

# Reducción de la carga contaminante de la vinaza por producción de proteína unicelular

Patricia M. Albarracín<sup>1,2</sup>; María F. Lencina<sup>1</sup>; Ada J. Robinson<sup>1</sup>; Samanta Rearte<sup>1</sup>; M.M. Elsa Ferreyra<sup>1</sup>

1. DIPGI, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología (FACET), Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Avenida Independencia 1800, 4000 S.M. de Tucumán, Argentina.

2. CEDIA Facultad Regional de Tucumán Universidad Tecnológica Nacional.

\* palbarracin@herrera.unt.edu.ar

## RESUMEN

Para realizar esta investigación, se estudió el uso de la vinaza como medio líquido para la producción de proteína mediante técnicas biotecnológicas. Se trabajó con una cepa de *Candida utilis* y concentraciones acuosas de vinaza desde 10 a 50 %, sin agregado de nutrientes en un reactor en lote. Se monitoreó el crecimiento del microorganismo con un sensor de CO<sub>2</sub>. Los parámetros medidos al inicio y final de cada ensayo fueron: nitrógeno total, DQO, pH, conductividad y cada dos horas se midió la DO (densidad óptica). Por ANOVA, con un nivel de significancia del 1 %, se evaluaron los factores repetición, tratamiento y reactor de cada parámetro. Los mejores resultados obtenidos fueron para las soluciones acuosas de 50 %: enriquecimiento proteico del 136 % en nitrógeno total y remoción promedio de DQO del 43 %. Se concluyó que el tratamiento de la vinaza con *Candida utilis* reduce su carga contaminante.

**Palabras clave:** proteína, vinaza, reducción de contaminación.

## ABSTRACT

In this work, the use of vinasse as a liquid medium was studied for the production of protein by biotechnological techniques. *Candida utilis* in aqueous concentrations of vinasse (10 % to 50 %) was used, with no nutrients added. In a batch reactor the growth of the microorganism was monitored with a CO<sub>2</sub> sensor. The parameters measured at the start and end of each test were: total nitrogen, COD, pH and conductivity and, every two hours, the DO (optical density). By ANOVA, with a level of significance of 1 %, the repetition, treatment and reactor factors of each parameter were evaluated. The best results obtained were for the 50 % aqueous solutions: 136 % protein enrichment in total nitrogen and average COD removal of 43 %. It was concluded that the treatment of vinasse with *Candida utilis* reduces its polluting load.

**Key words:** proteins; vinasse; polluting load.

## INTRODUCCIÓN

La perspectiva, a nivel mundial, es incrementar la producción de alcohol para su empleo como combustible automotor. En el año 2016, Argentina aumentó el corte de bioetanol en los combustibles al 12 %, que trajo como consecuencia un incremento del volumen de producción que llegó a 326 mil m<sup>3</sup> de alcohol anual (8). Esta producción genera un residuo final líquido, llamado vinaza, altamente contaminante y en grandes volúmenes pues se producen entre 12 a 16 litros por cada litro de etanol. En este contexto Tucumán cuenta con 15 ingenios azucareros y 10 destilerías de alcohol, con el consecuente impacto ambiental que producen sus efluentes.

Las vinazas residuales contienen cerca del 70 % del potasio que se aporta a los suelos cañeros, como fertilizante químico. La fertirrigación, con estos efluentes, método comúnmente usado para biorremediación, puede producir salinización del suelo si no es aplicada de forma controlada.

Entre otras soluciones alternativas, consideramos usar vinaza como medio de cultivo para levaduras. Las levaduras tienen la habilidad de acumular, en altas concentraciones, iones presentes en el medio de cultivo. En particular, *Candida utilis*, cuando es cultivada con técnicas de fermentación en un medio compuesto por residuales de destilería, muestra una alta resistencia a las concentraciones de potasio.

Estudios realizados por Christen (1, 2) han mostrado la capacidad de la levadura *Cándida utilis* de crecer en diferentes soportes sólidos y líquidos.

También en sus estudios Díaz (3) ha demostrado que esta levadura puede desarrollarse en medio líquido formado por vinaza o en medio de vinaza y melaza, como lo indicó Serguera (4) y Doménech (5), que reportan el desarrollo de la levadura en vinaza enriquecida con amonio sulfato y amonio sulfato dibásico, a diferentes concentraciones. En estos casos se destaca, además de la obtención de proteína unicelular, la disminución de la carga contaminante de la vinaza.

