

SUPLEMENTO NUTRICIONAL PARA LA FERMENTACION NUTRITIONAL SUPPLEMENT FOR FERMENTATION

Oscar Ganzo Pérez
o.ganzo@grupozuker.com

Resumen

Favorecer la economía de los bioprocesos que emplean levaduras para producir etanol o biomasa para nutrición animal requiere optimizar las etapas tempranas de propagación previas a la fermentación. El manejo adecuado de las variables de proceso y de las condiciones anaerobias, junto con un balance adecuado de los azúcares asimilables, del N, P, Mg y K, y el uso del Promotor de Crecimiento Microbiano (PCM) ZUKER QZ-350A (ZUKER S.A. de C.V., México) en la propagación de las levaduras *Candida utilis* y *Saccharomyces cerevisiae* resultó en importantes mejoras en la propagación y en los procesos fermentativos finales. En Cuba, en la propagación de *C. utilis*, el uso del PCM ZUKER QZ-350A con vinazas, sustituyó el uso de melazas, permitiendo una reducción del costo de operación del 30% o del 20% comparado con cuando fue empleada una mezcla 80:20 melazas-vinazas con iguales propósitos por el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Adicionalmente, en las fermentaciones para producir alcohol a partir de *S. cerevisiae*, los resultados obtenidos por el ICIDCA con el uso del PCM ZUKER QZ-350A en concentraciones de 0.03 y 0.05 g/L y más recientemente en México en las destilerías Fabricación de Alimentos Tenerife S.A. de C.V. y Destiladora de Alcoholes y Mieles S.A. de C.V. empleando concentraciones de 0.03 y 0.1 g/L, mostraron que se logró una mayor asimilación de los azúcares en el proceso y mejoras en las riquezas alcohólicas del orden del 5 al 7%.

Palabras clave: etanol, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, riqueza alcohólica, levadura forrajera.

Abstract

Favoring the economics of the bioprocesses involving yeasts to produce ethanol and biomass for animal feeding requires the optimization of the early stages of cell propagation before final fermentation. The appropriate handling of the process variables and the anaerobic conditions, the balance between sugars and N, P, Mg, K and the use of the Microbial Growth Enhancer (MGE) ZUKER QZ-350A (ZUKER S.A. de C.V., México) during *Candida utilis* and *Saccharomyces cerevisiae* propagation steps resulted in important improvements in cells propagation and final fermentation processes. In Cuba, by using PCM ZUKER QZ-350A with vinasses from ethanol distillation during *C. utilis* propagation steps, a reduction of 30 and 20% of the operational costs were achieved when cane molasses was eliminated or a mixture of 80:20 cane molasses and vinasses was employed respectively, at the Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). In addition, concentrations of 0.03 and 0.05 g/L, and 0.03 and 0.1 g/L of the MGE ZUKER QZ-350A at the ICIDCA and more recently at the distilleries Fabricación de Alimentos Tenerife S.A. de C.V. and Destiladora de Alcoholes y Mieles S.A. de C.V. in Mexico respectively, allowed an additional improvement of 5-7% on the alcoholic content during fermentations to produce ethanol by *S. cerevisiae*.

Key words: ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, alcoholic wealth, fodder yeast.

Introducción:

Los bioprocesos que emplean microorganismos para obtener compuestos de interés económico se caracterizan por seguir una estrategia en la cual, las células se reproducen en distintas etapas, con la peculiaridad, de que los volúmenes de trabajo de las mismas se multiplican paulatinamente hasta llegar al volumen final de producción. Las etapas previas iniciales a este último se conocen como etapas de propagación y a la etapa final se le denomina fermentación (Atkinson *et al.* 1991). La economía de estos bioprocesos depende de optimizar ambas, para obtener, en la primera, la cantidad de biomasa adecuada para comenzar la producción y en la última, la mayor concentración de producto recuperable posible. Satisfacer ambos propósitos en el tiempo mínimo conduce a maximizar la productividad y disminuir los costos operativos, lo que sin dudas constituye el objetivo fundamental de cualquier instalación industrial. Las producciones de alcohol y de proteína unicelular para alimentación animal a partir de levaduras siguen esta estrategia, común a cualquier proceso biotecnológico.

