

## APROVECHAMIENTO DE EFLUENTES DE INDUSTRIAS LÁCTEAS Y LEVADURAS RESIDUALES DE CERVECERÍAS PARA LA PRODUCCIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA Y ÁCIDO ACÉTICO

A. Flores P.; G.<sup>1</sup> Salas C.<sup>2</sup>, C. Altamirano C.; A. Patiño G.

### RESUMEN

En el presente trabajo, se efectuó la producción de biomasa de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109 sobre suero lácteo desproteinizado y la recuperación de biomasa de *S. cerevisiae* proveniente de efluente de cervecería complementado con cultivo sobre melaza de caña de azúcar. Se establecieron como condiciones óptimas para lograr el máximo rendimiento de biomasa: una temperatura de 30 °C, pH = 4,5; Agitación 600 RPM, un flujo de aireación de 1,75 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto (VVM), concentración de lactosa 20 g /L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 g /L; extracto de levadura 1.5 g/L. Se obtuvo un rendimiento promedio de: biomasa de 0,56 g/g con *K. marxianus* NRRL-Y-1109 en suero lácteo y un rendimiento de biomasa Yx/s 0 46 g/g para *Saccharomyces cerevisiae* en melaza con un rendimiento de 0,45 g/g, una concentración celular 12,75 y 11.52 g/L respectivamente al final de la fermentación. Se obtuvo una concentración de ácido acético, (3.5 g/L) por fermentación aeróbica del efluente líquido de cervecería.

**Palabras clave:** Cervecerías, DQO, fermentación acética, vinagre.

### USE OF DAIRY INDUSTRY EFFLUENTS AND WASTE BEER YEAST FOR THE PRODUCTION OF YEAST EXTRACT AND ACETIC ACID

#### ABSTRACT

This work was carried out with the purpose to optimize physical chemical parameters obtain a microbial biomass from *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109 and *Saccharomyces cerevisiae*. The yeasts were grown on sweet whey deproteinized, supplemented with nitrogen and vitamins sources and mollasses as carbon source for *S. cerevisiae*. The fermentation parameters were: An pH 4.5; Temperature 30°C and an aeration rate of 1.75 VVM; Agitation speed 600 RPM, Lactose concentration 5 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 g/L; Yeast extract 1.5 g/L. The average biomass yield obtained was 0.56 g/g lactose for *K. marxianus* and 0.46 g/g *S. Cerevisiae* respectively grown on sweet whey deproteinized & mollasses a cellular concentration of 12.75 g/L & 11.52 g/L respectively at the end of the fermentation. It was obtained acetic acid (3.5 g/L) by aerobic fermentation of brewery liquid effluent.

**Keywords:** Beer, DQO, acetic fermentation, vinegar.

### INTRODUCCIÓN

Las levaduras han sido usadas en procesos tradicionales de fermentación como vinos, cervezas y pan, también son usadas como fuentes alternativas de proteínas, enzimas y vitaminas de alto valor nutricional, tienen numerosas aplicaciones en la industria alimentaria como aditivos alimentarios,

agentes saborizantes, en la producción de extractos y medios de cultivo microbiológicos e insumos forrajeros. La producción de extractos de biomasa microbiana con alto contenido proteico y vitamínico, se ha presentado como una alternativa destinada a cubrir las demandas alimenticias del hombre y de los animales [1,4, 6, 10, 12].

1 serbioteca@hotmail.com, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.

2 gsalas19@yahoo.es, Departamento de Operaciones Unitarias, FQIQ-UNMSM.



La levadura cervecera es una excelente fuente de vitaminas B, Ca, P, K, Mg, Cu, Fe, Zn, Mn y Cr, ha sido estudiada por sus propiedades medicinales. Es usada para el tratamiento de la diabetes (regulación de niveles de insulina), pérdida de apetito, acné crónico, diarrea, etc. También es recomendada como suplemento dietético para la salud del cabello y uñas. En algunos casos causan algunos problemas como fatiga crónica, falta de memoria, inmunodeficiencia, síndrome de vejiga irritable, alergias, debido principalmente debido a antígenos de levaduras y altas cantidades de Cr y salicilatos<sup>[4]</sup>.

