



Evaluación de diferentes concentraciones de etanol rectificado en la producción del “bioaroma” acetato de etilo y proteína unicelular por *Candida utilis* var. *major* C.E.C.T. 1430

Evaluation of different concentrations of rectified ethanol in the production of the “Bioaroma” ethyl acetate and single cell protein from *Candida utilis* var. *major* C.E.C.T. 1430

Carlos León Torres^{1,*}, Julio Arellano Barragán¹, Carlos Nomberto Rodríguez¹, Cecilia Bardales Vásquez², José Mostacero León³, Guillermo Linares Luján⁴

¹ Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

² Ciencias de la Salud, Universidad Privada Antenor Orrego, Av. América Sur 3145 Monserrate, Trujillo, Perú.

³ Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

⁴ Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

Recibido 04 noviembre 2010; aceptado 17 diciembre 2010

Resumen

El trabajo tuvo como objetivo evaluar diferentes concentraciones de etanol rectificado en la producción del “bioaroma” acetato de etilo y proteína unicelular por *Candida utilis* var. *major*. Se construyó un biorreactor de 16 cm de altura tipo tanque agitado con turbina Rushton. La preparación del inóculo fue realizada a partir de la cepa *Candida utilis* var. *major* C.E.C.T. 1430. El medio de cultivo fue formulado a partir de diluciones de etanol rectificado desde 10 hasta 35 g/L en intervalos de cada 5 unidades. El bioproceso se llevó a cabo a 25 °C, pH de 4.5 – 5.5 y durante 60 horas. Se encontró que la biomasa y la productividad aumentan progresivamente, de 4.82 a 7.90 g/L y de 0.082 a 0.108 g/L-h respectivamente. Así mismo se determinó que a medida que aumenta la concentración (g/L) de etanol rectificado, la producción y la productividad disminuyen. El rendimiento de acetato de etilo, fue máximo a la concentración de 15 g/L de etanol rectificado (5.7%) y mínimo a 35 g/L y (1.97%) respectivamente. Se concluye que el incremento de la concentración de etanol rectificado no influye aumentando la producción y rendimiento del “bioaroma” acetato de etilo y de la proteína unicelular de *Candida utilis* var. *major*.

Palabras clave: Bioaroma, Acetato de etilo, Proteína Unicelular, *Candida utilis*.

Abstract

The present research was carried out with the purpose to evaluate the different concentrations of rectified ethanol in the production of “bioaroma” ethyl acetate and single cell protein from *Candida utilis* var. *major* for it a stirred – tank reactor of 16 cm of height with turbine Rushton was built. The preparation of the inoculum was carried out starting from *Candida utilis* var. *major* C.E.C.T. 1430. The broth of culture was formulated starting from rectified ethanol dilutions from 10 to 35 g/L each 5 units. The bioprocess was carried out at 25°C to pH 4.5 – 5.5 and during a time of 60 hours. It was found that the biomass productivity increase progressively from 4.82 to 7.90 g/L and from 0.082 a 0.108 g/L-h) respectively. Such as increase the rectified ethanol concentration (g/L) the production and the yield was down. The yield acetate ethyl was top to concentrations of 15 g/L of rectified ethanol (5.7%) and smallest to concentrations of 35 (g/L) of rectified ethanol (1.97%). Finally, the increase of rectified ethanol concentrations does not influence increasing the production of acetate ethyl and the single cell protein *Candida utilis* var. *major*.

Keywords: Bioaroma, ethyl acetate, single cell protein, *Candida Utilis*.

* Autor para correspondencia

E-mail: cartaviolabs@hotmail.com (C. León)

1. Introducción

Una de las más prometedoras vías para incrementar la disponibilidad de proteínas en el mundo es la producción de proteínas microbianas o unicelulares mediante fermentación de residuos industriales y agrícolas (Scragg, 1996). Las especies que han demostrado mayor productividad industrial son *S. cerevisiae* y *C. utilis*; sin embargo la que mayormente se utiliza en la producción de proteína unicelular es *C. utilis* conocida como “torula” y cuya composición química es aproximadamente 9.0% de nitrógeno, 55% de proteína, 7% de grasas, 5% de fibra y 8% de cenizas, además contiene elevada cantidad de lisina y vitaminas de complejo B (Marchand, 1997; Farmland Industries, 1999).

El etanol es un sustrato relativamente costoso, por ello en los últimos años se han dado diversas propuestas para obtener por acción de *C. utilis* productos derivados del mismo, tales como los denominados bioaromas, lo cual hace más rentable el proceso.

