

25. Medio Ambiente

Enriquecimiento proteico de cascara de citrus y vinaza con levadura *Candida Utilis*

Robinson AJ; Lencina MF; Argañara G; Albarracín PM

ajrobinsonm@gmail.com; lencinafernanda@gmail.com; pmariaalb@yahoo.com;

Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología

Universidad Nacional de Tucumán

Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar la propagación de *Candida utilis* en un reactor de laboratorio relleno de cascara de citrus utilizando como nutriente vinaza.

La cáscara de naranja fue obtenida de una empresa citrícola de la localidad de Lules, la vinaza de un ingenio azucarero de la localidad de Banda del Rio Salí, Tucumán. El microorganismo utilizado pertenece al cepario del PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos) CONICET.

Se adaptó la cepa al medio de cultivo formado por cáscara de naranja y vinaza en solución acuosa al 50%. Las fermentaciones "batch" se llevaron a cabo a escala laboratorio y se midieron las siguientes variables físico químicas para controlar el crecimiento de la levadura: DQO (Demanda Química de Oxígeno), pH, conductividad y nitrógeno total en vinaza y nitrógeno total en cáscara de naranja.

Se logró un 13% de enriquecimiento proteico en cáscara de naranja, y en la vinaza una disminución: de DQO del 43%, de pH del 4% y de conductividad del 9%. Se pudo establecer que luego de 21 h de fermentación los nutrientes del medio de cultivo, formado por cáscara de naranja y vinaza en solución acuosa al 50%, fueron agotados.

Se comprobó que la levadura *Candida utilis* es capaz de desarrollarse en residuos agroindustriales de industrias locales, provocando enriquecimiento proteico en los mismos y al mismo tiempo disminuyendo la carga contaminante de la vinaza.

Palabras clave: *Candida utilis*, cáscara de citrus, enriquecimiento proteico, DQO.

Introducción

La capacidad que tienen de reproducirse algunas levaduras en medios muy variados hace posible pensar en la producción de estos organismos unicelulares a partir de desechos agroindustriales, que muchas veces son contaminantes, como una alternativa válida y ecológica (Molina, 1976).

Tucumán posee dos grandes actividades industriales: la citrícola y la azucarera. Ambas coinciden en la época del año en

que se realiza la producción generando gran cantidad de productos y en consecuencia residuos.

La industria citrícola genera gran cantidad de cascara húmedas y efluentes líquidos como residuos. Mientras la industria azucarera tiene su mayor problema con el sector alcoholero que posee como un residual indeseable de la destilación de alcohol, las vinazas.

Por cada litro de etanol producido se genera entre 12 y 16 L de vinazas. Estas

se caracterizan por ser líquidos de color marrón, un gran contenido de sólidos suspendidos, olor a miel final, pH bajo, altos valores de DQO y DBO5 y gran contenido de sólidos en suspensión, entre otros. Factores estos que indican la gran dimensión de su impacto ambiental (Larrahondo, 2009).

Al mismo tiempo se analizó estudios realizados por Christen (1993, 1999, 2002) que han mostrado la capacidad de la levadura *Candida utilis* de crecer en diferentes soportes sólidos (amberlita, bagazo de caña y salvado de trigo), donde realizan un consumo total de azúcares en amberlita y bagazo de caña y solo parcial en el caso del salvado de trigo. El empleo de la levadura *Candida utilis* para el enriquecimiento proteico de materiales lignocelulósicos, es importante debido al elevado valor nutricional que ésta posee, alrededor del 50% de la levadura es proteína.

Estos datos nos permitirían utilizar cáscara deshidratada de naranja como material lignocelulósico para el desarrollo de la levadura.

Otros estudios realizados por Diaz (2003) han demostrado que *Candida utilis* puede desarrollarse en medio líquido formado por vinaza, o en medio de vinaza y melaza como lo indicó Serguera Niño (2001). También Domenech López (2015), reporta desarrollo de la levadura en vinaza enriquecida con sulfato de amonio y fosfato ácido de amonio a diferentes concentraciones. También se reporta, además de la obtención de proteína unicelular, la disminución de la carga contaminante de la vinaza cuando se utiliza este medio para cultivo de la cepa.

