

## Aprovechamiento de vinaza para producción de lípidos y biomasa microbiana mediante cultivo mixto de *Yarrowia lipolytica* (Wickerham, Kurtzman & Herman) van der Walt & von Arx y *Chlorella vulgaris* Beijerinck

Rojas, L.<sup>1,2\*</sup>; Gayozo, E.<sup>3</sup>; Sandoval-Espínola, W. J.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biotecnología Industrial, San Lorenzo, Paraguay

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Microbiología Industrial, San Lorenzo, Paraguay

<sup>3</sup> Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, San Lorenzo, Paraguay

<sup>4</sup> Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biotecnología Microbiana, San Lorenzo, Paraguay

\* E-mail del autor: mlrojasaguade@gmail.com

**Aprovechamiento de vinaza para producción de lípidos y biomasa microbiana mediante cultivo mixto de *Yarrowia lipolytica* (Wickerham, Kurtzman & Herman) van der Walt & von Arx y *Chlorella vulgaris* Beijerinck.** Estudios recientes señalan los beneficios de los cultivos mixtos de microalgas y levaduras para obtener compuestos de interés industrial como el biodiesel. A fin de evaluar la producción de biomasa y lípidos se estudió el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* y *Chlorella vulgaris* utilizando vinaza de caña dulce como sustrato evaluando tres proporciones de vinaza en agua destilada (75, 50 y 25% v/v) y cuatro proporciones de inóculo inicial de *Y. lipolytica* y *C. vulgaris* (100%, 98%, 95% y 0% de *Y. lipolytica* en células totales del inóculo). Se cultivaron en reactores aireados a 3 L.min<sup>-1</sup>, pH 6,7, temperatura de 25 °C durante 240 horas, se realizaron curvas de crecimiento mediante recuento celular, y de biomasa mediante peso seco. Los lípidos fueron extraídos de la biomasa seca mediante el método de Blich y Dyer. Se determinó la productividad de biomasa y el porcentaje de lípidos en base a biomasa seca. Las mejores condiciones fueron un cultivo puro de *Y. lipolytica* con 50% de vinaza que alcanzó 20,92±12,39% de lípidos, productividad de biomasa de 54,58±4,49 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>; y un cultivo mixto con inóculo inicial de 98% *Y. lipolytica*, 25% de vinaza con una productividad de biomasa de 102,67±32,07 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> con un porcentaje de lípidos de 7,06±1,76%. Aunque se observó en algunas ocasiones el efecto favorable del cultivo mixto entre estas especies, el monocultivo *Y. lipolytica* obtuvo mejores resultados en las variables evaluadas. Se logró cultivar cepas oleaginosas en un efluente diluido en agua sin agregado de fuente de carbono.

**Palabras claves:** Lípidos microbianos, microorganismos oleaginosos, cultivo mixto, biodiesel, vinaza

**Use of vinasse for the production of microbial lipids and biomass by mixed cultures of *Yarrowia lipolytica* (Wickerham, Kurtzman & Herman) van der Walt & von Arx and *Chlorella vulgaris* Beijerinck.** Recent studies have shown the benefits of mixed cultures between microalgae and yeasts to obtain compounds of industrial interest, such as biodiesel. In order to evaluate the production of biomass and lipids, the growth of *Yarrowia lipolytica* and *Chlorella vulgaris* using sugarcane vinasse as substrate was studied. Three different propor-

## Rojas, L. *et al.* Aprovechamiento de vinaza para producción de lípidos y biomasa microbiana

tions of vinasse in distilled water (75, 50, and 25% in volume) were evaluated, and four initial inoculum proportions of *Y. lipolytica* and *C. vulgaris* (100%, 98%, 95% y 0% of *Y. lipolytica* of total cells inoculum). They were cultured in aerated reactors at a constant flow rate of 3 L.min<sup>-1</sup>, pH 6.7, 25 °C for 240 hours, cell growth curves were made by direct cell counting under a microscope, and biomass curves by dry weight. Lipids were extracted from the dry biomass according to Bligh and Dyer's method. Dry biomass productivity and lipid percentage were determined. The best conditions were a pure culture of *Y. lipolytica* with 50% vinasse that reached 20.92±12.39% of lipids, and a biomass productivity of 54.58±4.49 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>; and a mixed culture with an initial inoculum of 98% *Y. lipolytica* and 25% vinasse, with biomass productivity of 102.67±32.07 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> and a lipid percentage of 7.06 ± 1.76%. Although the favorable effect of a mixed culture among these species was observed under some conditions, the monoculture of *Y. lipolytica* provided better results in the evaluated conditions. It was possible to cultivate oleaginous strains in an effluent diluted in water without adding an organic carbon source.

**Keywords:** Single cell oil, oleaginous microorganism, mixed culture, biodiesel, vinasse

---

## INTRODUCCIÓN

El incremento en la demanda energética de combustibles que se ha generado hace décadas ocasiona una problemática global por el agotamiento de las fuentes de combustibles fósiles y las emisiones de gases de efecto invernadero. A consecuencia de esto, en los últimos años fueron apareciendo varios sustitutos de combustibles fósiles y algunos de ellos inclusive fueron establecidos como fuentes alternativas de energía limpia (Marchetti *et al.*, 2007; Nautiyal *et al.*, 2014).

Los biocombustibles pueden clasificarse como de primera, segunda, tercera y cuarta generación: aquellos producidos a partir de materia prima de origen vegetal destinados al consumo humano, como azúcares comestibles y aceites, son denominados como de primera generación; los biocombustibles de segunda generación son obtenidos a partir de sustratos no empleados para la alimentación humana, como los residuos agrícolas y forestales, y aceites usados

(Cortés-Sánchez *et al.*, 2019). Los biocombustibles de tercera generación son aquellos que no compiten en la industria de alimentos por el uso del suelo, ni por la utilización de los cultivos con fines alimentarios debido a que generalmente provienen de organismos que pueden cultivarse en reactores fotoquímicos o en piletones al aire libre (Ramos *et al.*, 2016). Los biocombustibles de cuarta generación implican el uso de organismos genéticamente modificados capaces de disminuir el contenido de gases de efecto invernadero y al mismo tiempo generar una fuente de energía alternativa (Ramos *et al.*, 2016).