Los efluentes de industrias lácteas como suero lácteo y cerveceras se caracterizan por una alta carga orgánica, con azúcares residuales del proceso fermentativo y un alto contenido de levaduras. El efluente generado por filtración del proceso de elaboración de cerveza. Llega a contener hasta un 5% (V/V) de alcohol. La acción de los microorganismos presentes en este efluente (levaduras cerveceras remanentes del proceso y bacterias acéticas que se desarrollan espontáneamente bajo condiciones aeróbicas) hace factible la producción de extracto de levaduras rico en vitaminas y aminoácidos y ácido acético<sup>[10,12]</sup>. La mayoría de los efluentes líquidos de las cerveceras están caracterizados por una alta carga orgánica, debida a su contenido de azúcares remanentes del proceso fermentativo y de alcohol etílico.

En una cervecera localizada en la ciudad de Lima, uno de los aportes de carga orgánica más importantes lo constituye un efluente proveniente de la sala de bodega y filtración. Este efluente se genera a razón de 1.5 a 2.0 litros por cada 100 litros de cerveza producida, contiene principalmente carbohidratos, 10-12% p/v de levaduras (*S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, y 5-7% V/V de etanol.

Las levaduras se almacenan en un "tanque de residuos de levaduras" y se entrega a formuladores de alimentos balanceados

para animales, quienes aprovechan las levaduras. En otras ocasiones, este efluente se convierte en uno de los principales aportes a la carga orgánica total del residual de este tipo de industrias, puesto que, aun filtrada, presenta valores de Demanda Química de Oxígeno (DQO) del orden de los 200,000 mg O<sub>2</sub>/l. El etanol puede llegar a ser responsable de un 50-70% de su DQO "soluble" (DQO del filtrado). Es importante señalar que, como parte de la gestión de residuos sólidos, las empresas cerveceras industriales tratan la biomasa de levaduras residuales a 85 °C para destruirlas y evitar que sean reactivadas por otras empresas, por lo que se liberan levaduras muertas.

El extracto de levadura es un producto comercialmente valioso, disponible en polvo o en pastas, es usada intensamente como saborizantes en la industria alimentaria, es rica en ácidos nucleicos, principalmente ácidos ribonucleicos (ARN). Después de la autólisis e hidrólisis parcial de ARN, algunos ribonucleótidos como Guanosina 5-monofosfato (GMP) e Inosina 5-monofosfato (IMP) pueden ser extraídos de la biomasa. Estas sustancias son saborizantes eficientes en niveles muy reducidos. Los compuestos responsables de la acción intensificadora del sabor en las preparaciones crudas se atribuyen principalmente al glutamato de sodio (MSG), IMP e GMP<sup>[1]</sup>. Estos compuestos acentúan los sabores cárnicos en los alimentos y encuentran múltiples aplicaciones como saborizantes<sup>[26,27]</sup>.

La producción de extracto de levadura requiere la desintegración de las paredes celulares. Sin embargo, entre los métodos físico-químicos y enzimáticos para la ruptura de células de levaduras, el único método que parece práctico a escala industrial es la autólisis<sup>[1, 3]</sup>. La autólisis ocurre a un pH cercano a 5.0<sup>[6]</sup>. Sin embargo, durante la autólisis, el ARN intracelular normalmente se descompone en sustancias de bajo peso molecular como nucleósidos, o bases púricas y pirimidicas sin propiedades saborizantes, cuando se produce la autólisis a pH 6.0, la formación de GMP es muy reducido<sup>[27]</sup>.



## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la producción de levaduras sobre suero lácteo desproteinizado, se utilizó *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1009, procedente de la Northern Regional Research Laboratories ARS-USDA; *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-605 desarrollado sobre melaza de caña de azúcar, y biomasa de levaduras de efluente de cervecería.

