



## Efecto de la concentración del inóculo y la melaza como suplemento de la vinaza de destilería para la producción de biomasa de *Candida utilis* nativa

### Effect of inoculum and molasses concentration as supplement to vinasse of distillery for the production of biomass of native *Candida utilis*

Lady Cajo<sup>1</sup>, Lizveth Nizama<sup>1</sup>, Carmen Carreño<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Fac. de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Av. Juan XXIII 391, Lambayeque, Perú.

Recibido 02 junio 2011; aceptado 19 junio 2011

#### Resumen

La vinaza es un residuo de las destilerías de alcohol, rico en materia orgánica y sales minerales, cuyo aprovechamiento está limitado y finalmente es vertido al alcantarillado, ocasionando contaminación, no obstante, puede constituir un sustrato para la producción de biomasa de levaduras, utilizadas en la alimentación animal. En la presente investigación se determinó el efecto de la concentración del inóculo y la melaza como suplemento de la vinaza, para la producción de biomasa de *Candida utilis* nativa. Las levaduras se aislaron de panca de *Zea mays* L. "maíz" en agar Sabouraud glucosado, identificando el 40.23 % como *C. utilis*. Luego, se cultivaron en vinaza con 30 g/L de melaza, a 28 °C, durante 24 horas, se pesó la biomasa y se seleccionó *C. utilis* MKJ12, debido a que alcanzó el mayor valor de 7.667 g/L. Esta levadura en concentraciones de 25, 50 y 75 mL/L de inóculo se cultivó en biorreactores tipo tanque, en lote discontinuo, conteniendo 300 mL de vinaza con 10, 30, y 50 g/L de melaza, con flujo de aire descendente (1vvm), y una incubación a 28 °C, durante 20 horas. Con 50 mL/L de inóculo y 50 g/L de melaza se determinó el menor tiempo de generación (2.88 h) y los mayores valores en el número de generaciones (6.95), tasa específica de crecimiento (0.35 h<sup>-1</sup>), peso de biomasa (11.78 g/L) y proteína (40.15 %). Se demostró la factibilidad de la producción de biomasa de *C. utilis* con 5 mL/L de inóculo en vinaza suplementada con melaza.

**Palabras clave:** *Candida utilis*, proteína, vinaza, melaza.

#### Abstract

Vinasse is a residue of alcohol distilleries, rich in mineral salts and organic matter, whose use is limited and finally it is poured to the sewage system, causing pollution, nevertheless, can constitute a substrate for the production of biomass yeasts, used in the animal feed. In the present investigation was determined the effect of the concentration of the inoculum and the molasses as supplement of the vinasse, for the production of biomass of native *Candida utilis*. Yeasts were isolated of leaves of *Zea mays* L. "maize" in Sabouraud glucosade agar, were identified 40.23 % as *C. utilis*. Next, were cultivated in vinasse with 30 g/L of molasses, to 28 °C, during 24 hours, the biomass was weighed and was selected *C. utilis* MKJ12, because it had the highest biomass value of 7.667 g/L. This yeast in concentration of 25, 50 and 75 mL/L of inoculum was cultivated in bioreactors Batch tank type containing 300 mL of vinasse with 10, 30, and 50 g/L of molasses, with downward air flow (1vvm), and incubation was 28 °C during 20 hours. With 50 mL/L of inoculum and 50 g/L of molasses was determined the shortest generation time (2.88 h) and the highest values in number of generations (6.95), specific rate of growth (0.35 h<sup>-1</sup>), weight of biomass (11.78 g/L) and percentage of protein (40.15 %). Feasibility was demonstrated of the production of *C. utilis* biomass with 5 mL of inoculum in vinasse supplemented by molasses.

**Keywords:** *Candida utilis*, protein, vinasse, molasses.

#### 1. Introducción

En el mundo existe escasez de proteína,

originada fundamentalmente por el crecimiento acelerado de la población.

\* Autor para correspondencia

Email: crcf1@hotmail.com (C. Carreño)

Los métodos convencionales para producir alimentos ricos en proteína no son suficientes para cubrir los requerimientos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el consumo diario de proteína en los países desarrollados es de 40 a 50 g por persona y en los países en vías de desarrollo de 5 a 10 g (FAO, 2008). Por consiguiente, la exploración de fuentes no convencionales, como la biomasa microbiana o unicelular, representa una alternativa para satisfacer las exigencias proteicas y aumentar la calidad de los alimentos consumidos.