El biodiesel de tercera generación va cobrando protagonismo e importancia en las industrias gracias a los avances en la biotecnología. La obtención de lípidos aptos para la elaboración de biodiesel, y al mismo tiempo, de biomasa a partir de los microorganismos, son puntos de enfoque de varios estudios recientes orientados a conocer el potencial uso biotecnológico como fuente sustituta de combustible fósil (Nautiyal *et al.*, 2014).

Se han realizado numerosos estudios para mejorar la producción de lípidos microbianos apuntando a la obtención de biodiesel de tercera generación. Entre los microorganismos que demostraron mayores porcentajes de lípidos en base a biomasa seca, se encuentran las levaduras, como las del género *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y *Yarrowia* (Faife-Pérez *et al.*, 2012). También las microalgas fueron objetos de varios estudios, siendo *Chlorella vulgaris* una de las especies más prometedoras en la obtención de biocombustibles debido a su rápido crecimiento y producción de lípidos de 30 a 40% en peso seco bajo condiciones naturales (Cheirsilp *et al.*, 2011).

Se ha encontrado que la simbiosis entre microalgas y levaduras, es decir, la combinación de los cultivos en un mismo proceso, muestra ventajas significativas sobre los monocultivos de algas al presentar mayores rendimientos de productos de alto valor, como los lípidos, mayores tasa de crecimiento y concentración de biomasa, además de una mayor remoción de materia orgánica y nutrientes de efluentes, como consecuencia de la mayor concentración de dióxido de carbono disponible para la fotosíntesis de la microalga y la mayor disponibilidad de oxígeno para la levadura heterotrófica (Qin *et al.*, 2018; Cheirsilp *et al.*, 2011).

Los efluentes industriales pueden ser aprovechados por estos cultivos mixtos para la obtención de bioproductos de valor como los lípidos, presentando ventajas económicas y ambientales en la producción de biodiesel, mediante el desarrollo de nuevas fuentes de energía,

la protección de ambientes acuáticos y la reducción del efecto invernadero de origen antropogénico (Cheirsilp *et al.*, 2011).

Un efluente de interés para la utilización como sustrato en la producción de biocombustibles es la vinaza, que, a nivel nacional y regional, es uno de los mayores efluentes producidos, y es obtenido a partir de la destilación del alcohol procedente de la fermentación, principalmente, de subproductos del azúcar de caña (González *et al.*, 2018; Aquino, 2017; Valeiro y Portocarrero, 2017). La vinaza consiste en un líquido café oscuro, de pH ácido, rico en compuestos orgánicos como el glicerol, ácido láctico, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio (Brasil *et al.*, 2017; Santana *et al.*, 2017). Las cantidades de vinaza obtenidas año a año se incrementan por la demanda creciente de alcohol etílico, siendo el exceso de vinaza un problema para su disposición (González *et al.*, 2018). El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) proyectaba para el 2016 una producción de 215 millones de litros de etanol en el Paraguay (Aquino, 2017). Por cada litro de alcohol generado, se producen 13 litros de vinaza como efluente. En caso del alcohol de segunda generación a partir de bagazo y residuos de cosecha, la vinaza producida llega a 20 litros. El destino mayoritario de este residuo en la región es el fertirriego en zonas aledañas a las alcohólicas, por tanto, una mala disposición de este residuo podría cambiar la composición del suelo y tener un impacto ambiental negativo (Valeiro y Portocarrero, 2017).

En esta investigación se propuso eva-

**Rojas, L. et al. Aprovechamiento de vinaza para producción de lípidos y biomasa microbiana**

lular la utilización de diversas concentraciones de vinaza como sustrato para la producción de lípidos y biomasa microbiana a partir de cultivos mixtos de *Chlorella vulgaris* y *Yarrowia lipolytica*, para comprobar el aumento en el porcentaje de lípidos y en la productividad de biomasa debido al crecimiento en conjunto de estos microorganismos utilizando el efluente como única fuente de carbono, lo cual supondría el aprovechamiento de residuos industriales para obtener subproductos de interés y mejoraría la calidad de los efluentes de las destilerías.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**Tipo de investigación y distribución experimental**

El diseño empleado fue experimen-

tal, analítico de enfoque cuantitativo con arreglo factorial 4x3x3, en el que se evaluó el efecto de la concentración del sustrato (vinaza) en tres niveles de mezcla con agua estéril (25, 50 y 75 % sobre volumen del medio), y la proporción de cultivos de levadura: microalga, en cuatro niveles de acuerdo a sus concentraciones de inoculación en base al volumen del inóculo de cada cultivo (cultivo puro de *Y. lipolytica*, cultivo puro de *C. vulgaris*, y dos proporciones de mezclas de cultivos entre estos valores de 98% en células de *Y. lipolytica*, y 95% en células de *Y. lipolytica*), como variables independientes, sobre la cantidad de biomasa y lípidos producidos (variables dependientes) (Tabla 1). Todos los experimentos se realizaron en tres réplicas.