En los últimos tiempos, el interés en la producción de etanol se ha ido incrementando. Este alcohol, entre otras aplicaciones, ha demostrado ser un excelente combustible para motores y sus volúmenes de producción han ido aumentando en los últimos años. Esta tendencia, previsiblemente se mantendrá invariable en el futuro próximo. De los 121 países que producen azúcar actualmente, 58 de ellos también producen etanol a partir de subproductos de la caña de azúcar, lo que significa que el 48% de la producción mundial de alcohol tiene su origen en la agroindustria azucarera (Saura *et al.* 2010). Por otra parte, la producción de levaduras como fuente de proteína unicelular para alimento animal a partir de subproductos y residuos de la agroindustria azucarera ha demostrado efectividad y constituye un modo de reciclar compuestos con cierto valor nutricional, que de otra manera requerirían un tratamiento como residuos, a menudo costoso, antes de poder ser reincorporados al medio ambiente.

Los incrementos en la producción de etanol y el interés en el aprovechamiento de los residuos de la industria azucarera en su bioconversión en la producción de levadura forrajera, justifican que el Zuker S.A. de C.V. (Zuker) entrene y asesore a los fabricantes en la aplicación de sus productos de la SERIE 300, “Probióticos”, cuya finalidad es la de mejorar los procesos de propagación celular y de fermentación que involucran a levaduras.

El Promotor de Crecimiento Microbiano (PMC ZUKER QZ-350A), de la SERIE 300, es una mezcla de compuestos nutrientes balanceada, formulada a base de sales de nitrógeno y fósforo, que incluye además otra base proteica, probióticos y oligoelementos esenciales para los cultivos. El PMC ZUKER QZ-350A enriquece y complementa los medios que se emplean en las destilerías y las plantas de fabricación de levadura forrajera durante la propagación celular y la fermentación y ha sido utilizado durante más de 10 años en fermentaciones, aportando sus beneficios como sustituto de las melazas de caña y/o permitiendo mejorar los rendimientos de las fermentaciones alcoholeras.

Este trabajo muestra los resultados de estudios de aplicación del PMC ZUKER QZ-350A llevados a cabo por el Instituto Cubano de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), asesorado por Quimizuk S.A. (sociedad participada a partes iguales por el desaparecido Ministerio del Azúcar de Cuba (MINAZ) y el Zuker S.A. de C.V., de México) y por técnicos de Zuker en las destilerías, Fabricación de Alimentos Tenerife S.A. de C.V. y Destiladora de Alcoholes y Mieles S.A. de C.V. en las etapas de propagación de *Candida utilis* para fabricar levadura forrajera y en producción de alcohol a partir de *Sacharomyces cerevisiae*, respectivamente.

Materiales y Métodos:

Microorganismos.

En todos los estudios de aplicación del PMC ZUKER QZ-350A en las etapas de propagación de la levadura forrajera realizados por el ICIDCA se utilizó la cepa *C. utilis* NRRL Y-660, (Instituto Pasteur, París, Francia), que es habitualmente utilizada por la industria, en Cuba. En cambio, las cepas de *S. cerevisiae* Turbo yeast (Gert Strand AB, Malmö, Suecia) y Safdistil Plus (levadura híbrida, FERMENTIS, S. I. Lesaffre, Cedex, Francia) fueron empleadas para los trabajos de evaluación del PMC ZUKER QZ-350A durante la propagación y producción de alcohol por el ICIDCA y por las compañías Fabricación de Alimentos Tenerife S.A. de C.V. y Destiladora de Alcoholes y Mieles S.A. de C.V.

Medios de cultivo.

Los inóculos de *C. utilis* fueron preparados a partir de cuñas de agar-malta, a pH 4.5 e incubados a 32°C durante 24 horas. Los medios de cultivo utilizados en la evaluación del PMC ZUKER QZ-350A durante la propagación de *C. utilis* se prepararon a partir de mezclas de melazas y vinazas procedentes de destilerías como fuente de carbono y energía, en las proporciones: 85:15; 80:20 y 70:30, expresado como aporte de DQO (Otero *et al.* 2009, Saura *et al.* 2010). El análisis a la DQO, se estimó por reflujo de una mezcla de oxidación de la muestra en presencia de dicromato de potasio. Los experimentos que estudiaron el efecto de sustitución total de melaza por el PMC QZ-350A emplearon concentraciones del producto de 0.01, 0.03 y 0.05 kg/m³.

