

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

Quelbis Román Quintero Bertel

C.M.Sc. Ingeniero Agrícola, Esp. Ciencias Ambientales.
Universidad Autónoma de Colombia. quelbis.quintero@fuac.edu.co

Celso Libardo Mateus Pineda

Lic. Biología y Química. Ph.D. Universidad Autónoma de Colombia. celso.mateus@fuac.edu.co

Martha Giselle Rivera Pineda

M.Sc. Microbiología. Universidad Autónoma de Colombia. giselariver@gmail.com

Nubia Consuelo Riaño Jiménez

Ingeniera Ambiental y Sanitaria. Universidad Autónoma de Colombia. nubiariano0112@gmail.com

Jennyffer Lizeth Hernández Hernández

Ingeniera Ambiental. Universidad Autónoma de Colombia. jenniferli400@gmail.com

Recibido: 05-10-2009, aceptado: 17-11-2009, versión final: 17-11-2009

RESUMEN

*En el presente proyecto se realiza un estudio del proceso fermentativo en la producción de biomasa, empleando las vinazas procedentes de la destilación de alcohol a partir de remolacha forrajera, suplementadas con mieles de caña como fuente de sustrato, para la producción de proteína unicelular. Se empleó un sistema de cultivo por lote incrementado, a escala de laboratorio con tres alternativas de mezcla de vinazas de destilería y mieles finales: 90/10, 80/20 y 50/50, en contenido de azúcares reductores totales (ART) en el sustrato. Se utilizaron dos cepas de levadura: *Saccharomyces cerevisiae* de LEVAPAN® y *Kluyveromyces fragilis* del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN). Los mejores resultados fueron obtenidos con la mezcla VD/MF:80/20 y con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y se logró un incremento de hasta de 5,8 veces en la biomasa de la levadura en un período de 10 horas de incubación a 30°C.*

Palabras clave: Proteína unicelular, Vinazas, alimentación.

ABSTRACT

*This project is an study of the fermentation process used for the production of biomass using the fodder beetroot alcohol distillation vinasses, supplemented with cane honeys as source of substratum, for the production of single-cell protein. The process used was increased batch at laboratory scale, with three mixture alternatives of Distillery Vinasses and Final Honeys: 90/10, 80/20 and 50/50, in total reducer sugars (ART) in the substratum. Two different yeast strains were used, *Saccharomyces cerevisiae* from LEVAPAN® and *Kluyveromyces fragilis* from the: Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN). Best results were obtained with *Saccharomyces cerevisiae* from LEVAPAN® and with 80/20 mixture, achieving an increase of 5,8 times in the yeast biomass, in a 10 hours period of incubation at 30°C.*

Keywords: single cell protein, vinasse, food.

1. INTRODUCCIÓN

Las tecnologías más limpias o producción más limpia, se debe implementar en los procesos productivos para el aprovechamiento de los residuos o desechos, ya que esta tecnología brinda una estrategia de prevención ambiental integrada a producciones y servicios con el objetivo de incrementar su eficiencia. Además proporciona la reducción de los desechos o residuos recirculándolos con los procesos productivos para así minimizar y reducir los daños generados tanto al medio ambiente como a la salud humana, y orientado a la búsqueda de empresas más sostenibles.

Las vinazas de destilerías provenientes de la destilación de alcohol a partir de la remolacha forrajera, son considerados residuos industriales aprensivos con el ambiente; son una fuente atractiva para su empleo como sustrato en la producción de proteína unicelular (SCP), convirtiéndolo en un producto de alto valor agregado destinado a la alimentación animal.

Los primeros microorganismos empleados como fuente de proteína fueron las levaduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae* que aún hoy es la principal fuente de proteína unicelular (SCP) con una producción de 200.000 toneladas anuales en peso seco.

Son también de uso amplio la *Spirulina maxima*, *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces fragilis* y *Candida utilis*. La utilización de determinado microorganismo depende del sustrato, el proceso y la misma calidad deseada de la biomasa.

La producción de SCP alcanza sus niveles más rentables, puesto que los desechos industriales son las materias primas más baratas y diversas, especialmente si los mismos se aprovechan en el lugar propio donde son producidas, con lo cual se elimina en gran parte el costo del transporte.

