

# OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS FERMENTATIVOS PARA PRODUCCIÓN DE BIOMASA FORRAJERA CON LEVADURAS DESARROLLADAS EN CULTIVOS BATCH SOBRE SUERO LÁCTEO CRUDO Y DESPROTEINIZADO

Abad Flores P.<sup>1</sup>, Mario Bautista C.<sup>1</sup>, Juan Woolcott H.<sup>1</sup>, Alejandro Patiño G.<sup>1</sup>,  
Mayra De La Torre <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional Mayor de San Marcos

<sup>2</sup>Instituto Politécnico de México

## RESUMEN

Se efectuó la optimización de parámetros de producción de biomasa de las levaduras *Kluyveromyces marxianus* NRRL -Y-1109 y *Candida pseudotropicalis* BT-UNMSM\_6 sobre Suero lácteo crudo y desproteínizado suplementado con fuentes de nitrógeno y vitaminas. La optimización de parámetros se obtuvo aplicando un diseño estadístico factorial simplificada de Taguchi modificado. 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 1,475 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto (VVM), Concentración de Lactosa 5 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 y un rendimiento de biomasa Yx/s 0.54 g/g lactosa para *Candida pseudotropicalis* en suero lácteo desproteínizado y diluido al 50% y un rendimiento de biomasa de 0,425 g/g, con *K. marxianus* NRRL-Y-1109 y un rendimiento Yx/s 0.38 g/g para *Candida pseudotropicalis* en suero lácteo crudo, un consumo de lactosa del 98.25% y 94.45%, una concentración celular 12,75 y 12.52 g/L, respectivamente, al final de la fermentación.

**Palabras clave:** Suero lácteo, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida pseudotropicalis*, SCP concentrado proteico.

## ABSTRACT

This work was carried out with the purpose to optimize physical chemical parameters obtain a microbial biomass from *Kluyveromyces marxianus* NRRL -Y-1109 y *Candida pseudotropicalis* BT-UNMSM\_6. The yeasts were grown on sweet whey crude and deproteinized, supplemented with nitrogen and vitamins sources. The optimization of fermentation parameters was obtained applying a Taguchi's factorial design. It was established as optimal conditions: An pH 4.5; Temperature 30 °C and an aeration rate of 1.475 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 and 0.54 g/g Lactose for *K. marxianus* and *C. pseudotropicalis* respectively grown on sweet whey deproteinized diluted 50%, and Cellular yield 0.405 g/g with *K. marxianus* NRRL-Y-1109 and Yx/s 0.38 g/g with *Candida pseudotropicalis* grown on sweet whey crude. A lactose consumption of 98.25 & 94.45% and a cellular concentration of 12.75 g/L & 12.52 g/L respectively at the end of the fermentation.

**Keywords:** Whey, *Kluyveromyces marxianus*, protein concentrate, SCP.

## I. INTRODUCCIÓN

Los países en vías de desarrollo como el Perú, enfrentan serios problemas socioeconómicos, entre los cuales, la alta tasa de cre-

cimiento poblacional y la baja productividad agrícola generan problemas de escasez de proteínas convencionales, acompañados de hambre y desnutrición.

La producción de biomasa microbiana con alto contenido proteico y vitamínico, se ha presentado como una alternativa destinada a cubrir las demandas alimenticias del hombre y los animales. Este proceso está siendo aplicado en países industrializados, lográndose altos rendimientos de biomasa de subproductos agroindustriales: Melaza de caña de azúcar, licor sulfítico del procesamiento del papel, suero lácteo, vinazas y residuos lignocelulósicos y amiláceos del agro.

El suero de leche considerado como subproducto de la industria láctea, es un fluido claro, de color amarillo obtenido por la separación de coágulo de la leche total, crema o nata. La composición y el tipo de suero dependen de los tipos de quesos fabricados y de los procesos tecnológicos empleados. El suero lácteo dulce resulta del uso de enzimas tipo Renina a un pH de 5.6; el suero lácteo ácido deriva de la acidificación directa de la leche a pH menores de 5.1.

La producción de queso ácidos (Ricotta o Cottage) da lugar a la producción de sueros ácidos de pH 5.0-5.8. En muchos países en vías de desarrollo, el suero es descargado en las fuentes de agua naturales provocando un impacto ambiental negativo debido a su elevado contenido de materia orgánica, que alcanza una DBO<sub>5</sub> de 30.000-50.000 mg/L [4, 15, 26]. En la actualidad, la legislación prohíbe el vertimiento directo del suero a los cursos de agua sin un tratamiento previo, que consiste principalmente en la remoción de la lactosa y las proteínas. Sin embargo, son justamente estos componentes los más valiosos en el momento de aprovechar el suero lácteo como medio de cultivo para fermentaciones industriales [15].

El proceso más simple para la obtención del suero es el calentamiento para recuperar la proteína del mismo como un concentrado proteico insoluble, dando como resultado un suero parcialmente desproteínizado. La proteína láctea obtenida tiene muy variadas aplicaciones, entre las cuales se citan la fabricación de sopas, condimentos para ensaladas, pasta enriquecida con proteína,

helados, productos especiales dietéticos y productos cárnicos.

Se puede obtener lactó suero desproteínizado a partir de leche y empleando el sistema de ultra filtración, obteniendo así un suero lácteo que se conoce con el nombre del "permeado" [3,6]. Los sólidos totales del suero lácteo están formados, principalmente, por lactosa, la cual representa un 4,8% p/v, además de 0,9% p/v de proteína, 0,8% p/v de minerales y menos de 0,05% p/v de grasa [20] es por esto que el problema de la utilización del suero lácteo es en esencia el del uso de la lactosa, lo cual es también cierto para el suero desproteínizado [5, 11]. En el Perú, se ha estimado la producción de suero para el año 2006 en 25.258 toneladas (Min. Agricultura).

El suero lácteo puede ser usado como materia prima apropiada para un amplio rango de aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y productora de biogás. Sin embargo, la cantidad de suero lácteo procesado en el mundo es solo la mitad de la producción anual de suero en el mundo. Una alternativa a los usos tradicionales del suero es la producción de proteínas monocelulares (SCP) [3, 4, 5, 6, 8, 11, 24, 26, 32].

