

PRODUÇÃO DE MASSA DE CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *KLUYVEROMYCES LACTIS* E ATIVIDADE CATALÍTICA DA β -GALACTOSIDASE NA HIDRÓLISE DE LACTOSE

PRODUCTION PERMEABILIZED CELL MASS OF *Kluyveromyces lactis* AND CATALYTIC ACTIVITY OF β -GALACTOSIDASE IN LACTOSE HYDROLYSIS

Edimar A. F. Fontes¹

Flávia M. L. Passos²

Frederico J. V. Passos³

Paulo Rogério Fontes¹

RESUMO

A produção de massa de célula permeabilizada de *Kluyveromyces lactis* contendo a enzima-galactosidase e sua atividade catalítica na hidrólise de lactose foi realizada. Para obtenção da massa de célula permeabilizada, células foram produzidas, crescendo em soro de leite UF estéril. Para promover a permeabilização da membrana, células foram tratadas com uma solução etanol 50% para facilitar o contato entre a enzima e o substrato no processo de hidrólise da lactose. A atividade catalítica da enzima na hidrólise de lactose foi obtida pela relação linear entre a velocidade de reação e peso seco em mg de célula permeabilizada. A massa de 1mg de células permeabilizadas equivaleu a 0,32 unidades de atividade de enzima. O efeito da suspensão de célula permeabilizada na velocidade inicial de reação foi estudado utilizando diferentes concentrações de lactose (1, 40, 100 e 140 mM) e suspensões de células permeabilizadas que variaram de 0,1 a 3 mg/ml. As reações foram acompanhadas no espectrofotômetro DU em 510nm, que forneceu uma curva da variação de absorvância com o tempo de reação. A inclinação da reta apresentada por cada curva correspondeu as velocidades iniciais para cada concentração de célula permeabilizada e de lactose. Foi utilizado nessa análise um reagente colorimétrico GOP-PAP que reagiu especificamente com a glicose presente no meio. Para conversão da leitura de absorvância em unidades de mM glicose, foi feita uma curva padrão de glicose. A concentração de 1mg/ml de célula permeabilizada adicionada à mistura de reação, foi selecionada pela sua relação linear com a velocidade de reação para concentrações mínimas (1 mM) e extremas (140 mM) de lactose. Valores abaixo de 1mg/ml foram apropriados para a reação linear entre velocidade e concentração inicial de enzima.

Palavras-chaves: β -galactosidase; hidrólise de lactose; *Kluyveromyces lactis*.

1 INTRODUÇÃO

A hidrólise de lactose em glicose e galactose pela enzima β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) continua merecendo atenção da indústria de alimentos por razões nutricionais, ecológicas e tecnológicas. O leite com baixo teor de lactose atende às necessidades da população deficiente de lactase, permitindo que elas se beneficiem das qualidades nutricionais dessa fonte primária da dieta humana (FONTES, 1998). Uma das fontes comerciais de β -galactosidase para processamento de leite e soro hidrolisados são as leveduras *Kluyveromyces* (MAHONEY e WILDER, 1988). O uso dessas leveduras é permitido na indústria de

alimentos (JOSHI et al., 1987) e o soro do leite como meio de cultura é adequado para crescimento e indução da síntese para a produção da enzima por *K. lactis* (SISO, 1993 e BECERRA, 1996). Entretanto, como α -galactosidase de levedura é uma enzima intracelular e a sua extração com aceitável rendimento é difícil e onerosa, o uso de células permeabilizadas como agentes catalíticos é uma alternativa viável em relação ao uso da enzima purificada (FONTES, 2001). Estudos demonstraram que existe uma baixa atividade da enzima em células viáveis, isso devido a baixa permeabilidade de sua membrana a qual constitui uma barreira para difusão do substrato (JOSHI et al., 1989). Embora a ocorrência de um sistema de