Ambas cepas de *S. cerevisiae*, en condiciones de planta piloto e industriales, fueron reconstituidas en las condiciones y concentraciones sugeridas por los suministradores y posteriormente propagadas en condiciones aeróbicas adecuadas con temperaturas y pH controlados en rangos entre 30-32°C y 3.5-4.0, respectivamente. Los medios de cultivo emplearon melazas como fuente de carbono y energía que aportaron concentraciones de Azúcares Reductores Totales (ART) superiores a 30 g/L, y fueron suplementados con urea, sulfato amónico, fosfato di-amónico y en aquellos ensayos que evaluaron el efecto del PMC QZ-350A con la adición de 0.03, 0.05, 0.075 y 0.1 g/L (kg/t). Los medios de cultivo empleados en la producción de alcohol ensayados por el ICIDCA emplearon además combinaciones de otros subproductos procedentes de los ingenios como jugo mezclado, jugo de los filtros y melazas, cuya composición diaria fue obtenida a partir de los datos del laboratorio de la empresa mielera “Heriberto Duqueste” de Villa Clara, Cuba (Saura *et al.* 2010). En la evaluación de la producción de alcohol en las compañías Fabricación de Alimentos Tenerife S.A. de C.V. y Destiladora de Alcoholes y Mieles S.A. de C.V., los medios de cultivo emplearon además de las sales anteriores, melazas y jugo de caña por separado o en combinación para ajustar la concentración inicial de ART.

Caracterización de las vinazas de destilería.

Los análisis para la caracterización de las vinazas de destilería fueron realizados por los laboratorios del ICIDCA. Brevemente, las cenizas se determinaron por incineración a 450 °C y se expresaron como carbonatos. El nitrógeno orgánico se determinó según Kjeldahl en un 1030 Kjeltec Auto System (Tecator AB, Höganäs, Sweden) y el fósforo se cuantificó por el método vanadato-molibdato de amonio y se leyó 415 nm (Otero *et al.* 2009).

Resultados y Discusión:

Uso del PMC ZUKER QZ-350A en la propagación de C. utilis para producir levadura forrajera.

La composición típica de las vinazas empleadas en la formulación de los medios de cultivo se muestra en la tabla I. Las vinazas de destilería pueden ser recicladas como medio de propagación en la producción de levadura forrajera, mezcladas en diferentes proporciones con melaza como suplemento de probióticos.

Tabla I. Composición típica de las vinazas de destilerías

INDICADOR	Vinazas
Brix, °bx	6.5-10.0
pH	4.0-4.7
Sólidos totales, %	5-8.5
Cenizas, %	1.5-3.2
DBO5, 20°C	18 000-25 000
Acidez volátil	0.185-0.365
Ácido láctico, %	0.312-0.401
Nitrógeno orgánico, %	0.11-0.25
SRT, %	0.9-1.8
Fósforo (P2O5), %	0.07-0.091
Mg, %	0.11-0.15

En las fermentaciones de *C. utilis*, las mezclas de vinazas y melazas empleadas permitieron alcanzar velocidades máximas de crecimiento (μ_{max}) de 0.338 h⁻¹ y 0.429 h⁻¹ para las proporciones 85:15 y 70:30 respectivamente (Tabla II). Tanto la μ_{max} como el rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$) se incrementaron en la medida que aumentó la proporción de melazas en la mezcla (Otero *et al.* 2009). Desde el punto de vista ecológico, sin embargo, proporciones menores de melazas contribuyeron a una mayor degradación de la materia orgánica. La adición del PMC ZUKER QZ-350A a los medios de cultivo en cambio, condujo a valores ligeramente más bajos para la velocidad máxima de crecimiento y el rendimiento, pero contribuyeron en mayor medida a la degradación de la materia orgánica, lo cual aporta un beneficio considerable desde un punto de vista ecológico.