El microorganismo que mayormente se utiliza en la producción de biomasa es la levadura *Candida utilis*, conocida como “torula”, que contiene entre 43 a 55 % de proteína (Serguera *et al.*, 2000). Presenta un perfil balanceado de aminoácidos, principalmente lisina (4.5 %), treonina (3.0 %), histidina (2.0 %) y arginina (4.9 %), así como un bajo porcentaje de los aminoácidos azufrados metionina (0.9 %) y cisteína (0.7 %), por lo que constituye un complemento de las dietas para animales (Lezcano, 2005; Gutierrez y Gómez, 2008). La biomasa de *C. utilis* es producida comercialmente en melaza y es una excelente fuente proteica, pero es muy costosa, debido a que se requieren 4 - 4.5 t de melaza por tonelada de levadura seca, por lo que desde el punto de vista económico la producción es desestimada (Serguera *et al.*, 2001). La vinaza es el residuo líquido que se genera al destilar el producto de la fermentación alcohólica de las mieles finales de caña. Presenta un olor fuerte, temperatura cercana a 98 °C, pH de 4.0, un contenido de sólidos totales mayor de 50 g/L y una elevada demanda bioquímica de oxígeno (DBO), que oscila entre 30 a 60 g/L. Estas características, así como el gran volumen, en una relación de 10 a 15 L de vinaza/L de alcohol obtenido, son causa de los efectos negativos en la fauna y flora ocasionados por la vinaza sin tratamiento previo, cuando es vertida a las corrientes de agua (Lezcano y Mora, 2005; Giraldo y López, 2008).

Debido a su riqueza en materia orgánica (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos) e inorgánica soluble, en la que predominan el potasio, calcio, azufre, magnesio y fósforo, la vinaza, con ciertas restricciones, puede ser utilizada como enmienda de suelo y fertilizante de cultivos agrícolas, alimento de animales o puede ser digerida en anaerobiosis para la obtención de biogás (Lezcano y Mora, 2005). También, puede constituir un sustrato para la producción de biomasa de *C. utilis*, no obstante, para incrementar la concentración celular, debe ser suplementada con melaza, que presenta en promedio 65 g/L de azúcares totales, además de vitaminas, magnesio, hierro, azufre y potasio, entre otros (Fajardo y Sarmiento, 2007).

En la región Lambayeque existen industrias productoras de azúcar y etanol, que generan subproductos como la melaza y vinaza, por lo que se realizó el presente estudio, cuyos objetivos fueron aislar e identificar *C. utilis* en panca de *Zea mays* L. “maíz”, seleccionar las levaduras nativas según la biomasa formada en vinaza con 30 g/L de melaza, así como determinar el efecto de la concentración del inóculo (25, 50 y 75 mL/L) y la melaza (10, 30 y 50 g/L), como suplemento de la vinaza de destilería, para la producción de biomasa de *C. utilis* nativa.

## 2. Materiales y métodos

### Diseño metodológico

El trabajo de investigación se ejecutó en dos fases. En la primera descriptiva, se realizó el aislamiento e identificación de *C. utilis*, así como la selección de las levaduras nativas según la biomasa formada, utilizando un diseño no experimental transeccional descriptivo (Hernández *et al.*, 2003). En la segunda fase, con una investigación explicativa se cuantificó la biomasa y proteína en base seca de *C. utilis* nativa, obtenida en cultivo discontinuo, por efecto de tres concentraciones de inóculo y melaza como suplemento de vinaza de destilería.

### **Muestreo y tratamiento de las muestras**

Se recolectaron 25 muestras de panca de maíz en unidades agropecuarias de la región Lambayeque, durante los meses de octubre de 2007 a enero de 2008. Las muestras (20 g) fueron transportadas para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Cada una de las pancas fue cortadas en secciones de aproximadamente 2 cm, del material obtenido se tomaron 10 g y se depositaron en bolsas plásticas de primer uso. En cada bolsa se vertieron 50 mL de solución salina (NaCl 0.87 %, p/v) estéril, el contenido fue homogenizado durante 10 minutos y del líquido sobrenadante se tomó una alícuota para el aislamiento respectivo (Escrura y Toro, 2007).

### **Obtención de cultivos puros de levaduras**

El aislamiento de levaduras fue realizado en agar Sabouraud glucosado más cloranfenicol (50 mg/L), siendo incubadas a 28 °C, durante 48 horas, en aerobiosis. Posteriormente, se seleccionaron las colonias blancas, cremosas, con bordes regulares, a las que se realizó una tinción simple con azul de metileno y cuando se observaron levaduras se cultivaron en tubos con agar Sabouraud glucosado, se incubaron a 28 °C, durante 24 horas y constituyeron los cultivos puros, que fueron mantenidos en refrigeración a 8 °C.