Los bioaromas son una importante alternativa tecnológica en la bioconversión del etanol, para darle un mayor valor agregado en acetato de etilo por *C. utilis* (Domenech *et al.*, 1995). La bioconversión del etanol a acetato de etilo por *C. utilis* es una importante alternativa biotecnológica para darle mayor valor agregado al proceso. Estudios realizados muestran una producción de 0.80 g de acetato de etilo/L usando etanol rectificado como sustrato a una concentración de 32 g/L (Domenech *et al.*, 2002), también presentan una producción de 0.44g de acetato de etilo a partir de una concentración de 22.43g de etanol rectificado por litro (Vejarano, 2005). Así, *C. utilis* es la vía más prometedora en la producción de acetato de etilo (Lee, 2000), en donde se debe poner especial énfasis en los efectos que tiene la concentración del sustrato etanol rectificado sobre los rendimientos finales. Este factor es un punto crítico a tener en cuenta al inicio del proceso (Domenech *et al.*, 1995).

2. Materiales y métodos

Material biológico y reactivos

Se utilizó cepa liofilizada de *Candida utilis* var. *major* C.E.C.T 1430, adquirida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) Valencia, España. También se utilizó etanol rectificado grado comercial y etanol absoluto grado reactivo pa. Merck.

Biorreactores

Se emplearon 7 biorreactores tipo tanque agitado y aireado de 1 L de capacidad; con 16 cm de altura, 10 cm de diámetro y 10 cm de base y se les adaptó una tapa a presión de jebe Microporoso de 2 pulgadas de grosor (León, 2005).

Sustrato y cepa

Al etanol rectificado no se le practicó ningún tratamiento previo; este fue agregado a los biorreactores junto con los nutrientes disueltos en agua destilada previamente autoclavada, hasta conseguir las diluciones siguientes: 10, 15, 20, 25, 30, y 35 % (g/L) (Vejarano, 2005). A estos caldos de cultivo se les adicionó 0.7 g de sulfato de amonio como fuente nitrogenada (Bailón, 2001). Además se contó con un biorreactor a 30 g/L de alcohol absoluto, como testigo del bioproceso. La cepa se reactivó según Bailón (2001) en caldo sabouraud y medio de mantenimiento (Difco Manual, 1985).

Preparación del inóculo

A partir de la cepa de *C. utilis* var. *major* mantenida en refrigeración, se realizó un sembrado en el medio de mantenimiento y se incubó por 48 horas a temperatura ambiente (Marchand, 1997). Del desarrollo de este cultivo se hizo un traspaso al medio de propagación, compuesto por Caldo Sabouraud – Oxitetraciclina (Difco Manual, 1985) el cual se mantuvo a temperatura ambiente durante 48 horas. La pureza del cultivo se verificó por observación microscópica. El inóculo constó de un

volumen de microbio (3×10^7 cel/mL) al 10% del volumen de trabajo del biorreactor (Gómez, 1999).

Producción de biomasa y bioaroma

En cada biorreactor se adicionó 630 mL del caldo de cultivo a las concentraciones de estudio (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 g/L de etanol), la fuente nitrogenada (sulfato de amonio, al 1%) y 70 mL del inóculo previamente preparado.

El Bioproceso se realizó a un pH de 4 – 5.5 a la temperatura de 25 °C por un tiempo de 60 horas (Vejarano, 2005). Además se realizó un ensayo control (630 mL de caldo fermentativo conteniendo 30 g/L de alcohol absoluto y 70 mL de inóculo), todo este proceso se repitió 2 veces (Torres, 1997).

Cuantificación de la proteína unicelular

La producción de proteína unicelular por *C. utilis* var. *major*, C.E.C.T. 1430 se realizó durante 60 horas (Vejarano, 2005). Transcurrido dicho tiempo, se centrifugaron los caldos fermentativos a 3000 g durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó 3 veces con agua destilada estéril, los sedimentos fueron colocados en placas petri de peso conocido y llevados a estufa a 70°C hasta peso constante, las cuales luego fueron pesadas con la finalidad de obtener el peso seco de la biomasa (Gómez, 1999).

Cuantificación del Acetato de etilo

El líquido sobrenadante se utilizó para cuantificar el acetato de etilo (g/L) de acuerdo a lo estipulado por (Vegas y Castro, 2002).