Durante la fabricación de SCP, el suero es inoculado con levaduras seleccionadas de los géneros *Kluyveromyces* y *Candida*. Los contenidos de lactosa y lactato del suero suministran nutrientes para que estos microorganismos puedan crecer apropiadamente y producir proteínas. El producto final tiene un alto contenido de proteínas, aproximadamente, 50%, el cuál es de alto valor biológico (85%). Luego de un pretratamiento puede ser utilizado en nutrición humana y animal como nutriente o suplemento alimenticio [2, 11].

La factibilidad económica de la producción comercial de levaduras forrajeras reside en la disponibilidad de fuentes de Carbono de bajo costo en volúmenes significativos como el suero lácteo de las cuencas lecheras de Arequipa, Puno, Cusco, Huancayo y Cajamarca y en el desarrollo optimizado de los procesos fermentativos [15].

El objetivo del presente estudio fue establecer y optimizar los parámetros fermentativos para la producción de biomasa de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 1109 y una levadura nativa *Candida pseudotropicalis* BT-UNMSM-6 en suero lácteo dulce crudo y desproteinizado a nivel de planta piloto en reactores agitados, basados en la medición de El crecimiento: Velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), y el rendimiento celular  $Y_{x/s}$ .

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

Para la selección de levaduras a ser utilizadas en la fermentación de suero lácteo se trabajó con: *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1009, *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-2415 procedentes de la Northern Regional Research Laboratories NRRL) ARS-USDA; *Kluyveromyces marxianus* BT-USM-54; *Kluyveromyces lactis* BT-USM-81; ; *Kluyveromyces thermotolerans* BT-USM-82; *Candida curvata* BT-USM-21; *C. curvata* BT-USM-24; *Candida pseudotropicalis* BT-USM-6; *Candida pseudotropicalis* BT-USM-9; *Candida pseudotropicalis* BT-USM-84; *Trichosporon beugelli* BT-USM-50; *Trichosporon beugelli* BT-USM-40 de la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología-UNMSM, mantenidos mediante subcultivos periódicos, en agar nutricio lactosado (YPL <sup>[13]</sup>) y almacenado a 5 °C en el agar inclinado.

Para los procesos de optimización de parámetros de fermentación sobre suero lácteo total y suero desproteinizado, se utilizaron 2 cepas de levaduras forrajeras *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1009, y *Candida pseudotropicalis* BT UNMSM-6, seleccionados en base a su rendimiento celular en los experimentos preliminares.

### Preparación de inóculos para procesos fermentativos

El inóculo se preparó a través de dos ciclos sucesivos de crecimiento de la levadura a

30 °C, utilizando el medio de Mawson <sup>[25]</sup>. En el primer ciclo las levaduras se sembraron con asa de platino en matraces Erlenmeyer de 1000 mL con volúmenes de trabajo de 100 mL y se incubaron durante 18 horas utilizando un agitador rotario. Alícuotas de 20 mL de estos cultivos eran transferidas a matraces erlenmeyer de 1 litro con volúmenes de trabajo de 180 mL. Éstas fueron incubadas a 30 °C durante 18 horas, obteniéndose el inóculo requerido para iniciar la fermentación.

El mosto de fermentación se preparó mediante la suspensión de suero dulce en polvo a razón de 45-50 g/L en agua destilada (concentraciones correspondientes a suero lácteo en su estado líquido natural) y posterior desproteinización por precipitación ácida siguiendo el método empleado por Flores, A. <sup>[15]</sup>. Se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético concentrado, seguido del tratamiento térmico (96 °C/15 minutos).

La preparación se mantuvo en reposo durante 18 h, a temperatura ambiente y se filtró a través de papel Whatman N° 1. El filtrado se diluyó en agua destilada <sup>[3]</sup>, para ajustar la concentración de lactosa al 2,5% p/v y se suplementó con sulfato de amonio y extracto de levadura a las concentraciones de 0,2 y 0,1% p/v, respectivamente. El pH se reajustó a 4,5 y luego se esterilizó en un autoclave (121 °C/15 minutos).

### Desarrollo del proceso de Fermentación

Los cultivos se desarrollaron en tanques agitados "CHEMAP" de 7 L operados con volúmenes de trabajo de 3 L a 30 °C. Los procesos se iniciaron con un volumen de inóculo equivalente al 10% del volumen de trabajo y con adición de antiespumante Sigma A-5633 estéril a una concentración de 0,40 mL/h. Durante el proceso se burbujeaba aire estéril en forma continua con un flujo de 1,475 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto (VVM).

La determinación de las variables operacionales de fermentación de suero lácteo dulce desproteinizado, se efectuó siguiendo

un diseño estadístico factorial simplificado de Taguchi [32] y el diseño de Chen [10] que permitió evaluar la influencia de los niveles de concentración de lactosa en el suero lácteo; Concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Concentración de sales de Nitrógeno y Azufre; la velocidad de agitación (400-600-800 RPM) y el flujo de aireación (1.2 - 1.5 - 1.8 VVM) sobre el rendimiento celular de las levaduras seleccionadas desarrollados en cultivos sumergidos en el fermentador "CHEMAP", AGCH-8604 de 7 L. De capacidad adaptados con electrodos de Oxígeno, electrodos de pH y sensores de pH, Temperatura,  $\text{O}_2$  disuelto a nivel de laboratorio, para su escalamiento a reactores agitados.

Se fijaron como condiciones operativas un volumen de trabajo de 5 L, Temperatura 30°C, pH 4.5; Presión de aire 1 Kg/cm<sup>2</sup>. Los factores a evaluar fueron distribuidos aleatoriamente [10, 20, 29, 30].

Posteriormente, se aplicó un diseño estadístico ortogonal de la forma 3K con 3 niveles de concentración de Lactosa en suero (15-25-35 g/L); Concentración  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (4-6-8 g/L) Concentración de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  de (2-3-4 g/L); Concentración de extracto de levadura (0.5-1.0 -1.5 g/L) en medio de Mawson [21] suplementado con solución de oligoelementos y micronutrientes:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_4$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  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. Se aplicó una presión de flujo de aire de 2 Kg/cm<sup>2</sup> y una sobre presión del reactor de 1 Kg/cm<sup>2</sup>.

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

La determinación de los parámetros cinéticos y rendimiento celular de *K. marxianus* NRRL-Y-1109 y *C. pseudotropicalis* BT-UNMSM-6 fueron evaluadas por cultivo sumergido en lote en un reactor agitado del 100 L del laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología - UNMSM empleando los parámetros operacionales optimizados sobre suero lácteo desproteinizado y suero lácteo total a nivel de matraces agitados.

