

EFFECTO DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO PRODUCIDO POR *Aspergillus oryzae* SOBRE PRODUCCIÓN DE ETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae*

Effect of enzyme complex produced by *Aspergillus oryzae* on production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*

Sánchez-Torres, Liz¹; Otiniano-García, Milly²; Arellano-Barragán, Julio²; Chávez-Castillo, Milciades²; Robles-Castillo, Heber²; Lescano-Sacramento, Lilia¹

RESUMEN

Para determinar el efecto del complejo enzimático producido por *Aspergillus oryzae* CECT 2094 y CECT 2095 sobre la producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de laboratorio, se acondicionaron cuatro sistemas de fermentación empleando botellas con 400 ml de caldo melaza, a las que se adicionó extracto enzimático a las concentraciones de 2, 4, y 6% (v/v), y un control sin extracto enzimático. Los sistemas fueron inoculados con *S. cerevisiae* e incubados a temperatura ambiente durante 48h. en condiciones de anaerobiosis, luego se procedió a medir la concentración de alcohol expresada en porcentaje, en cada uno de los sistemas de fermentación. El mayor porcentaje de alcohol se obtuvo en el tratamiento con 4% de extracto enzimático, con una media de 4,47% de alcohol y una biomasa final de $1,36 \times 10^8$ cel/ml a diferencia del control en el que se obtuvo 3,73% de alcohol y la biomasa final de $9,92 \times 10^7$ cel/ml. En todos los tratamientos se observó una disminución del Brix (14 a 6,57°B). Se concluye que el complejo enzimático producido por *A. oryzae* tiene efecto positivo sobre la producción de etanol por *S. cerevisiae* en condiciones de laboratorio.

Palabras clave: *Aspergillus oryzae*, complejo enzimático, producción de etanol.

ABSTRACT

In order to determine the effect of the concentration of the enzyme complex produced by *Aspergillus oryzae* CECT 2094 and CECT 2095 on the production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in laboratory conditions, four fermentation's systems were conditioned using bottle with 400 ml molasses broth, which was added enzymatic extract at concentrations of 2, 4, and 6% (v / v) and a control without enzyme extract. The systems were inoculated with *S. cerevisiae* and incubated at environment temperature for 48hrs under anaerobic conditions, then it was proceeded to measure the concentration of alcohol expressed in percent in each of the fermentation systems. The highest percentage of alcohol was obtained in the treatment with 4% extract enzyme, with an average of 4,47% alcohol and a biomass at the end of $1,36 \times 10^8$ cells / ml as opposed to the control which was obtained 3,73% and its biomass at the end of fermentation was $9,92 \times 10^7$ cel / ml. In all treatments was observed a decrease of the Brix (14 a 6,57°B). The conclusion was that the enzyme complex produced by *A. oryzae* has an positive effect on ethanol production by *S. cerevisiae* under laboratory conditions.

Key words: *Aspergillus oryzae*, enzyme complex, ethanol's production.

Presentado el 27.05.2010 aceptado el 08.11.2013

Egresadas de la Escuela de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo¹. Docentes del Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo².

INTRODUCCIÓN

El biocombustible más importante es el alcohol carburante (etanol) el cual permite un aumento del índice de octano y mayor contenido de oxígeno; por lo tanto, la reducción del consumo y de la contaminación (10 a 15% menos de monóxido de carbono e hidrocarburos)¹. Así mismo, el etanol podría sustituir al metil ter-butil éter (MTBE) para reducir las emisiones de CO₂², acción muy importante pues el MTBE, por ser un compuesto muy estable de baja degradación y muy soluble en agua, ha resultado ser un contaminante de aguas subterráneas¹.

El etanol es el alcohol etílico producido a partir de la fermentación de los azúcares contenidos

en el almidón de los cereales (trigo, cebada, maíz, sorgo), los tubérculos (papa, yuca), la remolacha y en general, materias provenientes de ligno-celulíticos o de otros residuos orgánicos³. El proceso de obtención es más eficiente en aquellos productos que tienen más azúcar, como la caña de azúcar (jugo de caña o melaza) y el maíz, empleados como la mejor materia prima para los principales productores a nivel mundial como Brasil y Estados Unidos respectivamente¹.

La opción española de producción industrial de bioetanol se ha concretado en la utilización de cereales principalmente cebada; en un proceso que sigue los siguientes pasos: transformación del almidón del cereal en glucosa (hexosa), fermentación del mosto obtenido por medio de

levaduras, destilación, y deshidratación por medio de tamices moleculares para enriquecer el contenido alcohólico².

En condiciones anaeróbicas, *Saccharomyces cerevisiae* convierte un mol de hexosa en 2 moles de etanol, 2 moles de adenosín trifosfato (ATP)⁴, y CO₂³; algunas levaduras tienen la ventaja adicional de tolerar concentraciones relativamente altas de etanol (hasta 150g.l⁻¹)³ lo que les permite aumentar su productividad. El proceso de fermentación y su eficiencia para producir etanol depende en alto grado de la acción de levaduras y del sustrato utilizado⁵. En algunos casos es necesario emplear complejos enzimáticos para hidrolizar el almidón y las proteínas residuales, permitiendo generar la fuente de carbono (hexosas) y de nitrógeno (aminoácidos), para conformar las proteínas de la membrana celular (involucradas en el transporte de azúcares y aminoácidos) y de la pared celular encaminada a garantizar la supervivencia de las levaduras⁶ tolerando concentraciones altas de alcohol producido y aumentando su productividad, en tal sentido será necesario emplear enzimas hidrolíticas como las amilasas y proteasas (complejo enzimático) en este proceso y evaluar su efecto.