### **Identificación de *C. utilis***

Para identificar el género *Candida* se indujo la formación de pseudomicelio y blastosporas en agar harina de maíz y para la especie *C. utilis* se realizaron las pruebas de reducción de nitratos, así como la asimilación y fermentación de carbohidratos (Escrura y Toro, 2007).

### **Recolección y análisis de la vinaza y melaza**

En frascos de vidrio previamente esterilizados se recolectaron 25 L de vinaza, de la salida de la tubería de

descarga de la torre de destilación y 5 kg de melaza residual de una planta procesadora para la obtención de azúcar. En el laboratorio, se realizaron ensayos para la esterilización en autoclave (121 °C, 1 atmósfera de presión por 20 minutos), de la vinaza recolectada, que presentó 11 °Bx y debido a su elevada carga microbiana, se decidió diluirla con agua destilada hasta 5 °Bx.

A continuación, se midieron el pH, la densidad y los grados Brix, así como el porcentaje de azúcares reductores (AR) por el método de Lane y Eynon (INDECOPI, 2008) y el porcentaje de proteína por el método de Kjeldahl (Gutierrez y Gómez, 2008).

Según los resultados obtenidos, la vinaza diluida presentó un pH de 4.6, una densidad de 0.98 g/mL, con 5 °Bx, 0.65 % de AR y 0.98 % de proteína. A su vez, la melaza presentó un pH de 5.6, una densidad de 1.25 g/mL, con 89.16 °Bx, 52.55 % de AR y 10.0 % de proteína.

### **Preparación del sustrato vinaza con tres concentraciones de melaza**

Para la selección de las levaduras nativas, según la biomasa, se prepararon 6 L de vinaza suplementada con 30 g/L de melaza. También se utilizaron 6 L de vinaza, en donde al igual que en la vinaza con melaza se agregaron 1 y 0.5 g/L de sulfato de amonio y fosfato de potasio, respectivamente (León, 2005; Gualtieri *et al.*, 2007), el pH se ajustó a 5.0 (Fajardo y Sarmiento, 2007) y se esterilizó en autoclave 121 °C y 1 atmósfera de presión, durante 20 minutos. Para la producción de biomasa con una levadura nativa seleccionada se prepararon 10.5 L de vinaza con 10, 30 y 50 g/L de melaza, se determinó el porcentaje de azúcares reductores, se distribuyeron en biorreactores de 1L de capacidad y posteriormente se esterilizaron a 121 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

### **Selección de *C. utilis* nativas**

Cada levadura fue cultivada en agar Sabouraud glucosado a 28 °C durante 24

horas y con la biomasa desarrollada se obtuvo una suspensión con solución salina (0.87 %, p/v) estéril, cuya concentración fue estandarizada a  $10^7$  células/mL, mediante la técnica de conteo en cámara de Neubauer (Díaz *et al.*, 2003). Posteriormente, se tomó 1 mL de cada una de las suspensiones y se inoculó por triplicado en matraces con 50 mL de vinaza y 50 mL de vinaza - 30 g/L de melaza. Todos los matraces fueron incubados a 28 °C, en agitación constante (150 rpm), durante 24 horas. Después, el contenido de cada matraz fue centrifugado a 2500 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante fue eliminado y el sedimento fue deshidratado en la estufa a 70 °C, hasta alcanzar peso constante (Gómez, 2007). Se seleccionó *C. utilis* MKJ12, debido a que alcanzó el mayor peso de biomasa seca.

#### **Acondicionamiento de biorreactores tipo tanque con aireación**

Los biorreactores tipo tanque, con flujo de aire descendente, y en número de 30 estuvieron constituidos por frascos de vidrio de 1L de capacidad, cuyo extremo superior estuvo cubierto por una tapa de goma que presentó tres orificios. A través del primero de ellos ingresó una cánula de plástico taponada en su extremo superior con algodón, para permitir la salida de gases. A través del segundo orificio ingresó un difusor de aire (volumen /volumen /minuto, vvm), generado por una bomba Elite 803 de 4.0 watts y esterilizado por un sistema de burbujeo en solución de cloruro de sodio al 20 % y a través del tercer orificio ingresó una cánula de plástico para la toma de muestra.

Los frascos de vidrio fueron esterilizados en el horno (180 °C x 2 h) y el material de plástico y goma fueron remojados en hipoclorito de sodio 2 % durante 24 horas y posteriormente fueron irradiados con luz ultravioleta durante 30 minutos.