Los inóculos fueron preparados a partir de cultivos desarrollados en Agar YPL y transferidos a un matraz con 100 mL de suero lácteo desproteinizado (medio de Moresi) 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 8 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.

Los cultivos "semilleros" fueron incubados a 30 °C, con agitación de 150 RPM, durante 8-9 h, hasta alcanzar una concentración celular de  $1-2 \times 10^7$  células /mL en medio de Mawson [23] suplementado con solución de oligoelementos y micro nutrientes:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_4$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  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.

### Determinación de la Biomasa de levaduras forrajeras

Periódicamente, cada 2 horas, se tomaban alícuotas (10 mL) por duplicado del cultivo microbiano en crecimiento, las cuales se centrifugaron (12.000 g/10 minutos). Los sedimentos se lavaron 2 veces con agua destilada; posteriormente, se secaron a 105 °C hasta obtener peso constante.

Alternativamente, el peso seco (g/L) de la biomasa de las levaduras en los procesos fermentativos, fue determinado gravimétricamente, filtrando 10 mL de cultivos a través de filtros "Millipore" de 47 mm de diámetro y 0.43 micras ( $\mu$ ) de porosidad, secados y pesados en una balanza analítica. Los filtros con las muestras secadas a 80°C por 6 horas fueron pesados nuevamente para obtener el peso seco por diferencia de pesos.

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu_x$ ) fue determinada en el cultivo por lote durante el crecimiento logarítmico aplicando la formula:

$$\mu_x = \frac{\text{Ln}X_f - \text{Ln}X_0}{T_2 - T_1}$$

Se determinó el valor de la velocidad máxima de crecimiento específico ( $\mu_{\max}$ ) considerando la gráfica del logaritmo neperiano de la concentración celular con respecto al tiempo, se determinó la pendiente de la línea recta correspondiente a la fase exponencial.

El rendimiento celular ( $Y_{x/s}$ ) fue determinado considerando el peso seco de la biomasa alcanzada al final de la fermentación, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Y_{x/s} = \frac{X_2(g/L) - X_1(g/L)}{S_0(g/L) - S_f(g/L)}$$

$X_2$  = Peso seco al final de fermentación.

$X_1$  = Peso seco al inicio de fermentación.

$S_0$  = Concentración inicial de sustrato al inicio de la fermentación.

$S_f$  = Concentración final de sustrato al final de la fermentación.

## Determinaciones analíticas

### Determinación del consumo de lactosa

Para la determinación del consumo de lactosa, los sobrenadantes fueron procesados mediante el método calorimétrico de Miller<sup>[25]</sup> utilizando Ácido 3,5 Dinitrosalicílico. Y leídas espectrofotométricamente a 570 nm.

### 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 deshidrató (55 °C/18 h) en una estufa "Mettler". 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:  $C_1$ ) mediante extracción alcalina y subsiguiente precipitación isoelectrica<sup>[6, 7, 34]</sup>;  $C_2$ ) por extracción alcalina, fosforilación con trimetafosfato de sodio y precipitación isoelectrica<sup>[6, 34]</sup>.

## Análisis químico de la biomasa y de los concentrados proteicos

Se siguió la metodología de Official Methods of Analysis A.O.A.C. Internacional<sup>[33]</sup> para las determinaciones de humedad, proteína cruda, cenizas, nitrógeno no proteico. 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 Michel et al.<sup>[24]</sup>.

## Análisis estadístico

Los datos experimentales de la cinética de crecimiento de las levaduras fueron evaluados estadísticamente ajustándose los valores experimentales de la fase logarítmica de crecimiento, aplicando una regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados.

Para determinación de las variables de la fermentación de suero lácteo desproteinizado y suero lácteo total, Se siguieron las recomendaciones de Schroder, K.D, 1974<sup>[31]</sup>. Se aplicó un diseño estadístico factorial simplificado<sup>[10, 19, 20, 31, 32]</sup> considerándose como variables: Temperatura; pH, Concentración de sales de Nitrógeno y fósforo; Concentración de extracto de levadura; Concentración de Lactosa; velocidad de agitación y flujo de aireación.

La optimización de las variables del proceso fue determinada usando la metodología de superficie de respuesta, aplicando un diseño factorial simplificado. Se examinaron como variables: Concentración de Lactosa; Concentración de sales de Nitrógeno y fósforo; Concentración de extracto de levadura; velocidad de agitación y flujo de aireación.

La variable respuesta analizada fue el rendimiento celular  $Y_{x/s}$  de las levaduras seleccionadas; esta variable se analizó siguiendo los pasos de la Metodología de Superficie de Respuesta (Nelofer, N, 2008) en los que se incluye:

– *Análisis de varianza*. Se utilizó para establecer si existen diferencias o no



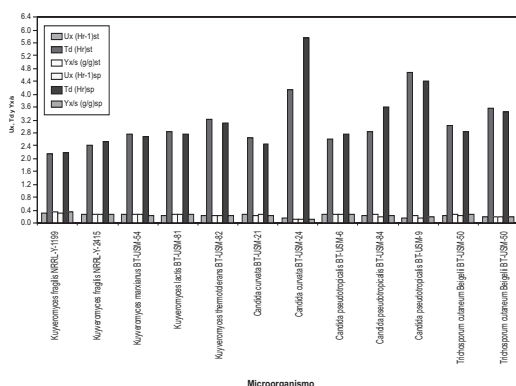
entre los tratamientos y también para determinar la variabilidad debida al error experimental.