Tabla II. Cinética de crecimiento de *C. utilis* en las mezclas vinazas-melazas

Fuente de C ¹	μ_{max}	Y x/s	Reducción de DQO %
70:30:00	0,429	0,382	38,90
80:20:00	0,391	0,323	39,37
85:15:00	0,338	0,325	41,90
PCM 0,03 g/L	0,274	0,307	65,32
PCM 0,05 g/L	0,278	0,315	64,28

¹ Vinazas - melazas (expresados como aporte de DQO)

La hipótesis de que el aporte de sustancias probióticas de la melaza podría ser sustituida por la adición del PMC ZUKER QZ-350A fue corroborada en una serie de experimentos que emplearon una mezcla del producto en una concentración de 0.03 kg/m³ con vinaza de destilerías. Los estudios realizados a escala de laboratorio, y posteriormente a escala industrial, reprodujeron comportamientos similares a los obtenidos en las fermentaciones cuando fueron empleadas melaza o una mezcla melaza-vinaza en la proporción 80:20, como fuente de carbono (Saura *et al.* 2010). Sin embargo, los beneficios económicos conseguidos, con un ahorro del 30 y el 20% respectivamente en los costos de operación (Tabla III),

condujeron a establecer que las tres plantas que actualmente producen levadura forrajera en Cuba, utilicen como medio de propagación el que emplea vinazas con PCM ZUKER QZ-350A como sustituto de las melazas.

Tabla III. Consumos de materias primas, materiales y energía, y costo de operación asociados al empleo de distintos medios de cultivo en la propagación de la levadura forrajera *C. utilis*.

	Melaza	Vinaza-melaza 80:20	PMC ZUKER-350A – Vinazas
Melaza (52% ART) (t/t)	4.3	1.3	0
H ₂ SO ₄ (98%) (kg/t)	0.8	160	100
Urea (kg/t)	50	0	0
NH ₄ SO ₄ (kg/t)	250	300	300
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (kg/t)	90	90	90
Antiespumante (kg/t)	10	8	8
Petróleo (t/t)	0.6	0.6	0.6
Electricidad (kW-h/t)	1450	1450	1450
Agua de proceso (m ³ /t)	100	80	60
PCM ZUKER QZ-350A (kg/t)	0	0	3
Costo de producción	348	299	248

Uso del PMC ZUKER QZ-350A en la producción de alcohol.

La producción de etanol en las destilerías sigue una estrategia que combina etapas de propagación celular en procesos aerobios con una etapa final de fermentación anaeróbica en un cultivo batch para producir etanol. Brevemente, la cinética de un cultivo batch de un microorganismo describe varias fases que se inician con la denominada fase lag o de latencia en la que las células se adaptan a las condiciones del medio y preparan todo su metabolismo para entrar, tras un período de crecimiento acelerado en la fase exponencial. La fase exponencial muestra las velocidades máximas posibles de crecimiento para las condiciones de cultivo establecidas y es en la que, por lo general, la producción y la productividad de los metabolitos primarios también es la máxima posible. La fase lag es una fase relativamente improductiva y es interés en todos los bioprocesos minimizar su duración. La manera más eficaz de lograr este propósito es sembrar el cultivo con un inóculo lo más rico posible en células viables y que estas se encuentren, de ser posible, creciendo en fase exponencial, lo cual garantiza que su fisiología y su capacidad de adaptarse a una nueva condición es la más favorable posible.

En los trabajos desarrollados por el ICIDCA con la cepa *S. cerevisiae* Turbo, se evaluó el efecto de emplear el PCM ZUKER QZ-350A para mejorar la calidad de los inóculos a sembrar en el fermentador de la destilería. En un medio de cultivo en el que la melaza, aportó los ART, ajustados a una concentración de 30 g/L y que tuvo lugar a 30-32°C, pH entre 3.5 y 4.0, con un caudal de aire de 1 vvm y a 450 rpm, la μ_{max} aumentó desde 0.28 hasta 0.31 h⁻¹ con la adición de 0.03 kg/t de PCM ZUKER QZ-350A, lo que condujo a un aumento en la concentración de biomasa al final de la etapa del 6% (Bello *et al.* 2005, Saura *et al.* 2010). En las mismas condiciones aumentar la cantidad del PCM ZUKER QZ-350A suplementada a 0.05 kg/t elevó la concentración celular desde 1.8x10⁸ hasta 2.47x10⁸ células/ml. Desafortunadamente el efecto que tuvo esta mejora en la producción y la productividad de la fermentación alcohólica no ha sido reportado.