1 Professores DS, Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Pomba, Rio Pomba-MG;

2 Professora PhD, Departamento de Microbiologia, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG;

3 Professor PhD - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

transporte indutível de lactose nessa membrana tenha sido descrito por DICKSON e BAAR, (1983). A permeabilidade dessa membrana pode ser alterada sem a total destruição de sua integridade, por meio de um tratamento conhecido como permeabilização da membrana celular. Dependendo da intensidade de exposição ao solvente este tratamento pode ser utilizado no preparo de células não viáveis utilizadas como biocatalizadores ou na extração da enzima intracelular (FENDON, 1982 e JOSHI, 1989). O uso de etanol como agente de permeabilização apresenta, dentre outras, vantagens como a sua disponibilidade, seu baixo preço, o fato de ser o componente de muitos alimentos fermentados e bebidas e ser admitido o seu uso na permeabilização de células na indústria de alimentos (SISO et al., 1992). A enzima como massa de célula permeabilizada é uma preparação conveniente para a indústria regional de leite e derivados que poderia adquirir a um preço mais acessível ou mesmo obtê-la em suas próprias instalações (FONTES, 2001 e FONTES, 1998). O objetivo deste trabalho foi caracterizar a atividade enzimática de células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis*, utilizadas como biocatalisador na hidrólise de lactose. Para a obtenção do biocatalisador, células de *Kluyveromyces lactis* foram cultivadas em soro ultrafiltrado, concentradas e tratadas com etanol para permeabilização.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Fisiologia de Microrganismo do Departamento de Microbiologia (DMB), instalado no Núcleo de Biotecnologia Aplicado a Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

2.1 Cultura

O organismo utilizado neste trabalho foi a levedura *Kluyveromyces lactis* uma linhagem selvagem da coleção de culturas do DMB -UFV. A cultura foi mantida em estoque com adição de 20% de glicerol -80 °C. Antes de ser utilizada como inóculo para produção de célula, a cultura foi ativada em 50 ml de soro estéril ultrafiltrado e incubada a 30°C sob agitação de 150 rpm em incubadora (Controlled Environment Incubator Shaker - série 25) por 24 horas.

2.2 Meio de cultivo

Utilizou-se como meio de cultura o soro de queijo, tipo mozzarella submetido a um sistema de ultrafiltração (Reginox) com membrana tipo

Desalination System Inc., de corte de 10.000 daltons (poros de 0,03µm) Modelo FW3840C. Obteve-se então duas frações: o soro UF permeado e o retido ou concentrado. O soro UF foi congelado a -20 °C em embalagens de 1 litro. Imediatamente antes de sua utilização este soro foi descongelado, aquecido por 15 minutos no microondas na potência alta e resfriado à temperatura ambiente. Ao sobrenadante, utilizado como meio de cultura, foi acrescido citrato de sódio (ECIBRA) em uma concentração de 4g/L e esterilizado por calor, a 121 °C por 10 minutos.

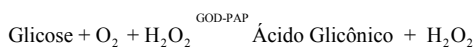
2.3 Obtenção da massa de célula permeabilizada.

Alíquotas de 3 ml da cultura pré-ativada foram transferidas para *fernabacks* de 2800 ml contendo 1 litro de soro estéril UF. Após aproximadamente 16-18 horas de crescimento a 30 °C sob agitação a 150 rpm, que correspondeu ao início da fase estacionária, fase de máxima atividade de enzima por célula, obteve-se as células de *Kluyveromyces lactis* com Densidade Ótica a 600 nm (DO_{600}) da cultura nessa fase que correspondeu a 3,45. As células de *Kluyveromyces lactis* foram centrifugadas a 4060 x g por 10 minutos (RC5C Sorvall Instruments) sob refrigeração (5-7°C). O precipitado foi ressuspenso em 100ml de etanol 50 % (Merck) e agitado por 15 minutos em agitador magnético (Wheaton Biostir 4) para permitir um maior contato das células com o etanol. Novamente, as células foram centrifugadas e lavadas com água destilada para retirada do excesso de álcool. O precipitado obtido foi submetido à secagem a uma temperatura de aproximadamente 30 °C, por cerca de 1 hora, sob ventilação, até se obter uma massa de células secas. Esta massa de células permeabilizadas, após ser macerada, foi colocada dentro de um frasco de vidro e armazenada sob refrigeração (4 °C).