Teniendo en cuenta estas experiencias, el objetivo de este trabajo fue estudiar la propagación de la levadura *Candida utilis* en un reactor "batch" con un lecho formado por cáscara de naranja y usando vinaza como nutriente. Este sería un estudio preliminar para la implementación

del proceso biotecnológico de enriquecimiento proteico de cáscara de naranja para ser usada en alimento bovino.

Objetivos

El objetivo de este trabajo fue estudiar la propagación de *Candida utilis* en un reactor de laboratorio relleno de cascara de citrus utilizando como nutriente vinaza.

Materiales y Métodos

Los ensayos realizados en el presente trabajo se llevaron a cabo en el laboratorio de biotecnología perteneciente a la cátedra de Microbiología General e Industrial y al laboratorio de Química orgánica de la cátedra de Química Orgánica de la FACET-UNT.

La cáscara de naranja fue suministrada por una empresa citrícola de la zona de Lules, Tucumán y la vinaza por un ingenio azucarero de la localidad de la Banda del Rio Salí, Tucumán.

Las determinaciones físico-químicas que se realizaron en los ensayos llevados a cabo en los reactores "batch" utilizados fueron: medición de DQO (Demanda Química de Oxígeno), pH, conductividad, Nitrógeno total en Cáscara húmeda de naranja, nitrógeno total en vinaza en solución acuosa al 50%, al inicio y final de cada ensayo. También se midieron cada dos horas la DO (densidad óptica del medio líquido) con el fin de conocer la concentración celular en él. Los parámetros DQO y nitrógeno total fueron analizados por un laboratorio externo, Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres.

Medios de cultivo

La cepa seleccionada fue activada en frascos de 100 ml de medio Papa Dextrosa (PD): papa 400 g/L, glucosa 15 g/L. Luego se incubó la levadura en distintas concentraciones de vinaza para

conocer si ésta generaba alguna inhibición o limitación en el cultivo.

Una vez elegida la concentración de vinaza en solución acuosa al 50% como la indicada para usar en el reactor batch, se probó, de manera cualitativa, el medio compuesto por cáscara de naranja y vinaza para corroborar que los aceites esenciales de la cáscara no tengan propiedades inhibitorias sobre la *Candida utilis*.

La cáscara de naranja luego del proceso de extracción de jugo queda húmeda; se procedió a cortarla y secarla en estufa. Se decidió secarla durante 24 h en estufa a 50 °C, ya que a temperaturas superiores la cáscara se caramelizaba.

Curva de crecimiento medio líquido

Se realizó la curva de crecimiento en el medio líquido midiendo Densidad Óptica a 600 nm. Previamente se realizó una curva de calibración que relaciona la concentración celular en el medio (obtenida a través de conteo en cámara de Neubauer) y la absorbancia de la luz a longitud de onda mencionada anteriormente.

Construcción de reactores “batch”

Se usaron Erlenmeyer de 1 l como reactor “batch” tapado por un tapón de goma que posee dos perforaciones para permitir el ingreso y egreso de aire.

Para tener una distribución de aire homogénea y facilitar la transferencia de oxígeno a las células se utilizó una manguera difusora de pecera de 45 cm de longitud que tiene como ventaja la posibilidad de tomar la forma que se quiera dentro del reactor.

El aire llega a la manguera difusora mediante una manguera de silicona de 1/8”, esta manguera es resistente a la esterilización por autoclave. Antes de ésta, el aire impulsado por un aireador de pecera de caudal máximo 8 L/min, pasa por un filtro microbiológico para asegurar la esterilidad del aire que

ingresa. La salida de aire se realiza a través de otro filtro.

24 h antes del inicio de cada ensayo se debía preparar el inóculo de células para el reactor. Esto se realizó transfiriendo con asa microbiológica levadura desde una caja de Petri a un frasco de vidrio de 100 mL que contenía 50 mL de medio PD (papa dextrosa) estéril. Se dejó el medio durante 24 h en baño termostático con agitación a 34 °C.