#### **Obtención del inóculo**

*C. utilis* MKJ12 fue cultivada en tubos con agar Sabouraud glucosado, a 28 °C,

durante 24 horas. Con las colonias desarrolladas se obtuvo una suspensión en solución salina (0.87 %, p/v) estéril, se estandarizó a  $10^7$  células/mL y se inoculó 1 mL en matraces con 10 mL de vinaza con 10, 30 y 50 g/L de melaza. Después de una incubación a 28 °C por 24 horas, cada uno de estos cultivos en las concentraciones de 25, 50 y 75 mL/L, fueron inoculados en matraces con vinaza suplementada con 10, 30 y 50 g/L de melaza, siendo incubados a 28 °C por 20 horas.

#### **Tiempo óptimo de incubación de *C. utilis* MJK12**

Cada una de las tres concentraciones de inóculo de *C. utilis* MKJ12 se cultivaron en nueve biorreactores conteniendo vinaza con 10, 30 y 50 g/L de melaza, hasta completar 300 mL de volumen de trabajo y se incubaron a 28 °C durante 24 horas. Desde el momento de la inoculación y cada 2 horas se tomaron muestras de 0.5 mL para realizar el conteo de células, determinándose el tiempo requerido para alcanzar el mayor valor en la concentración celular o tiempo óptimo de incubación, que fue de 20 horas.

#### **Producción de biomasa**

El cultivo de *C. utilis* MJK12 se llevó a cabo en 27 biorreactores, con un volumen de trabajo de 300 mL y una incubación a 28 °C, durante 20 horas. Adicionalmente, se incluyeron tres biorreactores no inoculados, como testigos de cada una de las concentraciones de melaza. Terminado el bioproceso, los caldos fermentativos se centrifugaron a 2500 rpm por 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó tres veces con solución salina (0.87 %, p/v), estéril obteniéndose la crema de levadura que fue depositada en bases de placas de Petri, de peso conocido y fue llevada a estufa a 70 °C, hasta tener un peso constante.

#### **Diseño experimental y análisis estadístico**

El estudio fue conducido en un diseño completamente aleatorio (DCA), con arreglo factorial 3x3, para la evaluación de

tres concentraciones de inóculo y melaza, correspondientes a nueve tratamientos con tres repeticiones cada uno, constituyendo 27 unidades experimentales. Se realizó el análisis de varianza (ANAVA) para determinar las diferencias entre los tratamientos y la prueba múltiple de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para comparar las medias entre ellos (Hernández *et al.*, 2003). Se utilizó el software estadístico SPSS versión 15.0.

### 3. Resultados y discusión

El 100 % de las muestras de panca de maíz fue positivo para el aislamiento de levaduras, obteniéndose 87 cultivos puros, de los que 40.23 % (35) fue identificado como *C. utilis*, coincidiendo con Escurra y Toro (2007), quienes reportaron una frecuencia de 38.71 %. Esta levadura está ampliamente distribuida en la naturaleza, es aerobia facultativa y crece entre 20 a 37 °C, frecuentemente en forma de polvillo blanco sobre las hojas y frutos (Petrenko, 2005). Puede ser aislada de forrajes, como la panca de maíz, constituidos por las partes vegetativas de gramíneas y leguminosas que tienen alto contenido nutricional, por lo que son usados en la alimentación animal, especialmente en la dieta de vacas en producción (González *et al.*, 2005). Los 35 cultivos de *C. utilis* se desarrollaron en vinaza, alcanzando valores de biomasa comprendidos entre 0.1 y 1.02 g/L, coincidiendo con Serguera *et al.* (2001) y Díaz *et al.* (2003), quienes también cultivaron *C. utilis* en vinaza. Este efluente de las destilerías es rico en materia orgánica como azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos, así como en potasio, fósforo, azufre, magnesio y calcio, entre otros (Lezcano y Mora, 2005), que son nutrientes para las levaduras. En la producción de biomasa microbiana, la vinaza, al igual que otros residuos agroindustriales como el bagazo y bagacillo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”, así como el descarte de la pulpa de *Coffea arabica* L. “café”, pueden constituir sustratos alternativos