La lista de posibles residuos involucra técnicamente cualquier fuente de carbón, entre ellos

melazas derivadas de la industria azucarera, empleando *Saccharomyces cerevisiae* y los residuos de la industria licorera o vinazas con el mismo microorganismo¹.

2. METODOLOGÍA

Microorganismo: se emplearon cepas de levaduras obtenidas de terceros como *Saccharomyces cerevisiae* de LEVAPAN® y *Kluyveromyces fragilis* del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN). La incubación se realizó a 30°C. Los tubos de ensayo con las levaduras se guardaron en frío (4-6 °C) por un periodo máximo de un mes.

Muestreo del desecho líquido: la vinaza utilizada para el cultivo se toma del tanque de reserva de destilación de la Planta de Tratamiento ubicada en el Municipio de Tenjo (Cundinamarca) perteneciente a una industria alcoholar.

Ensayo de pre-adaptación y crecimiento: este ensayo se realiza para adaptar la levadura al sustrato vinaza. Para ello se toma una asada de cepas y se inocula en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de vinaza esterilizada, al cual se le ajustó el pH a 4,5 previamente. Este inóculo se deja en agitación mecánica por 24 horas a temperatura ambiente. Este procedimiento se repite por dos períodos más de 24 horas para luego sembrar la cepa adaptada en agar.

Preparación del medio de cultivo: se preparan cuatro medios de cultivo diferentes, tomando como base un litro de vinaza y sin esterilizar, con concentraciones de 0, 0,5, 1.0 y 1.5 g/L de cada uno de los nutrientes por separado.

Se ajusta el pH a 4.5; luego se reparte en proporciones de 10, 100 y 390 ml en *erlenmeyers* de 125, 500 y 1000 ml respectivamente, haciéndose por duplicado. Posteriormente, se esteriliza la

¹ García, A. y Rojas, C. "Posibilidades de uso de la Vinaza en la agricultura de acuerdo con su modo de acción en los suelos". Nota técnica, p. 98.

vinaza contenida en los *erlenmeyers* con tapón de gasa y algodón en una autoclave a 15 lb. durante 15 minutos.

Recuento de células: para determinar el crecimiento de la levadura en el medio con vinaza se emplea la técnica de conteo de células en Cámara de Neubauer (Anido, 1943).

Fermentación aeróbica: luego de preparado cada medio, se procede a montar la fermentación aeróbica. Para ello se mezcla el contenido de los *erlenmeyers* de 1000 ml, llegándose así a un volumen de un litro, y se coloca en un *erlenmeyer* de dos litros previamente lavada y esterilizada, tapándola con un tapón aforado, el cual contiene dos tubos. Por uno de ellos está conectada la entrada de aire proveniente de un filtro de aire utilizado para peceras, la salida de aire debe estar casi al fondo del *erlenmeyer*, para así garantizar una buena distribución de aire en la mezcla. El otro tubo es para la descarga de gases. Se enciende el filtro de aire y se deja burbujear por espacio de 24 horas, tomando muestras para conteo celular cada dos horas.

Separación de levadura del sobrenadante: luego de finalizada la fermentación aeróbica se separa la levadura del sobrenadante mediante centrifugación a 1500 rpm.

Caracterización de productos de la fermentación: los análisis químicos se realizan por triplicado, empleando métodos COVENIN. La determinación del extracto libre de nitrógeno (Brenner, 1965).

El proceso de producción de biomasa involucró un procedimiento de conteo de células por el método de la cámara de Neubauer, determinación de pH y temperatura a intervalos de dos horas, el cual se realizó en un tiempo estimado de catorce horas y mediante el cual se obtuvieron los resultados reportados en las Tablas No. 1, Tabla No. 2, Tabla No. 3, Tabla No. 4 y Gráficas No. 1, Gráfica No. 2, Gráfica No. 3, Gráfica No. 4, Gráfica No. 5.