Muchas industrias biotecnológicas de bioprocesos han evaluado la adición de una serie de enzimas que mejoran la producción de etanol empleando melaza como sustrato cuyos componentes no pueden ser metabolizada por la levadura en condiciones normales de proceso^{4,7}; por esta razón han evaluado una mezcla de enzimas comerciales (0,05% p/v), obteniendo muy buenos resultados, pero el elevado costo no es apropiado desde el punto de vista económico⁶.

Hoyos y Carrera (2004) reportaron un incremento del grado alcohólico hasta el 10%, v/v, con la adición de enzimas de 0,5%, p/v, obtenidas por fermentación en sustrato sólido con *Rhizopus niveus*, valor muy satisfactorio; que sin embargo, no superó el rendimiento que se obtiene con la adición de las enzimas comerciales de 0,05%, p/v, ya que se empleó 10 veces más la proporción de enzimas, para obtener el mismo resultado⁶.

En América Latina está aumentando el interés por la producción de etanol; por ejemplo en noviembre del 2005, se inició en Colombia la adición de un 10% de etanol a la gasolina⁸; Argentina por su parte, planea para los próximos cinco años la transición hacia mezclas de gasolina con un 5% de etanol. En Perú, aún no se ha desarrollado mucho la producción de etanol; por la falta de una tecnología desarrollada que pueda suplir las necesidades de la industria productora de alcohol, haciendo necesario el estudio de nuevas alternativas y metodologías de la de la producción que permitan aprovechar al máximo los recursos industriales como el salvado de trigo para producir enzimas y la melaza para producir etanol¹.

El salvado de trigo es más rico en celulosa, hierro, fósforo, magnesio, calcio, y vitaminas del complejo

B, y ha sido utilizado en Bogotá-Colombia (Universidad Jorge Tadeo Lozano) como sustrato en la obtención de amilasas por *Aspergillus* sp. aislado de lentejas, demostrando que estas amilasas son activas en el desdoblamiento de la molécula de almidón a pH 5,0 y temperatura de 37°C⁷.

La utilización de melaza de caña como sustrato tiene ventajas económicas (minimizar costo) y nutricionales como sales y minerales fundamentales para el crecimiento de la levadura; además posee compuestos que favorecen su desarrollo, tales como altos contenidos de carbohidratos (sacarosa), proteínas, grasas, calcio, fósforo, aminoácidos y vitaminas⁸.

En este trabajo se estudió la utilización del complejo enzimático producido por *A. oryzae* para mejorar el rendimiento en la producción de alcohol en fermentación de melazas de caña con *S. cerevisiae*. Hipotéticamente, el complejo enzimático actuaría sobre las sustancias no fermentables presentes en la melaza, convirtiéndolas en monosacáridos, aminoácidos libres o simplemente moléculas más sencillas que podrían ser fácilmente asimilables por la levadura, otorgándole de este modo una nutrición más completa y mayor vitalidad. De esta manera, la adición del complejo enzimático al proceso fermentativo podría tener un impacto significativo en la economía del proceso al inducir la producción de mayor cantidad de alcohol por unidad de materia prima.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

- Cepas de *Aspergillus oryzae* CECT 2094 (productora de amilasas) y CECT 2095 (productora de proteasas), procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universidad de Valencia- España.
- Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus MIT-L51, proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo-Perú.
- Salvado de *Triticum aestivum* "trigo", adquirido en el Mercado Central de Trujillo-Perú.
- Melaza de *Saccharum officinarum* "Caña de azúcar", adquirido en el Molino San Francisco. Trujillo. La Libertad-Perú.

Fermentación en sustrato sólido con *A. oryzae*.

Propagación de *A. oryzae*.

Las cepas CECT 2094 y CECT 2095 de *A. oryzae*, fueron suspendidas en Caldo Sabouraud estéril y sembradas en Agar Papa Dextrosa (APD) y Agar Extracto de Malta (AEM), respectivamente. Se incubó por cinco días a 28°C⁹.

Preparación de los inóculos.

La preparación del stock de esporas de *A. oryzae* se realizó a partir de cultivos en placa de APD y AEM para las cepas CECT 2094 y CECT 2095

respectivamente, previo lavado de la superficie del cultivo con 10 ml de solución de Tween 80 al 0,1 %; luego, cada solución del lavado se centrifugó a 2800 rpm, durante 3 minutos. Posteriormente, se decantó y se resuspendió en 10 ml de agua destilada estéril, este proceso de lavado se repitió una vez más. Finalmente, se resuspendieron en 10mL de agua destilada estéril. Seguidamente, se cogió una alícuota de cada suspensión y se llevó a la cámara de Neubauer para el recuento de esporas por ml haciendo las diluciones necesarias para obtener el inóculo de $2,7 \times 10^8$ esporas/ml de cada cepa^{10,11}.