Determinación del rendimiento

Para el rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) se utilizó la siguiente expresión (Herbert, 1999):

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - Y_o}{S_o - S_f}$$

Donde X_o : Biomasa inicial (g/L); X_f : Biomasa final (g/L); S_o : Sustrato inicial (g/L); y S_f : Sustrato final (g/L).

Para el rendimiento del acetato de etilo ($Y_{p/s}$) (Herbert, 1999):

$$Y_{p/s} = \frac{P_f - P_o}{S_o - S_f}$$

Donde P_o : Producto inicial (g/L); P_f : Producto final (g/L); S_o : Sustrato inicial (g/L); y S_f : Sustrato final (g/L).

Para el cálculo de la productividad (P) se utilizaron las siguientes expresiones (Herbert, 1999):

$$P = \frac{X}{t} \quad \text{y} \quad P = \frac{p}{t}$$

Donde P : Productividad del sistema (g/L.h); X : Biomasa neta producida (g/L); p : Producto neto formado (g/L) y t : Tiempo del bioproceso (h).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las variables biomasa, acetato de etilo, rendimiento y productividad fueron evaluados mediante la estimación de medidas de tendencia central y dispersión, ANVA y comparación de medidas según el método “t” (Freese, 1988).

3. Resultados y discusión

En la tabla 1, se presentan los resultados promedio de la producción de proteína unicelular y del “bioaroma” acetato de etilo en (g/L) respectivamente; así mismo sus indicadores de rendimiento y productividad dentro del sistema; donde se resalta que el consumo de la fuente de sustrato etanol rectificado va desde 10 hasta 16.67 (g/L) además se indica también que la proteína unicelular neta producida va desde 4.82 hasta 7.90 (g/L) y en la que sobresale la concentración de 15 g/L de sustrato etanol rectificado. Además se observa que la producción de acetato de etilo va desde 0.27 hasta 0.74 g/L, en la que destaca la concentración de 15 g/L de sustrato.

Tabla 1

Valores promedio de la producción, aprovechamiento, rendimiento y productividad del bioproceso.

Concentraciones de sustrato			Biomasa				Bioaroma (Acetato de etilo)			
S_o (g/L)	S_f (g/L)	S_c (g/L)	X (g/L)	A (%)	$Y_{x/s}$ (%)	P_x (g/L.h)	AE (g/L)	A (%)	$Y_{AE/s}$ (%)	P_{AE} (g/L.h)
10	0.00	10.00	5.80	58.00	58.00	0.098	0.42	4.17	4.17	0.007
15	0.70	4.30	7.90	52.61	55.11	0.104	0.74	4.93	5.17	0.013
20	3.70	16.30	5.96	29.80	36.80	0.099	0.54	2.72	3.33	0.009
25	8.33	16.67	5.74	22.96	34.44	0.097	0.44	1.76	2.64	0.007
30	16.00	14.00	5.50	18.33	35.71	0.092	0.36	1.20	2.57	0.006
35	24.33	10.67	4.82	13.77	35.23	0.080	0.27	0.78	1.97	0.006
T	16.00	14.00	5.31	17.71	38.00	0.089	0.35	1.16	2.48	0.006

Leyenda:

T: Testigo (concentración de alcohol absoluto a 30 g/L)

S_o : Concentración inicial de sustrato (g/L)

S_f : Concentración final de sustrato (g/L)

S_c : Concentración de sustrato consumido (g/L)

X: Proteína unicelular = biomasa (g/L)

A: Aprovechamiento de azúcares suministrados (%)

$Y_{x/s}$: Rendimiento de la biomasa con relación al sustrato consumido (%)

$Y_{AE/s}$: Rendimiento del producto "bioaroma" acetato de etilo con relación al sustrato consumido (%)

AE: Producto "Bioaroma" acetato de etilo (g/L)

P: Productividad del sistema en base a "X" y "AE" producido (g/L.h)

Se observa el rendimiento de la producción de la proteína unicelular y acetato de etilo en (%) a partir del sustrato etanol rectificado consumido por *C. utilis. var. major* C.E.C.T. 1430, en donde se puede apreciar un porcentaje de 58% para la proteína unicelular, a la concentración de 10 g/L de etanol rectificado y para el acetato de etilo un porcentaje de 5.17% a la concentración de 15 g/L de sustrato, respectivamente.

Así mismo se aprecia la productividad del sistema, en términos de producción de proteínas unicelular, la cual es máxima (0.104 g/L-h) a 15 g/L de etanol rectificado, mostrándose así también la máxima producción de acetato de etilo (0.013 g/L-h) a la misma concentración de etanol rectificado.