En total se realizaron 9 ensayos, 6 fueron con vinaza en solución acuosa de vinaza al 50% y cáscara de naranja (tratamiento 1) y 3 con vinaza en solución acuosa de vinaza al 50% enriquecida con 0,65 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y 1,08 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y cáscara de naranja (tratamiento 2)

Procesamiento estadístico de datos

Con los datos obtenidos de todas las mediciones realizadas se armaron planillas, y a partir de allí se trabajaron con dos programas: En una primera instancia se emplearon las herramientas estadísticas que nos provee el paquete de Microsoft Office®, en particular el programa Microsoft Excel®. Con él realizamos los análisis descriptivos básicos y gráficas respectivas. Para el ANOVA (del inglés “ANalysis Of VAriance”) y la verificación de los supuestos del modelo planteado, se trabajó con un Software libre, llamado R, el que permitió obtener los resultados y llegar a las conclusiones que se discutirán a continuación. Para cada variable físico química analizada se realizó un ANOVA evaluando los factores repetición,

tratamiento y reactor y se eligió un nivel de significancia del 1%.

Resultados y Discusión

Reactor. Puesta a punto de funcionamiento

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los ensayos realizados en los reactores durante su funcionamiento. Los resultados se presentan de a pares, es decir que se analizarán los datos obtenidos para cada variable físico-química propuesta con cada tratamiento

1. Curva de crecimiento en medio líquido

1.1. Tratamiento 1:

De los 6 experimentos realizados sin nutrientes se obtuvo un promedio de datos para obtener la figura 1.

Luego de usar la curva de calibración, la gráfica queda:

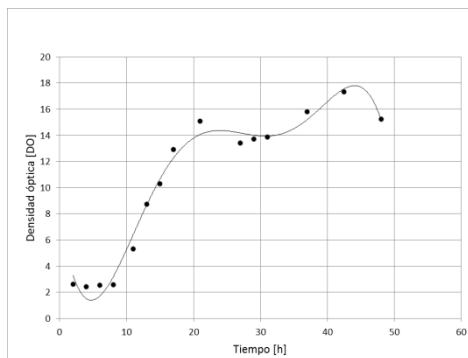


Figura 1: curva de densidad óptica del medio vs tiempo

Como puede observarse en la figura 2 la gráfica obtenida presenta 3 fases bien definidas, fase "lag" que en nuestro caso dura un promedio de 8 horas, una fase de crecimiento logarítmico o exponencial que termina en promedio a las 21 horas de iniciada la fermentación y una fase estacionaria que en los ensayo duro hasta el final de los mismos (48 h). La concentración de células alcanzadas fue de $2,5 \cdot 10^9$ cél/mL que están en el orden de magnitud que obtuvo Serguera Niño *et al.* (2000) con un medio óptimo para el desarrollo de la levadura, no un residuo, y usando la misma concentración de inóculo

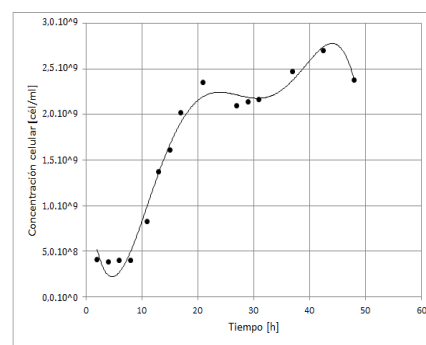


Figura 2: curva de crecimiento de la levadura *C. utilis*

10^8 cel/mL y la misma relación de inoculación 1/10, también Serguera Niño *et al.* (2001) reporta concentraciones finales de $9 \cdot 10^8$ cel/mL con un medio formado por vinaza 70-30 de vinaza y miel de caña; Diaz *et al.* (2003) usando vinaza enriquecida con 1g/L de sulfato de amonio, 1g/L de urea y 1g/L extracto de malta obtuvieron concentraciones de células de $2,2 \cdot 10^8$ cel/mL. Se puede decir entonces que con un medio sin enriquecer se logró una concentración final de células mayor que los reportados en la bibliografía consultada.

1.2. Tratamiento 2:

Como se ve en la figura 3 luego de más de 40 h de fermentación el microorganismo no mostró signos de ingresar a la fase estacionaria de crecimiento este resultado obtenido fue contrario a lo que se esperaba, (Diaz *et al.*, 2003) al suplementar el medio con nutrientes obtuvo una disminución en el tiempo de fermentación.