Tabla No. 1
Resultados de la producción de biomasa proteica concentración 90 VD/10 MF.

| LEVAPAN 90/10 | | | | |
|---------------|-------------|----------|----------|-----|
| t (horas) | cel totales | cel / ml | vol (mL) | pH |
| 0 | 1,00E+10 | 2,00E+07 | 500 | 4,5 |
| 2 | 5,60E+09 | 1,12E+07 | 673 | 4,0 |
| 4 | 3,77E+10 | 5,60E+07 | 846 | 4,0 |
| 6 | 2,67E+10 | 3,16E+07 | 1000 | 4,0 |
| 8 | 2,85E+10 | 2,85E+07 | 1000 | 4,0 |

Gráfica No. 1
Curva de crecimiento concentración 90 VD/10 MF con levadura *Saccharomyces cerevisiae*

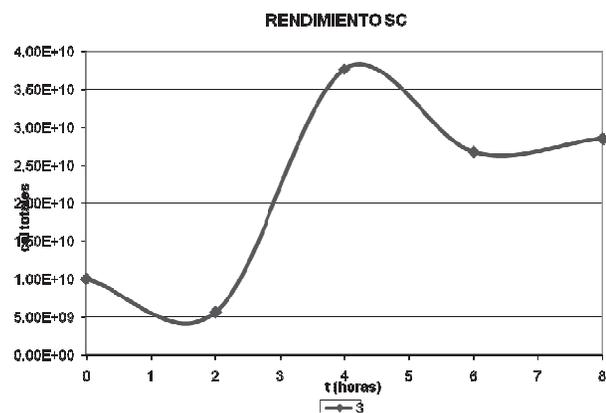


Tabla No. 2
Resultados de la producción de biomasa proteica Concentración 80 VD/20 MF con levadura *Saccharomyces cerevisiae*

| LEVAPAN 80/20 | | | | |
|---------------|-------------|----------|----------|-----|
| t (horas) | cel totales | cel / ml | vol (mL) | pH |
| 0 | 1,00E+10 | 2,00E+07 | 500 | 7,0 |
| 2 | 1,43E+10 | 2,85E+07 | 500 | 6,0 |
| 4 | 1,78E+10 | 2,20E+07 | 808 | 4,7 |
| 6 | 1,95E+10 | 1,95E+07 | 1003 | 4,7 |
| 8 | 2,39E+10 | 2,00E+07 | 1198 | 4,7 |
| 10 | 4,55E+10 | 3,80E+07 | 1198 | 4,5 |
| 12 | 6,10E+10 | 6,10E+07 | 1000 | 4,0 |
| 14 | 4,00E+10 | 4,00E+07 | 1000 | 4,0 |

Gráfica No. 2

Curva de crecimiento concentración 80 VD/20 MF con levadura *Saccharomyces Cerevisiae*

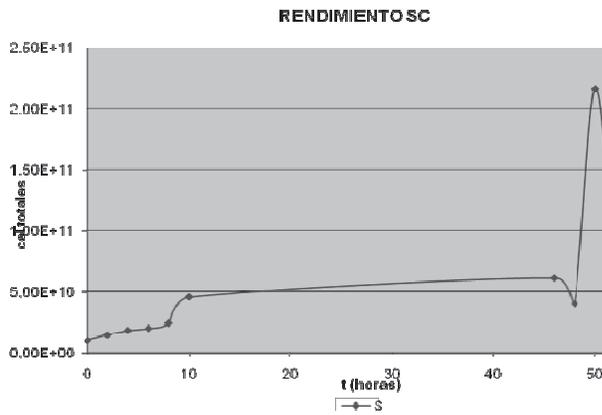


Tabla No. 3

Resultados de la producción de biomasa proteica concentración 80 VD/20 MF con *Saccharomyces cerevisiae* Levapan®

| LEVAPAN 80/20 | | | | |
|---------------|-------------|----------|----------|-----|
| t (horas) | cel totales | cel / ml | vol (mL) | Ph |
| 0 | 5,00E+09 | 1,00E+07 | 500 | 5,0 |
| 2 | 8,50E+09 | 1,70E+07 | 673 | 5,0 |
| 4 | 1,10E+10 | 1,65E+07 | 846 | 5,0 |
| 6 | 2,24E+10 | 2,65E+07 | 1000 | 5,0 |
| 8 | 3,25E+10 | 3,25E+07 | 1000 | 5,0 |
| 10 | 5,80E+10 | 5,80E+07 | 1000 | 5,0 |

