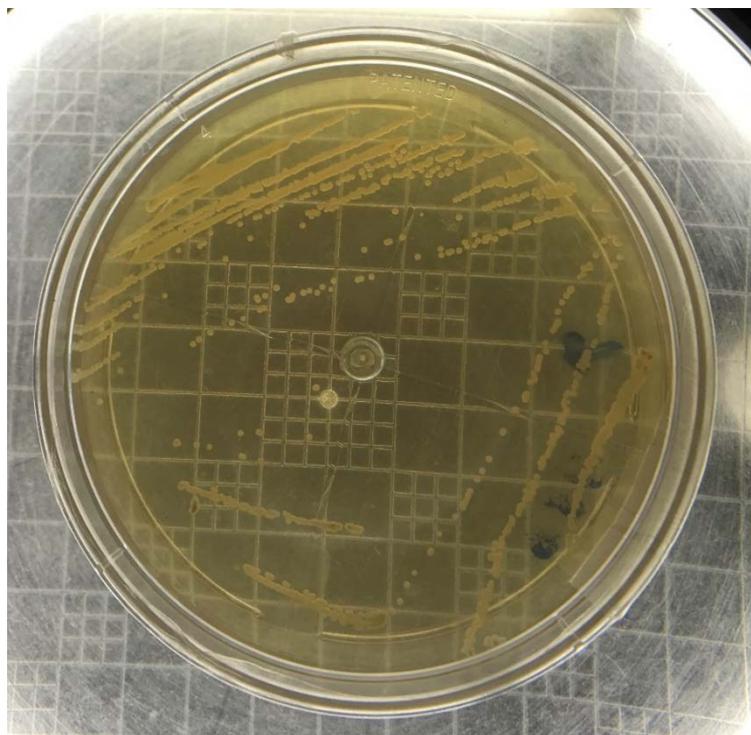


Figura 9. Caja Petri inventario de *Kluyveromyces marxianus* a las 24 horas de incubación a 37°C en agar YM.

Anexo 6: Preparación del inóculo

La levadura *Kluyveromyces marxianus* con código LAF-4 fue obtenida por medio de la importadora Descalzi y es un producto de la empresa Hansen comercializado en polvo. El producto es distribuido con una previa activación, por lo cual solo se requiere hacer una inducción enzimática del producto.

La inducción enzimática se realizó en un matraz de 25 ml con 2g del inóculo y 18g de caldo PDB. El cual fue llevado a incubar tal como la biografía consultada en (Araujo, y otros, 2010), donde se detallan las condiciones para este proceso durante 24 horas a 30°C a 200rpm.

Anexo 7: Pretratamiento del medio de cultivo

El suero para su uso debe ser adecuado a condiciones que favorezca al desarrollo de la levadura, en este caso, se debe realizar un desproteneizado siguiendo la metodología antes detallada para la cuantificación de lactosa.

Para lo cual se tomó 1,2 L de suero y se repartieron en dos matraces de 1000ml. Se sometió a un tratamiento térmico con agitación constante en la plancha y se ajustó el pH a 4,5 para el desproteneizado.

Después de transcurridos los 10 minutos a temperatura de 90°C y dejar reposar hasta conseguir una temperatura de 35°C se llevó a filtrado en tierra de diatomeas y papel filtro en 3 matraces de 500ml con embudo para utilizar el producto recolectado en los recipientes.