Si bien no se pudo realizar la curva de calibración para este medio por la formación de gránulos que dificultan su conteo, al observar el valor de DO alcanzado se puede inferir que la concentración de células al final de los ensayos fue mayor en aquellos donde el medio no fue suplementado con nutrientes, debido a que se alcanzan valores mayores de DO.

2. Variación de pH en medio líquido

2.1. Tratamiento 1:

En la tabla 1 se observa el comportamiento del pH del medio líquido, puede verse claramente que al finalizar los ensayos el pH fue un 4% menor que al

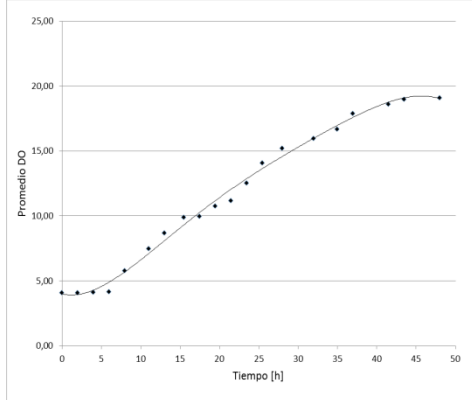


Figura 3: DO del medio líquido en función del tiempo

inicio, llegando en todos los casos a valores cercanos a 4,4, esto indica que la levadura produce ácidos como desechos metabólicos que conducen la disminución del pH del medio. Esto se condice con lo reportado por Soto Meza (2002) que informa un descenso del pH del medio líquido de 4 a 3,6 luego de su tratamiento con *Candida utilis*. Si bien el comportamiento del pH del medio es el esperado no es conveniente que el pH baje aún más ya que un gran inconveniente que presenta este desecho es su pH ácido que deteriora rápidamente cualquier material que entre en contacto con él y dificulta su manejo.

Nº ensayo	pH inicial	pH final	Disminución de pH %
1	4,62	4,42	5
2	4,62	4,45	4
3	4,62	4,47	3
4	4,62	4,47	3
5	4,62	4,44	4
6	4,62	4,43	4
Promedio			4

Tabla 1: resultados obtenidos de pH en medio líquido con el tratamiento 1, el valor de pH de cada ensayo fue obtenido de un promedio de 3

La variación de pH en el medio enriquecido fue superior que en el tratamiento 1 (tabla 2), si bien la disminución de pH era de esperarse como se explicó antes, su descenso aún mayor en este caso es indeseable ya que vuelve al efluente más corrosivo.

Nº ensayo	pH inicial	pH final	Disminución de pH %
1	4,75	4,39	8
2	4,75	4,34	9
3	4,75	4,36	8
Promedio			8

Tabla 2: resultado obtenido de pH en medio líquido con el tratamiento 2, el valor de pH de cada ensayo fue obtenido de un promedio de 3

Se propone como trabajo futuro para el grupo de investigación, la realización de experimentos donde se estudie el comportamiento de la levadura a distintas concentraciones de pH. Paca y Votruba (1990) reportan una disminución en la tasa de crecimiento y en la concentración final de células en diferentes sustratos, cuando el pH disminuye hasta cierto valor dependiendo del medio.

2.3. Análisis estadístico

Se obtuvo como resultado que existe diferencia significativa entre ambos tratamientos y entre los reactores ($p < 0,01$).

3. Variación de DQO en medio líquido

3.1. Tratamiento 1:

Nº ensayo	DQO inicial [mgO ₂ /L]	DQO final [mgO ₂ /L]	Remoción DQO %
1	83687	37182	56
2	83687	40178	52
3	83687	50797	39
4	83687	55234	34
5	83687	51193	39
6	83687	52127	38
Promedio			43

Tabla 3: resultados obtenidos para la variable DQO con tratamiento 1

Como se ve en la tabla 3 la remoción promedio de la demanda química de oxígeno (DQO) fue de 43%. Se observa una variabilidad entre los primeros 2 ensayos y los últimos 4, esto puede deberse a que la temperatura en los primeros ensayos fue mayor (cerca a 30°C) mientras que los segundos se realizaron con temperaturas ambiente menores; cabe recordar que en este trabajo no se controló la temperatura de los reactores sino que ellos trabajaron a temperatura ambiente y que la temperatura para el desarrollo óptimo de la *C. Utilis* es entre 28-34°C, es decir a temperaturas cercanas a la óptima se obtuvo una remoción de DQO mayor. Es destacable que Domenech López (2015) obtuvo una remoción de DQO de entre 30% y 50 % para vinaza en solución acuosa al 50% con bagazo de caña resultados muy similares a los expresados en este trabajo.