- *Análisis de la regresión.* Para los efectos lineales, cuadráticos y cruzados de los factores que tuvieron influencia sobre la variable respuesta.
- *Establecimiento del modelo de regresión.* Para establecer el modelo de regresión de la variable respuesta, se consideraron los coeficientes de regresión estimados en el análisis de regresión.
- *Análisis canónico de la superficie de respuesta.* Para caracterizar la superficie en la vecindad inmediata del punto estacionario, determinar si este es un punto de respuesta máxima, mínima o punto de silla.
- *Análisis de Riegue.* En caso tal que el punto estacionario resultó ser un punto de silla, este análisis permitió estimar los niveles de cada factor para obtener la respuesta óptima.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* en suero lácteo

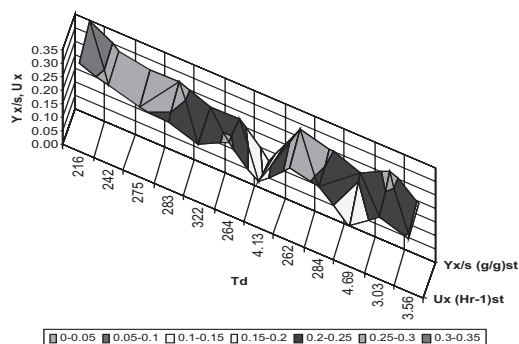
La Tabla N.º 1, y la Figura N.º 1 muestran un análisis comparativo del crecimiento de levaduras seleccionadas desarrolladas en matraces agitados sobre caldo YPL. Se ob-



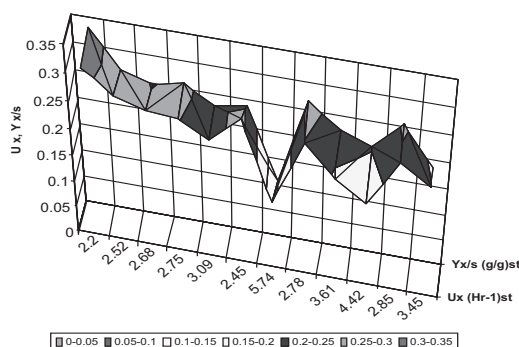
**Figura N.º 1.** Evaluación y rendimiento celular de la levadura seleccionada sobre suero lácteo total y suero lácteo desproteínizado, en matraces agitados. (T°=30 °C; pH=4.5; Vol=200 mL; Agitación=150RPM)

serva que las cepas de *K. marxianus* NRRL-Y-1109 y *K. marxianus* -NRRL-Y-2415, presentan los mayores rendimientos celulares Yx/s de 0.408 y 0.387 respectivamente, con velocidades específicas de crecimiento  $\mu_x$  de 0.36 hrs<sup>-1</sup> y tiempos generacionales de 1.95 horas.

Las Figuras N.º 2 y 3 muestran una representación del rendimiento celular de *K. marxianus* NRRL-Y-1109 en suero lácteo total y suero lácteo desproteínizado en matraces agitados; de acuerdo al método de superficie de respuesta, en la superficie de respuesta, puede observarse que los parámetros óptimos para un máximo rendimiento de biomasa corresponden a Temperatura 30 °C; pH= 4.5; Concentración de lactosa 20g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>0</sub>4 y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g/L; extracto de levadura 5 g/L. Y una relación de volumen de medio/ volumen matraz Erlenmeyer de 50/1000 mL, alcanzando Yx/s= 0.365



**Figura N.º 2.** Evaluación y rendimiento celular de la levadura seleccionada sobre suero lácteo total en matraces agitados. (T°=30 °C; pH=4.5; Vol=200 mL; Agitación=150RPM)



**Figura N.º 3.** Evaluación y rendimiento celular de la levadura seleccionada sobre suero lácteo desproteínizado, en matraces agitados. (T°=30 °C; pH=4.5; Vol=200 mL; Agitación=150RPM)

Las Tabla N.º 2 y 3, muestran la evaluación de factores que influyen en el rendimiento celular de *K. marxianus* NRRL-Y-1109 y *C. Pseudotropicalis* BT-USM-6, en matraces agitados con suero lácteo desproteínizado (diseño factorial compuesto) observándose en el experimento 13, Que los valores óptimos corresponde a: una temperatura de 25°C; pH= 5.0- 5.5; Concentración de sales de N y P 0.5%; extracto de levadura 0.10%; Lactosa 20 g/L; con el cual se alcanza un  $Y_{x/s}$  0.485 para *C. pseudotropicalis*.

Las Tabla N.º 4 y 5, muestran la evaluación de factores que influyen en el rendimiento celular de *K. marxianus* NRRL-Y-1109 en tanques agitados con suero lácteo desproteínizado (diseño factorial compuesto); observándose en el experimento 3 que la concentración de lactosa 15 g/L; Concentración de Sales de Sulfato, Nitrógeno de 7.5 g/L; Agitación 600 RPM; Aireación: 1.825 VVM, nos da una velocidad específica de crecimiento  $\mu_X = 0.35 \text{ hrs}^{-1}$  y un rendimiento celular  $Y_{x/s} = 0.425$  y para *C. pseudotropicalis* BT-USM-6, en el experimento 10 Concentración de lactosa 15 g/L; Concentración de Sales de Sulfato, Nitrógeno de 7.5 g/L; Agitación 600 RPM; Aireación : 1.825 VVM, nos da una velocidad específica de crecimiento  $\mu_X = 0.35 \text{ hrs}^{-1}$  y un rendimiento celular  $Y_{x/s} = 0.4275$

La Tabla N.º 6, muestra el rendimiento de biomasa, de acuerdo al diseño factorial simplificado para la optimización de parámetros de fermentación de suero lácteo por *C. pseudotropicalis* BT-USM-6 en tanques agitados, alcanzando su mejor rendimiento celular  $Y_{x/s} = 0.48$  con 25 g /L de Lactosa; 6 g/ L de sales de Nitrógeno y Azufre; Agitación de 600 RPM y un flujo de aireación de 1.52 VVM.

La Tabla N.º 7, nos permite observar la evaluación de parámetros cinéticos de crecimiento de *K. marxianus* NRRL-Y-1109 sobre suero lácteo desproteínizado en reactor agitado con agitación fijada en 600 RPM y un flujo de aireación de 1.52 VVM alcanzando su mejor rendimiento celular  $Y_{x/s} =$

0.57 con 25 g/L de Lactosa; 6 g/L de sales de Nitrógeno y Azufre; 2.5 g/L de extracto de levadura.

