

Optimización de la sacarificación de productos amiláceos para la producción de bioetanol

Optimization of the saccharification of starchy products for the production of bioethanol

MÉNDEZ-CARRETO, Carlos†*, BRIONES-PÉREZ, Ana Isabel, SANDOVAL-SALAS, Fabiola y PÉREZ-SALAS, Anyuli

Instituto Tecnológico Superior de Perote

ID 1^{er} Autor: *Carlos, Méndez-Carreto* / ORC ID: 0000-0002-2897-4453, CVU CONACYT ID: 227409

ID 1^{er} Coautor: *Ana Isabel, Briones-Pérez* / ORC ID: 0000-0003-3389-9027

ID 2^{do} Coautor: *Fabiola, Sandoval-Salas* / ORC ID: 0000-000-1-9267-4974, CVU CONACYT ID: 71814

ID 3^{er} Coautor: *Anyuli, Pérez-Salas* / CVU CONACYT ID: 471275

Recibido 2 de Abril, 2018; Aceptado 1 de Junio, 2018

Resumen

Con la finalidad de proponer un proceso para la producción de bioetanol a partir de sustratos amiláceos, en este trabajo se optimizó la hidrólisis y sacarificación de almidón de papa mediante el uso de una cepa de *Aspergillus niger*. Se utilizó un arreglo de superficie de respuesta, en el que las variables independientes fueron pH (4 y 5), temperatura (25°C y 35°C) y velocidad de agitación (200 rpm y 300 rpm). Los experimentos se realizaron a escala de matraz de 1 L con 250 mL de suspensiones de harina de papa (100 g de harina/L) suplementadas con medio mineral y suspensiones de esporas de *A. niger* de 1×10^5 esporas/mL. Los experimentos se realizaron por duplicado. La variable de respuesta fue el rendimiento de los azúcares reductores medidos por espectrofotometría. Como principal contribución se obtuvo un modelo estadístico que optimiza el rendimiento de azúcares reductores respecto al sustrato, encontrando que la interacción de la temperatura (35°C) y la velocidad de agitación (200 rpm), tienen un efecto positivo sobre la productividad de los azúcares reductores ($1.71 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$).

Bioetanol, Sacarificación, Optimización

Citación: MÉNDEZ-CARRETO, Carlos, BRIONES-PÉREZ, Ana Isabel, SANDOVAL-SALAS, Fabiola y PÉREZ-SALAS, Anyuli. Optimización de la sacarificación de productos amiláceos para la producción de bioetanol. Revista de Tecnologías en Procesos Industriales. 2018, 2-3: 27-32

Abstract

In order to proposing a process for the production of bioethanol from starchy substrate, in this work the hydrolysis and saccharification of potato starch was optimized by using an *Aspergillus niger* strain. A response surface arrangement was used, in which the independent variables were pH (4 and 5), temperature (25 ° C and 35 ° C) and agitation speed (200 rpm and 300 rpm). The experiments were carried out at a 1 L flask scale with 250 mL of potato flour suspensions (100 g flour / L) supplemented with mineral medium and suspensions of *A. niger* spores of 1×10^5 spores / mL. The experiments were performed in duplicate. The response variable was concentration of reducing sugars measured by spectrophotometry. The main contribution was a statistical model that optimizes the yield of reducing sugars with respect to the substrate, where interaction of temperature (35°C) and agitation speed (200 rpm) have a positive effect on reducing sugar productivity (1.71 g/L/h).