**Tabla 1.** Distribución de condiciones de experimentos

Dilución de vinaza (% volumen)	Dosificación de cultivos puros iniciales		Condición (C)
	<i>Yarrowia lipolytica</i> (1,3.10 <sup>8</sup> cel.mL <sup>-1</sup> )	<i>Chlorella vulgaris</i> (3,4.10 <sup>6</sup> cel.mL <sup>-1</sup> )	
75	0 mL	15 mL	C1
	5 mL	10 mL	C2
	10 mL	5 mL	C3
	15 mL	0 mL	C4
50	0 mL	15 mL	C5
	5 mL	10 mL	C6
	10 mL	5 mL	C7
	15 mL	0 mL	C8
25	0 mL	15 mL	C9
	5 mL	10 mL	C10
	10 mL	5 mL	C11
	15 mL	0 mL	C12

### **Conservación y mantenimiento de cepas**

La cepa estándar de *Y. lipolytica* ATCC™ 9773™ fue adquirida de la empresa Microbiologics®, fue transferida a un medio agar YPD (Conda Lab S.A, España) (composición: glucosa 20 g.L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 10 g.L<sup>-1</sup>, peptona 20 g.L<sup>-1</sup> y 15 g.L<sup>-1</sup> agar) y conservada en medio caldo YPD (Conda Lab S.A, España) (composición: glucosa 20 g.L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 10 g.L<sup>-1</sup> y peptona 20 g.L<sup>-1</sup>) (Qin *et al.*, 2019).

La cepa de *C. vulgaris*, UTEX 265 fue donada por el Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN-UNA), fue conservada en medio Bristol modificado (Starr y Zeikus, 1993; Silveira-Font *et al.*, 2018), e incubada a 25 °C, controlando día a día su crecimiento (Qin *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2018).

### **Crecimiento de inóculos puros**

La cepa de *Y. lipolytica* fue inoculada en medio caldo YPD, e incubada en un agitador orbital a 25 °C y 150 rpm durante 36 horas (Qin *et al.*, 2018).

La cepa de *C. vulgaris* fue cultivada en un fotobiorreactor de columna de vidrio conteniendo 500 mL de medio Bristol, fue cultivada a 25 °C e iluminada con una lámpara fluorescente de luz blanca (intensidad de la luz de 100 μmol fotones.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) y suplementada con aireación a un caudal de 3 L.h<sup>-1</sup> en el fondo del fotobiorreactor por diez días (Santana *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2018).

Los cultivos fueron centrifugados a 955 RCF por cinco minutos a 25 °C y se ajustó la concentración con agua destilada estéril para obtener inóculos de alta

densidad mediante el recuento celular en cámara Neubauer (Qin *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2018).

### **Preparación de la vinaza**

La vinaza cruda de caña de azúcar fue obtenida de un ingenio azucarero orgánico de la ciudad de Arroyos y Esteros, Paraguay y transportada a temperatura ambiente al Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales para ser refrigerada hasta su uso. La vinaza cruda fue centrifugada a 4800 RCF durante diez minutos para remover los sólidos suspendidos. Para clarificar las soluciones de vinaza se añadió hidróxido de calcio en proporción de 3 g.L<sup>-1</sup>, se mantuvo en reposo durante 40 minutos y luego se centrifugó a 4800 RCF por diez minutos. Se colectó el sobrenadante. Posteriormente todas las formulaciones fueron esterilizadas tres veces por autoclave a 121°C por 30 minutos con periodos de enfriamiento de seis horas para eliminar los microorganismos resistentes. Se diluyeron las formulaciones de vinaza mediante la adición de agua destilada estéril en las proporciones de 25%, 50% y 75% con respecto a volumen (Santana *et al.*, 2017).

### **Inoculación de cultivos**

El pH de las soluciones de vinaza estéril fue ajustado a 6,7 ± 0,01 con solución de HCl 4 M bajo campana de flujo laminar antes de la adición de los inóculos. La concentración de los sustratos fue ajustada en los tres niveles estudiados (Tabla 1). Se llevó a cabo cada cultivo en fotobiorreactores de columna de vidrio de 1 L de capacidad, con 500

## **Rojas, L. et al. Aprovechamiento de vinaza para producción de lípidos y biomasa microbiana**

mL de volumen de trabajo, incubadas a 25°C durante diez días, con 100  $\mu\text{mol}$  de fotones. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  y aireadas a una tasa de 3  $\text{L}.\text{h}^{-1}$ , cada experimento se llevó a cabo por triplicado (Qin *et al.*, 2018).

### **Construcción de curva de crecimiento**

De cada experimento fueron recolectados 41 mL de cultivo a las 48, 96, 144, 192 y 240 horas. Un volumen de 1 mL de esa muestra fue utilizado para observación microscópica y conteo celular en cámara de Neubauer. El resto de la muestra, se centrifugó a 3820 RCF por cinco minutos y los sedimentos fueron empleados para la determinación de biomasa (método gravimétrico por peso seco a 60 °C) (Qin *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2018).

### **Extracción de lípidos**

El volumen final remanente en el décimo día de crecimiento fue medido, y centrifugado a 3820 RCF por cinco minutos para recuperar la biomasa, realizándose el proceso de secado a 60 °C hasta peso constante. Los lípidos totales fueron medidos mediante extracción por solvente cloroformo:metanol:agua (2:2:1,8), por el método estandarizado de Bligh y Dyer adaptada a la cantidad de la muestra de biomasa (Bligh y Dyer, 2011) y asistida con disrupción física con mortero (Zeng *et al.*, 2018).

### **Cálculo de parámetros de biomasa y lípidos**

Siguiendo lo señalado por Qin *et al.* (2016) la concentración y productividad de biomasa fue calculada con las siguientes ecuaciones:

Productividad de biomasa:

$$(\text{g}.\text{L}^{-1} \text{ día}^{-1} \text{ ó } \text{mg}.\text{L}^{-1} \text{ día}^{-1}) = \frac{\text{Bs}}{\text{V}.\text{t}}$$

Procentaje de lípidos (%):

$$\frac{\text{Ls}}{\text{Bsl}} \times 100$$

Donde:

Bs es el peso de la biomasa seca obtenida por gravimetría hasta peso constante, V es el volumen de la muestra del que se extrajo la biomasa, t es el tiempo de cultivo en días. Ls es el peso del lípido extraído seco, Bsl es el peso de la biomasa de la cual se extrajo el lípido.