Para la producción de ácido acético se utilizó el efluente líquido de la filtración de levaduras el efluente de la separación de levaduras y se utilizó una cepa de *Gluconobacter suboxydans* NRRL, haciéndolo desarrollar en condiciones aeróbicas en tanque agitado de 100 l, con una agitación de 300 RPM y 1.8 VVM de aireación, durante 96 horas.

### Preparación de inóculos para procesos fermentativos

El inóculo para fermentación de suero lácteo se preparó utilizando el medio de Mawson<sup>[11, 16]</sup> ml con volúmenes de trabajo de 100 mL incubados durante 18 horas en un agitador rotario. Alícuotas se transfirieron alícuotas de 20 ml de estos cultivos e incubadas a 30°C durante 18 horas, obteniéndose el inóculo para iniciar la fermentación.

### Evaluación de la cinética de crecimiento de las levaduras

Los parámetros cinéticos y rendimiento celular de *K. marxianus* NRRL-Y-1109 y *Saccharomyces cerevisiae* NRRL-Y605-, fueron evaluadas en cultivos sumergidos en lote en un reactor agitado de 100 litros del laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología-UNMSM empleando los parámetros operacionales optimizados sobre suero lácteo desproteinizado y melaza de caña más micronutrientes a nivel de matraces agitados.<sup>[5, 11, 12]</sup>

Los inóculos fueron preparados a partir de cultivos desarrollados en Agar YPL y transferidos a un matraz con 100 ml de suero lácteo desproteinizado con una concentración

de lactosa 20 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5 g/l; extracto de levadura 2.5 g/l, incubados a 30 °C con agitación constante (150 RPM) durante ocho horas y luego transferidos en alícuotas de 10 ml a matraces Erlenmeyer con 100 ml del medio descrito o medio con suero lácteo total, suplementado con solución de oligoelementos<sup>[5, 11, 12, 13]</sup>.

Los cultivos "semilleros" fueron incubados a 30 °C, con agitación de 150 RPM, durante 8-9 horas, hasta alcanzar una concentración celular de  $1-2 \times 10^7$  células / ml en medio de Mawson<sup>[16]</sup> suplementado con solución de oligoelementos y micronutrientes:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/l;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0.1 mg/l;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0.15 mg/l;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0.15 mg/l. Para el cultivo de *S. cerevisiae* NRRL-Y-, se utilizó el medio de Mawson modificado reemplazando la sacarosa por sacarosa en concentración de 20 g/l.

En el reactor agitado de 100 litros de capacidad, se realizaron varios ensayos de acuerdo a un diseño factorial simplificado<sup>[11, 12]</sup>. En los ensayos de recuperación de biomasa de *S. cerevisiae* se utilizó levaduras residuales del efluente del tanque y mezclado con una alícuota (50:50) del medio resultante del ensayo de producción de *S. cerevisiae* NRRL-Y-.

**Determinaciones analíticas.** La concentración celular de las levaduras cultivadas fue estimada midiendo la densidad óptica y el peso seco, de acuerdo al protocolo sugerido por Flores.<sup>[11, 12]</sup> Las células fueron recolectadas a 4,500 RPM por 15 minutos y lavadas dos veces con buffer fosfato pH=6.6 y secadas a 105 °C en un crisol hasta obtener un peso constante.

### Recuperación de la biomasa

Alcanzada la fase estacionaria de crecimiento, todo el caldo de cultivo fue centrifugado (12.000 g/15 minutos). El sedimento se lavó dos veces con agua destilada y se deshidrató (55 °C /18 h) en una estufa Memmert. El residuo seco se depositó en frascos cerrados herméticamente y se almacenó a 4 °C.



### Obtención de los concentrados proteicos

Se prepararon dos tipos de concentrados proteicos: C<sub>1</sub>) mediante extracción alcalina y subsiguiente precipitación isoelectrica (1; 3; 4.); C<sub>2</sub> por extracción alcalina, fosforilación con trimetafosfato de sodio y precipitación isoelectrica<sup>[12; 21]</sup>.