2.4 Efeito da concentração da massa de células permeabilizadas na hidrólise de lactose

Preparou-se uma solução estoque de lactose (Sigma) de 600 mM e uma suspensão estoque de células permeabilizadas de 12mg/ml em tampão fosfato. O Tampão fosfato foi constituído de 0,06 M de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$; 0,04M de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 0,01M de KCl e 0,001M de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, (Tampão Z) segundo Miller (1972) citado por SHEETZ e DICKSON (1979). Não foi acrescentado 50mM de 2-mercaptoetanol por afetar a enzima do sistema de reação GOD-PAP® (Glicose Oxidase e Peroxidase) (Merck) usada na medida de atividade de β -galactosidade. O efeito da concentração do biocatalizador na velocidade inicial da reação foi estudado

em diferentes concentrações de lactose: 1, 40, 100 e 140 mM. As suspensões de célula permeabilizada para cada uma das concentrações de lactose foram: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg/ml. Ao volume da mistura de reação (500 μ l) foi adicionado 2ml de reagente GOD-PAP[®] para análise espectrofotométrica de glicose produzida durante reação. Na análise espectrofotométrica o GOD (Glicose Oxidase) oxida a glicose, que foi liberada da hidrólise da lactose, para ácido glicônico resultando num produto de cor violeta com a intensidade de cor proporcional à concentração de glicose no meio. O princípio da reação é:



As reações foram acompanhadas em espectrofotômetro (Beckman DU[®] 640), comprimento de onda de 510nm, que forneceu uma curva da variação de absorvância com o tempo de reação. No início da curva, temos a adaptação das enzimas envolvidas no sistema de reação (GOD-PAP e β -galactosidase) que logo em seguida atinge o steady-state, ou seja, velocidade constante de reação. A inclinação da reta apresentada para cada curva correspondeu as velocidades iniciais para cada combinação de célula permeabilizada e de lactose. A conversão de absorvância em unidades de mM de glicose, foi feita a partir de uma curva padrão. Preparou-se uma solução padrão de 1% de glicose, que foi diluída 100 vezes. Desta solução, obteve-se soluções contendo diferentes concentrações de glicose de: 0,5; 0,33; 0,25; 0,167; 0,0833; 0,0167 mM. O volume de reação de 1,5 ml constituiu-se de 500 μ L de solução devidamente diluída de glicose e 1,0mL de reagente GOD-PAP[®]. Após o tempo de reação (15 minutos), obteve-se as leituras das absorvâncias a 510 nm. A curva de calibração para glicose foi construída, relacionando as leituras das absorvâncias a 510 nm com as concentrações conhecidas de glicose em mM.

2. 5 Relação densidade ótica a 600nm e peso seco

Para definir a faixa de relação linear entre a leitura de densidade ótica da cultura e o peso seco da massa celular, preparou-se uma suspensão de células permeabilizadas em água destilada de 12mg/ml. Dentro de cadinhos de porcelana, previamente secos em estufa a 105°C/ 24 horas, foi colocado 1ml dessa solução. Essas amostras foram submetidas a temperatura de 105°C em estufa, até peso constante. A partir da suspensão inicial de células permeabilizadas de 12mg/ml, foram feitas diluições de 1:2 até 1:2000. Em cada uma das suspensões preparadas foram feitas duas determinações de densidade ótica: a primeira

obtida pela leitura direta da densidade ótica da suspensão (definida como D_{medida}) e a segunda determinada a partir da diluição da suspensão de modo a permitir leitura de densidade ótica na faixa de 0,1 - 0,4, que após multiplicada pelo fator de diluição foi definida como D_{real} . Todas as leituras de densidade ótica das amostras foram feitas no espectrofotômetro Beckman DU[®] 640 a 600nm. O gráfico relacionando os valores de D_{medida} e D_{real} foi traçado e a região dessa curva que apresentou um comportamento linear foi usada para a construção da curva de peso seco que relaciona a D_{medida} e a massa seca de célula permeabilizada (mg). Uma equação foi deduzida para converter D_{medida} para seu valor correspondente em matéria seca.