Por ello, el objetivo de este trabajo es estudiar la propagación de la levadura *Candida utilis* en un reactor en lote, y usar como medio líquido soluciones acuosas de vinaza sin agregado de nutrientes, que permita captar y/o separar potasio de vinazas, por medio de las levaduras y reducir la carga contaminante del efluente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de Microbiología General e Industrial y en el laboratorio de Química Orgánica de FACET-UNT.

La vinaza fue suministrada por un ingenio azucarero de la localidad de la Banda del Río Salí, Tucumán, que utiliza la melaza como materia prima para la producción de etanol. La levadura utilizada en este trabajo es una cepa extraída del cepario de PROIMI CONICET. Los ensayos se llevaron a cabo en reactores y trabajaron en lote. Se realizaron 3 ensayos por duplicado en reactores de 250 ml, con diluciones acuosas de vinaza del 10 %, 25 % y 50 %.

Para cada ensayo, se prepararon los 3 medios de cultivos, se esterilizaron con autoclave de tipo chamberland a 1 atmósfera de sobrepresión y 121 °C durante 15 minutos. La cepa *Candida utilis*, previamente se activó en medio papa – Dextrosa durante 24 h a 34 °C antes de cada propagación a los reactores en lote. Se inoculó cada reactor con 10 mL de este cultivo.

El crecimiento se llevó a cabo con un agitador axial a 34 °C, por 24 h. No se realizó aireación externa, únicamente se utilizaron tapones biológicos, para permitir el flujo de gases en el reactor.

Se realizaron determinaciones analíticas al inicio y al final del tratamiento. Se midieron parámetros físico-químicos, para caracterizar los ensayos llevados a cabo en los reactores. Se determinó la variación del ión potasio por fotometría de llama, DQO (demanda química de oxígeno) por método colorimétrico y ART (azúcares reductores totales) método ICUMSA. Como parámetros de caracterización se midieron: pH con ph-metro Orion 420, conductividad con conductímetro Adwa AD32 y se realizó conteo en cámara de Neubauer para controlar la concentración de las levaduras. Los parámetros medidos se promediaron en Microsoft Excel 2013.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos obtenidos de los ensayos de fermentación se informan a continuación.

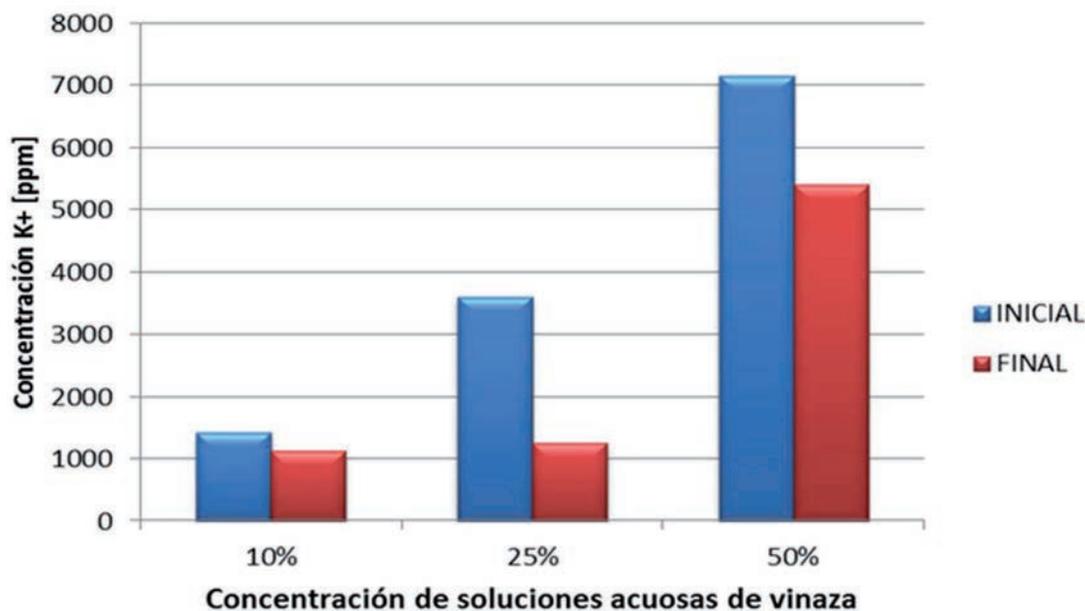
En la tabla 1, se observa que la cantidad de células por unidad de volumen aumenta con la concentración de vinaza; es decir, con la disponibilidad de nutrientes; esto habla muy bien del nivel de adaptación de *Candida utilis* a la naturaleza del efluente. No se observan aumentos en el orden de magnitud de la concentración de células, entre las soluciones acuosas de vinaza al 25 % y 50 %.