### Hidrólisis de suspensiones celulares

Las biomásas de *K. marxianus* NRRL-Y-1109 y *S. cerevisiae* fueron recuperadas por centrifugación a 4,500 RPM por 20 minutos<sup>[10]</sup>.

Para la autólisis de las levaduras, se preparó una suspensión celular de 10% (P/V) en buffer fosfato pH= 6.4. Se añadió etil acetato a una concentración final de 5% (P/V). Las suspensiones celulares fueron incubadas a 35- 50 °C por 18-24 horas, las levaduras autolisadas fueron centrifugadas a 4,500 RPM por 20 minutos. Los pellets fueron descartados, recuperándose los sobrenadantes para posteriores análisis. Parte de los autolisados de levaduras fueron secados a 95 °C por 3-4 horas, la hidrólisis del ARN fue logrado por acción enzimático de 5-fosfodiesterasa por 10 horas a 55 °C (P/V) de acuerdo a Tanekawa, 1981.<sup>[27]</sup> La enzima fue inactivada por tratamiento térmico a 95 °C por cinco minutos. La concentración de ARN fue determinada por espectrofotometría según De Palma Revillion, *et al.*<sup>[10]</sup>

Para las determinaciones de humedad, proteína cruda, cenizas, nitrógeno no proteico se siguió la metodología de Official Methods of Analysis A.O.A.C. Internacional<sup>[26]</sup>. La proteína verdadera se determinó mediante la diferencia entre el nitrógeno total y el nitrógeno no proteico, la grasa por

el método de Soxhlet, carbohidratos por diferencia y los ácidos nucleicos según el método empleado por Mitchell *et al.*<sup>[16]</sup>.

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Folin-Ciocalteu; los carbohidratos por el método Fenol-Sulfúrico y por el método de Miller<sup>[17]</sup>. La composición global del extracto de levadura fue determinada siguiendo los protocolos propuestos por la AOAC, 1984<sup>[2]</sup>.

Se determinó la concentración de ácido acético por titulación con solución de NaOH 0.5 N y del pH utilizando técnicas estandarizadas.<sup>[14]</sup>

### RESULTADOS

La optimización de parámetros de producción de biomasa de las levaduras *Kluyveromyces marxianus* Y-1109 sobre suero lácteo desproteínizado y *S. cerevisiae* sobre melaza de caña de azúcar suplementado con fuentes de N determinados en experimentos preliminares fueron: 1,475 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto (VVM), concentración de lactosa 20 g/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 g/l; extracto de levadura 1.5 g/l.

Se obtuvo un rendimiento promedio de: biomasa de 0,56 g/g lactosa, con *K. marxianus* NRRL-Y-1109, una concentración celular 12,75 g/g; Para *Saccharomyces cerevisiae* y un rendimiento de biomasa Yx/s 0 46 g/g y 10.52 g/l, siendo sus parámetros óptimos: Sacarosa 25 g/l; concentración de sales y extracto levadura 5 g/l; agitación 6000 PM; aireación 1.825 VVM, con una  $\mu_x$  de 0.35 hrs.<sup>-1</sup> y un tiempo generacional de 1.98 h. (Tabla N.º 1 ).



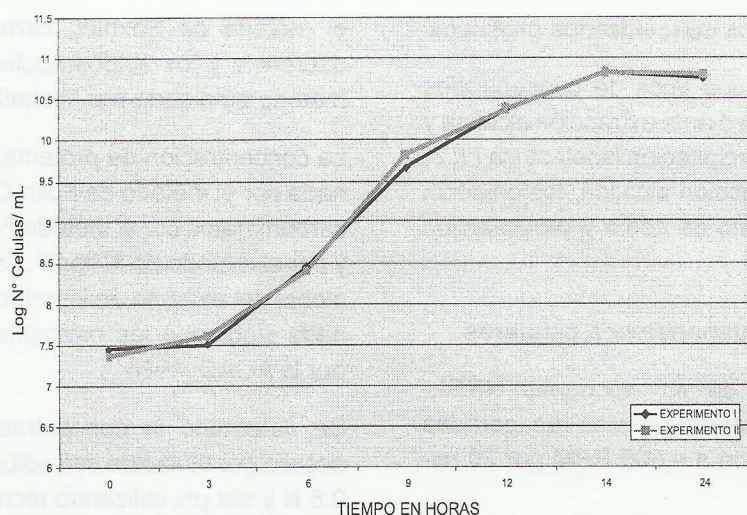


Fig. N.º 1. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* NRRL-Y- en condiciones optimizadas.