### **Análisis estadístico de datos**

Los datos obtenidos en los experimentos, tanto la producción de lípidos, así como la obtención de biomasa fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis (5% de nivel de significancia) para determinar diferencias entre los tratamientos realizados, y la prueba post-hoc de Conover (5% de nivel de significancia) para determinar diferencias entre las medias (Kruskal y Wallis, 1952; Conover, 1998).

Para los mismos se empleó el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2015). Los gráficos estadísticos se realizaron empleando los programas Excel (Microsoft Office, 2016) y PAST 4.03 (Hammer *et al.*, 2001).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

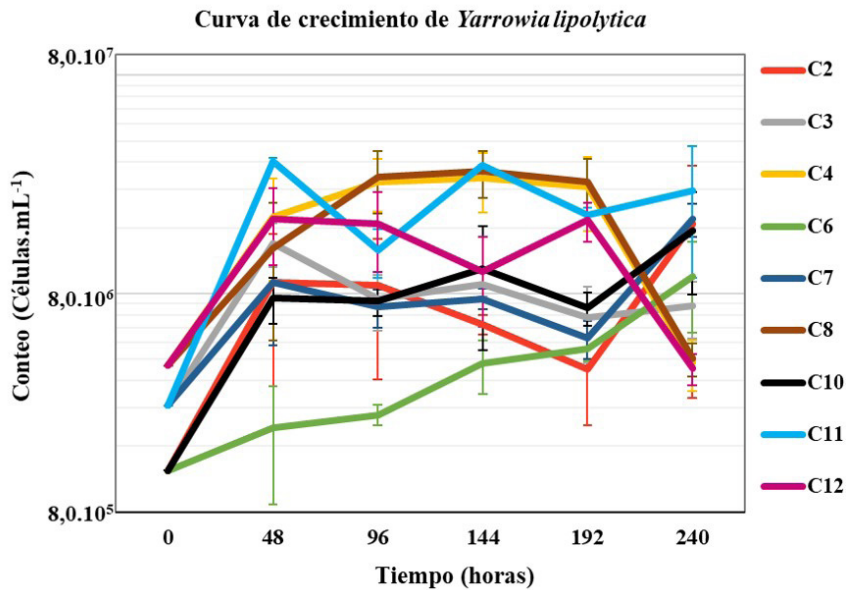
### **Construcción de curvas de crecimiento en cultivos mixtos y puros**

Las curvas de crecimiento de cada especie (Figura 1 y Figura 2) para Y.

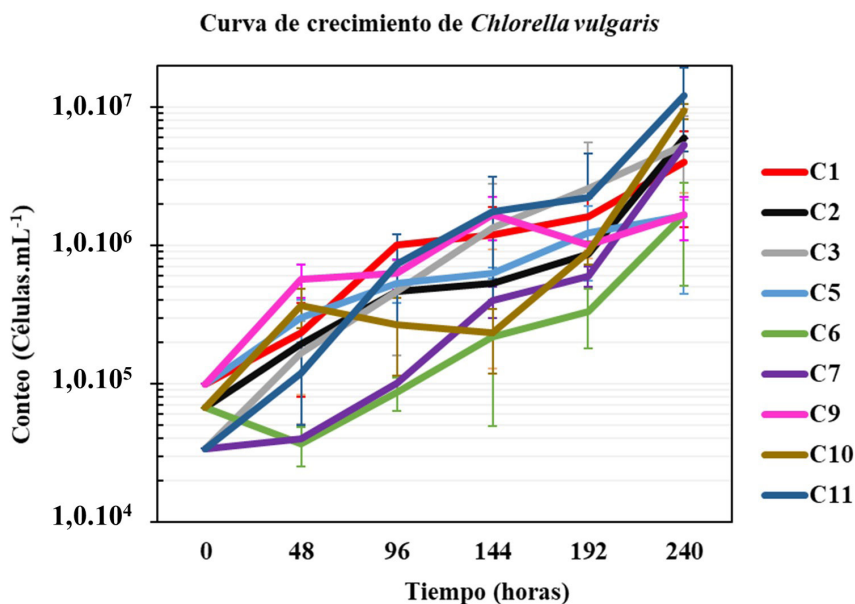
*lipolytica* y para *C. vulgaris* respectivamente. Puede observarse que para *Y. lipolytica* los conteos más elevados corresponden a cultivos puros en la mayoría de los tiempos evaluados (condiciones C4, C8 y C12). Sin embargo, a partir de las 192 horas los conteos celulares de los cultivos mixtos empiezan a elevarse, momento en el cual la concentración de microorganismos en los cultivos puros empieza a disminuir. Las condiciones C11 y C12 presentan un comportamiento diferente a las demás al exhibir picos positivos y negativos entre los tiempos 96 a 144 horas, sin embargo, su tendencia a partir de este momento se asemeja

a la de los cultivos mixtos en el caso de C11 que va acrecentándose, y monocultivos en el caso de C12, en descenso.

En el caso de *C. vulgaris* (Figura 2) las líneas de crecimiento se muestran más uniformes, incrementándose el número de células a partir de las 192 horas en todas las condiciones. Las condiciones más prometedoras son provenientes de cultivos mixtos, como en el caso de C11 y C10. Existe una propensión de crecimiento para *C. vulgaris* en cultivo puro (C1, C5 y C9), sin embargo, las pendientes de las curvas se observan ligeramente menores que sus contrapartes en cultivos mixtos.