para disminuir los costos de producción; sin embargo, previamente deben ser enriquecidos con fuentes de carbono o de nitrógeno, para incrementar el crecimiento celular (Ferrer *et al.*, 2004; Gualtieri *et al.*, 2007; Gutierrez y Gómez 2008). De esta manera, cuando la vinaza fue suplementada con 30 g/L de melaza, los valores de la biomasa de *C. utilis* oscilaron entre 1.5 a 7.667 g/L y según la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) *C. utilis* MKJ12 alcanzó el mayor valor, diferenciándose significativamente de las demás levaduras nativas. *C. utilis* MKJ12 cultivada en vinaza con tres concentraciones de inóculo y melaza, alcanzó los mayores valores en el número de células, después de 20 horas, en todos los tratamientos (Tabla 1), por lo que éste fue considerado como el tiempo adecuado para obtener biomasa, coincidiendo con Serguera *et al.* (2001), quienes determinaron que *C. utilis* Y-660 cultivada en vinaza con melaza presentó una etapa de latencia de 5 horas y la etapa de crecimiento exponencial culminó entre las 20 y 24 horas. Según la cinética de crecimiento, con 50 mL/L de inóculo y 50 g/L de melaza se alcanzó la mayor concentración de *C. utilis* MJK12, con  $4.2 \times 10^8$  células/mL, superior a  $2.2 \times 10^8$  células/mL, obtenido por Díaz *et al.* (2003) en vinaza con 1 g/L de una mezcla de nutrientes constituida por sulfato de amonio, urea y extracto de malta. También, se determinó (Tabla 2) el menor tiempo de generación (2.88 h), así como el mayor número de generaciones (6.95) y tasa específica de crecimiento ( $0.35 \text{ h}^{-1}$ ). El peso de la biomasa obtenida osciló entre 4.973 y 11.781 g/L (Tabla 3). A su vez, el % de proteína de la biomasa osciló entre 9.725 y 40.153 % (Tabla 4) y según la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), tanto en biomasa como en proteína, se alcanzaron mayores valores con 50 mL/L de inóculo (50 g/L de melaza) no diferenciándose estadísticamente de 75 mL/L de inóculo (50 g/L de melaza), pero sí de los demás tratamientos.

**Tabla 1**

Número de células de *C. utilis* MKJ12 obtenidas con tres concentraciones de inóculo y melaza como suplemento de la vinaza de destilería.

| Tiempo<br>(h) | Melaza (g/L)      |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|               | 10                |                   |                   | 30                |                   |                   | 50                |                   |                   |
|               | Inóculo (mL/L)    |                   |                   | Inóculo (mL/L)    |                   |                   | Inóculo (mL/L)    |                   |                   |
|               | 25                | 50                | 75                | 25                | 50                | 75                | 25                | 50                | 75                |
| 0             | $2.2 \times 10^6$ | $3.5 \times 10^6$ | $4.1 \times 10^6$ | $2.1 \times 10^6$ | $3.6 \times 10^6$ | $4.0 \times 10^6$ | $2.3 \times 10^6$ | $3.4 \times 10^6$ | $4.2 \times 10^6$ |
| 2             | $3.9 \times 10^6$ | $4.2 \times 10^6$ | $5.6 \times 10^7$ | $3.7 \times 10^6$ | $4.2 \times 10^6$ | $5.2 \times 10^6$ | $3.5 \times 10^6$ | $4.5 \times 10^6$ | $5.7 \times 10^6$ |
| 4             | $6.3 \times 10^6$ | $5.4 \times 10^6$ | $7.9 \times 10^7$ | $6.0 \times 10^6$ | $5.8 \times 10^6$ | $7.0 \times 10^6$ | $5.7 \times 10^6$ | $5.6 \times 10^6$ | $7.3 \times 10^6$ |
| 6             | $9.2 \times 10^6$ | $8.7 \times 10^6$ | $9.0 \times 10^6$ | $8.9 \times 10^6$ | $7.9 \times 10^6$ | $2.2 \times 10^6$ | $1.4 \times 10^7$ | $7.2 \times 10^6$ | $2.8 \times 10^7$ |
| 8             | $2.1 \times 10^7$ | $2.1 \times 10^7$ | $2.3 \times 10^7$ | $2.0 \times 10^7$ | $9.6 \times 10^6$ | $5.0 \times 10^6$ | $4.7 \times 10^7$ | $2.5 \times 10^7$ | $5.2 \times 10^7$ |
| 10            | $3.9 \times 10^7$ | $5.4 \times 10^7$ | $3.7 \times 10^7$ | $3.6 \times 10^7$ | $2.1 \times 10^7$ | $8.4 \times 10^7$ | $7.6 \times 10^7$ | $6.3 \times 10^7$ | $8.7 \times 10^7$ |
| 12            | $5.1 \times 10^7$ | $8.1 \times 10^7$ | $5.0 \times 10^7$ | $4.9 \times 10^7$ | $5.4 \times 10^7$ | $5.2 \times 10^7$ | $9.6 \times 10^7$ | $9.2 \times 10^7$ | $9.9 \times 10^7$ |
| 14            | $7.5 \times 10^7$ | $9.1 \times 10^7$ | $7.2 \times 10^7$ | $7.3 \times 10^7$ | $8.8 \times 10^7$ | $8.7 \times 10^7$ | $1.1 \times 10^8$ | $2.0 \times 10^8$ | $1.6 \times 10^8$ |
| 16            | $8.7 \times 10^7$ | $1.5 \times 10^8$ | $8.6 \times 10^7$ | $8.7 \times 10^7$ | $1.3 \times 10^8$ | $9.5 \times 10^7$ | $1.8 \times 10^8$ | $2.9 \times 10^8$ | $2 \times 10^8$   |
| 18            | $9.2 \times 10^7$ | $2.0 \times 10^8$ | $9.8 \times 10^7$ | $9.8 \times 10^7$ | $3.1 \times 10^6$ | $1.6 \times 10^8$ | $2.0 \times 10^8$ | $3.8 \times 10^8$ | $2.6 \times 10^8$ |
| 20            | $9.5 \times 10^7$ | $2.2 \times 10^8$ | $1.1 \times 10^8$ | $1.2 \times 10^8$ | $3.4 \times 10^8$ | $1.9 \times 10^8$ | $2.2 \times 10^8$ | $4.2 \times 10^8$ | $2.8 \times 10^8$ |
| 22            | $9.5 \times 10^7$ | $2.1 \times 10^8$ | $1.1 \times 10^8$ | $1.1 \times 10^8$ | $3.4 \times 10^8$ | $1.8 \times 10^8$ | $2.1 \times 10^8$ | $4.2 \times 10^8$ | $2.8 \times 10^8$ |
| 24            | $9.4 \times 10^7$ | $1.9 \times 10^8$ | $9.8 \times 10^7$ | $1.0 \times 10^8$ | $3.3 \times 10^8$ | $1.7 \times 10^8$ | $2.1 \times 10^8$ | $4.1 \times 10^8$ | $2.7 \times 10^8$ |