Tabla N.º 1. Evaluación de parámetros cinéticos de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* sobre melaza de caña de azúcar en reactor agitado de 100 litros.

Nº exper.	Conc. sac. (g/L)	Conc. Sales y ext. lev. (g/L)	Agitac. RPM	Aereación V.V.M	Veloc. específica crecim. $\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )	Tiempo generacional (h)	Rendimiento biomasa $Y_{x/s}$
1	15	2.5	400	1.145	0.305	2.27	0.305
2	15	5	600	1.750	0.345	2.09	0.350
3	25	5	600	1.825	0.350	1.98	0.460
4	15	2.5	600	1.825	0.350	1.98	0.420
5	25	5	800	1.145	0.330	2.10	0.360
6	25	7.5	400	1.145	0.310	2.31	0.310
7	35	2.5	800	1.750	0.350	1.98	0.360
8	35	5	600	1.143	0.295	2.35	0.310
9	35	7.5	400	1.823	0.285	2.45	0.30

### Preparación y caracterización de los concentrados proteicos

Para evitar la coprecipitación de ácidos nucleicos a bajos valores de pH [8] y debido a que no se observaron grandes diferencias en los valores de pH de mínima solubilidad de las proteínas, los concentrados por precipitación a pH 4. La composición química de los mismos y del extracto obtenido de ellos se muestra en las Tablas 2, 3 y 4 para ambos tratamientos.

Todos los parámetros, a excepción de la humedad y la proteína verdadera, mostraron diferencias significativas entre los trata-

mientos estudiados ( $C_1$  y  $C_2$ ). El contenido de cenizas en  $C_2$  resultó estadísticamente mayor que en  $C_1$ , como era de esperarse ya que parte de la sal utilizada en la fosforilación proteica durante la elaboración del concentrado  $C_2$  queda remanente formando parte del producto final. En cuanto al contenido de grasa, éste resultó significativamente mayor en  $C_1$  que en  $C_2$ . Los valores obtenidos para ambos concentrados se aproximan a 3,58% y 4,1%.<sup>[11,12]</sup>

Los resultados del presente estudio demuestran que se puede obtener un concentrado proteico a partir de biomasa microbiana *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109



y *S. cerevisiae* residual de cervecería cultivadas en suero lácteo desproteinizado y melaza de caña de azúcar respectivamente. Los valores de rendimiento y la concentración celular obtenidos fueron satisfactorios para estos microorganismos.

En relación con la extracción de extracto de levadura puede observarse en la Tabla 2, que el tratamiento de biomasa de *K. marxianus* y *S. cerevisiae* en concentraciones de 80-100 g/l a 50 °C por 8 horas es el más eficiente para inducir la autólisis celular con una solubilización de 50% de proteínas coincidente con los reportados por Orban *et al.*; Revillon J.P. *et al.*, quienes demuestran además que los tratamientos celulares previos con NaCl 5% o la ruptura mecánica de células no modifican el proceso autolítico.

En la Tabla 3, se observa que el tratamiento térmico no influye significativamente en la liberación de proteínas intercelulares. La máxima concentración de proteínas solubles se observa a 37 °C por 12 horas, esto podría explicarse como sugiere Revillon a que el etil acetato al 5% (P/V) es un eficiente agente permeabilizante.

En cuanto a la producción de ácido acético, se observó que la concentración de microorganismos en el reactor, aumenta hasta el tercer día, esto nos indica la capacidad de las levaduras remanentes en el efluente y bacterias acéticas de metabolizar el etanol y los azúcares remanentes en condiciones aeróbicas.