Bioethanol, Saccharification, Optimization

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: cmendezc@gmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

La tecnología para la producción de etanol a partir de materias primas amiláceas involucra tres etapas: (1) licuefacción: proceso hidrolítico en donde los gránulos de almidón se hidratan y se dilatan en condiciones de alta temperatura y donde las enzimas amilolíticas (α -amilasa) producen maltodextrinas (Alvis *et al.*, 2008); las α -amilasas son enzimas producidas por plantas, animales y microorganismos. Entre los principales microorganismos productores se encuentran las bacterias del género *Bacillus sp.*, destacando las productoras de amilasas termoestables tales como *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*. Algunas especies de hongos pertenecientes al género *Aspergillus* tales como *A. niger* y *A. oryzae* también han mostrado ser buenos productores de enzimas α -amilasas (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006). Su acción da lugar a la formación de glucosa, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentosa y maltohexosa. (2) sacarificación: proceso enzimático en donde enzimas glucoamilolíticas (glucoamilasas o también conocidas como amiloglucosidasas) hidrolizan los enlaces carboxílicos terminales de las moléculas de maltodextrinas a glucosa; (3) fermentación: transformación de azúcares fermentables, producto de la hidrólisis del almidón (maltosa y glucosa), en etanol (Lizarazo *et al.*, 2015). Esta transformación se da mediante el uso de diferentes microorganismos entre los que se encuentran bacterias, levaduras y hongos, donde el más utilizado es el género *Saccharomyces*. La integración de los procesos de sacarificación del almidón y fermentación disminuye los costos de operación aunque el control de los parámetros es más complejo que cuando se presentan los procesos de manera secuencial (Cardona y Sánchez, 2007).

El interés en la producción de bioetanol se ha incrementado en los últimos años debido a que su utilización es una fuente alternativa de combustible y a que se produce de recursos agrícolas renovables y de bajo costo. Las fluctuaciones recientes en el costo de los combustibles fósiles convencionales han creado una atmósfera para que investigadores e industriales se aventuren en la producción de etanol de diferentes fuentes empleando nuevas tecnologías (Manikandan y Viruthagiri, 2009).

El alto rendimiento etanol en tiempos de fermentación es uno de los factores industriales más relevantes, económicamente. Este factor depende del tipo de cepa de levadura que se emplee, el sistema de proceso, la densidad celular, la temperatura y la concentración de azúcar, nutrientes y factores de crecimiento que se utilicen en el medio (Laluce *et al.*, 2009). Los sustratos amiláceos más utilizados para su bioconversión en etanol son el almidón de maíz, que es ampliamente utilizado, seguido del almidón de trigo, arroz y papa (Whitehurts *et al.*, 2002).

Una opción atractiva para la bioconversión, es el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS), donde las enzimas hidrolíticas y microorganismos fermentativos están en el mismo reactor, este sistema tiene la ventaja de reducir las operaciones del proceso con el consecuente ahorro de tiempo, equipo y energía. (García y Garza, 2016).

El empleo de co-cultivos de las cepas de *A. niger* y *S. cerevisiae* para hidrolizar almidón y producir etanol eficientemente las hacen aptas para incluirlas en el desarrollo de un proceso integral que considere menos operaciones y mayores rendimientos que los obtenidos hasta ahora (Izmirliglu y Demirci, 2017). El empleo de harina cruda para la fermentación alcohólica representa un ahorro energético y económico, debido a que se eliminan las etapas de extracción de almidón, la gelificación y la hidrólisis a altas temperaturas (Mu *et al.*, 2015).

La investigación y los resultados obtenidos hasta el momento permiten inferir que el desarrollo del sistema SFS a partir de harina de papa es potencialmente factible.

Metodología a desarrollar

Material biológico

Se utilizó una cepa microbiana de *Aspergillus niger* ITV18, obtenida del Laboratorio de Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Veracruz, México y conservada en medio de cultivo de Papa Dextrosa Agar (PDA).

Obtención de harina de papa

Para este trabajo se emplearon papas frescas de la variedad Tolloca cosechadas en la región del valle de Toluca, Estado de México. Para la obtención de la harina, las papas frescas se lavaron, se cortaron en rodajas y se sumergieron en una solución de ácido tartárico al 0.3 %. Posteriormente, se secaron durante 24 horas a 60 °C en un horno de charolas (Horno Jersa, modelo L, serie 019/03) y se molieron hasta obtener un polvo fino.

