

Eje temático elegido: Energía convencionales y alternativas

Estudio del Efecto de Iones Metálicos en el Tratamiento de Vinaza para la Obtención de Productos de Interés Biotecnológicos

Sarita Isabel Reyes¹², Juan Manuel Alfaro¹², María Rita Martearena¹², Silvia Blanco¹², Mario Baigori³⁴, Licia Pera³.

¹Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI - CONICET). ²Universidad Nacional de Salta. Salta. Argentina. ³Laboratorio de Morfogénesis y Fermentaciones (PROIMI - CONICET).

⁴Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán, Argentina.

reyessarita.unsa@gmail.com

Resumen

La vinaza es un subproducto final resultante de la producción de bioetanol a partir de cultivos azucareros. La disposición inadecuada e indiscriminada de la vinaza ha generado problemas ambientales. Se han desarrollado técnicas de biorremediación para el tratamiento de este efluente, entre estos encontramos el empleo de microorganismos oleaginosos con interés biotecnológico, para la obtención de biomasa y lípidos con fines energéticos. En el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de sales inorgánicas en vinaza para el desarrollo de *Rhodotorula mucilaginosa* y *Rhodotorula glutinis*. Se observó un incremento en el diámetro mayor y menor de las levaduras oleaginosas con el agregado de FeCl₃ y MnCl₂ sin embargo el aumento no fue significativo en la obtención de biomasa y lípidos. A su vez, se logró una remoción de la carga de la vinaza del 66% para *R. mucilaginosa* y 67% para *R. glutinis*.

Palabras claves

Vinaza, lípidos microbianos, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*.

Abstract

Vinasse is a final by-product resulting from the production of bioethanol from sugarcane crops. Inadequate and indiscriminate disposal of vinasse in soils and bodies of water has generated environmental problems. Bioremediation techniques have been developed for the treatment of this effluent, among them we find the use of oleaginous microorganisms with biotechnological interest. It is an interesting option for obtaining biomass and lipids for energy purposes. In the present work the effect of different concentrations of inorganic salts in vinasse was evaluated for the development of oleaginous yeasts, using vinasse as the culture medium. It was observed an increase in the major and minor diameter of *Rhodotorula mucilaginosa* and *Rhodotorula glutinis*, with the addition of salts in different concentrations of FeCl₃ and MnCl₂, however the increase was not significant in obtaining biomass and lipids. A removal of the enriched vinasse load was achieved with 66% and 67% salts for *R. mucilaginosa* and *R. glutinis* respectively.

Keywords

Vinasse, single cell oil, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*.

Introducción

La utilización de efluentes, excedentes o subproductos industriales con alto contenido de carga orgánica como sustratos para el desarrollo de microorganismos, es una alternativa interesante para la producción de lípidos mediante microorganismos oleaginosos [1].

Entre los residuos industriales más abundantes, en la Región del NOA, se puede citar a la vinaza un subproducto del proceso de obtención de etanol a partir de la melaza y jugo de caña de azúcar. En Argentina en el año 2016 por medio de la resolución 37/2016, el Ministerio de Energía y Minería resolvió incrementar el corte obligatorio de bioetanol en las naftas en un 12%, lo que incrementa la producción de biocombustible y por lo tanto la cantidad de vinaza, ya que por cada litro de alcohol producido se obtienen de manera adicional 15 litros de vinaza como residual. La vinaza es una buena fuente de carbono para el metabolismo microbiano debido a la presencia de grandes cantidades de azúcares fermentables en su composición [2], [3].

La pared celular es una estructura compleja y dinámica, es sitio de diversas actividades enzimáticas. El balance entre su síntesis y lisis es crítico, la síntesis de pared en ausencia de lisis puede causar un excesivo engrosamiento de la pared y una posible detención del crecimiento; mientras que la lisis en ausencia de síntesis puede producir la ruptura celular. Por lo tanto, dentro de los límites permisibles, el balance neto entre la síntesis y lisis de la pared ejercerá una notable influencia sobre el crecimiento y morfología celular. Tanto la biomasa celular como la producción de lípidos pueden aumentar significativamente mediante la optimización de la concentración de los iones Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , y Ca^{2+} , [4]. Alfaro en 2017 [5] estudió la influencia de Mn^{2+} y Fe^{3+} sobre la actividad β -D-glucosidasa producida por *Rhodotorula glutinis* y *Rhodotorula mucilaginosa*, observó que la presencia de estos iones pueden incrementar la actividad de dicha enzima originando cambios en la morfología de la célula, un aumento en el crecimiento celular y en la producción de lípidos al emplear un medio de cultivo en bajo contenido de nitrógeno.

El objetivo de este trabajo es aumentar la producción de biomasa y lípidos con fines energéticos, evaluando el efecto de diferentes concentraciones de sales inorgánicas en el desarrollo de levaduras oleaginosas en vinaza.

Metodología

Microorganismos: *Rhodotorula mucilaginosa*, aislada de cachaza de un ingenio de la provincia de Salta y *Rhodotorula glutinis* adquirida del instituto de Botánica Carlos Spegazzini de La Plata (Buenos Aires).

Medio pre cultivo: antes de inocular las levaduras en vinaza, fueron cultivadas en un medio que contenía (g/L): sacarosa 40,0; extracto de levadura 15,0 y peptona 5,0, pH 6 [6].

Medio de cultivo: se utilizó vinaza proveniente de un Ingenio Azucarero de la provincia de Salta. Previamente fue suplementada con 5,0 g/L de sulfato de amonio, 0,5 g/L de fosfato diácido de potasio y 109,0 g/L de glicerol para obtener una relación C/N: 42/1 [7] y se acondicionó el pH a un valor de 6. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C.