Hacia el cuarto día del experimento de producción de ácido acético, se presenta un máximo en la concentración de microorganismos ( $1.25 \times 10^{10}$  UFC/mL) y en la concentración de ácido acético, (3.5 g/L) acompañados de un mínimo de la DQO (2,100 mg O<sub>2</sub>/L), se debe considerar que a excepción de algunas especies como el *Gluconobacter*<sup>[20]</sup>, la mayoría de las bacterias acéticas son capaces de procesar el etanol a ácido acético, especialmente si los demás nutrientes orgánicos se tornan escasos.

**Tabla N.º 2.** Composición química de los concentrados proteicos de *K. Marxianus* NRRL-Y-1109 y levadura residual de cervecería.

Componentes	<i>Kluyveromyces marxianus</i> 1109		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	C <sub>1</sub> (% p/p)	C <sub>2</sub> (% p/p)	C <sub>1</sub> (% p/p)	C <sub>2</sub> (% p/p)
Proteína Kjeldhal	72.35	71.10	68.25	68.10
Nitrógeno no proteico	0.95	0.65	0.84	0.72
Humedad	6.75	6.12	7.25	7.10
Proteína verdadera	65.75	61.45	62.75	61.15
Cenizas	4.50	12.78	5.65	11.21
Grasa	5.45	3.65	6.5	5.74
Carbohidratos	8.15	4.35	7.75	5.60
ARN	4.65	3.15	5.45	5.15

C<sub>1</sub>. Concentrado proteico por extracción alcalina y precipitación isoelectrica.

C<sub>2</sub>. Concentrado proteico por extracción alcalina, fosforilación con trimetafosfato de sodio y precipitación isoelectrica.

**Tabla N.º 3.** Liberación de proteínas solubles por diferente procedimientos de autólisis en *K. Marxianus* y *S. cerevisiae* residual de cervecería.

Tratamiento	Tipo de levadura			
	<i>K. marxianus</i> 1109		<i>S. cerevisiae</i>	
	Proteína soluble (g/L)	Yx/s (g/g Biomasa)	Proteína soluble (g/L)	Yx/s (g/g)
Control	16.2	0.62	15.8	0.58
25 °C / 12 h.	12.8	0.48	11.6	0.32
37 °C / 12 h.	18.8	0.68	16.6	0.62
37 °C / 30 h.	17.6	0.62	15.6	0.52
50 °C / 48 h.	16.8	0.58	14.8	0.45
50 °C / 48 h.	16.6	0.56	14.6	0.42

**Tabla N.º 4.** Composición del extracto de levadura de biomasa de *K. marxianus* NRRL-1109 y *S. cerevisiae* residual de cervecería.

Componente	Tipo de levadura	
	<i>K. marxianus</i> NRRL-1109 (mg/ g)	<i>S. cerevisiae</i> (mg/ g)
Proteína cruda	505.0	482.0
Grasa	5.2	4.85
Ceniza	66	68.2
Humedad	56.0	52.0
Carbohidratos	336.5	345.0
AC. Ribonucleico ARN	4.65	5.25



## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican la factibilidad de producir extracto de levadura rica en proteínas, vitaminas y aminoácidos y ácido acético a partir de una biomasa de *K. marxianus*, *S. cerevisiae* y efluentes industriales de las cervecías, fermentación de suero lácteo en condiciones aeróbicas, a través de un proceso que involucra operaciones muy sencillas como la agitación y la aireación.

El producto de desecho de cervecías se puede convertir en materia prima para producir un producto que podría ser comercializado como extracto de levaduras y "vinagre de cerveza", si se lograra la concentración de ácido acético mínima permitida (Codex alimentarius). El costo cero de la "materia prima", la sencillez del proceso y de los equipos requeridos permiten vislumbrar su rentabilidad, aun si se debiera incorporar una etapa de pasteurización del producto final para asegurar su inocuidad y una clarificación (p. ej., con carbón activado) para mejorar el aspecto visual del producto. El tratamiento previo es muy sencillo: las levaduras contenidas en el efluente "crudo", de poca actividad biológica por el origen del efluente, pueden separarse mediante procesos físicos como la centrifugación o la sedimentación en frío y sometidos a procesos de autólisis para ser comercializadas con destino a la formulación de alimentos balanceados para animales, contribuyendo de este modo al balance económico del proceso.