**Figura 1.** Curva de crecimiento de células de la *Yarrowia lipolytica* bajo diferentes condiciones de cultivo. Conteo celular realizado en cámara de Neubauer. Detalles de las condiciones en Tabla 1



**Figura 2.** Curva de crecimiento de las células de la microalga *C. vulgaris* bajo diferentes condiciones de cultivo. Conteo celular realizado en cámara de Neubauer. Detalles de las condiciones en Tabla 1

Al evaluar todas las condiciones de cultivo respecto al peso seco a las 240 horas, tres de ellas fueron significativamente superiores al resto, específicamente las condiciones C11, C3 y C2, que presentaron concentraciones máximas de  $1026,67 \pm 320,69 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $815,00 \pm 649,12 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $717,50 \pm 262,71 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente (Tabla 2).

Entre las condiciones que presentaron menor concentración de biomasa se encuentran la C1, C5 y C9, con valores de  $438,33 \pm 61,46 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $155,83 \pm 38,43 \text{ mg.L}^{-1}$ , y  $212,50 \pm 52,20 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Estas corresponden a monocultivos de *C. vulgaris*, cuya tendencia se observó en todos los tiempos de muestreo.

Esto se debe probablemente a la menor concentración de células en el inó-

culo inicial, a la probable baja disponibilidad de nutrientes esenciales como las vitaminas y al estrés generado por el exceso de luz, condiciones que suelen prolongar una etapa de adaptación y ralentizar el crecimiento (Cheirsilp *et al.*, 2011; Ling *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2018).

La biomasa obtenida (peso seco) en las demás condiciones de cultivo evaluadas se mantuvieron en un rango intermedio entre las condiciones anteriormente mencionadas.

Es importante resaltar que en varios estudios se demostró el aumento de la producción de biomasa en los cultivos mixtos en comparación a sus contrapartes monocultivadas (Xue *et al.*, 2010; Cheirsilp *et al.*, 2011, 2012; Qin *et al.*, 2018, 2019). En estos cultivos se observaron efectos sinérgicos entre algas y



levaduras asociadas principalmente al balance  $O_2/CO_2$ , intercambio de sustratos, oxígeno disuelto, ajuste de pH y la liberación de elementos traza. Además, la microalga recibe de parte de la levadura protección ante el exceso de luz, incrementando el contenido de pigmentos, o la sobre protección a causa del excesivo crecimiento de la levadura, lo que dificulta el paso de luz. Estas inte-

rrelaciones demuestran las ventajas de relación simbiótica alga-levadura (Qin *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2019).

Las condiciones que aportaron cantidades diferencialmente mayores de biomasa (C11, C3 y C2), fueron seleccionadas para la producción de lípidos y su transesterificación.

**Tabla 2.** Datos de concentración de biomasa en peso seco ( $mg.L^{-1}$ ) a lo largo del tiempo de acuerdo a las condiciones de estudio (media  $\pm$  desviación estándar)

Condiciones (C)	Tiempo de muestreo (horas)				
	48	96	144	192	240
C1	80,83 $\pm$	180,83 $\pm$	230,00 $\pm$	145,83 $\pm$	438,33 $\pm$
	30,55	32,15	27,04	57,79	61,46
C2	207,50 $\pm$	285,00 $\pm$	412,50 $\pm$	265,00 $\pm$	717,50 $\pm$
	40,93	54,14	19,53	2,50	262,71
C3	286,67 $\pm$	343,33 $\pm$	385,83 $\pm$	277,50 $\pm$	815,00 $\pm$
	34,67	86,07	68,98	108,77	649,12
C4	257,50 $\pm$	490,83 $\pm$	432,50 $\pm$	567,50 $\pm$	659,17 $\pm$
	124,32	104,89	69,06	84,30	101,68
C5	72,50 $\pm$	143,33 $\pm$	197,50 $\pm$	137,50 $\pm$	155,83 $\pm$
	22,50	10,41	10,90	165,13	38,43
C6	156,67 $\pm$	254,17 $\pm$	365,00 $\pm$	194,17 $\pm$	547,50 $\pm$
	24,66	27,88	60,67	49,33	46,84
C7	254,17 $\pm$	288,33 $\pm$	369,17 $\pm$	233,33 $\pm$	590,83 $\pm$
	17,56	10,10	20,21	10,10	117,80
C8	185,00 $\pm$	480,00 $\pm$	453,33 $\pm$	488,33 $\pm$	545,83 $\pm$
	133,06	127,74	119,30	146,21	44,88
C9	48,33 $\pm$	83,33 $\pm$	179,17 $\pm$	114,17 $\pm$	212,50 $\pm$
	8,04	22,68	20,97	111,17	52,20
C10	260,00 $\pm$	290,00 $\pm$	347,50 $\pm$	172,50 $\pm$	565,83 $\pm$
	32,50	110,76	29,47	146,61	92,24
C11	552,50 $\pm$	487,50 $\pm$	539,17 $\pm$	222,50 $\pm$	1026,67 $\pm$
	67,64	63,10	74,34	112,58	320,69
C12	390,00 $\pm$	360,00 $\pm$	276,67 $\pm$	360,00 $\pm$	487,50 $\pm$
	68,05	34,73	81,41	52,50	118,22

**Selección de las mejores condiciones de cultivo**

Las mayores concentraciones de biomasa se cosecharon a las 240 horas, por lo que los cálculos de porcentaje de lípidos en base a biomasa seca, y las productividades de biomasa y de lípidos se realizaron teniendo en cuenta este tiempo (Tabla 3).

Las diferentes condiciones de cultivo (proporción de vinaza y proporciones de microorganismos) no demostraron efectos sobre la concentración de lípidos (P=0,0623), lo cual se puede observar en la Figura 3. Sin embargo, sí se pudo registrar cambios significativos en las concentraciones de biomasa a consecuencia de las diferentes condiciones de cultivo evaluadas en esta investigación

(P=0,0182).