La Tabla N.º 8, muestra la evaluación de parámetros cinéticos de crecimiento de *C. Pseudotropicalis* BT-USM-6 sobre suero lácteo desproteínizado en reactor agitado con agitación fijada en 600 RPM y un flujo de aireación de 1.52 VVM alcanzando su mejor rendimiento celular  $Y_{x/s} = 0.54$  con 25 g /L de Lactosa; 6 g/L de sales de Nitrógeno y Azufre; 1.5 g/L de extracto de levadura. El gráfico 4 representa la Cinética de crecimiento de *K. marxianus* NRRL-Y-1109, desarrollado en condiciones optimizadas sobre suero lácteo desproteínizado. Obteniéndose una velocidad específica de crecimiento  $\mu_X = 0.305 -0.36 \text{ hrs}^{-1}$ ; tiempo generacional 2.02-2.27 hrs y un rendimiento celular  $Y_{X/s} = 0.572$

Los valores de rendimiento de biomasa y reducción de los niveles de DQO y DBO obtenidos sobre suero lácteo fueron con comparativamente cercanos a los obtenidos por; Ben-Hassan, R. M.; Ghaly, A. E.;1994; quienes reportan rendimientos de biomasa  $Y_{x/s}$  de 0.40-0.45 (g/g) , utilizando levaduras seleccionadas de *Kluyveromyces marxianus*, *Candida tropicales* y *Candida pseudotropicalis* y una reducción de los niveles de DQO y DBO e 85-94% (por Beausejour, D. et al.; 1981; Ben-Hassan, R. M.; Ghaly, A. E. 1994; Moeini M, 2004; Flores P. y col. 2008.

Los rendimientos en biomasa en relación con la lactosa consumida, oscilaron entre 0,38 y 0,56 g/g. Es importante destacar que los valores de los distintos parámetros de cultivo determinados en el presente estudio guardan cierta similitud con los reportados por otros autores, a pesar de que en algunos casos las condiciones de operación fueron marcadamente diferentes. Vananuvat y Kinsella<sup>[34]</sup>, utilizando tanques agitados reportan valores agitación de 300 RPM y 700 RPM de  $\mu_{max}$  en el rango de 0,35 h<sup>-1</sup> y 0,44 h<sup>-1</sup> para velocidades de respectivamente; Castillo y Sánchez<sup>[9]</sup>, empleando matraces agitadas obtuvieron valores de  $\mu_{max}$  de 0,41

h-1 a 35 °C, y determinaciones de  $\mu_{max}$  entre 0,34 y 0,62 h-1, al

C(1) Concentrado proteico por extracción Alcalina y precipitación isoeléctrica.

C(2) Concentrado proteico por extracción alcalina, fosforilación con trimetafosfato de sodio y precipitación isoeléctrica.

El análisis estadístico lleva a la optimización del proceso con respecto al rendimiento celular. Los niveles de los factores en los cuales se obtiene un mayor rendimiento celular  $Y_{x/s} = 0.56$  son: temperatura 30,0 °C, pH 4,5, velocidad de agitación 600 RPM y tiempo de fermentación 16 h.

Los valores de Concentración de lactosa (22.5 g/L); Concentración de sales de Fosfato y Nitrógeno (3-6 g/L) y Sulfatos (3.0 g/L), encontrados a través de este análisis coinciden con los señalados en la literatura en la producción de levaduras alimenticias (Bainotti y col.<sup>[3]</sup>; Beausejour, et al.<sup>[4]</sup>; Bernstein, et al.<sup>[5]</sup>; Mansour, et al.<sup>[21]</sup>; Moeini et al.<sup>[24]</sup> Moresi et al.<sup>[26]</sup>; Vanavanut<sup>[32]</sup>; sin embargo, no hay concordancia entre la velocidad de agitación (300-400 RPM) y el tiempo de fermentación (16-20 hrs) indicado entre estos autores.

Diversos investigadores<sup>[6, 21, 24, 28, 34]</sup> han señalado con las mismas levaduras bajo estudio, el uso de 300 RPM por un tiempo de 20 a 24 hrs<sup>[9, 21, 24]</sup> hasta 400 RPM. x 10 hrs. Otros autores han indicado la utilización de 120 RPM. x 24 hrs<sup>[3, 4]</sup>, hasta 175 RPM x 18 hrs<sup>[4, 6]</sup> con la levadura *K. fragilis*. Con *K. marxianus* algunos autores reportan 400 RPM, sin considerar el tiempo de agitación utilizado<sup>[1, 4, 5]</sup> y otros<sup>[6, 7, 11, 15]</sup> señalan 600 RPM x 14 hrs. Es de hacer notar que esta variabilidad entre la velocidad de agitación y el tiempo de fermentación utilizado depende de la geometría del equipo empleado y del coeficiente volumétrico de transferencia de Oxígeno<sup>[4, 6, 26, 28, 34]</sup>.

Cabe resaltar que en nuestra experiencia, utilizando un diseño factorial simplificado, y la metodología de superficie de respuesta

metodología de superficie de respuesta, hemos establecido como parámetros óptimos de producción de biomasa de *K. marxianus* NRRL-Y-1109 y *C. Pseudotropicalis* BT-USM: temperatura 30 °C, pH 4,5, velocidad de agitación 600 RPM y tiempo de fermentación 16 hrs, concentración de lactosa (22.5 g/L); concentración de sales de Fosfato y Nitrógeno (3-6 g/L) y Sulfatos (3.0 g/L); Flujo de aireación de 1.52 VVM

Se obtuvo un rendimiento promedio de: biomasa de 0,56 g/g lactosa, con *K. marxianus* NRRL-Y-1109 y un rendimiento de biomasa  $Y_{x/s}$  0.54 para *Candida pseudotropicalis* en suero lácteo desproteínizado y diluido al 50% y un rendimiento de biomasa de 0,425 g/g con *K. marxianus* NRRL-Y-1109 y un rendimiento  $Y_{x/s}$  0.38 para *Candida pseudotropicalis* en suero lácteo crudo, un consumo de lactosa del 98.25% y 94.45%, una concentración celular 12,75 y 12.52 g/L, respectivamente, al final de la fermentación.

### Preparación y caracterización de los concentrados proteicos

Para evitar la coprecipitación de ácidos nucleicos a bajos valores de pH<sup>[6]</sup>, y debido a que no se observaron grandes diferencias en los valores de pH de mínima solubilidad de las proteínas, los concentrados precipitación a pH 4. La composición química de los mismos se muestra en la Tabla N.º 10 para ambos tratamientos.

Todos los parámetros, a excepción de la humedad y la proteína verdadera mostraron diferencias significativas entre los tratamientos 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, este resultó significativamente mayor en  $C_1$  que en  $C_2$ . Los valores obtenidos para ambos concentrados se aproximan a 3,58% y 4,1% (Bernstein, 1977; Vanavanut, 1976; Michel, 1989).