Preparación del sustrato sólido e inoculación de esporas

En dos botellas de vidrio planas de 1000 ml (una para cada cepa), se colocaron 80 g de salvado de trigo cada una y se llevaron al autoclave a una presión de 15 libras, con temperatura de 121°C durante 15 minutos. Seguidamente, se humedeció el salvado con solución tampón estéril (buffer - acetato a pH 5,0) en cantidad suficiente para alcanzar una humedad relativa de 50%. Posteriormente, se le adicionó 6 ml del inóculo (de cada cepa en su respectiva botella) homogenizándose con una bagueta estéril. Estos recipientes se ubicaron horizontalmente en la incubadora a 24°C durante cinco días¹⁰. Todos los ensayos se ejecutaron en triplicado.

Extracción de enzimas

Una vez cumplido el tiempo de incubación, el sustrato de fermentación (de cada cepa por separado) se pasó a un matraz estéril (un matraz para cada cepa) y se les agregó 200 ml de la solución tampón. Se agitó aproximadamente por una hora en un agitador magnético, luego se separó la fracción soluble de la insoluble, filtrando a través de un lienzo (prensado). Se recolectaron los sobrenadantes (preparados enzimáticos) y se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos a 4 °C y finalmente se filtraron a través de un filtro bacteriológico estéril que seguidamente se guardaron en refrigeración a 4°C hasta la determinación de la actividad enzimática de cada uno de los extractos¹².

Determinación de la actividad de Alfa Amilasa

Se rotularon 3 tubos de la siguiente manera: Tubo I (reactivos), Tubo II (testigo) y Tubo III (Problema). En los tubos II y III se agregó 10µl del extracto enzimático, luego al tubo I y III se agregó 0,5ml de la solución de almidón bufferado pH 5. Luego se incubaron los tres tubos a 37°C por 7.5 minutos. Finalizando dicho tiempo se le añadió 4.5ml de la solución reveladora (0,006% de I_2 +0,06% de KI en HCl de 0,02M) a los tres tubos y se completaron los volúmenes con 10 µL y 0,5mL de agua destilada en los tubos I y II , respectivamente¹². Luego se midió la absorbancia a 574nm. Para el cálculo del resultado, se usó la siguiente fórmula

donde:
Absorbancia del Tubo Blanco= Abs. del Tubo I + Abs. del Tubo II

Absorbancia del Tubo Problema= Absorbancia del producto de la reacción debido a la actividad del extracto enzimático originado por la cepa *A. oryzae* 2094.

Determinación de la actividad de las enzimas proteolíticas.

Se trabajaron con tres tubos (I, II, III). A los tubos I y II se les añadió 2 ml de caseína al 1% y 2ml de buffer fosfato 0,1 M pH 8. A los tubos I y III, se les añadió 2ml del preparado enzimático. Para igualar los volúmenes se añadió agua destilada a los tubos II y III. Se mezclaron y se colocaron en baño de agua a 37°C durante 30 minutos. Finalizado el tiempo de reacción, se tomaron alícuotas de 0,5 ml de cada uno de los tubos y se trasladaron a otro sistema de tubos numerados (I', II', III') a los cuales se les agregó 1 ml de solución de ninhidrina a cada uno. Se mezclaron y se llevaron a un baño de agua hirviendo (franca ebullición) durante 3 a 5 minutos, luego se les retiró y agregó 3,5 ml de agua destilada. Finalmente, se mezclaron por inversión y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 640 nm. Se definió que una unidad de actividad enzimática proteolítica UE/g corresponde a la cantidad de enzimas que libera un 1µg de caseína por minuto bajo las condiciones de ensayo. Este análisis de la actividad fue hecha para el extracto enzimático producido por la cepa *A. oryzae* 2095¹³.

$$\text{Amilasa, UA/dL} = \frac{\text{Absorbancia (Blanco)} - \text{Absorbancia (Problema)}}{\text{Absorbancia (Blanco)}} \times 1000$$

Preparación del inóculo de *S. cerevisiae*.

A partir del cultivo puro, se reactivó sembrando en placas conteniendo Agar Sabouraud Glucosa Enriquecido (ASGE), y se incubaron a 30°C durante 36 horas. Luego secosecharon las células de levaduras utilizando de 2 a 3 ml de Solución Salina Fisiológica (SSF) por placa de cultivo. Seguidamente, se reunieron todas las suspensiones en un tubo estéril y se homogenizó la suspensión. Posteriormente, se realizó una observación en fresco utilizando azul de metileno para determinar la viabilidad de las levaduras. Finalmente, se tomó una alícuota de la suspensión y se hizo recuento celular en cámara de Neubauer haciendo diluciones necesarias para obtener la concentración de $2,7 \times 10^8$ cel/ml¹⁴.

Determinación de la fase logarítmica de crecimiento de *S. cerevisiae*.

300ml de caldo melaza (melaza diluída hasta 14°B, refrigerada a 4°C por 2 horas y decantada) a una densidad de 1,05 Kg/dm³ y a pH 4,5 fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos. Se pasó 200ml a un biorreactor aireado con agitación de 150 rpm, se enfrió e inoculó 20ml de suspensión de levadura (equivalente a una concentración final del 10% v/v en el sistema) y se incubó a temperatura ambiente (20±1°C) durante 48 horas. Los recuentos de células se llevaron a cabo

cada hora con el método de conteo directo en cámara de Neubauer, luego con los datos obtenidos se elaboró la curva de crecimiento¹⁴.