Los tratamientos que presentaron una concentración de biomasa significativamente mayor (P=0,0182) fueron las condiciones C2, C3, C4, C6, C7, C8, C10 y C11, los cuales reportaron valores promedios de 717,50 ± 262,71 mg.L<sup>-1</sup>, 815,00 ± 649,12 mg.L<sup>-1</sup>, 659,17 ± 101,68 mg.L<sup>-1</sup>, 547,50 ± 46,84 mg.L<sup>-1</sup>, 590,83 ± 117,80 mg.L<sup>-1</sup>, 545,83 ± 44,88 mg.L<sup>-1</sup>, 565,83 ± 92,24 mg.L<sup>-1</sup> y 1026,67 ± 320,69 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente. A su vez, los tratamientos que demostraron una menor producción de biomasa fueron las condiciones C1, C5, C9 y C12, con 438,33 ± 61,46 mg.L<sup>-1</sup>, 155,83 ± 38,43 mg.L<sup>-1</sup>, 212,50 ± 52,20 mg.L<sup>-1</sup>, y 487,50 ± 118,22 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente.

**Tabla 3.** Media y desviación estándar de la concentración de lípidos, concentración de biomasa, porcentaje de lípidos y productividad de biomasa calculados a las 240 horas

Condición	Lípidos (mg.L <sup>-1</sup> )	Biomasa (mg.L <sup>-1</sup> )	Porcentaje de lípidos (%)*	Productividad de biomasa (mg.L <sup>-1</sup> .día <sup>-1</sup> )
1	59,17±23,09	438,33±61,46	13,50±5,27	43,83±6,15
2	60,00±38,49	717,50±262,71	8,36±5,36	71,75±26,27
3	66,67±1,44	815,00±649,12	8,18±0,18	81,50±64,91
4	96,67±27,88	659,17±101,68	14,66±4,23	65,92±10,17
5	8,33±1,44	155,83±38,43	5,35±0,93	15,58±3,84
6	84,17±11,55	547,50±46,84	15,37±2,11	54,75±4,68
7	68,33±11,27	590,83±117,80	11,57±1,91	59,08±11,78
8	114,17±67,65	545,83±44,88	20,92±12,39	54,58±4,49
9	40,83±16,65	212,50±52,20	19,22±7,83	21,25±5,22
10	58,33±31,46	565,83±92,24	10,31±5,56	56,58±9,22
11	72,50±18,03	1026,67±320,69	7,06±1,76	102,67±32,07
12	105,00±37,75	487,50±118,22	21,54±7,74	48,75±11,82

\* Porcentaje en base a biomasa seca

También se encontraron cambios significativos en el porcentaje de lípidos específico, en base a biomasa seca obtenida, en las diferentes condiciones ( $P=0,0200$ ), siendo las de mayor proporción las obtenidas en las condiciones C1, C4, C6, C8, C9 y C12, en las cuales se registraron porcentajes promedio de  $13,50 \pm 5,27 \%$ ,  $14,66 \pm 4,23 \%$ ,  $15,37 \pm 2,11 \%$ ,  $20,92 \pm 12,39 \%$ ,  $19,22 \pm 7,83 \%$  y  $21,54 \pm 7,74$  respectivamente. Las últimas tres condiciones mencionadas, C9 cultivo puro de *C. vulgaris*, C8 y C12 cultivos puros de *Y. lipolytica*, permitirían a los microorganismos clasificarse como oleaginosos al producir un contenido de al menos 20% de lípidos totales en base a biomasa seca (Beopoulos *et al.*, 2011).

La productividad de biomasa de las distintas condiciones sigue la tendencia de concentración de biomasa, es decir que está asociada al crecimiento. La proporción de vinaza empleada no ejerció una influencia sobre las concentraciones de lípidos, o biomasa, lo que puede observarse en la Figura 3, donde las condiciones en las que se utilizaron diferentes proporciones de vinaza, pero iguales proporciones de inóculos, no demostraron diferencias significativas entre sí.

Las condiciones de mejor concentración de lípidos fueron C8 y C12 ambos cultivos puros de *Y. lipolytica*, y las condiciones mejores para obtener biomasa fueron C11, C3 y C2, todos cultivos mixtos.

En el trabajo de Qin *et al.* (2018) en el que se cultivó el mismo consorcio de microorganismos en un efluente de digestión anaerobia, se consiguieron resultados de  $1560 \text{ mg.L}^{-1}$  de biomasa y