El proceso propuesto de producción de vinagre de cerveza permite una disminución de la carga orgánica del efluente, con el consiguiente impacto favorable en el diseño y/o la performance del proceso de tratamiento.

El estudio del comportamiento de bacterias acéticas perfectamente identificadas, en lo que a cinética y rendimientos respecta, resultará de suma utilidad en el diseño del proceso a escala industrial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Akiyama S, Di M, Arai Y, Nakoa Y, Fukuda H. Production of Yeast biomass U.S. patent 3, 909, 532. 1975.
- [2] AOAC Official Methods of analysis 17<sup>th</sup> ed. Association of official Analytical Chemists, Washington.
- [3] Babayan TL, Bezrukov MG. Acta biotechnol, 1985. 5. 129-136.
- [4] Bekatorou A, Psarianos C, Koutinas A. 2006 44 (3): 407-415.
- [5] Berstein S, Tzeng Ch. Environmental Protection technology series. 1977, EPA-600/2-77-133.
- [6] Bèhalova B, Beran K. Folia Microbiologica. 1979. 24: 455-461.
- [7] Belem MAF, Gibas BF, Lee BH. J. Food Sci. 1997.62:851-857.
- [8] Codex alimentarius, Art.1328 y 1335, Capítulo XIV, Res. M S y AS N° 80/82.
- [9] Dziekak JD. Food technol. 1987. 41: 104-112.
- [10] Palma Revillion JP de, Brandelli A, Zachia A. M.A. (2003): Braz. Arch. Biol. Technol. 2003. 46: 121-127
- [11] Flores P., A. Aislamiento, selección y evaluación de Levaduras forrajeras para procesos de bioconversión de residuos agroindustriales, Tesis para optar el grado académico de Doctor en Ciencias biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM, 2000.
- [12] Flores PA. Rev. Peruana de Química e Ing. Química. 2008. Vol. 11 (1): 3-10.
- [13] Grady CPL, Daigger G, Lim HC. Biological wastewater treatment. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Marcel Dekker Inc; 1999.
- [14] Greenberg AE, Clesceri LS, Eaton AD. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18<sup>th</sup> ed.

- Washington: American Public Health Association; 1998.
- [15] Mawson AJ. Bioresource technology, 1994, vol. 47: 3, p. 195-203.
- [16] Michel A, Jacob F, Perrier J, Poncet S. Biotechn. Bioeng. 1987, 30, p.780-783.
- [17] Miller, G. Anal. Chem. 31: 426-428, 1975.
- [18] Moresi M, Colocchio A, Sansovani, F. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechn. 1980, 9: 173-183
- [19] Moresi M, Patete M, Trunfio A. Applied Microbiology and Biotechnology, 1989, vol. 31, p. 495-501.
- [20] Maragoudakis ME, Strassman M. J. Bacteriol. 1967, vol. 94(3), 512-517.
- [21] Moresi, M. Italian J. food Sci. 6: 1994, 357-370
- [22] Lahl WJ, Braun SD. Food technol. 1884, 48: 68-71
- [23] Ogata K. adv. Appl. Microbiol. 1975, 19: 209-247.
- [24] Orban E, Quaglia GB, Casini I, Moresi M. Bioprocess and biosystems engineering. 1998, vol. 18: 5, 383-388.
- [25] Palma Revillion JP de, Brandelli A, Ayub MAZ. Ciencia Tecnol. Alim. 2000, 20: 246-249.
- [26] Official Methods of Analysis 16<sup>th</sup> ed. 3<sup>rd</sup> revision, A.O.A.C. INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD. Method 92523. 1997.
- [27] Tanekawa T, Takashima H, Hachiya T. Production of yeast extract containing flavourin US patent, 4, 303, 680, 1981.