Fermentación.

En 4 biorreactores de 500 ml estáticos y en condiciones anaeróbicas se colocaron 352, 344, 336 y 360 ml de caldo melaza de 14°B a pH 4,5. A cada uno de los biorreactores, se inocularon con 40 ml (equivalente al 10% de volumen final en todos los biorreactores) de suspensión de levaduras en fase logarítmica. Posteriormente, se les adicionó 8, 16, y 24 ml de la mezcla (en proporción 1 a 1) de los extractos enzimáticos (producido por *A. oryzae*) en los tres primeros biorreactores completándose un volumen final de 400ml; siendo el último biorreactor el control al que no se le añadió extracto enzimático, luego se les hizo recuento inicial de levaduras en cámara de Neubauer. Finalmente, se dejaron los 4 biorreactores en incubación durante 48 horas a temperatura ambiente ($20\pm 1^\circ\text{C}$)¹⁵. Todos los ensayos se ejecutaron en triplicado.

Mediciones finales de población celular y grados Brix.

Después de las 48 horas, en cámara de Neubauer se hizo recuento de población celular de *S. cerevisiae* en diluciones de caldo melaza fermentado. Así mismo, con el hidrómetro se midió los grados Brix finales en los 4 biorreactores de fermentación¹³.

Determinación del porcentaje de etanol.

Durante las 48 horas de incubación, con el Ebulloscopio de Malligan se midió el porcentaje (%) de etanol en cada uno de los cuatro biorreactores. Los resultados obtenidos se organizaron y analizaron estadísticamente en base a la prueba de análisis de varianza (ANAVA)¹⁶.

RESULTADOS

Se observó que el momento óptimo de pasar la levadura a la fase anaeróbica fue a las 5 horas 23 minutos (Fig. 1). Así mismo, se observó que la mezcla de los extractos enzimáticos (complejo enzimático) favoreció (efecto enzimático, Tabla 1) la concentración de etanol llegando al máximo valor de producción (Fig. 2) en la fase estacionaria (después de las 12 horas).

Se encontró que el porcentaje de etanol producido por *S. cerevisiae* fue mayor en el tratamiento con 4% de complejo enzimático obteniéndose una media de 4,47% de etanol a diferencia del control en el cual se obtuvo 3,73% (Fig. 3). Sin embargo, se obtuvo menor grado Brix en el tratamiento con 6% de complejo enzimático (Fig. 4).

El análisis de varianza indicó que sí existe diferencia significativa entre las variables de estudio (producción de alcohol y concentración del complejo enzimático) a un nivel de confianza de 95% (Tabla 2). Así mismo, el post anava señala que existe dos grupos estadísticamente homogéneos. (Tabla 3).

Tabla 1. Actividad enzimática de los extractos de *A. oryzae* determinadas por la absorbancia promedio de los ensayos de reacción.

| Extractos | Absorbancias (promedios) | | | Actividad Enzimática |
|--------------|--------------------------|--------|--------|----------------------|
| | I | II | III | |
| Aminolítico | 0,2754 | 0,2524 | 0,1708 | 676,42 UA/dl |
| Proteolítico | 1,7256 | 0,9870 | 0,0140 | 13,20 UE/g |

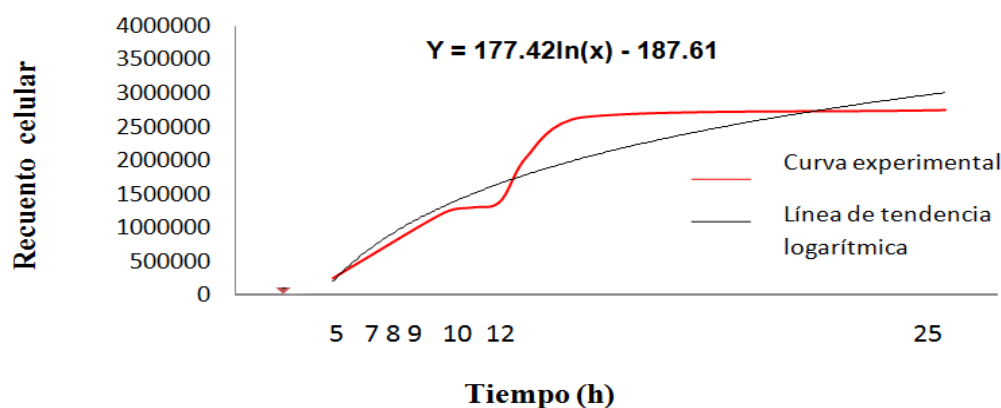


Fig. 1. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* (cel/ml) cultivado en medio caldo melaza evaluado hasta las 25 horas.