En la empresa Destiladora de Alcoholes y Mieles S.A. de C.V., la producción de alcohol comienza con la preparación de la levadura en un tanque propagador de 3.5 m³, desde el cual se inoculan dos cubas madres o pre-fermentadores de 200 m³ de volumen total (CM1 y CM2) y en las que se crece la semilla con la que se siembran los fermentadores denominados cubas hijas (CH1 al 10). Como medio de cultivo durante la fermentación alcohólica se emplea mosto al que se le suplementa con urea, fosfato di-amónico y sulfato de magnesio. Debido a que la producción de biomasa que se obtenía en los pre-fermentadores no alcanzaba la concentración mínima de 1.5×10^8 células/ml, inocular el fermentador de producción requería sembrar con un volumen de semilla de 120 m³, que era completado con 150 m³ de mosto para llevar a cabo la fermentación.

Durante dos períodos de tiempo a principios de 2016, se evaluó el efecto que sobre la calidad de la producción tuvo la adición del PCM ZUKER QZ-350A. La figura 1 muestra el comportamiento obtenido para la riqueza alcohólica (RA), la concentración de azúcares reductores residual (ARR) y la población de células de levadura (PC-Lx10⁶) tras la adición de 0.05 kg/t del PCM ZUKER QZ-350A para medios de cultivo que emplearon mosto (M), jugo de caña (JC), o mezcla de jugo y mosto (M+JC) para ajustar la concentración inicial de ART.

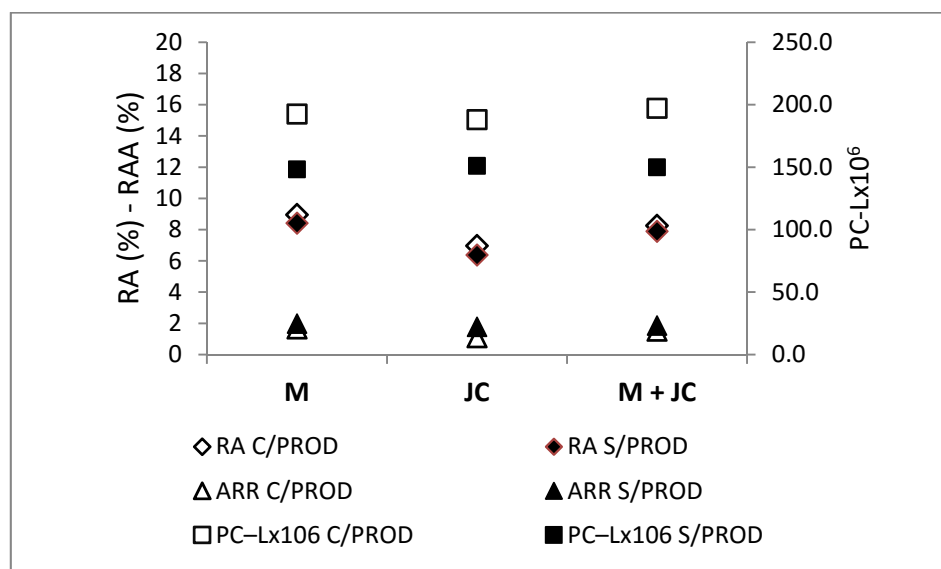


Fig. 1. Efecto sobre la riqueza alcohólica (RA), los azúcares reductores residuales (ARR) y la población celular de levadura (PC-Lx10⁶) de la adición de 0.05 kg/t del PCM ZUKER QZ-350A a los medios de cultivo que emplearon mosto (M), jugo de caña (JC) y mezcla de mosto y jugo de caña (M+JC). Los puntos en el gráfico representan el promedio de la variable medida durante los dos períodos de prueba realizados en la destilería entre los meses de enero y febrero de 2016.

Con independencia de la composición del medio de cultivo, en todos los casos, la adición del PCM ZUKER QZ-350A aumentó la riqueza alcohólica de la fermentación, disminuyó la cantidad de azúcares reductores residuales y aumentó la población de células de levadura. Desde el punto de vista económico estos efectos se tradujeron en un incremento de la RA de un 6.7% en las fermentaciones que consiguieron aumentar la producción de etanol en 4 224.5 y 6 833.3 L/diarias y disminuir los consumos de mosto en 49 639.9 y 14 639.7 L/diarios durante los dos períodos de prueba que tuvieron lugar (Tabla IV).