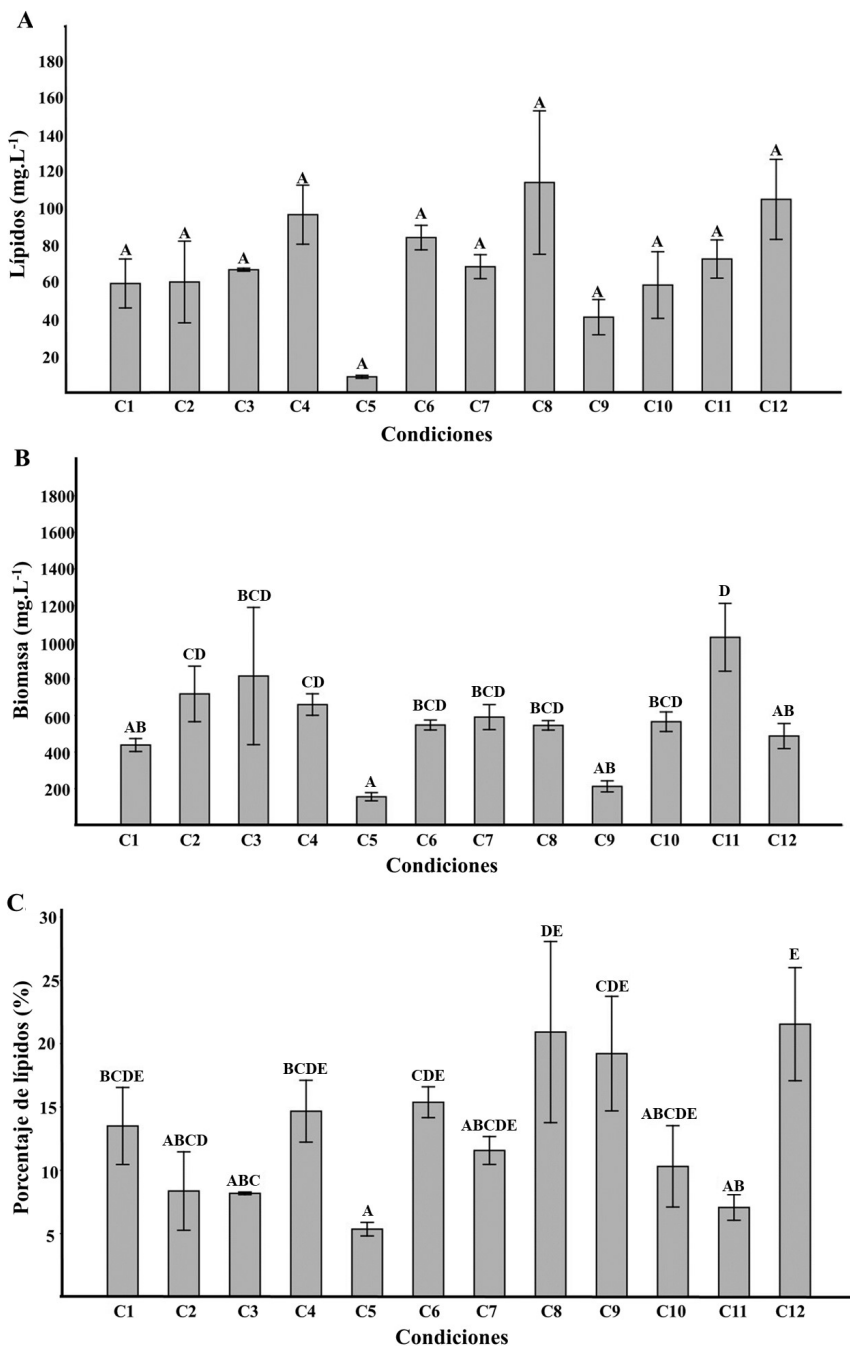
$183 \text{ mg.L}^{-1}$  de lípidos a las 48 horas mediante cultivos mixtos. Así también, Qin *et al.* (2019) obtuvieron una concentración de biomasa máxima de  $5770 \text{ mg.L}^{-1}$  y una productividad de  $760 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  de biomasa y  $770 \text{ mg.L}^{-1}$  de lípidos en sus cultivos mixtos de *Y. lipolytica* y *Chlorella pyrenoidosa* en un medio de cultivo sintético. Sin embargo, estos ensayos fueron mediante la adición de fuentes de carbono tradicionales.

Los efluentes derivados de destilados podrían presentar inhibidores de crecimiento para levaduras, como es el caso del furfural, si estos componentes estuvieran presentes, podrían explicar en parte el bajo desarrollo de *Y. lipolytica* en el medio estudiado (Ling *et al.*, 2013).

Además del furfural, se pueden citar inhibidores como vainillina, ácido fórmico y ácido acético, cuya acción en solitario hasta concentraciones de 0,5, 1,5, 2 y 5  $\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente, permiten una alta acumulación de biomasa de levadura. No obstante, los efectos sinérgicos entre estos compuestos podrían disminuir contundentemente las concentraciones mínimas inhibitorias que conducirían a reducciones significativas del crecimiento y la producción de lípidos (Zhao *et al.*, 2012). Al ser la vinaza un efluente complejo, se sugiere la investigación de estos componentes inhibitorios en futuros estudios.

A pesar de que los valores obtenidos son muchos menores que otras investigaciones que utilizan el consorcio microalga-levadura, en donde los rendimientos y productividades de biomasa y lípidos se observan superiores en comparación a los cultivos de una sola de las especies, debe considerarse que en este

**Rojas, L. et al. Aprovechamiento de vinaza para producción de lípidos y biomasa microbiana**



**Figura 3.** A) Promedio de concentración de lípidos. B) Concentración de biomasa. C) Porcentaje de lípidos en base a biomasa seca. Ajustado al test de Conover (1999), medias con una letra común no son significativamente diferentes entre sí ( $P>0,05$ ). Barras: error típico

estudio no se suplementó con ninguna fuente de carbono adicional. Es de resaltar que estas condiciones podrían ser optimizadas mediante el suplemento de fuentes de carbono provenientes de sustratos de bajo costo para conducir a los ensayos a mejores resultados, teniendo como base el comportamiento que se observó en esta investigación.

## CONCLUSIONES

Los resultados hallados sugieren que las mejores condiciones para la obtención de una mayor concentración y productividad de biomasa a partir de la vinaza en las concentraciones empleadas fueron, C2, C3 y C11, todas estas de cultivos mixtos. Sin embargo, las condiciones que demostraron ser favorables para un mayor porcentaje de lípidos fueron C8, C9 y C12, estas condiciones a diferencia de las anteriores pertenecen a cultivos puros, siendo C8 y C12 cultivos de *Y. lipolytica* y C9 de *C. vulgaris*. También es importante destacar que no se observó una influencia en las variables evaluadas con las diferentes proporciones de vinaza estudiadas.