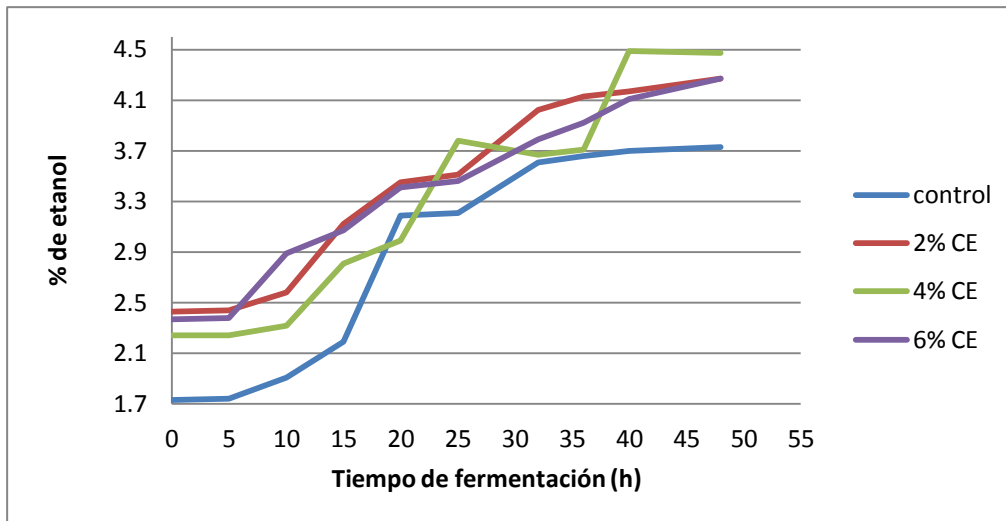


Fig.2 Concentración de etanol producido por *S. cerevisiae* en fermentación de caldo melaza con tres concentraciones del complejo enzimático producido por *A. oryzae* evaluado hasta las 48 horas.

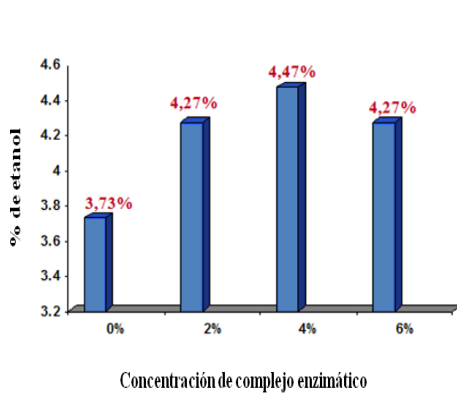


Fig 3. Porcentaje de alcohol producido por *S. cerevisiae* en fermentación de caldo melaza con tres concentraciones de complejo enzimático producido por *A. oryzae* a las 48 horas de fermentación.

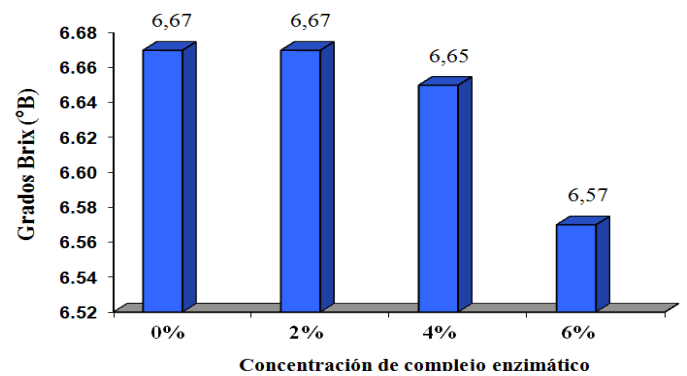


Fig 4. Grados Brix de fermentación alcohólica suplementada con tres concentraciones de complejo enzimático.

Tabla 2. Análisis de varianza para porcentaje de alcohol según concentraciones enzimáticas.

| Fuente | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | Cociente-F | P-Valor |
|---------|-------------------|--------------------|----------------|------------|---------|
| Modelo | 0.486 | 1 | 0.486 | 6.65 | 0.0275 |
| Residuo | 0.730667 | 10 | 0.0730667 | | |

Tabla 3. Contraste múltiple de rango para porcentaje de alcohol según concentración enzimática

| Método: 95.0 porcentaje LSD | | | |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------------|
| Nivel | Frec. | Media | Grupos homogéneos |
| 0 | 3 | 3.73333 | X |
| 2 | 3 | 4.26667 | X |
| 6 | 3 | 4.26667 | X |
| 4 | 3 | 4.46667 | X |
| Contraste | Diferencias | +/- Límites | |
| 0 - 2 | *-0.533333 | 0.380472 | |
| 0 - 4 | *-0.733333 | 0.380472 | |
| 0 - 6 | *-0.533333 | 0.380472 | |
| 2 - 4 | -0.2 | 0.380472 | |
| 2 - 6 | 0.0 | 0.380472 | |
| 4 - 6 | 0.2 | 0.380472 | |

* indica una diferencia significativa.

DISCUSIÓN

En la estandarización de la metodología de la fermentación alcohólica, hay una etapa muy importante que es el momento de pasar la levadura de fase aerobia a fase anaerobia⁶. La levadura se debe pasar a la fase anaerobia cuando la curva de crecimiento del cultivo está en la fase exponencial de desarrollo (Fig.1). Al realizar la incubación aeróbica con caldo melaza se presentó la fase de lag y la fase exponencial, lo que demostró que el caldo melaza sirve como medio de crecimiento en aerobiosis y como medio de fermentación en anaerobiosis¹³.

