

DISEÑO Y PUESTA EN MARCHA DE UN "SISTEMA SEMICONTINUO EN DOS ETAPAS: HIDRÓLISIS - FERMENTACIÓN" PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE ALMIDÓN DE PAPA USANDO SIMULTÁNEAMENTE *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*

Amleto León Téllez*, Graciela Chalela Alvarez, Alba Lucia Roa

Recibido: Julio 31/97 - Aceptado: Octubre 27/97

Keywords: bioproduction, ethanol, starch, single protein unicelular, *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*, bioreactor.

RESUMEN

Se describe el diseño y evaluación de las variables que gobiernan el sistema semicontinuo en dos etapas: hidrólisis - fermentación para la producción de etanol a partir de almidón de papa usando simultáneamente *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*, con resultados comparables a los del método clásico de monocultivo pero con tiempos de bioproducción inferiores. La hidrólisis del almidón y posterior fermentación produjo cantidades significativas de biomasa, azúcares simples, y enzimas como productos colaterales al etanol.

ABSTRACT

The design and evaluation of the variables that govern the continuous system in two phases: hydrolysis - fermentation by the production of ethanol from potato starch using simultaneously *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* are described. The

results were similar to those obtained by the classic method the monocultive but lower bioproduction times. The starch hydrolysis and its subsequent fermentation produce high amount of biomass and enzymes as a collateral products of ethanol, those can be removed during the process.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los procesos más utilizados, aunque no tan rentables para la obtención de etanol a partir de almidón, son los que realizan una hidrólisis previa para transformar este último a glucosa y, posteriormente, fermentar ésta a etanol mediante levaduras. Se ha intentado, con resultados prometedores eliminar el paso de sacarificación y licuefacción enzimática mediante el empleo de un cocultivo simbiótico de organismos amilolíticos y fermentadores de azúcares, disminuyendo así, los tiempos de producción.

Dentro de los cultivos no convencionales, la papa es uno de los más prometedores para la obtención de etanol en nuestro país, debido a su alto contenido de hidratos de carbono fácilmente fermentables, la rusticidad de la planta y los altos rendimientos obtenidos. Dentro de éste contexto se sitúa la presente investigación que se inclina al aprovechamiento del recurso agrícola, almidón de papa, como fuente energética en la producción de etanol y el aprovechamiento de los productos intermedios del bioproceso como son la

*Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Carrera 27 con 9, Bucaramanga, Colombia.

proteína unicelular, la glucosa y los preparados crudos de amilasas.

En nuestro país la producción de papa promedio con 176.200 Ha cultivadas en 1994 fue de 2'660.000 Toneladas (1), si consideramos el porcentaje de desperdicios del 3% por falta de transporte, almacenamiento y conservación tendríamos alrededor de 79.800 Toneladas de papa residual al año que podría ser utilizada en la producción de almidón, que sería de aproximadamente 15.960 Toneladas, que por hidrólisis enzimática se obtendría 15.162 Toneladas de azúcares fermentables y que por fermentación es posible producir alrededor de 50 millones de litros de alcohol.

Paralelamente a estos hechos, la creciente preocupación por la conservación del medio ambiente se está plasmando en legislaciones concretas que obligan, entre otras medidas, al uso de combustibles menos contaminantes, como el etanol. El Ministerio del Medio Ambiente mediante Resolución N° 898 de Agosto 23 de 1995, establece que a partir de Enero 1 del 2001 las gasolinas colombianas deben tener oxigenados para disminuir las emisiones nocivas ambientales.

Con el diseño y puesta en marcha de un sistema semicontinuo de dos etapas: hidrólisis-fermentación se garantiza una producción de etanol y de sus productos intermedios de una manera más acelerada que los métodos tradicionales de mono y cocultivo.

PARTE EXPERIMENTAL

Los microorganismos.

Las especies tipo nativo del *Aspergillus niger* y *Saccharomyce cerevisiae* utilizadas en este estudio fue suministrada por el Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad Industrial de Santander.

El bioreactor.

El Bioreactor semicontinuo en dos etapas Hidrólisis - Fermentación consta de un reactor por cada etapa del proceso. Cada reactor tiene una capacidad de 2 litros construido en vidrio con tapas esmeriladas con cuatro accesos; dos para la entrada y salida de gases, una para suministro de inoculo y de medio nuevo y otra para monitoreo de muestras y control de temperatura (ver figura 1. para mayor ilustración). Entre los reactores se encuentra el Biofiltro, de 1 litro de capacidad en vidrio con tapa esmerilada y unido con los reactores por medio de conectores en vidrio provistos de válvulas de paso tipo bureta. Dentro del biofiltro se encuentra primero el prefiltro, que es una malla circular en alambre que soporta una capa de lana de vidrio de 3 mm de espesor con el fin de retener las partículas más grandes como las dextrinas y el micelio de *Aspergillus niger*; a 4 cm del prefiltro se encuentra el filtro de membrana de 0,2 micras el cual retiene las unidades reproductoras de *Aspergillus niger*, las conidias, garantizando la esterilidad del los hidrolizados de almidón que van al reactor de fermentación con la *Saccharomyces cerevisiae*. Para disminuir el tiempo de filtración y aumentar su eficiencia el biofiltro posee un desprendimiento lateral para la conexión a la bomba de vacío con su respectiva trampa, otra ventaja del biofiltro es su fácil remoción para el cambio de las membranas en caso de que se taponen sin necesidad de interrumpir el proceso conjunto de hidrólisis y fermentación.