La biomasa de *C. utilis* y el contenido de proteína se incrementaron por efecto de la concentración de inóculo y melaza como suplemento de la vinaza. En lo que respecta a la melaza, se coincide con León (2005), quien encontró que la biomasa de

*C. utilis* aumentó progresivamente desde 0.127 hasta 10.25 g/L, conforme se incrementaron los azúcares reductores de la melaza, desde 1 hasta 35 %.

**Tabla 2**

Parámetros de crecimiento de *C. utilis* MKJ12 con tres concentraciones de inóculo y melaza como suplemento de vinaza de destilería.

| Inóculo - Melaza<br>(mL/L - g/L) | N <sub>0</sub>    | N <sub>f</sub>    | n    | g<br>(h) | u<br>(h <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|------|----------|-------------------------|
| 25 - 10                          | $2.2 \times 10^6$ | $9.5 \times 10^7$ | 5.43 | 3.68     | 0.27                    |
| 50 - 10                          | $3.5 \times 10^6$ | $2.2 \times 10^8$ | 5.97 | 3.35     | 0.30                    |
| 75 - 10                          | $4.1 \times 10^6$ | $1.1 \times 10^8$ | 4.75 | 4.21     | 0.24                    |
| 25 - 30                          | $2.1 \times 10^6$ | $1.2 \times 10^8$ | 5.84 | 3.42     | 0.29                    |
| 50 - 30                          | $3.6 \times 10^6$ | $3.4 \times 10^8$ | 6.56 | 3.05     | 0.33                    |
| 75 - 30                          | $4.0 \times 10^6$ | $1.9 \times 10^8$ | 5.57 | 3.59     | 0.29                    |
| 25 - 50                          | $2.3 \times 10^6$ | $2.2 \times 10^8$ | 6.58 | 3.58     | 0.28                    |
| 50 - 50                          | $3.4 \times 10^6$ | $4.2 \times 10^8$ | 6.95 | 2.88     | 0.35                    |
| 75 - 50                          | $4.2 \times 10^6$ | $2.8 \times 10^8$ | 6.06 | 3.30     | 0.30                    |

**Tabla 3**

Prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para el peso de la biomasa de *C. utilis* MKJ12.