S. cerevisiae es una levadura que posee alta actividad metabólica, por lo que en la fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y la fase anaerobia generalmente por la producción de etanol¹³(Fig.2). Es importante la fase aeróbica debido a la producción de enzimas como la enzima tipo invertasa propia de la levadura que le permitan metabolizar la sacarosa presente en el caldo melaza produciendo glucosa y fructosa; así mismo, el complejo enzimático actuaría sobre las sustancias no fermentables presentes en la melaza, convirtiéndolas en monosacáridos, aminoácidos libres o simplemente moléculas más sencillas que podrían ser fácilmente asimilables por la levadura, otorgándole de este modo una nutrición más completa y mayor vitalidad disminuyendo así el grado Brix (sólidos solubles) (Fig 1y 4).

Los grados Brix miden la cantidad de sólidos solubles en agua¹⁴. Los biorreactores, control y el de 2% de complejo enzimático (equivalente a 8mL) debido al metabolismo de la levadura en fase aeróbica disminuyó los sólidos solubles presentes en el caldo melaza, ambos biorreactores tiene igual Brix finales (Fig.4); pero, el segundo biorreactor de 2% se observa mayor porcentaje de alcohol en fase anaeróbica (Fig.3), debido a que la levaduras han

aprovechado las moléculas sencillas liberadas por la actividad del complejo enzimático y por ello mayor concentración de alcohol en el biorreactor con 2% de complejo enzimático^{17,18}.

El complejo enzimático obtenido de *A. oryzae* contiene enzimas de diferentes tipos y para la investigación se evaluó el contenido de amilasas y proteasas, donde la prueba de actividad arrojó un concentración de 676.42 UA/dL(unidades aminolíticas por decilitro de solución) (Tabla 1), que indica que el complejo enzimático puede hidrolizar residuos de almidón (amilosa y amilopectina). Este complejo hidroliza enlaces alfa(1,4-1,6) de polisacáridos proporcionando a la levadura nuevos componentes⁶.

David Johnston, investigó nuevos procesos usando proteasas de microbios y hongos para producir etanol más eficazmente, y ha descubierto que las enzimas ponen más nutrientes disponibles para la levadura, acelerando la fermentación de los azúcares¹⁹. Así mismo, trabajando con otros investigadores, ha reportado que las α -amilasas afectan la concentración final del etanol dando como resultado un aumento de 10,5 hasta 11,6%(v/v) con una concentración de α -amilasa de 42,8 U/g a nivel de laboratorio²⁰; además que, las proteasas también pueden facilitar el proceso deshidratación de los restos sólidos después de la extracción del etanol²⁰. Sin embargo, utilizando 4% del complejo enzimático (8 ml del extracto de amilasas y 8 mL del extracto de proteasas) se obtuvo un aumento de 3,73 hasta 4,47% (v/v) de etanol con una concentración de 676,42 UA/dL de amilasa y proteasas que hidrolizan 2,7305mg de caseína a 37°C en 30 minutos.

La prueba de la proteasa, fue incluida por la baja especificidad que presentan las enzimas proteolíticas de la levadura⁶. Las proteasas hidrolizan las proteínas y aminoácidos para liberar Nitrógeno, el

mismo que puede ser asimilado por la levadura para mejorar la estructura conformacional de la membrana celular¹⁴; y por tanto dar una mayor tolerancia a la inhibición por concentración de alcohol y aumentar la población celular²¹.

Existen muchos métodos bioquímicos que nos permiten identificar la presencia de aminoácidos en una muestra, dentro éstos destacan la formación de complejos cromóforos por interacción del aminoácido y un reactivo específico, en esta ocasión se trabajó con la Ninhidrina, agente que al entrar en contacto con aminoácidos libres da lugar a un complejo visible de color azul-violáceo, lo que permitió demostrar que el extracto enzimático adicionado al sistema contenía proteasas¹³, al liberar aminoácidos de la caseína (fosfoproteína) en la prueba de la proteasas.

Las melazas se diferencian de otras materias primas empleadas en la producción de etanol como maíz, papa, milo y otros, en que éstos son productos de plantas con alto contenido de carbohidratos almacenados en la forma de almidón (biomasa amilácea)¹. Por lo tanto, estos materiales deben pasar por un proceso de pretratamiento para hidrolizarlos y obtener azúcares fermentables antes de la fermentación²². Sin embargo, ambas materias primas necesitan la ayuda del complejo enzimático antes de la fermentación para que obtengan los azúcares fermentables y puedan ser metabolizados por la levadura.

Para procesar materiales que contienen azúcares no fermentables (se hidrolizarán con la actividad del complejo enzimático para obtener azúcares fermentables), azúcares simples y disacáridos, como las mieles de la industria de la caña de azúcar, se consiguió concentraciones apropiadas (14°B) y luego se agregó cantidades de levadura suficientes (inóculo de concentración de $2,76 \times 10^8$ cel/mL que al ser añadido al sistema al 10%, la concentración inicial fue de $2,76 \times 10^7$ cel/mL). Sin embargo, el porcentaje de alcohol que se obtuvo en la fermentación fue limitado (4,47%) posiblemente debido a la mediana tolerancia de la levadura a las concentraciones de alcohol como lo observado en otras investigaciones, varía de una cepa a otra²³. El etanol ejerce influencia negativa sobre muchos componentes y eventos intracelulares; tales como la inhibición y desnaturalización de varias proteínas internas y enzimas glicolíticas, la inhibición del flujo de protones inducidos por glucosa, así como la inducción de una acelerada reentrada pasiva de protones²³. Así mismo, se ha demostrado que las membranas citoplasmáticas de varios organelos son el blanco principal para la inhibición por etanol^{21,24}. El alcohol ocasiona alteraciones en la organización y permeabilidad de las mismas al afectar su composición lipídica y el funcionamiento de proteínas de membrana involucradas en el transporte de azúcares y aminoácidos²⁵. Estos cambios en la permeabilidad, causan la fuga de cofactores, coenzimas y nucleótidos, esenciales para la

actividad de enzimas involucradas en la glicólisis y producción de alcohol²³.