En la producción de proteína unicelular de *Candida utilis*, es necesaria la adición de sustancias nitrogenadas y carbonadas al medio de cultivo que puedan ser asimiladas y transformadas en nutrientes esenciales para el crecimiento (Estévez, 1998) y para estar

acorde con ello, en el presente trabajo, se usó sulfato de amonio 1 g/L tal como también lo propone (Bailón, 2001), puesto que si se cultiva en un medio con limitación de nitrógeno, la producción de *C. utilis var major* es baja (Israelidis y Evangelopoulos, 1980). Por otro lado hay que considerar que la cantidad de fuente carbonada presente en el medio fermentativo, es un factor influyente en el rendimiento de proteína unicelular "biomasa" de *C. utilis*.

La disponibilidad de oxígeno en el medio limita el crecimiento ya que al no estar en cantidades suficientes puede actuar como sustrato limitante (Dorán, 1995), y tratándose de un proceso aeróbico el problema de la transferencia de oxígeno es muy importante. Además de la naturaleza química del etanol, tal como sostiene (Lee, 2000).

La concentración de etanol sería otra limitante ya que a partir de determinadas concentraciones, empieza a inhibir el crecimiento y metabolismo de la levadura (Domenech *et al.*, 2002), o sea inhibición por

sustrato. Una concentración de etanol a partir de 35 g/L disminuye la actividad metabólica de la levadura (Armstrong *et al.*, 1984); hechos que se han comprobado en la presente investigación.

La mayor producción de proteína unicelular de *C. utilis. var. major* C.E.C.T. 1430 hallada en este trabajo, se da para la concentración de sustrato de 15 g/L, con un valor de 7.90 g/L medio, puesto que es un valor menor al reportado por (Ferrer *et al.*, 2004), quienes con *C. utilis. var. major* obtuvieron un valor de 9.45 g/L medio a partir de hidrolizado de bagacillo de caña de azúcar; pero que se encuentra dentro del rango reportado (Quintero *et al.*, 1999), cuya producción de proteína unicelular reportada está entre 6 y 25 g/L medio, proceso desarrollado en Cuba a partir de melaza de caña de azúcar en cultivo continuo. Por otro lado se obtuvo una producción de proteína unicelular de 2.42 g/L medio tras 40 horas de fermentación a partir de algarrobina (Bailón, 2001). Así también se ha encontrado una mayor producción de proteína unicelular 10.25 g/L utilizando melaza a 35 g/L de ART como sustrato tras 24 horas de fermentación (Vejarano, 2005).

Cuando el etanol no es utilizado exclusivamente para el crecimiento de la levadura, también puede seguir otra ruta metabólica; ruta que implica la participación de enzimas sintetizadas por la levadura, la cual además produce dichos catalizadores para contrarrestar el efecto del pH bajo que llega hasta valores de 2.50, y la esterificación hasta acetato de etilo puede ser una vía para superar estos efectos negativos por la acumulación de ácido acético (Watteeuw *et al.*, 1979).

La producción de acetato de etilo en la presente investigación estaría dentro de los rangos reportados (Vejarano, 2005), sobre todo para el tratamiento con etanol rectificado a 15 g/L, el cual es de 0.74 g acetato de etilo/L medio; mientras que para el etanol sin rectificar es tan sólo de 0.10 g/L medio. Ello probablemente se deba a la alta volatilidad

del acetato y más aún a la presencia de congénicos en el etanol sin rectificar lo que pudo haber afectado la capacidad metabólica de la levadura.

La prueba F indica la existencia de diferencias significativas entre los promedios de producción de acetato de etilo para los tres tratamientos. Ello motivó la realización de la comparación múltiple de medias mediante el método "t", para determinar el mejor tratamiento y cuantificar dicha diferencia entre los tratamientos. La mejor producción de acetato de etilo corresponde al tratamiento con etanol rectificado de 15 g/L, mientras que estadísticamente entre los otros tratamientos sí existe una relativa diferencia significativa. Entre el tratamiento control con su respectivo par no existe diferencia significativa.