3.2. Tratamiento 2

En la tabla 4 se puede observar la remoción de DQO obtenida cuando se suplemento el medio líquido con nutrientes. La disminución de DQO fue menor y el DQO final del medio es mayor que los ensayos realizados con el tratamiento 1.

Nº ensayo	DQO inicial [mgO ₂ /L]	DQO final [mgO ₂ /L]	Remoción DQO %
1	94475	66700	29
2	94475	65019	31
3	94475	65235	31
Promedio			31

Tabla 4: resultados obtenidos para la variable DQO con tratamiento 2

3.3. Análisis estadístico

Se obtuvo como resultado que existe diferencia significativa entre ambos

tratamientos y entre los reactores ($p < 0,01$).

4. Enriquecimiento Proteico en cáscara de naranja

4.1. Tratamiento 1:

En la tabla 5 se observan los resultados obtenidos en el enriquecimiento proteico de la cáscara de naranja utilizada en este trabajo. Es importante señalar que los resultados fueron procesados por la EEAOC, para obtener el valor en proteínas solo se debe multiplicar el porcentaje de nitrógeno que contiene la muestra por el factor 6,25.

Nº ensayo	Nitrógeno inicial cáscara %	Nitrógeno final cáscara %	Enriquecimiento proteico de Cáscara %
1	0,131	0,154	18
2	0,131	0,15	15
3	0,131	0,145	11
4	0,131	0,144	10
5	0,131	0,146	11
6	0,131	0,148	13
Promedio			13

Tabla 5: resultados obtenidos para la variable Nitrógeno en cáscara de naranja con tratamiento 1

Los resultados obtenidos en promedio rondan en una ganancia neta de 0,017% de nitrógeno en cáscara. Es decir que el porcentaje de proteínas promedio que contiene la cáscara de naranja luego del tratamiento es $(0,131 + 0,017) * 6,25 = 0,925\%$. Si bien se logró un enriquecimiento proteico de la cáscara, el porcentaje de proteína que esta posee al final aún está muy alejado del porcentaje requerido para la dieta bovina desarrollada que es de 14% Albarracín (2011), se debe señalar que la levadura no es el único ingrediente de la dieta que aporta nitrógeno pero si el que más aporta. Por lo tanto si bien el resultado es

alentador debido a que obtuvo un enriquecimiento, se debe estudiar distintos mecanismos que permitan a la levadura adherirse a la cáscara de naranja. Autores señalan el crecimiento de diferentes microorganismos en fermentaciones de estado sólido, Domenech López (2015) y Christen *et al.*, (1993). En estas los microorganismos crecen sobre el soporte sólido y no hay medio líquido disponible. En el caso del reactor “batch” desarrollado no se realizó una fermentación en estado sólido sino con lecho sólido y vinaza en solución acuosa como sobrenadante. Como consecuencia de esta separación y la ausencia de agitación, la levadura estaba sometida a dos medios con humedades y actividad del agua diferente y, debido a que había oxígeno disponible en el medio líquido, se observó una preferencia de la levadura a desarrollarse en la solución acuosa de vinaza

4.2. Tratamiento 2:

Los valores obtenidos en el enriquecimiento de la cáscara de naranja, tabla 6 fueron similares a los reportados en los ensayos sin nutrientes. El enriquecimiento neto de la cáscara de naranja aumentó debido a que el medio líquido poseía 0,65 g/L de $(NH_4)_2HPO_4$ y 1,08 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, es decir contenía nitrógeno, es por ello que si bien la cáscara finalmente posee en promedio $0,28+0,037= 0,317\%$ de nitrógeno que representan 2% de proteínas no todo corresponde a la adhesión de la levadura sino también al agregado de nitrógeno en el medio líquido.