#### IV. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio demuestran que se puede obtener un concentrado proteico a partir de biomasa microbiana *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109 y *C. pseudotropicalis* BT-UNMSM-6 cultivadas en suero lácteo desproteinizado. Los valores de rendimiento y la concentración celular obtenidos fueron satisfactorios para estos microorganismos.

Los parámetros de fermentación de *K. marxianus* NRRL-Y-1109 y *C. pseudotropicalis* BT-UNMSM-6 sobre suero lácteo: Concentración de lactosa, Concentración de sales de fosfato y Nitrógeno; extracto de levadura; la agitación (600-800 RPM) y el flujo de aireación (1.5 -1.8 VVM), tienen una influencia significativa sobre el rendimiento

celular Temperatura y el pH no influyen en el rendimiento  $Y_{x/s}$ .

Las condiciones operativas optimizadas para fermentación de suero lácteo crudo y desproteinizado por *K. marxianus* NRRL-Y-1109 y *C. pseudotropicalis* –BT-UNMSM-6 son: Temperatura de fermentación 30 oC; pH: 4.5; Concentración de lactosa: 25 g/L, Extracto de levadura: 1.5 g/L;  $K_2HPO_4$ : 6 g/L;  $(NH_4)_2SO_4$ : 6 g/L; aireación: 1.52 VVM; Agitación: 600 RPM; Tiempo fermentación: 14 hrs.

#### V. AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el apoyo económico del CONCYTEC, UNIVERSIDAD DE LAS NACIONES UNIDAS y al Consejo superior de Investigaciones científicas CSI-UNMSM: por el financiamiento del proyecto.

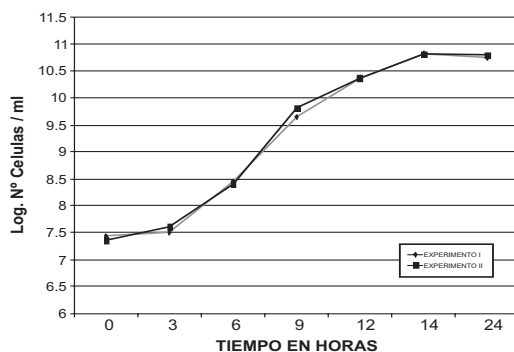
**TABLA N.º 1: EVALUACIÓN Y RENDIMIENTO CELULAR DE LA LEVADURA SELECCIONADAS SOBRE SUERO LÁCTEO TOTAL Y SUERO LÁCTEO DESPROTEINIZADO, EN MATRACES AGITADOS**

(Tº= 30 °C; pH= 4.5; Vol= 200 mL; Agitación= 150 RPM)

Microorganismo	SUERO LÁCTEO TOTAL			SUERO LÁCTEO DESPROTEINIZADO		
	Ux (h <sup>-1</sup> )	Td (h)	Y <sub>x/s</sub> (g/g)	Ux (h <sup>-1</sup> )	Td (h)	Y <sub>x/s</sub> (g/g)
<i>Kuyveromyces marxianus</i> NRRL-Y-1109	0.32	2.16	0.345	0.315	2.2	0.33
<i>Kuyveromyces fragilis</i> NRRL-Y-2415	0.286	2.42	0.285	0.275	2.52	0.265
<i>Kuyveromyces marxianus</i> BT-USM-54	0.252	2.75	0.26	0.258	2.68	0.248
<i>Kuyveromyces lactis</i> BT-USM-81	0.245	2.83	0.265	0.252	2.75	0.26
<i>Kuyveromyces thermotolerans</i> BT-USM-82	0.215	3.22	0.22	0.224	3.09	0.23
<i>Candida curvata</i> BT-USM-21	0.263	2.64	0.224	0.272	2.45	0.241
<i>Candida curvata</i> BT-USM-24	0.168	4.13	0.115	0.126	5.74	0.108
<i>Candida pseudotropicalis</i> BT-USM-6	0.265	2.62	0.278	0.249	2.78	0.268
<i>Candida pseudotropicalis</i> BT-USM-84	0.244	2.84	0.255	0.192	3.61	0.225
<i>Candida pseudotropicalis</i> BT-USM-9	0.148	4.69	0.21	0.157	4.42	0.204
<i>Trichosporum cutaneum</i> Beigelii BT-USM-50	0.229	3.03	0.268	0.243	2.85	0.256
<i>Trichosporum cutaneum</i> Beigelii BT-USM-50	0.195	3.56	0.195	0.207	3.45	0.185

**TABLA N.º 2: EVALUACIÓN DE FACTORES QUE INFLUYEN EN EL RENDIMIENTO CELULAR DE K. MARXIANUS NRRL-Y- 1109 EN MATRACES AGITADOS CON SUERO LÁCTEO DESPROTEINIZADO (DISEÑO FACTORIAL COMPUESTO)**

EXPERIMENTO	T (°C)	pH	NIVEL DE FACTORES DE EVALUACIÓN			
			SALES N.P. % P/V	E. LEV. % P/V	LACTOSA (g/L)	RENDIMIENTO CELULAR X 100 Y <sub>x/s</sub> (g/g)
1	30	5.0	0.50	0.05	20	46.0
2	35	5.0	0.50	0.05	30	37.0
3	25	5.5	0.25	0.05	30	30.0
4	35	5.5	0.25	0.05	20	39.0
5	25	5.0	0.50	0.05	30	31.5
6	35	5.0	0.50	0.05	20	46.5
7	25	5.5	0.50	0.05	20	48.5
8	35	5.5	0.50	0.05	30	38.0
9	25	5.0	0.25	0.10	30	33.0
10	35	5.0	0.25	0.10	20	42.5
11	25	5.5	0.25	0.10	20	48.0
12	35	5.5	0.25	0.10	30	41.0
13	25	5.0	0.50	0.10	20	48.5
14	35	5.0	0.50	0.10	30	42.0
15	25	5.5	0.50	0.10	30	33.0
16	35	5.5	0.50	0.10	20	45.2
17	30	5.25	0.375	0.075	25	41.5
18	20	5.25	0.375	0.075	25	42.5
19	40	5.25	0.375	0.075	25	30.5
20	30	5.0	0.375	0.075	25	38.0
21	30	5.5	0.25	0.075	25	31.5
22	30	5.5	0.75	0.075	25	45.6
23	30	5.5	0.375	0.10	25	32.5
24	30	5.5	0.375	0.15	25	42.5
25	30	5.5	0.375	0.075	15	46.5
26	30	5.5	0.375	0.075	35	32.0



**Figura N.º 4.** Cinetica de crecimiento de K. marxianus NRRL-Y-1109 en Suero Lacteo desproteínizado: Parámetros optimizados.