Inoculación

Las esporas empleadas para iniciar los cultivos de *A. niger* se obtuvieron mediante una suspensión de Tween 80 al 1% estéril aplicada sobre la superficie del hongo crecido en cajas Petri y/o tubos de cultivo. Se tomó una muestra y se realizó el conteo de esporas de la suspensión 1×10^5 esporas/mL (36 h de incubación) empleando la cámara de Neubauer. Posteriormente se calculó el volumen de suspensión para inocular los matraces y alcanzar la concentración inicial deseada.

Software

Empower v. 2.0

Efecto del pH, temperatura y agitación sobre la hidrólisis de almidón

Se emplearon matraces Erlenmeyer de 1000 mL con 250 mL de medio de cultivo AN (1 gL⁻¹ de peptona, 1 gL⁻¹ de extracto de malta, 2 gL⁻¹ de extracto de levadura, 1 gL⁻¹ de MgCl₂, 1 gL⁻¹ de CaCl₂, 2 gL⁻¹ de (NH₄)₃PO₄ y 0.01 gL⁻¹ de Fe₂(SO₄)₃) de acuerdo a lo reportado por Abouzied y Reddy (1986), adicionado con 100 gL⁻¹ de harina de papa. Se utilizó un arreglo de superficie de respuesta, en el que las variables independientes fueron pH (4 y 5), temperatura (25°C y 35°C) y velocidad de agitación (200 rpm y 300 rpm). El pH del medio de cultivo se ajustó con HCl. Se incubaron bajo las diferentes velocidades de agitación durante 36 horas con muestreos cada 3 horas para cuantificación de la concentración de azúcares reductores mediante el método de DNS (Miller, 1959).

Resultados

Efecto del pH, temperatura y agitación sobre la hidrólisis de almidón

En la Figura 1, se observa el efecto de cada uno de las variables evaluados sobre la productividad de los azúcares reductores, donde la temperatura y la velocidad de agitación afectan directamente el proceso de hidrólisis del almidón.

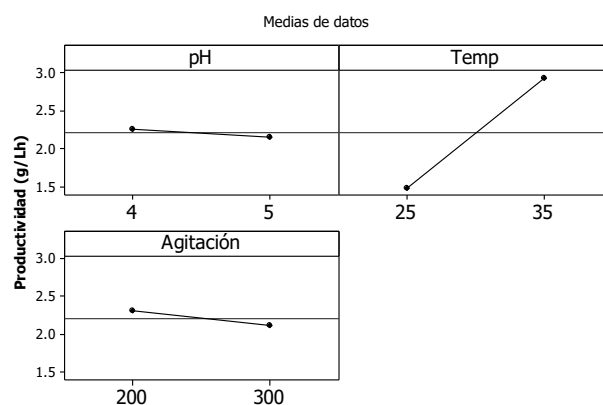


Figura 1 Efecto del pH, temperatura y velocidad de agitación sobre la productividad de azúcares reductores
Fuente: Elaboración Propia

A partir de la Figura 1, se graficó la superficie de respuesta de las variables con mayor efecto en la productividad de azúcares reductores, temperatura y velocidad de agitación, donde se observa que el incremento de la temperatura a una menor velocidad de agitación se obtienen los mejores rendimientos de azúcares reductores, incrementando el rendimiento de los azúcares reductores de 0.36 gg_{sustrato}⁻¹ a 0.45 gg_{sustrato}⁻¹ (Figura 2).

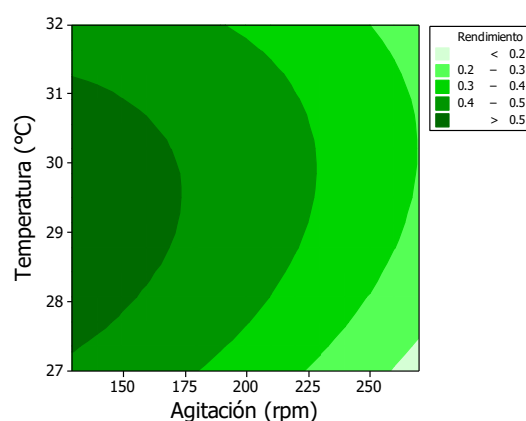


Figura 2 Efecto de la temperatura y velocidad de agitación sobre el rendimiento de azúcares reductores
Fuente: Elaboración Propia