Gráfica No. 3

Curva de crecimiento concentración 80 VD/20 MF con *S. cerevisiae*

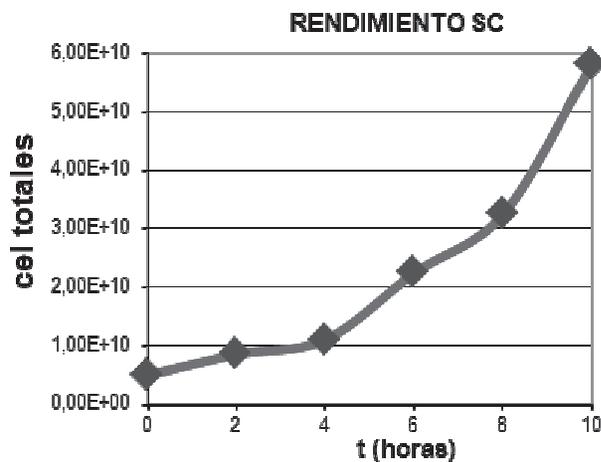


Tabla No. 4

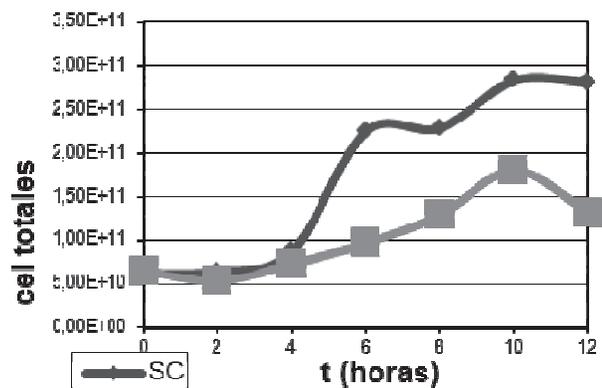
Resultados de la producción de biomasa proteica concentración 80 VD/20 MF con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y con levadura *Kluyveromyces fragilis*

| LEVAPAN (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) | |
|---|-------------|
| t (horas) | CEL TOTALES |
| 0 | 6,22E+10 |
| 2 | 6,45E+10 |
| 4 | 8,69E+10 |
| 6 | 2,25E+11 |
| 8 | 2,29E+11 |
| 10 | 2,83E+11 |
| 12 | 2,81E+11 |
| 14 | 1,61E+11 |

| <i>Kluyveromyces fragilis</i> | |
|-------------------------------|-------------|
| t (horas) | cel totales |
| 0 | 6,55E+10 |
| 2 | 5,35E+10 |
| 4 | 7,35E+10 |
| 6 | 9,65E+10 |
| 8 | 1,29E+11 |
| 10 | 1,81E+11 |
| 12 | 1,32E+11 |
| 14 | 2,20E+11 |

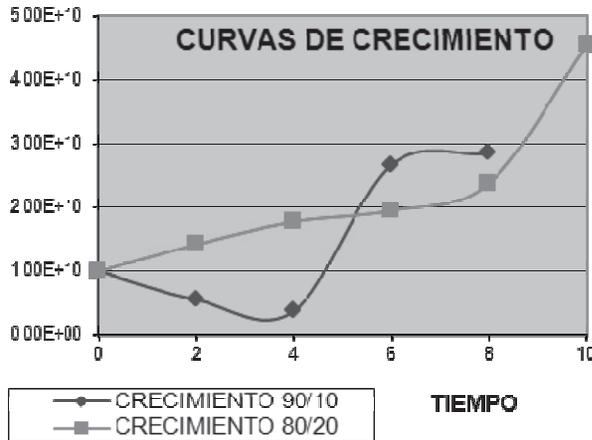
Gráfica No. 4

Comparación de las curvas de Crecimiento en la concentración 80 VD/20 MF de (*Saccharomyces cerevisiae*) y *Kluyveromyces fragilis*



Gráfica No. 5

Comparación de las curvas de crecimiento de las concentraciones 90 VD/10 MF y 80 VD/20 MF con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)



3. RESULTADOS

Según los análisis realizados a la biomasa proteica, se obtuvo un 16.5 g. de proteína aproximadamente y se requiere, en caso de ganado vacuno un 12.2%.