**Tabla 1.** Concentración celular promedio, a diferentes concentraciones de soluciones acuosas de vinaza

Concentración de soluciones acuosas de vinaza	[Cél./mL]
10 %	$3.6 \cdot 10^7$
25 %	$1.6 \cdot 10^8$
50 %	$1.9 \cdot 10^8$

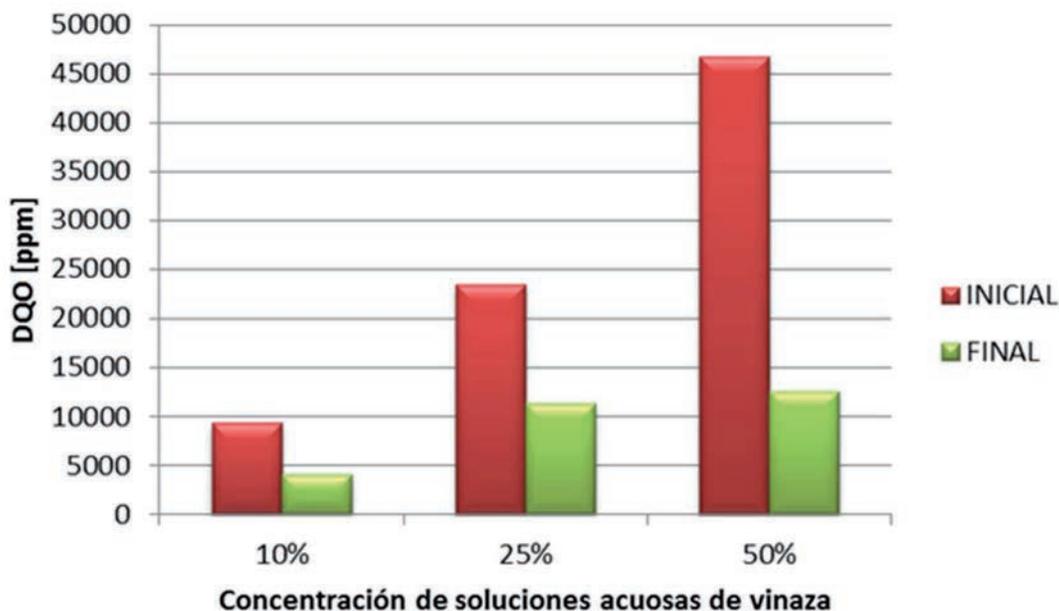
En la figura 1 se observa la remoción promedio de iones potasio en las soluciones acuosas de vinaza de 25 % y 50 %. Los resultados de 2 000 ppm removidas con respecto a las soluciones sin tratamiento, son similares a los encontrados por Otero Rambla *et al.* (6). Estos iones son los que más abundan en la vinaza en Tucumán, según Amhed *et al.* (7). Se evidencia que la remoción de este ión depende de la concentración celular y no de la concentración de iones presentes en el medio. Esto coincide con que en las soluciones acuosas al 25 % y 50 %, la concentración celular que arrojó la cámara de Neubauer fue de la misma magnitud y la remoción de potasio fue la misma.

Es destacable que el tratamiento de soluciones acuosas de vinaza al 50 % con la cepa de *Candida utilis*, logró bajar la concentración de iones potasio a 5 400 ppm lo que facilitaría la disposición final del efluente como fertirriego y evitar que salinice los suelos donde es vertida.

**Figura 1.** Concentración de iones K<sup>+</sup> al inicio y al final de cada ensayo de fermentación, en soluciones acuosas de vinaza 10 %, 25 % y 50 %.

El DQO (demanda química de oxígeno) es uno de los parámetros más relevantes en la vinaza y que la vuelven contaminante, refirió Serguera *et al.* (4). Se puede observar en la figura 2 que luego del tratamiento de los distintos medios con el microorganismo, se produce una importante disminución en el valor de este parámetro. Es decir, el tratamiento disminuye la carga contaminante de la vinaza en términos de DQO. La tendencia creciente en el porcentaje de remoción de carga contaminante, se corresponde con el aumento en el número de células por unidad de volumen a mayor concentración de vinaza en el medio que se observó anteriormente.