2.6 Determinação da unidade de atividade de β -galactosidase

A unidade de atividade de β -galactosidase foi determinada em termos de mM de glicose, utilizando as velocidades iniciais de reação para as suspensões de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/ml de célula permeabilizada. A inclinação da reta no gráfico velocidade de reação versus mg de célula permeabilizada, representou a atividade de β -galactosidase. Uma unidade enzimática (UE) foi definida como a massa de enzima que catalisa a produção de 1mM de glicose a partir da lactose por minuto sob as condições experimentais (temperatura ambiente e pH=7,1). UE foi expressa por mg de massa seca de célula permeabilizada.

2.7 Estabilidade da β -galactosidase em solução.

Determinou-se a estabilidade da enzima na célula permeabilizada suspensa em água. Em diferentes intervalos de tempo retirou-se alíquotas de 500 μ l da suspensão estoque de células permeabilizadas de 6mg/ml que foram adicionadas em uma cubeta de 4ml contendo 500 μ l de lactose (Sigma) retirada da solução estoque de 300 mM e 2ml de reagente GOD-PAP. Na mistura de reação, foi estabelecido que células permeabilizadas e lactose tivessem no volume final de reação uma concentração de 1mg/ml e 50 mM respectivamente. Esse procedimento foi repetido em intervalos de tempo por um período total de 9 horas. A variação de absorvância com o tempo foi acompanhada no espectrofotômetro (Beckman DU[®] 640) a 510nm para cada amostra; para determinação da velocidade inicial da reação. Determinou-se também a estabilidade da enzima na célula permeabilizada em tampão fosfato, seguindo o mesmo procedimento acima.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da Concentração da Massa de Célula Permeabilizada na Hidrólise de Lactose

A Figura 1 representa o efeito da concentração de massa de célula permeabilizada na velocidade da reação, para diferentes concentrações de lactose. A partir da equação da curva de calibração de glicose (Figura 2), a unidade da velocidade inicial foi transformada em mM de glicose/min. Pelos resultados apresentados na Figura 1, verificou-se que para concentrações de célula permeabilizada até 1mg/ml, a equação de Michael-Menten pode ser aplicada. Valores superiores a 1mg/ml extrapolam a relação linear do modelo entre velocidade e concentração inicial de enzima. Segundo BAILEY e OLLIS, 1986 esta relação mesmo aplicável no início das reações, pode se tornar imprópria no final do processo, quando a relação enzima/substrato é alta. De acordo com os resultados do presente trabalho, para concentrações de substrato de até 1mM o modelo é válido. Os resultados obtidos por SABIONI et al. (1984), indicaram que adição de 400 a 800 mg/litro de células permeabilizadas em leite em 2,5 a 3,5h de incubação a 35°C, resultaram em 45 a 69% de lactose hidrolisada. Nas presentes condições experimentais foi mais conveniente trabalhar com uma concentração de 1mg/ml. Os perfis das curvas de 40, 100 e 140 mM de lactose foram o mesmo, isso porque a concentração de lactose é alta no meio.

3.2 relação de densidade ótica a 600nm e peso seco

Para uma suspensão de células permeabilizadas de 12mg/ml de densidade ótica inicial de 2,66; foi obtido 9,8 mg de massa seca de células permeabilizadas. A curva da Figura 3 mostra que valores de leitura de densidade ótica até próximo a 0,5 coincidem com a região linear da curva. Essa faixa foi então utilizada para a construção da curva de peso seco e para a obtenção de uma equação linear da densidade ótica a 600nm ($D.O_{medida}$) com matéria seca, conforme mostrado na Figura 4.