La evaluación del efecto de la interacción de las variables sobre la productividad de azúcares se observa en la Figura 3, que en conjunto con los resultados del modelo estadístico, las condiciones óptimas de la hidrólisis se encontraron a un pH de 5, con una temperatura de 35°C y una velocidad de agitación de 200 rpm, ya que a dichas condiciones se incrementa la productividad de azúcares reductores ($1.71 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$).

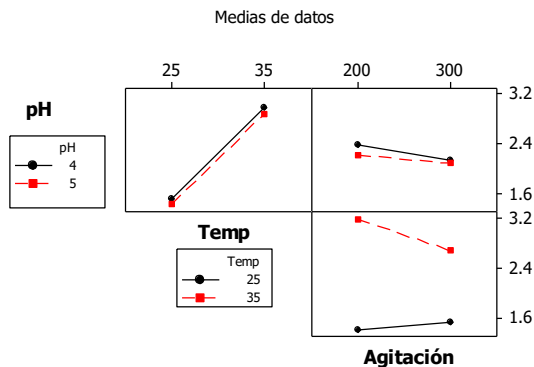


Figura 3 Efecto de la interacción del pH, temperatura y velocidad de agitación sobre la productividad de azúcares reductores

Fuente: *Elaboración Propia*

En un estudio realizado por Hatami *et al.*, (2015), encontraron que las condiciones óptimas de hidrólisis de agua residual de arroz con *A. niger* es a pH de 5, temperatura de 35°C, con una velocidad de agitación de 120 rpm, en un periodo de incubación de 36 h, dichos resultados resultan concordantes con lo reportado en el presente estudio. Los resultados obtenidos también son comparables con los reportados por Jain (2018), donde encontró que las condiciones óptimas de sacarificación de almidón de maíz con *A. niger* es a 32.5°C y un pH de 5.5.

Posteriormente se graficó la superficie de respuesta de la temperatura y velocidad de agitación, la cual se observa en la Figura 4. Al evaluar el efecto de la interacción de la temperatura y la agitación sobre la productividad de azúcares reductores, se tiene que al incrementar la temperatura también se incrementa la productividad de azúcares reductores ($1.71 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$), con una velocidad de agitación de 150 rpm.

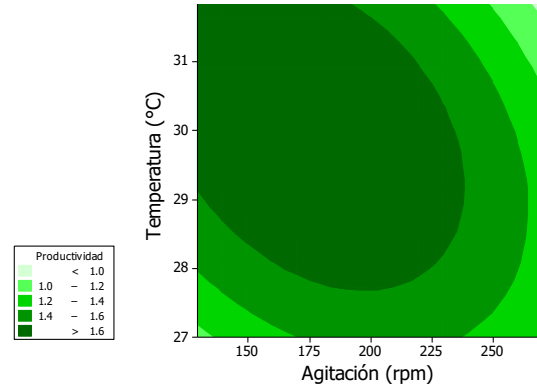


Figura 4 Efecto de la temperatura y velocidad de agitación sobre la productividad de azúcares reductores

Fuente: *Elaboración Propia*

Izmirlioglu y Demirci (2017), estudiaron el proceso de sacarificación sobre residuos de papa utilizando *A. niger*, y encontraron que el aumento en la temperatura tiene un efecto positivo sobre la actividad enzimática en el proceso de sacarificación. Lo cual tiene relación con lo reportado en el presente estudio.

Por otra parte, Lezama (2006), evaluó el efecto de la temperatura y el pH en la sacarificación de almidón de yuca, encontrando una relación directa entre la temperatura y el pH en la sacarificación, incrementando la concentración de azúcares. Mientras que en el presente estudio, la relación pH y temperatura no presentó influencia sobre la productividad de azúcares reductores.