Nº ensayo	Nitrógeno inicial cáscara %	Nitrógeno final cáscara %	Enriquecimiento proteico de Cáscara %
1	0,28	0,31	11
2	0,28	0,32	14
3	0,28	0,323	15
Promedio			13

Tabla 6: resultados obtenidos para la variable Nitrógeno en cáscara de naranja con tratamiento 2

4.3. Análisis estadístico

El ANOVA de medidas repetidas nos da que es significativo para tratamiento y para reactor ($p < 0,01$).

5. Enriquecimiento Proteico en vinaza

5.1. Tratamiento 1:

En el análisis hecho para la variable nitrógeno cáscara de naranja, se dijo que la levadura mostró mayor afinidad a desarrollarse en el medio líquido esto puede observarse en la tabla 7. En promedio se obtuvieron enriquecimientos de 136% en el medio líquido formado por vinaza en solución acuosa al 50%, valores superiores a los 100% reportado por Serguera Niño *et al.*, (2010) en un medio líquido formado por: urea (2,3 g), $(NH_4)_2HPO_4$ (4 mg), NH_4SO_4 (11,5 g), miel B de caña (200 mg) y enrasados con agua destilada hasta 1 l, que es un medio mucho más nutritivo preparado exclusivamente para el desarrollo de la levadura.

Nº ensayo	Nitrógeno inicial vinaza [mg/L]	Nitrógeno final vinaza [mg/L]	Enriquecimiento proteico de vinaza %
1	335	774	131
2	335	777	132
3	335	800	139
4	335	805	140
5	335	792	136
6	335	789	136
Promedio			136

Tabla 7: resultados obtenidos para la variable Nitrógeno en vinaza con tratamiento 1

Si bien se obtuvo enriquecimiento proteico en medio líquido por encima de los valores reportados por otros autores se necesita que esas células, que se encuentran en el medio líquido, se adhieran a la cáscara de naranja. Para ello una mejora del método sería triturar aún más la cáscara con el fin de aumentar la superficie de contacto con las células. Otra alternativa para aumentar el nitrógeno total en la cáscara sería eliminar el agua del medio líquido, secando en estufa a 50 °C durante 72 h. como reporta Villas Boas *et al.*, (2003).

5.2. Tratamiento 2:

Lo descripto anteriormente también se vio en el tratamiento 2, donde el porcentaje de enriquecimiento del medio líquido (tabla 8) fue cercano al 80%, si bien en porcentaje fue menor, los mg/L de nitrógeno aumentaron en promedio 545 mientras que con el tratamiento 1 la ganancia neta fue de 455 mg/L, es decir obtuvo un aumento neto mayor de la cantidad de células en el medio líquido que con el tratamiento 1.

Nº ensayo	Nitrógeno inicial vinaza [mg/L]	Nitrógeno final vinaza [mg/L]	Enriquecimiento proteico de vinaza %
1	694	1243	79
2	694	1235	78
3	694	1239	79
Promedio			79

Tabla 8: resultados obtenidos para la variable Nitrógeno en vinaza con tratamiento 2

5.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para el ANOVA muestran la existencia de diferencia significativa para tratamiento y para reactor ($p < 0,01$).

6. Variación de la conductividad en medio líquido

6.1. Tratamiento 1:

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos al medir la conductividad del medio al inicio y al final de los ensayos, en promedio la conductividad disminuyó un 9%, esto habla de la disminución de iones en la solución. Se sabe que los iones de potasio son los que más abundan en la vinaza (Amhed *et al.*, 2015), esto se debe a que el suelo tucumano posee gran cantidad de potasio.

Nº ensayo	Conductividad inicial [mS]	Conductividad final [mS]	Disminución de la conductividad %
1	9,34	8,25	12
2	9,34	8,35	11
3	9,34	8,64	7
4	9,34	8,74	6
5	9,34	8,68	7
6	9,34	8,6	8
Promedio			9

Tabla 9: resultados obtenidos para la variable conductividad en vinaza con tratamiento 1

6.2. Tratamiento 2:

La conductividad presentó una mayor disminución que en los ensayos anteriores, tabla 10, esto se debe a que los nutrientes agregados aumentaron la conductividad inicial pero como consecuencia de esto la conductividad que se obtiene en el medio líquido al finalizar los ensayos es aún mayor que la inicial en los reactores del tratamiento 1, efecto no deseado.