3.3 Determinação da unidade de atividade de β -Galactosidase

Foram feitas leituras de D.O a 600nm das suspensões de 0,1; 0,5 e 1 mg/ml para suas respectivas conversões em matéria seca utilizando para isso a equação de curva de peso seco. Pela análise da Figura 5, podemos observar que um mg de massa seca de célula permeabilizada produz 0,31 mM de glicose da hidrólise de lactose em solução aquosa por minuto a temperatura ambiente. Sendo uma unidade de enzima

a massa de células permeabilizadas capaz de produzir 1 mM de glicose nas condições definidas, deduz que existe na preparação enzimática estudada 1 unidade de enzima correspondente a 3,2 mg de células permeabilizadas.

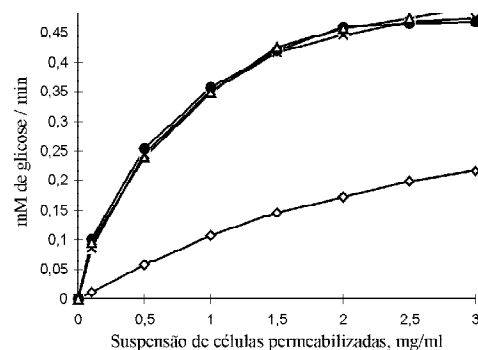


Figura 1 - Efeito da concentração da massa de células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis* na cinética de hidrólise de lactose. (○) lactose=1mM, (●) lactose = 40mM, (Δ) lactose=100mM e (x) lactose =140 mM.

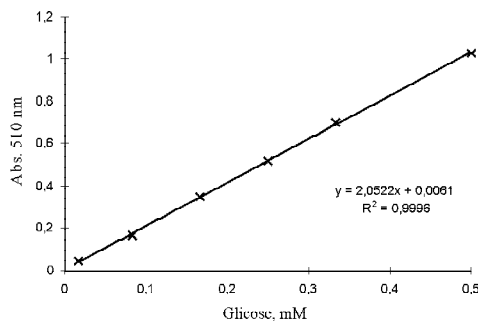


Figura 2 - Curva de calibração de glicose pelo método GOD-PAP.

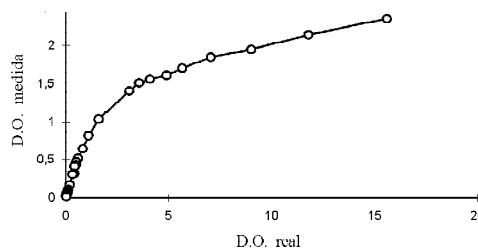


Figura 3 - Relação das leituras de densidade ótica $D.O_{medida}$ e $D.O_{real}$ da suspensão de 12mg/ml da massa de célula permeabilizada de *K. lactis*.

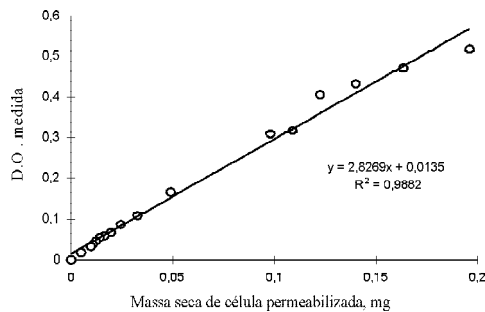


Figura 4 - Curva de peso seco para massa de células permeabilizadas de *K. lactis*.

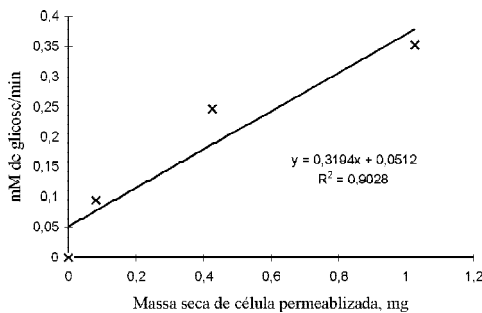


Figura 5 - Medida de unidade de atividade de β-galactosidase pela relação linear entre a velocidade de reação com o peso seco de células permeabilizadas.