El modelo del efecto de las variables de pH, temperatura y velocidad de agitación sobre la productividad de los azúcares reductores se observa en el Cuadro 2, donde el valor de P (Probabilidad de que $H_0 = 0$) indica que la temperatura, la velocidad de agitación (Agitación) y la interacción Temp*Agitación, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la productividad de azúcares reductores.

Término	Coefficiente	Valor P
Constante	2.2104	0.000
pH	-0.1032	0.336
Temp	1.4626	0.000
Agitación	-0.1906	0.096
pH*Temp	-0.0071	0.946
pH*Agitación	0.0539	0.608
Temp*Agitación	-0.3085	0.016
pH*Temp*Agitac	0.0918	0.390

Tabla 1 Datos estadísticos de la interacción del pH, temperatura y velocidad de agitación sobre la productividad de azúcares reductores

Fuente: Elaboración Propio

Conclusiones

La hidrólisis de almidón de papa mediante *A. niger* fue favorable, ya que el arreglo de superficie de respuesta sobre las variables independientes arrojó que la interacción de la temperatura (35 °C) y la velocidad de agitación (200 rpm) tienen un efecto positivo en la productividad de azúcares reductores (1.71 gL⁻¹h⁻¹). Según lo obtenido por el modelo a dichas condiciones se optimiza el rendimiento de azúcares reductores respecto al sustrato.

Referencias

Abouzied, M. M. y Reedy, A. (1986). Direct fermentation of potato starch to ethanol by cocultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 5 (52):1055-1059.

Alvis, A., Vélez, C. A., Villada, H. S. y Rada-Mendoza, M. (2008). Análisis Físico-Químico y Morfológico de Almidones de Yuca y Papa y Determinación de la Viscosidad de las Pastas. *Información Tecnológica*. 19(1), 19(28):18-28.

Cardona, C. A. y Sánchez, Ó. J. (2007). Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource technology*. 98(12): 2415-2457.

García, V. P. y Garza, G. Y. (2016). Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated cob corn. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*. 5 (9).

Hatami, M., Younesi, H., y Bahramifar, N. (2015). Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of rice cooker wastewater by using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Journal of Applied Research in Water and Wastewater*, 2 (1): 103-107.

Izmirlioglu, G. y Demirci, A. (2017). Simultaneous saccharification and fermentation of ethanol from potato waste by co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors. *Fuel*, 202: 260-270.

Jain, D. (2018). Microbial liquefaction and saccharification of corn starch (Doctoral dissertation, Punjab Agricultural University, Ludhiana).

Laluce, C., Tognolli, J. O., Oliveira, K. F., Souza, C. S. y Morais, M. R. (2009). Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production significant decrease in yeast cell viability. *Biotechnological Products and Process Engineering. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83:627-637.

Lezama-Hernández, S. X. (2006). Determinación a escala de laboratorio de las variables más importantes para la obtención de etanol a partir del almidón de yuca (Bachelor's thesis, Universidad Autónoma de Occidente): 114.

Lizarazo, H., Hurtado, R. y Rodriguez, C. 2015. Análisis técnico económico de la producción de bioetanol a partir de papa a nivel de laboratorio en Boyacá. *Revista colombiana de ciencias hortícolas*. 9 (1): 97-111.

Manikandan, K. y Viruthagiri. (2009). Simultaneous saccharification and fermentation of wheat bran flour into ethanol using coculture of amylolytic *Aspergillus niger* and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus*. *Front. Chem. Eng. China* 3 (3): 240-249.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.

Mu, T. H., Zhang, M., Raad, L., Sun, H. N. y Wang, C. (2015). Effect of α -amylase degradation on physicochemical properties of pre-high hydrostatic pressure-treated potato starch. *PloS one*. 10 (12), e0143620.

Sivaramakrishanan S., Gangadharan D. Nampoothiri K.M., Soccol C.R. y Pandey A. 2006. α -Amylases from microbial sources-An overview on recent developments. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2):173-184.

Whitehurst, R. J. (Ed). (2009). *Enzymes in food technology. John Wiley & Sons.*