Tabla IV. Efecto técnico-económico de la aplicación del PCM ZUKER QZ-350A sobre la producción de etanol durante los dos períodos de aplicación en la empresa Destiladora de Alcoholes y Mieles S.A. de C.V.

	Riqueza Alcohólica (%)	Mosto consumido (L/día)	Alcohol producido (L/día)	Cubas destiladas (No./día)
Primer período de pruebas				
Sin PCM	7.87	1 492 665.41	122 048.76	5.29
Aplicando PCM	8.40	1 443 025.50	126 273.25	5.48
Segundo período de pruebas				
Sin PCM	7.66	1 460 515.96	116 545.67	5.56
Aplicando PCM	8.18	1 445 876.25	123 379.00	5.60

Conclusiones.

En Cuba el PCM ZUKER QZ-350A se aplica desde hace más 10 años en la propagación de levaduras en los procesos de fabricación de levadura para nutrición animal y en las destilerías, habiéndose logrado excelentes resultados en ambas producciones.

En México la empresa de Fabricación de Alimentos Tenerife S.A. de C.V. ha incluido el producto en su recetario para la producción de alcohol, y realiza otros ensayos enfocados a otras áreas de oportunidades, donde también estudia el uso del PCM ZUKER QZ-350A.

En la actualidad están en curso pruebas en otras dos destilerías de México; una de ellas ya en una tercera y última etapa de evaluación industrial, con resultados excelentes. En la otra, a escala piloto, se aspira a alcanzar igualmente resultados satisfactorios.

Bibliografía:

- A. Atkinson, F. Mavituna, Upstream Processing, in: A. Atkinson, F. Mavituna (Eds.), Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook, Second Edition, Macmillan Publishers Ltd., NY, 1991, pp. 831-872.
- Bello, Daniel, García, Roxana, Otero, Miguel A., Saura, Gustavo, Fermentación alcohólica con jugo de caña mezclado en Heriberto Duquesne ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar [en línea] 2005, XXXIX (Mayo-Agosto) : [Fecha de consulta: 2 de junio de 2016] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120661006> ISSN 0138-6204
- Saura, Gustavo, Martínez-Valdivieso, Julio A., Otero, Miguel A., Propagación de levadura Candida utilis a partir de vinazas de destilación de etanol y sus componentes individuales ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar [en línea] 2010, 44 (Septiembre-Diciembre) : [Fecha de consulta: 2 de junio de 2016] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120684005> ISSN 0138-6204
- Saura, Gustavo, Vasallo, María C., Otero-Rambla, Miguel A., Pérez, María C., García, Roxana, Bello, Daniel, Martínez, Julio A., Producción de bioetanol a partir de mezclas de jugos-melazas de caña de azúcar ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar [en línea] 2009, XLIII (Enero-

Abril) : [Fecha de consulta: 2 de junio de 2016] Disponible
en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120657003>> ISSN 0138-6204

- Martínez, J.A.; Otero, M.A.; Saura, G.; Valdés, I.F. Utilization of yeast nutrient.

- QZ-350 as substitute of cane molasses in fodder yeast production Wrap up Meeting of Project PGTF INT04/K04. Mexico DF, March 8-10, 2005. 2. Saura, G.; Otero, M.A.; Martínez, J.A.; Fundora, N.; Reyes, E.; Vasallo, M.C.; Almazán, O.A. Propagation of yeast biomass from distillery wastes. Process and product evaluation Int. Sug. J. (U.K.) 105 (1249): p. 36-39.

Referencias:

Dr. Gustavo Saura Laria, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Habana, Cuba. Teléfono: (+537) 557015, 986501, Email: saura@icidca.azcuba.cu

Ing. Mariano Méndez Velazquez, Fabricación de Alimentos Tenerife S.A. de C.V, Veracruz, México
Teléfono: (+52) 272 7287506 Ext. 128, Email: mendezv@grupobaltico.com

Ing. Carlos M. Mujica Dominguez, Destiladora de Alcoholes y Mieles S.A. de C.V. (DAYMIEL),
Teléfono: (+52) 271 7170232 Ext. 111, Email: superintendencia@daymiel.com.mx