3. 4 Estabilidade da β-galactosidase em solução

A atividade de β-galactosidase da célula permeabilizada em água e no tampão fosfato, está ilustrada na Figura 6. As unidades das velocidades, foram convertidos em mM de glicose/min, utilizando para isso a equação da curva de calibração de glicose (Figura 2). Pelos resultados, verifica-se que há perda de atividade da enzima em solução aquosa. Observa-se que a atividade da enzima é menor quando suspensa a massa de células permeabilizadas em água. Quando a enzima foi suspensa no tampão fosfato (pH=7,1), a atividade foi mais alta. Segundo VOGET et al., 1994, íons Mn^{++} e Mg^{++} mostram um importante papel estrutural na enzima β-galactosidase em razão de estarem diretamente envolvidos no processo catalítico e, além disso, protegem a enzima contra desativação térmica e a presença de K^+ é importante para a estabilidade da enzima.

DICKSON et al. (1979) demonstraram que a atividade máxima da lactase de *Kluyveromyces lactis* (em ONPG a 30°C) foi obtida na presença de Mn^{++} ou combinação de Mg^{++} e β-mercaptoetanol. Conforme os resultados de OHMIYA et al. (1976) a curva de pH para a β-galactosidase de *K. lactis* mostra uma alta atividade relativa da enzima em valores de pH próximos da neutralidade. Resultados obtidos por CLAMPLUVEIR et al. (1988), indicaram que a atividade de lactase de *Kluyveromyces lactis* foi estável em pH 6,55 e 6,98 quando estocada em temperatura de 37°C na presença de Mn^{++} .

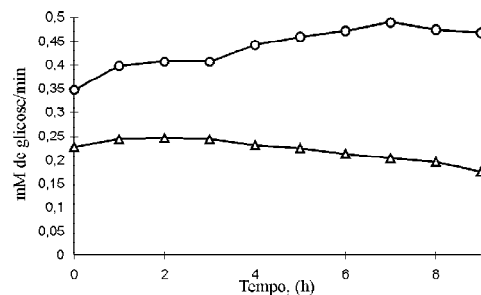


Figura 6 - Atividade de β-galactosidase em células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis* e estabilidade do em função do tempo de estocagem a 25°C. (o) tampão fosfato e (Δ) água destilada.

4 CONCLUSÕES

A cinética de hidrólise de lactose por β-galactosidase contida numa preparação de células de *Kluyveromyces lactis* permeabilizada em etanol 50%, foi avaliada na presença da lactose. A massa de 1mg de células permeabilizadas equivaliu a 0,32 unidades de atividade de enzimas. A concentração de 1mg/ml de células permeabilizadas adicionada à mistura de reação, foi selecionada pela sua relação linear com a velocidade de reação para as concentrações mínimas (1mM) e extremas (140mM) de lactose. Valores abaixo de 1mg/ml foram apropriados para a reação linear entre velocidade e concentração inicial de enzima. No estudo feito sobre a estabilidade da β-galactosidase em solução foi verificado que a enzima mantém sua atividade constante no tampão fosfato por um período de 9h. Atividade da enzima em água inicialmente foi menor e ocorreu a perda de atividade com o tempo.

ABSTRACT

The production permeabilized cell mass of *Kluyveromyces lactis* containing the enzyme β-galactosidase and her catalytic activity in the

lactose hydrolysis was accomplished. For obtaining of the permeabilized cell mass, cells were produced, growing in serum of UF sterile milk. To promote the permeabilization of the membrane, cells were treated with ethanol solution 50% to facilitate the contact between the enzyme and the substratum in the process lactose hydrolysis. The catalytic activity of the enzyme in the lactose hydrolysis was obtained by the lineal relationship between the reaction speed and dry weight in mg of permeabilized cell. The mass of 1mg of permeabilized cells was equal to 0.32 units of enzyme activity. The effect of the suspension of permeabilized cell in the initial speed of reaction was studied using different lactose concentrations (1, 40, 100 and 140 mM) and suspensions of permeabilized cells that varied from 0.1 to 3 mg/ml. The reactions were accompanied in the spectrophotometer DU in 510nm, that it supplied a curve of the absorbance variation with the time of reaction. The inclination of the straight line presented by each curve corresponded the initial speeds for each concentration of permeabilized cell and lactose. It was used in that analysis a reagent colorimeter GOP-PAP that specifically reacted with the present glucose in the middle. For conversion of the absorbance reading in units of mM glucose, it was made a curve standard of glucose. The suspension of 1mg/ml of permeabilized cell added to the reaction mixture, it was selected by her lineal relationship with the reaction speed for minimum concentrations (1mM) and extreme (140 mM) of lactose. Values below 1mg/ml were appropriate for the lineal reaction between speed and initial concentration of enzyme.