Métodos analíticos: se suplementó a la vinaza con 6 mM de $MnCl_2$ (para *R. glutinis*) y 6 mM de $FeCl_3$ (para *R. mucilaginosa*), se utilizó 45 mL de vinaza en erlenmeyers de 100 mL, se inoculó con 10 % V/V (5 mL) de pre cultivo de levaduras oleaginosas y se incubó en agitador orbital (180 rpm), durante 6 días a 30 °C. Se empleó como ensayo control vinaza sin el agregado de $MnCl_2$ o $FeCl_3$. Se tomó muestras a distintos tiempos para controlar la cinética de crecimiento, al final de la fase estacionaria se estudió el tamaño y la morfología empleando microfotografía. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Posteriormente se centrifugó (10.000 rpm), se lavó y se colocó la biomasa en estufa de secado (70 °C) hasta peso constante. Se extrajeron los lípidos producidos por las levaduras oleaginosas utilizando hexano como solvente, en equipo Soxhlet durante 4 horas. Se

determinó lípidos totales mediante técnica gravimétrica. Se determinó Demanda Química de Oxígeno (DQO) a la vinaza al inicio y final del tratamiento.

Resultados y Discusión

Durante la experiencia se tomó muestras a distintos tiempos y se midió la cinética de crecimiento, al finalizar la fase estacionaria se observó que al enriquecer la vinaza con 6 mM de FeCl₃, el diámetro de *R. mucilaginosa* aumentó de 2,91 ± 0,46 μm a 4,43 ± 0,54 μm y 3,19 ± 0,49 μm a 4,65 ± 0,32 μm, en presencia de 6 mM de FeCl₃. El diámetro menor de *R. glutinis* aumentó de 2,31 ± 0,38 μm a 4,86 ± 0,43 μm y de 4,70 ± 0,51 μm a 5,30 ± 0,32 μm, respectivamente, en presencia de MnCl₂ 6 mM. Respecto a la producción de biomasa y lípidos producidos por *R. mucilaginosa*, las diferencias no fueron significativas entre el control sin agregado y el agregado de 6 mM FeCl₃, obteniéndose 12,43 ± 0,74 y 13,93 ± 0,65 g/L de biomasa y 10,50 ± 0,87 y 10,41 ± 0,36 g/L de lípidos respectivamente. Respecto a *R. glutinis* tampoco se observaron diferencias significativas entre el control y el agregado de 6 mM MnCl₂ obteniéndose 10,91 ± 0,40 y 10,04 ± 0,67 g/L de biomasa y 11,60 ± 1,19 y 9,88 ± 0,51 g/L de lípidos respectivamente.

Se evaluó la Demanda Química de Oxígeno (DQO) al inicio y al final del cultivo de las levaduras. Se logró una remoción de la carga de la vinaza enriquecida con sales del 66% y 67% para *R. mucilaginosa* y *R. glutinis* respectivamente, valores similares se obtuvieron para los ensayos control.

Conclusiones

A partir de estos resultados se podría concluir que la suplementación con FeCl₃ o MnCl₂ a la vinaza indujo cambios morfológicos en ambas levaduras oleaginosas, sin embargo no se vio reflejado el incremento en la producción de biomasa y lípidos obtenidos después de las fermentaciones. No se observó variación de remoción de la carga de la vinaza, frente al agregado de sales obteniéndose del 66% y 67% para *R. mucilaginosa* y *R. glutinis* respectivamente.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por FONCyT (PICT 2011-2158 y PICT 2015-2596), CONICET (PIP 339), CIUNSa Proyecto "A" N° 20/C237 y UNT (PIUNT E 548/3).

Referencias bibliográficas

- [1] Silva C. F.; Arcuri S. L.; Campos C. R.; Vilela D. M.; Alves J.; Schwam R. F. (2011). Using the residue of spirit production and bio-ethanol for protein production by yeasts. *Waste Management* 31; 108–114.
- [2] Scaroni E.; Martearena M. R.; Alfaro J. M.; Locatelli S. (2010). Bioconversión de vinaza a biomasa proteica mediante levaduras. *Revista Argentina de Microbiología Supl. 1 Vol. 42*: 222-223.
- [3] Cazetta M. L.; Pedrine M. A. (2005). Use of sugar cane molasses and vinasse for proteic and lipidic biomass production by yeast and bacteria. *Semina: Ciencias Exatas e Tecnológicas, Londrina*; Vol 26, N° 2:105-112.
- [4] Faife Pérez E.; Otero Rambla M. A.; Alvarez Delgado A. (2012). Producción de biodiesel a partir de microorganismos oleaginosos. Una fuente de energía renovable. Parte I. Levaduras y bacterias.
- [5] Alfaro J.M.; Reyes S.; Martearena M. R.; Blanco S; Baigorí M.; Pera L. (2017). Influence of metal ion on β-D-glucosidase and cell morphology of *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula mucilaginosa*. XII Congreso Argentino de Microbiología General.
- [6] Dai Ch.; Tao J.; Xie F.; Day Y.; Zhao M. (2007). Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of biotechnology* Vol. 6 (18): 2130-2134.

[7] Alfaro J. M.; Scaroni E. E.; Martearena M. R.; López F. & Locatelli S. (2011). Síntesis de triglicéridos de origen microbiano a partir de un residuo agroindustrial. XVIII Simposio Nacional de Química Orgánica.