Una de las etapas en el proceso de fermentación es la preparación del "mosto", el cual en este caso, se ajustó los grados Brix a 14° Brix (13,31% de azúcares); además una concentración óptima de azúcar está en el rango del 10 al 18%, siendo el valor más corriente el de 12%¹⁴. Cuando se trabaja con concentraciones de azúcar muy altas, del orden de 22%, se ha observado una deficiencia respiratoria en la levadura y un descenso de la velocidad de fermentación; sin embargo, al trabajar con concentraciones muy bajas, el proceso resulta antieconómico ya que requiere un mayor volumen para la fermentación¹⁴. Tal es así que, la evaluación de los grados Brix (sólidos solubles), mostró una disminución al final de la fermentación con respecto al blanco (fermentación alcohólica sin la adición de enzima), lo que indica que los azúcares reductores se transformaron en etanol por lo tanto se observa la disminución de los grados Brix^{26,27}. (Fig. 4).

Las condiciones de fermentación también constituyen factores importantes en la producción de etanol^{3,14}. Así tenemos que el pH óptimo para el metabolismo de la levadura es de pH 4,5, la temperatura es de 30°C y el tipo de sustrato que debe tener azúcares fermentables, la levadura solo metaboliza directamente azúcares simples (glucosa y fructosa). Para fermentar disacáridos como la sacarosa presentes en jugos y mieles de caña, la levadura emplea la enzima invertasa para desdoblarse la sacarosa en sus azúcares simples glucosa y fructosa²⁸.

El porcentaje de alcohol producido por *S. cerevisiae* empleando diferentes concentraciones del extracto enzimático de *A. oryzae* arrojó valores bajos entre 4,27 y 4,47% (Fig. 3); en comparación con otra investigación que reportan el incremento del grado alcohólico del 8% a 10% v/v con la adición de enzimas obtenidas por fermentación en sustrato sólido con *Rhizopus niveus*⁶. Valores satisfactorio pero muy bajos probablemente porque la cepa de *Saccharomyces* usada no fue una cepa mejorada y ni específica para obtención de alcohol por no presentar tolerancia al alcohol (cepas con tolerancia al alcohol soportan de 9 a 11% de alcohol); pero al añadir el complejo enzimático presentó mediana tolerancia (cepas con mediana tolerancia soportan de 4 a 8% de alcohol)²³.

Según el ANAVA, Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las porcentajes de alcohol medias de un nivel de concentración enzimática a otro para un nivel de confianza del 95,0% (Tabla 2). Por lo tanto; se concluye que el complejo enzimático producido por *A. oryzae* tiene efecto positivo sobre la producción de etanol por *S. cerevisiae* en condiciones de laboratorio. El post-ANAVA (Tests de Rangos Múltiples), aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente

diferentes unas de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. En la parte superior de la tabla, se identifican 2 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna, lo que indicó que cualquiera sea la concentración del extracto enzimático se tendría el mismo efecto positivo, (Tabla 3).

CONCLUSIONES

1. El complejo enzimático producido por *A. oryzae*, a una concentración de 676,42 UA/dL y 13,20 UE/g; tiene efecto positivo sobre la producción de alcohol etílico por *S. cerevisiae* cualquiera sea la concentración del extracto enzimático.
2. La utilización del complejo enzimático *A. oryzae* constituye entonces un método sencillo de incrementar la producción de alcohol en fermentación de melazas de caña.
3. Estadísticamente, existe diferencia significativa entre los tratamientos (2, 4 y 6% de concentración del complejo enzimático) y el control.

AGRADECIMIENTO

A la Ms.C. Milly Otiniano García; por su asesoramiento, constante apoyo y sus acertados consejos; al Ms.C. Milciades Chávez Castillo y Lilia Lescano Sacramento; por ayudar en la reactivación de las cepas de *Aspergillus oryzae* ; al Ms.C. Julio Arellano Barragán y al Dr. Heber Robles-Castillo; por ayudar a resolver algunas inquietudes presentadas durante el desarrollo del artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vásquez J, Dacosta O. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ing Investigación y Tecnol 2007; VIII(4): 249-59.
2. Ortiz S, Fernández M. El bioetanol como carburante alternativo: Análisis el proceso de producción, evaluación del coste y revisión de la fiscalidad actual. En: Comunicación del VIII Congreso de Ingeniería de Organización; Lérganes 9 – 10 de setiembre de 2004. Madrid: España 2004; 287-96.
3. Sánchez J, Cardona A. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. Interciencias 2005; 30(11): 671-6.
4. Gonzales PM, Gross CP. Producción de etanol y proteínas por una cepa de *S. cerevisiae* inmovilizada en alginato de calcio. Tecnología Química 2003; XXIII: 44-51
5. Santos G, Ronda F, Milego I. Proyecto de I+D para la conversión a etanol de mezclas de biomasa del cultivo de maíz y “Destiller Grain and Soluble” DGS. Revista de la Asociación Española de Científicos 2003; (7): 20-23.
6. Hoyos J, Carrera E. Desarrollo de un complejo enzimático por fermentación de sustrato sólido con *Rhizopus niveus*, para la optimización de la

producción de alcohol etílico a partir de melaza. Fac. de Ciencias Agropecuarias. Universidad del Cauca. Popayán (Colombia) 2004; 2(1): 33-42.