**TABLA N.º 3: EVALUACIÓN DE FACTORES QUE INFLUYEN EN EL RENDIMIENTO CELULAR DE *C. Pseudotropicalis* EN MATRACES AGITADOS CON SUERO LÁCTEO DESPROTEINIZADO (DISEÑO FACTORIAL COMPUESTO)**

EXPERIMENTO	T (°C)	pH	NIVEL DE FACTORES DE EVALUACIÓN			
			SALES N.P. % P/V	E. LEV. % P/V	LACTOSA (g/L)	RENDIMIENTO CELULAR X 100 Y <sub>x/s</sub> (g/g)
1	30	5.0	0.50	0.05	20	45.5
2	35	5.0	0.50	0.05	30	36.5
3	25	5.5	0.25	0.05	30	29.5
4	35	5.5	0.25	0.05	20	38.5
5	25	5.0	0.50	0.05	30	30.0
6	35	5.0	0.50	0.05	20	46.0
7	25	5.5	0.50	0.05	20	48.0
8	35	5.5	0.50	0.05	30	37.5
9	25	5.0	0.25	0.10	30	32.5
10	35	5.0	0.25	0.10	20	42.0
11	25	5.5	0.25	0.10	20	47.5
12	35	5.5	0.25	0.10	30	40.5
13	25	5.0	0.50	0.10	20	48.0
14	35	5.0	0.50	0.10	30	41.5
15	25	5.5	0.50	0.10	30	32.5
16	35	5.5	0.50	0.10	20	44.7
17	30	5.25	0.375	0.075	25	41.0
18	20	5.25	0.375	0.075	25	42.0
19	40	5.25	0.375	0.075	25	30.0
20	30	5.0	0.375	0.075	25	37.0
21	30	5.5	0.25	0.075	25	31.0
22	30	5.5	0.75	0.075	25	45.1
23	30	5.5	0.375	0.10	25	32.0
24	30	5.5	0.375	0.15	25	42.0
25	30	5.5	0.375	0.075	15	46.0
26	30	5.5	0.375	0.075	35	31.5

**TABLA N.º 4: EVALUACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL y-1199 SOBRE SUERO LÁCTEO DULCE DESPROTEINIZADO EN REACTOR AGITADO "CHEMAP"- DISEÑO DE TAGUCHI SIMPLIFICADO (Vol= 5 L; pH 4.5; Tº 30 °C)**

N.º EXPERIM	CONC. LACTOSA (g/L)	CONDICIÓN EXPRIEM.; CONC. SALES Y LEVADURA (g/L)	AGITACIÓN RPM	AEREACIÓN V.V.M	VELOCIDAD ESPECÍFICA CRECIMIENTO U <sub>x</sub> (h <sup>-1</sup> )	TIEMPO GENERACIONAL (h)	RENDIMIENTO BIOMASA Y <sub>x/s</sub>
1	15	2.5	400	1.1436	0.305	2.27	0.305
2	15	5	600	1.475	0.345	2.09	0.35
3	15	7.5	600	1.823	0.35	1.98	0.425
4	25	2.5	600	1.823	0.35	1.98	0.42
5	25	5	800	1.143	0.33	2.1	0.36
6	25	7.5	400	1.143	0.3	2.31	0.31
7	35	2.5	800	1.475	0.35	1.98	0.36
8	35	5	600	1.143	0.295	2.35	0.31
9	35	7.5	400	1.823	0.285	2.45	0.3

**TABLA N.º 5:** RENDIMIENTO DE BIOMASA, DISEÑO FACTORIAL SIMPLIFICADO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN DE SUERO LÁCTEO con *Candida pseudotropicalis* BT-USM-6 EN TANQUES (DISEÑO EXPERIMENTAL DE CHEN Y COL.)

N.º EXPERIM.	LACTOSA (g/L)	CON SALES (g/L)	AERACIÓN V.V.M	AGITACIÓN RPM	RESPUESTA CELULAR (Y <sub>x/s</sub> )
1	15	4	1.2	400	0.305
2	25	4	1.2	400	0.3
3	15	6	1.5	600	0.35
4	25	6	1.2	400	0.31
5	15	4	1.5	600	0.34
6	25	6	1.5	400	0.36
7	15	4	1.2	600	0.38
8	25	6	1.5	600	0.41
9	35	6	1.5	600	0.32
10	25	6	1.8	600	0.475
11	35	8	1.5	600	0.35
12	25	6	1.8	800	0.46
13	35	8	1.8	600	0.365
14	25	6	1.5	800	0.48
15	35	8	1.8	800	0.38

**TABLA N.º 6:** EVALUACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO DE *K. marxianus* NRRL-Y-1109 SOBRE SUERO LÁCTEO DULCE DESPROTEINIZADO EN REACTOR AGITADO "CHEMAP" (Vol.= 5L; Agit.= 800 RPM; 1.52 V.V.M.)

N.º EXPERIM.	LACTOSA (g/L)	(NH <sub>4</sub> ) SO <sub>4</sub> (g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	E. LEV. (g/L)	RENDIMIENTO Y <sub>x/s</sub> X 100
1	15 (12.8)	4	2	0.5	0.51
2	15 (12.75)	6	3	1.5	0.488
3	15 (15.7)	8	4	2.5	0.474
4	15 (15.8)	4	3	2.5	0.48
5	25 (20.8)	4	3	2.5	0.512
6	25 (20.45)	6	4	0.5	0.541
7	25 (21)	8	2	1.5	0.57
8	25 (21.17)	6	3	1.5	0.56
9	35 (28.7)	4	4	1.5	0.347
10	35 (12.8)	6	2	2.5	0.39
11	35 (31.25)	8	3	0.5	0.385
12	35 (34.48)	8	4	2.5	0.38

**TABLA N.º 7: EVALUACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO DE *C. pseudotropicalis* BT-USM -6 1109 SOBRE SUERO LÁCTEO DULCE DESPROTEINIZADO EN REACTOR AGITADO “CHEMAP” (Vol.= 5L; Agit.= 800 RPM; 1.52 V.V.M.)**