| Inóculo - Melaza<br>(mL/L - g/L) | Peso biomasa<br>(g/L) | Significancia |
|----------------------------------|-----------------------|---------------|
| 50 - 50                          | 11.781                | a             |
| 75 - 50                          | 11.616                | a             |
| 25 - 50                          | 10.431                | b             |
| 75 - 10                          | 7.889                 | c             |
| 75 - 30                          | 7.885                 | c             |
| 50 - 30                          | 6.787                 | d             |
| 50 - 10                          | 6.240                 | d             |
| 25 - 10                          | 5.277                 | e             |
| 25 - 30                          | 4.973                 | e             |

**Tabla 4**

Prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para el porcentaje de proteína de *C. utilis* MJK12.

| Inóculo - Melaza<br>(mL/L - g/L) | Proteína<br>(%) | Significancia |
|----------------------------------|-----------------|---------------|
| 50 - 50                          | 40.153          | a             |
| 75 - 50                          | 39.861          | a             |
| 25 - 50                          | 26.153          | b             |
| 75 - 30                          | 19.350          | c             |
| 75 - 10                          | 18.805          | cd            |
| 50 - 30                          | 16.180          | d             |
| 50 - 10                          | 15.850          | d             |
| 25 - 10                          | 12.680          | e             |
| 25 - 30                          | 9.725           | e             |

Los mayores valores de biomasa y proteína de *C. utilis* MKJ12 se alcanzaron con 50 g/L de melaza. Por el contrario, Serguera *et al.* (2001), determinaron que en la vinaza con una concentración de melaza igual o menor a 100 g/L, el número de células de *C. utilis* no se diferenció del obtenido con la vinaza no suplementada, encontrando los mayores valores con 200 y 300 g/L de melaza, sin diferencias estadísticas entre ellos; sin embargo, estos investigadores trabajaron con melaza a 20 °Bx, en contraste con la melaza a 89.16 °Bx utilizada en el presente estudio, que correspondió a más de cuatro veces el contenido de sacarosa, que puede ser metabolizada por *C. utilis* para la formación de biomasa.

Con 50 mL/L de inóculo y 50 g/L de melaza se obtuvo el mayor peso de biomasa (11.781 g/L), superior a los obtenidos por Ferrer *et al.* (2004) y León (2005) con 9.45 g/L y 10.25 g/L respectivamente. Asimismo, se obtuvo el mayor porcentaje de proteína, correspondiente a 40.153, cercano a los valores obtenidos por Díaz *et al.* (2003) y Gualtieri *et al.* (2007), con 37.78 y 43 % de proteína en biomasa de *C. utilis* cultivada en melaza y residuos de café, respectivamente. A su vez, es inferior a 49.99 %, obtenido por Gómez (2007) en vinaza con 200 g/L de melaza. En cuanto al porcentaje de conversión de sustrato fue de 38.1 % (Tabla 5), cercano al obtenido por Gómez (2007), quien determinó 40 % en vinaza con 200 g/L de melaza. La biomasa obtenida presentó 40.15 % de proteína, más de  $10^5$  UFC de levaduras/g y estuvo exenta de aerobios mesófilos, mohos y coliformes totales (Tabla 6), por lo que coincidiendo con Serguera *et al.* (2001), se concluye que la producción de levadura forrajera *C. utilis* en el sustrato vinaza con melaza constituye una alternativa rentable, mediante la cual se disminuye la carga contaminante de la vinaza, y se aprovecha con el costo mínimo, la melaza como fuente de carbono.

**Tabla 5**

Cinética de la producción de biomasa de *C. utilis* MKJ12 con 50 mL de inóculo y 50 g/L de melaza como suplemento de vinaza de destilería.

| Parámetros   | Valores |
|--|---------|
| Azúcares reductores iniciales (g/L)                        | 39.0    |
| Azúcares reductores consumidos (g/L)                       | 30.9    |
| Azúcares reductores consumidos (%)                         | 79.231  |
| Rendimiento volumétrico (g/L)                              | 11.781  |
| Coefficiente de rendimiento, $Y_{x/s}$ (gg <sup>-1</sup> ) | 0.381   |
| Porcentaje de conversión (%)                               | 38.1    |
| Productividad (g/Lh)                                       | 0.589   |

**Tabla 6**

Caracterización de la biomasa de *C. utilis* MJK12 obtenida con 50 mL/L de inóculo y 50 g/L de melaza como suplemento de vinaza de destilería.