Si bien la concentración de lípidos y productividad de biomasa son bajos en comparación a otros estudios, en el presente trabajo se resalta la obtención de porcentajes de lípidos típicos de cepas oleaginosas utilizando como única fuente de carbono al efluente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aquino, A. (2017). Relatorio de Impacto ambiental (RIMA). Proyecto-Planta industrial de producción de alcohol

carburante y miel de caña de azúcar. [Fecha de consulta: 29 de junio de 2018]. Disponible en: [http://www.mades.gov.py/wp-content/uploads/2018/07/RIMA-818.2017\\_PLANTA-INDUSTRIAL-DE-PRODUCCION-DE-ALCOHOL-CARBURANTE-Y-MIEL-DE-CA%-C3%91A-DE-AZUCAR\\_EXP.-SEAM-4579.17\\_PINDOYU-S.A.pdf](http://www.mades.gov.py/wp-content/uploads/2018/07/RIMA-818.2017_PLANTA-INDUSTRIAL-DE-PRODUCCION-DE-ALCOHOL-CARBURANTE-Y-MIEL-DE-CA%-C3%91A-DE-AZUCAR_EXP.-SEAM-4579.17_PINDOYU-S.A.pdf)

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (2011). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. <https://doi.org/10.1139/o59-099>

Brasil, B. S. A. F., Silva, F. C. P., & Siqueira, F. G. (2017). Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. *New Biotechnology*, 39, 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.04.007>

Cheirsilp, B., Kitcha, S., & Torpee, S. (2012). Co-culture of an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and a microalga *Chlorella vulgaris* for biomass and lipid production using pure and crude glycerol as a sole carbon source. *Annals of Microbiology*, 62(3), 987-993. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0338-y>

Cheirsilp, B., Suwannarat, W., & Niyomdech, R. (2011). Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. *New Biotechnology*, 28(4), 362-368. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.01.004>

Conover, W. J. (1998). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley & Sons.

- Cortés-Sánchez, M. D., Gata-Montero, E. M., Papió-Tertero, A., Rivas, Á. R., & Sánchez-Santos, J. M. (2019). Biocombustibles: tipos y estrategias de producción. *MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, (35), 1-6.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; González, L.; Tablada, M. y C.W. Robledo. InfoStat versión (2015). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>.
- 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. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 46(1), 22-32.
- González, J. A., Buedo, S. E., Prado, F. E., & Álvarez, S. (2018). Efecto de la vinaza sobre el crecimiento y productividad de la Soja (*Glycine max*) en condiciones semicontroladas. *Boletín de la Sociedad Argentina de botánica*, 53(4), 597-608.
- Hammer, O.; Harper, D.A.T. y P.D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4(1): 1-9.
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583-621. <https://doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>
- Ling, J., Nip, S., Cheok, W. L., de Toledo, R. A., & Shim, H. (2014). Lipid production by a mixed culture of oleaginous yeast and microalga from distillery and domestic mixed wastewater. *Bioresource Technology*, 173, 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.047>
- Ling, J., Nip, S., & Shim, H. (2013). Enhancement of lipid productivity of *Rhodospiridium toruloides* in distillery wastewater by increasing cell density. *Bioresource Technology*, 146, 301-309. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.023>
- Marchetti, J. M., Miguel, V. U., & Errazu, A. F. (2007). Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11(6), 1300-1311. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2005.08.006>
- Nautiyal, P., Subramanian, K. A., & Das-tidar, M. G. (2014). Production and characterization of biodiesel from algae. *Fuel Processing Technology*, 120, 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2013.12.003>
- Qin, L., Liu, L., Wang, Z., Chen, W., & Wei, D. (2019). The mixed culture of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and yeast *Yarrowia lipolytica* for microbial biomass production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(9), 1409-1419. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02138-1>
- Qin, L., Wang, Z., Sun, Y., Shu, Q., Feng, P., Zhu, L., Xu, J., & Yuan, Z. (2016). Microalgae consortia cultivation in dairy wastewater to improve the potential of nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9), 8379-8387. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-6004-3>

- Qin, L., Wei, D., Wang, Z., & Alam, M. A. (2018). Advantage Assessment of Mixed Culture of *Chlorella vulgaris* and *Yarrowia lipolytica* for Treatment of Liquid Digestate of Yeast Industry and Cogeneration of Biofuel Feedstock. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(3), 856-869. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2854-8>
- Ramos, F. D.; Díaz, M. S., & Villar, M. A. (2016). Biocombustibles. *Ciencia Hoy*, 25(147), 69-73. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/25791>
- Santana, H., Cereijo, C. R., Teles, V. C., Nascimento, R. C., Fernandes, M. S., Brunale, P., Campanha, R. C., Soares, I. P., Silva, F. C. P., Sabaini, P. S., Siqueira, F. G., & Brasil, B. S. A. F. (2017). Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. *Bioresource Technology*, 228, 133-140. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.075>
- Silveira-Font, Y., Gómez-Luna, L., Kufundala-Wemba, M. D., Salazar-Hernández, D., & Ortega-Díaz, Y. (2018). Variación de la composición de pigmentos de *Chlorella vulgaris* Beijerinck, con la aplicación del campo magnético estático. *Revista Cubana de Química*, 30(1), 55-67.
- Starr, R. C., & Zeikus, J. A. (1993). UTEX—The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin 1993 List of Cultures 1. *Journal of Phycology*, 29(s2), 1-106. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1993.00001.x>
- Valeiro, A. & Portocarrero, R. (2017). EEA INTA Famaillá. Gestión de las Vinazas Sucro-Alcoholeras en Brasil. INTA Ediciones. [Fecha de consulta: 29 de junio de 2018] Disponible en: [https://inta.gov.ar/sites/default/files/inta\\_gestion\\_vinazas\\_brasil.pdf](https://inta.gov.ar/sites/default/files/inta_gestion_vinazas_brasil.pdf)
- Xue, F., Miao, J., Zhang, X., & Tan, T. (2010). A New Strategy for Lipid Production by Mix Cultivation of *Spirulina platensis* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(2), 498-503. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8376-z>
- Zeng, Y., Xie, T., Li, P., Jian, B., Li, X., Xie, Y., & Zhang, Y. (2018). Enhanced lipid production and nutrient utilization of food waste hydrolysate by mixed culture of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and oleaginous microalgae *Chlorella vulgaris*. *Renewable Energy*, 126, 915-923. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.04.020>
- Zhao, X., Peng, F., Du, W., Liu, C., & Liu, D. (2012). Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and preparation of biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(6), 993-1004. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0684-6>