Al tener en cuenta los resultados obtenidos de los procesos productivos de biomasa proteica en concentraciones vinazas/melazas 90/10 y 80/20, el crecimiento celular que proporciona mejores resultados y mayor rendimiento de biomasa es la concentración 80/20, pues se puede aumentar el tiempo de producción y el crecimiento celular es más alto y adicionalmente proporciona mayor rendimiento.

Al realizar la comparación del crecimiento celular entre el proceso de producción con levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis*,

se observa un crecimiento más rápido con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que llega un crecimiento de 2.81×10^{11} Cel/totales, mientras que la *K. fragilis* sólo alcanza hasta 2.20×10^{11} Cel/totales. Esto indica que se debe utilizar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para obtener un mayor crecimiento celular y un mayor rendimiento de biomasa proteica.

4. CONCLUSIONES

Las vinazas de destilería suplementadas con miel final constituyen un sustrato factible para la producción de proteína celular.

La variante de sustrato MF/VD: 80/20 resulta una buena alternativa de mezcla, pues se obtienen mayores niveles de productividad y rendimiento biomasa - sustrato en el proceso fermentativo

La cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* presenta un buen comportamiento en los ensayos realizados, por lo que puede ser empleada como una alternativa de cultivo en el proceso de producción de biomasa proteica incluidos residuales agresivos al medio ambiente como son las vinazas que forman parte del sustrato en el proceso.

Esta alternativa de empleo de los residuales de la industria alcoholera (vinaza) en la producción de levadura resulta una variante de interés para disminuir la contaminación y el impacto ambiental que provoca esta industria, y se aprovechan de forma útil estos residuales que son los que más afectan el medio ambiente en este caso, y se contribuye, además a la economía de la propia industria.

REFERENCIAS

- Anido, V. (1980). *Técnicas clínicas e interpretaciones. Fraguio Cultural, S.A.* La Habana, Cuba. CIEPE. Centro de Investigaciones Agroindustriales y experimentales para el Estado. *I Simposium Nacional de Desechos Agroindustriales*. 7 y 8 de julio de 1980. San Felipe, Venezuela.
- Echegaray O., Carvalho J., Fernández A., Sato S., Aquarone E., Vitolo M. (2000). *Fed- Batch culture of Saccaromyces cerevisiae in sugarcane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation*. Biomass Bioenerg.
- Goncalvez, Yene (1984). *Producción de biomasa de Chaetomium Cellulolyticum a partir de vinaza como única fuente de carbono*. Fundación CIEPE. San Felipe. Venezuela.
- Gualtieri, María (2001). *Producción de biomasa de Cándida utilis, Saccharomyces cerevisiae y Schwanniomyces castelli, utilizando como substrato desechos de harina de maíz precocida (Zea mays)*. Bogotá, Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes.
- Molina G., Yomaira M. (1976). *Producción de Levadura a partir de Vinaza*. Fundación CIEPE. San Felipe. Venezuela.
- Pedraza G. X. (2003). *Aplicación de la biotecnología apropiada para la producción de proteína unicelular a partir de Spirulina máxima*. Cuba.
- Riaño, N., Bustos, E. (2004). "Las vinazas de destilería y las mieles finales, procedentes de los ingenios azucareros como fuente de sustrato para la producción de biomasa proteica como posible suplemento alimenticio de porcinos el Palmira Valle del Cauca". Bogotá, Universidad Autónoma de Colombia.
- Trujillo, Francisco N. (1985). *Utilización de la Vinaza en la Producción de Levadura Torula*. Destilería Yaracuy. Chivacoa, San Felipe. Venezuela.
- Webb (1966). *Ingeniería Bioquímica*. Acribia. Zaragoza, España.