En cuanto a los azúcares reductores, se observó que la concentración de vinaza original era 0.5 mg/l. Luego de los ensayos hubo un aprovechamiento de estos por parte de los microorganismos para desarrollarse. Resultó un consumo de 82 %, 78 % y 64 % correspondientes a soluciones



**Figura 2.** Concentración de DQO al inicio y final de cada ensayo de fermentación en soluciones acuosas de vinaza 10 %, 25 % y 50 %.

acuosas de vinaza de 10 %, 25 % y 50 % usadas, respectivamente, en cada ensayo. O sea, aun en el medio más concentrado de efluente, después del tratamiento, todavía posee disponibilidad de azúcares. Esto sugiere que la concentración de azúcares no es el nutriente limitante en el crecimiento de la levadura.

En cuanto al pH, el tratamiento no indicó cambios en la acidez propia del efluente que se mantuvo cercano a  $\text{pH} = 4.8$ .

La conductividad, usada para registrar la concentración de iones en las soluciones, disminuyó en promedio 8 %, comparativamente entre inicio y final de ensayos, en las diferentes concentraciones de soluciones de vinaza usadas como medio. Estos resultados obtenidos en conductividad concuerdan con el comportamiento observado en la remoción de potasio, pues como se mencionó el ion potasio es el más frecuente en las vinazas de las destilerías tucumanas.

## CONCLUSIONES

La propagación de levadura ofrece un método de descontaminación de las vinazas de destilación del etanol y reduce al mismo tiempo, la carga orgánica de estas y parte de su fracción mineral, en especial el contenido de potasio. El efluente, solución acuosa de vinaza al 50 %, luego del tratamiento realizado posee un DQO de 12000 ppm (12 mg/mL) y se logró reducir la concentración de iones K a 5000 ppm, valores que facilitan su disposición final, ya que poseen un menor impacto ambiental que las vinazas no tratadas, para ser usadas como fertirrigación.

La concentración de azúcares reductores totales en el efluente no limita el crecimiento de la levadura *Candida utilis*, ya que luego del tratamiento realizado todavía hay azúcares disponibles en el medio de cultivo.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Christen, P.; Doménech, F.; Michelena, G.; Auria, R.; Revah, S. (2002). Biofiltration of volatile ethanol using sugar cane bagasse inoculated with *Candida utilis*. Journal of Hazardous Materials B89:253-265.
2. Christen, P.; Domenech, F.; Páca, J.; Revah, S. (1999). Evaluation of four *Candida utilis* strains for biomass, acetic acid and ethyl acetate production from ethanol. Bioresource Technology 68: 193-195.
3. Diaz, M.; Semprún, A.; Gualtier, i M. (2003). Producción de proteína unicelular a partir de desechos de vinaza. Revista de la Facultad de Farmacia vol 45: 23-26.
4. Serguera, M.; Rodríguez Y.; Gómez A.; Suárez, W. (2001). Estudio del efecto de la velocidad de agitación y del flujo de aire en el crecimiento de la levadura torula en la etapa de pre-fermentación. Tecnología Química 20: 63-69
5. Doménech, F. (2015). Enriquecimiento proteico de residuos lignocelulosicos para la alimentación animal a partir de efluentes azucareros- Optimización del crecimiento de la levadura forrajera *Candida utilis* empleando vinazas y etanol gaseoso emitido por las destilerías como nutrientes. Proyecto Perez Guerrero del fondo fiduciario para la cooperación Sur-Sur.
6. Otero-Rambla, M.; Almazán-del Olmo, O.; Bello-Gil, D.; Saura-Laria, G.; Martínez-Valdivieso-Piloto, J. (2012). Reducción de la concentración de ion potasio en las vinazas de destilación de alcohol por medio de la propagación de *Candida utilis*. ICIDCA sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 46 (2), 23-29.
7. Ahmed, P. M.; Pajot, H. F.; Coronel, M.; Juárez, G.; Castellanos, L. I.; Gusils, C. H. (2015). Estudio de las características composicionales de la vinaza de la caña de azúcar. X Simposio de Biotecnología RedBio Argentina.
9. Instituto de promoción del azúcar y alcohol de Tucumán (2019) <http://www.ipaat.gov.ar/wp-content/uploads/2020/04/TOTALES-HASTA-2DA-QUINCENA-FEBRERO-2020.pdf>