| Características            | Vinaza con 50 g/L de melaza no inoculada | Biomasa de <i>C. utilis</i> MKJ12 |
|----------------------------|--|-----------------------------------|
| Proteína (%)               | 9.625                                    | 40.153                            |
| Humedad (%)                | 83.05                                    | 9.20                              |
| Cenizas (%)                | 4.33                                     | 20.67                             |
| Extracto seco (%)          | 16.95                                    | 90.80                             |
| Aerobios mesófilos (UFC/g) | $>10^3$                                  | 0                                 |
| Mohos (UFC/g)              | $>10^3$                                  | 0                                 |
| Levaduras (UFC/g)          | $>10^3$                                  | $>10^5$                           |
| Coliformes totales (NMP/g) | $<10^2$                                  | 0                                 |

#### 4. Conclusiones

Según los resultados es posible aislar *C. utilis* de panca de maíz. La melaza de caña de azúcar (30 g/L) como suplemento de la vinaza de destilería incrementó la biomasa de las levaduras nativas, alcanzándose 7.667 g/L de biomasa con *C. utilis* MJK12. Las concentraciones 50 mL/L de inóculo y 50 g/L de melaza resultaron las más adecuadas para la producción de biomasa y proteína de *C. utilis* nativa, en biorreactores con vinaza en sistema discontinuo, con aireación durante 20 horas, obteniéndose 11.78 g/L y 40.15 % de proteína, respectivamente.

#### Referencias

- Díaz, M.; Semprúm, A.; Gualtieri, M. 2003. Producción de proteína unicelular a partir de desechos de vinaza. Revista de la Facultad de Farmacia 45(2): 18-35.

- Escurra, J.; Toro, K. 2007. Concentración óptima de sulfato de amonio en el enriquecimiento de vainas de algarrobo (*Prosopis pallida*) con cepa nativa de *Candida utilis*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.
- Fajardo, E.; Sarmiento, S. 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- FAO - Food Agriculture Organization. 2008. Situación alimentaria mundial 2006. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>.
- Ferrer, J.; Davadillo, R.; Chlander, C.; Páez, G.; Mármol, Z.; Ramones, E. 2004. Producción de proteína microbiana a partir de los desechos del procesamiento de la caña de azúcar (bagacillo). Archivo Latinoamericano de Producción Animal 12(2): 28 - 35.
- Giraldo, M.; López, P. 2008. Producción de proteína unicelular a partir de desechos agroindustriales. Revista VIRTUALPRO 82:1-18.
- Gómez, R. 2007. Complementación de las vinazas de destilería para su utilización más eficiente en la producción de levadura forrajera. Revista ICIDCA 21(3): 49-52.
- González, F.; Peña, A.; Núñez, G.; Jiménez, C. 2005. Efecto de la densidad y altura de corte en el rendimiento y calidad del forraje de maíz. Revista Fitotécnica Mexicana 28 (4):393-397.
- Gualtieri, M.; Villalta, C.; Medina, G.; Lapenna, E.; Rondon, M. 2007. Producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* usando residuos de pulpa de *Coffea arabica* L. Revista INHRR 38(2): 31-37.
- Gutierrez, R.; Gómez, A. 2008. Determinación de proteína total de *Candida utilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en bagazo de caña. Revista Lasallista de Investigación 5(1):61-64.
- Hernández, R.; Fernández, C.; Baptista, P. 2003. Metodología de la Investigación. Mc Graw. Hill Interamericana Editores S.A. México.
- INDECOPI - Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual. 2008. Determinación de azúcares reductores en la melaza de caña y en algunos jarabes refinados, por medio del procedimiento Lane y Eynon a volumen constante. Norma Técnica Peruana 207.059. Lima, Perú.
- León, C. 2005. Influencia de la concentración de melaza de *S. officinarum* L. (caña de azúcar) en la producción de proteína unicelular de *Candida utilis* var. *Major*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Lezcano, P. 2005. Desarrollo de una fuente de proteína en Cuba. Levadura torula (*Candida utilis*). Revista Cubana de Ciencia Agrícola 39:459-463.
- Lezcano, P.; Mora, L. 2005. Las vinazas de destilería de alcohol. VIII Encuentro de Nutrición y Producción de Animales Monogástricos. Noviembre, 2005. Cuba.
- Petrenko, O. 2005. Estudio de algunas características de las cepas de levaduras y de su rendimiento celular utilizando un medio de cultivo a base de suero lácteo. Tesis de Licenciatura. Universidad de Belgrano, Buenos Aires, Argentina.
- Serguera, M.; Rodríguez, Y.; Gómez, A.; Suárez, W. 2000. 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(3):63-68.
- Serguera, M.; Consuegra, Y.; Pedroza, C.; Rodríguez, Y. 2001. Determinación de la composición óptima de la mezcla mosto-miel para el crecimiento de la levadura *Torula*. Tecnología Química 21(3): 89-93.