N.º EXPERIM.	LACTOSA (g/L)	(NH <sub>4</sub> ) SO <sub>4</sub> (g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	E. LEV. (g/L)	RENDIMIENTO Y <sub>x/s</sub> X 100
1	15 (12.8)	4	2	0.5	0.51
2	15 (12.75)	6	3	1.5	0.485
3	15 (15.7)	8	4	2.5	0.475
4	15 (15.8)	4	3	2.5	0.482
5	25 (20.8)	4	3	2.5	0.51
6	25 (20.45)	6	4	0.5	0.54
7	25 (21)	8	2	1.5	0.52
8	25 (21.17)	6	3	1.5	0.5
9	35 (28.7)	4	4	1.5	0.347
10	35 (12.8)	6	2	2.5	0.372
11	35 (31.25)	8	3	0.5	0.38
12	35 (34.48)	8	4	2.5	0.378

**TABLA N.º 8: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS CONCENTRADOS PROTEICOS DE *K. marxianus* NRRL -Y-1109 DE LA BIOCONVERSIÓN DE LACTOSUERO**

COMPONENTES		
	C <sub>1</sub> (% p/p)	C <sub>2</sub> (% p/p)
Proteína Kjeldhal	72.35	71.10
Nitrógeno no Proteico (NNP)	0.95	0.65
Humedad	6.75	6.12
Proteína verdadera	65.75	61.45
Cenizas	4.50	12.78
Grasa	5.45	3.65
Carbohidratos	8.15	4.35
ARN	4.65	3.15

**REFERENCIAS**

[1] Antier P, Maulin G, Galzy P (1990). *Process Biotechn.* 25: 9-13.

[2] Araujo K, Páez G, Mármol Z, Ferrer J, Ramones E, Mazzari CA, Rincón M (2007). *Rev Tec Ing U Zulía*; 31: 164-171.

[3] Bainotti AE, Basilico JC and Carrasco De Mendoza MS (1987). *Rev Argentina Microbiología*; Vol. 19, pp. 1-7.

[4] Beausejour D, Leduy A and Ramalho RS (1981). *Can Journal of Chemical Engineering*; Vol. 59, pp. 522-526.

[5] Ben-Hassan RM and Ghaly AE (1994). *Applied Biochemistry and Biotechn*; Vol. 47, p. 89-105.

[6] Berstein S, Tzeng CH. *Environmental Protection technology series 1977*, EPA-600/2-77-133.

[7] Blackbrough N, Moresi M (1981) *Europ J Appl Microbiol Biotechn*; 13: 1-19.

[8] Carlotti A, Jacob F, Perrier J and Poncet S (1991). *Biotechnology Letters*; Vol. 13, N.er 6, pp. 437-440.

[9] Castillo F, De Sánchez SB (1978). *Acta Científica Venezolana*; 29: 113-118.



- [10] Chen-Chin K, Lee B, Houngh JY (1992). *Enzyme Microbiol Technol*; 14: 659-664.
- [11] Cristiani - Urbina E, Netzahuatl-Muñoz AR, Manríquez-Rojas FJ, Juárez-Ramírez C, Ruiz-Ordaz N and Galíndez-Mayer J (February 2000). *Process Biochemistry*; Vol. 35, N.º 7, p. 649-657.
- [12] De La Torre M, Flores L. Proteínas unicelulares. Cap 11. En: García M, Quintero R, López A (Ed.) (1993). *Biotecnología Alimentaria*. México, Limusa Noriega Editores, 383-396 pp.
- [13] Delaney R, Kennedy R, Walley B (1975). *J of the Sci of Food and Agric*; 26(8): 1177-1186.
- [14] Flores P, A (2000). Selección y evaluación de levaduras nativas para procesos de bioconversión de residuos agroindustriales por fermentación. Tesis para optar el grado académico de Doctor en Ciencias biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.
- [15] Flores P, A (1998). Selección y evaluación de levaduras para la producción de biomasa microbiana por fermentación de suero lácteo. Tesis para optar el grado académico de Magíster en Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM.
- [16] Flores P, A (2008). *Rev Per de Quím e Ing Quím*. Vol 11 (1): 3-10.
- [17] Garcia- Garibay M, Torres J, Lopez-Munguía A, Casas LT (1987). *Biotechn Letters*; 9(6): 417-420
- [18] Gonzales Siso MI (1996). *Bioresearch Technology*; Vol. 57, pp.1-11.
- [19] Himmelblau DM (1970). John Wiley & sons, New York; pp. 282
- [20] Lawley DN, Maxwell AE (1963), Ed. Butterworths, London, pp. 185-190.
- [21] Mansour MH, Ghaly AE, Ben-Hassan RM and Nassar MA (October 1993). *Applied Biochemistry and Biotechnology*; Vol. 43, N.º 1, p. 1-14.
- [22] Marwaha SS, Kennedy (1988). *Int J Food Sci Techn*; 23: 323-336.
- [23] Mawson AJ (1994). *Bioresource Technology*; Vol. 47, N.º 3, p. 195-203.
- [24] Michel A, Jacob F, Perrier J, Poncet S (1987). *Biotechn Bioeng*; 30: 780-783.
- [25] Miller G. *Anal Chem*; 31: 426-428.
- [26] Moeini M, Nahvi IM (2004). *Tavassoli Electron J Biotechn*; 7(3) dec. 15
- [27] Moresi M, Sebastiani E (1979). *Europ J Appl Microbiol Biotechn*; 8: 63-71.
- [28] Moresi M, Colocchio A, Sansovani F (1980). *Europ J Appl Microbiol Biotechn*; 9: 173-183.
- [29] Moresi M, Patete M and Trunfio A (1989). *Applied Microbiology and Biotechnology*; Vol. 31, p. 495-501.
- [30] Nelofer N, Syed Q, Nadeem M (2008). *Turkish J Biochem*; 33(2): 50-57.
- [31] Schroder KD (1974). *Biotechn Bioeng Symp*; 4: 713-720.
- [32] Taguchi G, ELSayed A, Hsiang TC. MacGraw-Hill Inc, New York.
- [33] OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS 16th Ed. 3rd Revision, A.O.A.C. INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD. Method 92523. 1997.
- [34] Vananuvat P, Kinchella J (1975b). *J of Food Sci*; 40:336-341.