4. Conclusiones

La mayor producción de proteína unicelular de *Candida utilis. var. major* C.E.C.T. 1430 se obtiene en la concentración de 15 g/L de etanol rectificado correspondiendo a un valor de 7.90 g/L; seguida de la concentración de 10 g/L de etanol rectificado donde se encontró una producción de proteína unicelular de 5.80 g/L; así mismo el tratamiento con menor producción de proteína unicelular fue el de 35 g/L de etanol rectificado con un valor de 4.82 g/L de medio. La mayor producción de acetato de etilo por *Candida utilis var major* C.E.C.T. 1430 se obtuvo en el tratamiento de 15 g/L de etanol rectificado dando una producción de 0.74 g/L; seguido del tratamiento de 20 g/L de etanol rectificado con una producción de 0.54 g/L de acetato de etilo, así mismo el tratamiento con menor producción de acetato de etilo fue el de 35 g/L de etanol rectificado con un valor de 0.27 g/L. No existe diferencia significativa entre el control de etanol absoluto 30 g/L y su par etanol rectificado; tanto para la producción de proteína unicelular como para acetato de etilo.

Referencias

- Armstrong, D.; Martin, S.; Yamazaki, H. 1984. Production of ethyl acetate from dilute ethanol solutions by *Candida utilis*. Biotechnology and Bioengineering. Biotechnology Report. Ottawa. Canada.
- Bailón, S. 2001. Influencia del sulfato de amonio, nitrato de potasio y urea en la producción de proteína unicelular de *Candida utilis* var. *major*. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Mención Microbiología Industrial y Biotecnología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
- Difco Manual. 1985. Dehydrated culture medium and reagent for microbiology. 10th edition. Edit. Difco Laboratories. Detroit. USA.
- Dorán, P. 1995. Principios de Ingeniería de Bioprocesos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.
- Domenech, P.; Christen, F.; Revah, S. 1995. Evaluación de diferentes cepas de *Candida utilis* sobre la bioconversión de etanol en medio líquido y estudio de la bioconversión de etanol en medio sólido. UAM – Iztapalapa. México.
- Domenech, F.; Michelena, G.; Auria, R.; Revah, S. 2002. Biofiltration of volatile ethanol using sugar cane bagasse with *Candida utilis*. Journal of Hazardous Materials 89: 251-263.
- Estévez, R. 1998. Influencia de la concentración de azúcares sobre la producción de levadura torula. Rev. ICIDCA 7(3): 61-63. La Habana. Cuba.
- Farmland Industries. 1999. Torula driest yeast.
- Ferrer, J.; Davadillo, Y.; Chandler, C.; Páez, G.; Marmol, Z.; Ramones, E. 2004. Producción de proteína microbiana a partir de desechos del procesamiento de la caña de azúcar (bagacillo). Universidad del Sula. Venezuela.
- Freese, F. 1988. Métodos estadísticos elementales para técnicas forestales. Departamento de Agricultura de Estados Unidos. U.S.A.
- Gómez, J. 1999. Variación de la concentración de aminoácidos obtenidos a partir de la fermentación de suero láctico con *Kluyveromyces fragilis*. Tesis para optar el grado de bachiller en Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
- Herbert, D. 1999. Some principles of continuous culture. Recent progress in Microbiology. Edit. G. Tonerall. Canadá.
- Lee, B. 2000. Fundamentos de Biotecnología de los Alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.
- León, C. 2005. Influencia de la concentración de melaza de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” en la producción de proteína unicelular de *Candida utilis* var. *major*. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Mención Biotecnología y Bioingeniería. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
- Israelidis, C.; Evangelopoulos, A. 1980. Enzymatic and Microbial Conversion of Cellulose Agricultural by Products for the Production of Animal Feed, Ethanol and Chemicals. Chimica Crónica 9: 337-352.
- Marchand, G. 1997. Inorganic: Spray torula yeast.
- Quintero, R.; López, A.; García, M. 1999. Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa S.A. México.
- Scragg, A. 1996. Biotecnología para Ingenieros. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- Torres, B.C. 1997. Metodología de la investigación científica. 5^a ed. Edit. “San Marcos”. Lima – Perú.
- Vegas, R.; Castro, W. 2002. Evaluación de la calidad de alcohol etílico a diferentes valores de reflujo en una columna rectificadora de una destilería prototipo, con una altura equivalente al plato teórico determinada experimentalmente. Tesis. U.N.T. Trujillo. Perú.
- Vejarano, R. 2005. Estudio comparativo de la producción de biomasa con acetato de etilo por *Candida utilis* CECT 10704 a partir de melaza de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), etanol rectificado y etanol sin rectificar como fuentes de carbono. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
- Watteeuw, C.; Armiger, W.; Ristroph, D.; Humphrey, A. 1979. Production of Single Cell Protein from ethanol in a Fed-batch process. Biotech. Bioeng. 21: 1221 – 1237.