Nº ensayo	Conductividad inicial [mS]	Conductividad final [mS]	Disminución de la conductividad %
1	11,71	10,05	14
2	11,71	10,02	14
3	11,71	10,17	13
Promedio			14

Tabla 10: resultados obtenidos para la variable conductividad en vinaza con tratamiento 2

6.3. Análisis estadístico de datos

Los resultados obtenidos para el ANOVA realizado fueron que existe diferencia significativa entre tratamiento y entre reactor ($p < 0,01$).

Debido a que en todas las variables analizadas estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos, y que estas diferencias se traducen en que el tratamiento 2 presenta pH final inferior mientras que la conductividad final aumentó, que la remoción de DQO fue menor, que la ganancia neta de nitrógeno fue mayor en medio líquido sumado a que con este tratamiento el tiempo de fermentación se vio aumentado, todos efectos no deseados y que no justifican el costo que significa el agregado de estos nutrientes a la vinaza, es que se eligió el tratamiento 1 como el más recomendado.

Conclusiones

Se comprobó que la levadura *Candida utilis* puede desarrollarse en un reactor "batch" utilizando como sustrato cáscara de naranja y vinaza como nutriente en solución acuosa al 50%.

Se demostró que la cáscara de naranja no produce efecto inhibitorio en el desarrollo de la levadura.

Se consiguió disminuir la carga contaminante de la vinaza, DQO, en un 43%. Se obtuvo un enriquecimiento proteico en cáscara de naranja del 13%

Bibliografía

Christen P., Domenech López F, Michelena G., Auria R. y Revah S, *Biofiltration of volatile ethanol using sugar cane bagasse inoculated with Candida utilis*, Journal of Hazardous Materials, pag. 253-265, 2002

Christen P., Domenech López F, Paca ., y Revah S, *Evaluation of four Candida utilis strains for biomass, acetic acid and ethyl acetate production from ethanol*, Bioresource Technology, pag. 193-195, 1999.

Christen P., Auria R., Vega C., Villegas E., y Revah S, *Growth of Candida utilis in solid state fermentation*, Biotechnology Advances, pag. 549-557, 1993.

Diaz M. Semprún A., Gualtieri M., *Producción de proteína unicelular a partir de desechos de vinaza*, Revista de la facultad de Farmacia, pag 23-26, 2003.

Domenech López, Reporte de avance Perez Guerrero Organización de las Naciones Unidas, 2015.

Larrahondo, J., *La vinaza: Caracterización de la vinaza, usos y aprovechamientos potenciales*. Memorias Seminario

internacional de Fertilización y Nutrición de la Caña de Azúcar, Técnicaña. Cali, Colombia, pp. 69 - 90, Noviembre 2009

Molina G., Yomaira M., *Producción de Levadura a partir de Vinaza*. Fundación CIEPE. San Felipe. Venezuela, 1976.

Serguera Niño M., Yoandry C., Pedroza Ortiz C., Rodríguez Clavijo Y., *Determinación de la composición óptima de la mezcla mosto miel para el crecimiento de la levadura torula*, Tecnología Química, pag 89-92, 2001.

Soto E., *Producción de proteína unicelular a partir de levaduras (Saccharomyces cerevisiae y Candida Utilis) utilizando el agua residual del proceso de nixtamalización*, Tesis Ingeniería Biotecnológica, 2002.

Quinteros Bertel Q., Mateus Pineda C., Rivera Pineda M., Riaño Jiménez N., Hernández Hernández J., *Manejo ambiental del subproducto vinaza de la obtención de bioetanol a partir de remolacha forrajera (Beta Vulgaris L.) mediante la producción de proteína unicelular- fase laboratorio*, Clepsidra pag 47-52, 2009.

Agradecimientos

Se agradece a la Cátedra de Microbiología de FACET- UNT su colaboración.

Financiamiento

El trabajo se financió dentro de los proyectos PIUNT 189 convocatoria 2014 y PID 2274 de FRT _UTN convocatoria 2015.