7. Castro C, Navas C, Caro O, Piñeros Y. [En línea] Obtención de amilasas fúngicas a partir de *Aspergillus* sp. aislado de semillas de lentejas. Universidad Jorge Tadeo Lozano; Bogotá-Colombia.[Fecha de consulta: 19 agosto 2009]. Disponible en: URL: <http://www.utadeo.edu.co/dependencias/publicaciones/alimentica3/amilasas.pdf>
8. Arroyave C, Bonilla A. Editores. Conciencia: Innovación y desarrollo empresarial. 9 ed. Bogota(Colombia): Editorial El Tiempo 2007.
9. Rico M, Piattoni C, Gonzales C, Monela R, Latorre M. Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. Revista Fabicib 2004; 8: 163-172.
10. Agamez E, Zapata R, Oviedo L, Barrera J. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. Revista colombiana de biotecnología 2008; X(2): 23-34.
11. Henao I, Correa I, Marín G. Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática aminolítica. Universitas scientiarum 2006; 11(2): 51-60.
12. Pichén L. Efecto de la variación del pH en un medio de cultivo a base de salvado de trigo para la producción de amilasa por *Paecilomyces lilacinus*. Tesis de Bachiller en Ciencias Biológicas. Perú: Universidad Nacional de Trujillo, 2008.
13. Alquicira L. Determinación de la especificidad de proteasas fúngicas en la hidrólisis de Proteína. Tesis de especialista en biotecnología. México. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa 2003.
14. Fajardo E, Sarmiento S. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de Grado en Ciencias Básicas, Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá 2007.
15. Acevedo A, Godoy R, Bolaño G, Incremento de la producción de alcohol en fermentación de melazas mediante la utilización del complejo enzimático Rhyzozyme. XXII Congreso colombiano de ingeniería química 2003 Agosto 13-15; Bucaramanga, Colombia.
16. Mejía L, Albán D, Murcia N, Cuervo R, Durán J. Hidrólisis y fermentación alcohólica simultánea del residuo agroindustrial de mango común utilizando levadura *Saccharomyces cerevisiae* y cepa recombinante RH218. Revista científica Guillermo de Ockham 2009; 7(2): 51-64.
17. Cobana M, Antezana R. [En línea] Proceso de extracción de almidón de yuca por vía seca [Fecha de consulta: 21 Septiembre 2010]. Disponible en:

- http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-
18. Garzón M. [En línea] Almidón retrogradado para uso en comprensión directa. Caracterización y pregelatinización del almidón de chayote. Mexicana de ciencias farmacéutica [Fecha de consulta: 21 septiembre 2010]. Disponible en:
<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/579/57937104.pdf>
 19. Johnston D. [En línea] Enzimas aumenta la eficacia de la producción de etanol. Agricultura [Fecha de consulta: 27 de abril 2007]. Disponible en URL:
<http://www.ars.usda.gov/is/espanol/pr/2007/070409.es.htm>
 20. Naidu K, Singh V, Johnston D, Rausch K, Tumbleson M. Effects of ground corn particle size on ethanol yield and thin stillage soluble solids. *Cereal Chemistry* 2007; 84(1):6-9.
 21. Ingram, L. Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. *Trends Biotechnol* 1984; 4:40.
 22. Aguilar-Rivera, N. Bioetanol de la caña de azúcar. *AIA (Avances en Investigación Agropecuaria)* 2007; 11(3): 25-39.
 23. Concepción M, Del Risco C, Lorenzo D, Fajardo M, Pérez J. [En línea] Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel de *Apis mellifera*. *Estación Experimental Apícola* 2000 [Fecha de consulta: 19 de agosto 2009]. Disponible en: URL:
http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/consumidor/05_cepa_levadura_fermentacion_alcoholica_miel.pdf
 24. Aguilera A, Benitez T. Role of mitochondria in ethanol tolerance of *S. cerevisiae*. *Arch. Microbiol* 1986; 142: 389-392.
 25. Lucero P, Peñalver É, Moreno E, Lagunas R. Moderate concentrations of ethanol inhibit endocytosis of the yeast maltose transporter. *Appl. Environm. Microbiol* 1997; 63(10):3831-3836.
 26. Pérez A. Tópicos sobre Biotecnología. Editorial Libertad E.I.R.L. Trujillo (Perú) 1994.
 27. Herrera C, Bolaños N, Lutz G. Química de alimentos. Comisión Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José (Costa Rica) 2003.
 28. Villanueva C, Aycachi R. Diseño de Bioprocesos y Biotecnología Microbiana “ Producción de Etanol”. Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque (Perú) 2008.

CORRESPONDENCIA

Liz Sánchez Torres

Dirección

Espinar N° 221 Moche

Teléfono:949747131

E-mail: pamelaunt18@hotmail.com