Keywords: β -galactosidase; lactose hydrolysis; *Kluyveromyces lactis*

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, J.E., OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. New York: McGraw-Hill, 1986. 567p.
- BECERRA, M., SISO, M.I.G. Yeast β -galactosidase in solid-state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**. 1996. 19:39-44.
- CLAMPLUVIER, B., KAMP, B., ROUXHET, P.G. Preparation and properties of β -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces sp.* **Enzyme Microb. Technol.**, 1988, 10:611-617.
- DECLÉIRE, M., DE CAT, W., VAN HUYNH, N. Comparison of various permeabilization treatments on *Kluyveromyces* by determining *in situ* β -galactosidase activity. **Enzyme Microb. Technol.**, 1987, 9: 300-302.
- DICKSON, R.C., DICKSON, L. R., MARKIN, J. S. Purification and properties of inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**. 1979. Volume 137, No 1. 51-61.
- DICKSON, R.C., BAAR, K. Characterization of lactose transport in *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**. 1983. Volume 154, No 3. 1245-1251.
- FENTON, D.M. Solvent treatment for β -D-galactosidase release from yeast cells. **Enzyme Microb. Technol.**, 1982, 4:229-232.
- FLORES, M. V., VOGEL, C. E., ERTOLA, R. J. J. Permeabilization of Yeast Cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. **Enzyme Microb. Technol.** 1994. 16: 340-346.
- FONTES, E. A. F.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J. V. A mechanistical mathematical model to predict lactose hydrolysis by β -galactosidase in a permeabilized cell mass of *Kluyveromyces lactis*: validity and sensitivity analysis. **Process Biochemistry**. 2001. 37:267-274.
- FONTES, E.A.F **Cinética de hidrólise de lactose utilizando células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis*: um modelo matemático mecanístico**, MG:UFV, 1998. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- HANSRUEDI, F. Review: Permeabilized cells. **Analytical Biochemistry**. 1982. 120:211-234.
- JOSHI, M.S., GOWDA, L.R., KATWA, L.C., BHAT, S. G., Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by digitonin. **Enzyme Microb. Technol.** 1989. 11:439-443.
- LEE, J.M. **Enzyme Kinetics**, New Jersey: A Simon & Schuster Company. Englewood Cliffs. 1992. 51p.
- MAHONEY, R. R., ADAMCHUK, C. Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of food science**. 1980. 45: 962-964.
- OHMIYA K., OHASHI, H., KOBAYASHI, T., SHIMIZU, S. Hydrolysis of lactose by immobilized microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. 1977. 33:137-145.
- PASSOS, L.M.L. **Produção de Células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 em soro de queijo ultrafiltrado e suplementado**. Viçosa, MG:UFV, 1996. 48p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- SABIONI, J. G., PINHEIRO, A. J. R., SILVA, D. O et al. Control of lactose crystallization from permeabilized *Kluyveromyces lactis* cells. **Dairy Sci.** 1984. 67: 2210-2215.
- SHEETZ, R.M., DICKSON, R. C. Mutations affecting synthesis of β -galactosidase activity in the yeast *Kluyveromyces lactis*. 1980. **Genetics** 93: 877-890.
- SISO, M.I.G. β -galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* on milk whey: batch versus fed-batch cultures. **Process Biochemistry**. 1994. 29:565-568.
- SISO, M. I. G., CERDÁN, E., PICOS, M. A. F, et al. Permeabilization of *Kluyveromyces lactis* cells for Different Treatments. **Biotechnology Techniques**. 1992. volume 6 No.4. 289-292.