Se realizaron una serie de ensayos preliminares con el fin de optimizar la operación del bioreactor, una vez realizados, se programaron los experimentos en propiedad estudiando las variables características de un cultivo continuo.

Las variables objeto de estudio fueron: Velocidad de crecimiento, tiempo

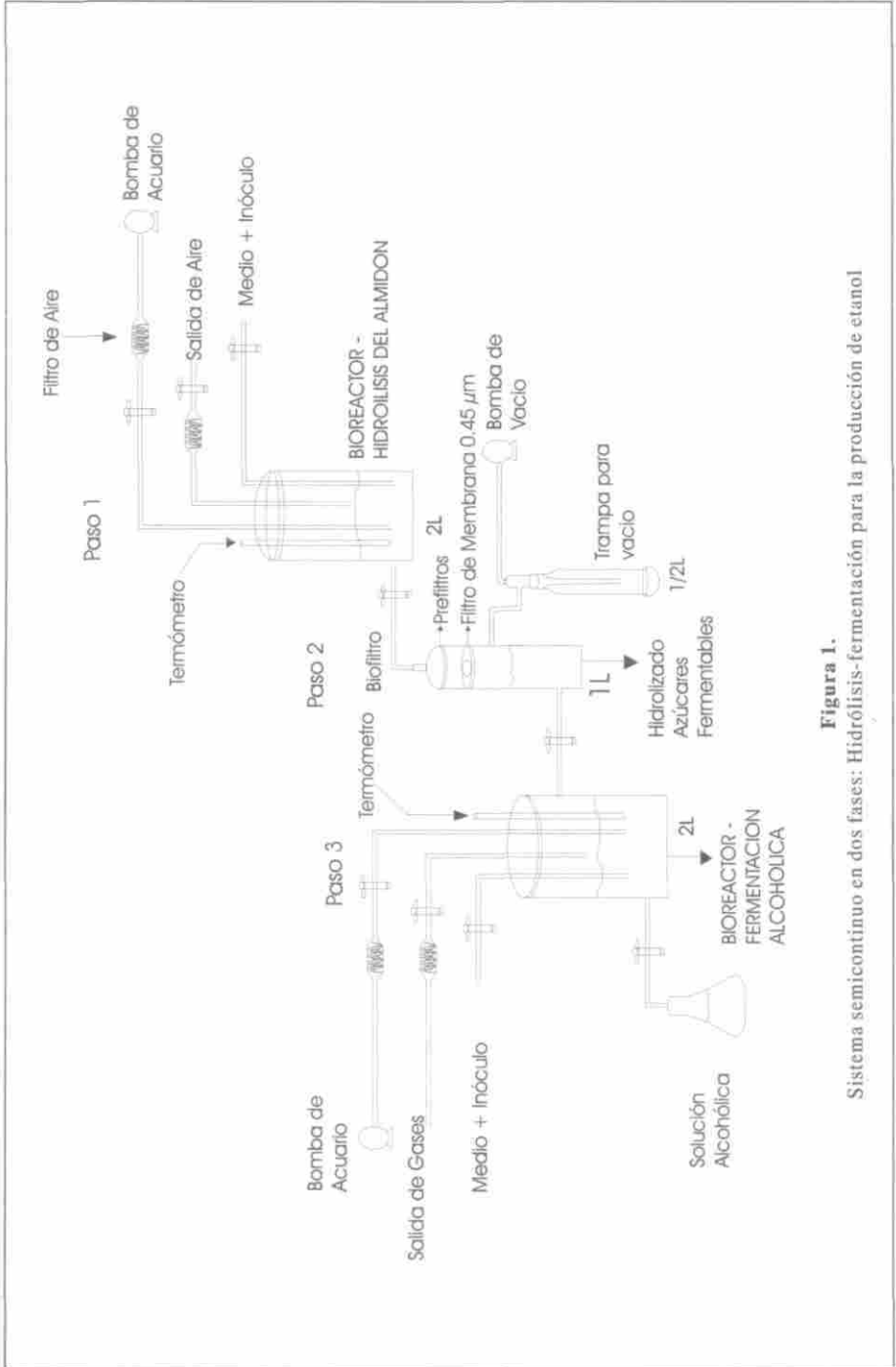


Figura 1.
Sistema semicontinuo en dos fases: Hidrólisis-fermentación para la producción de etanol

de generación, sustrato limitante, concentración del producto, concentración celular, flujo volumétrico, tasa de dilución como base para la determinación de la μ_{max} , K_s , productividad, concentraciones de biomasa y sustrato en el equilibrio. Determinando lo anterior se puede decir que se tiene la descripción experimental del cultivo continuo de acuerdo a la Teoría del Quimiostato para cada etapa del proceso.

Se realizaron 3 experimentos completos para concentraciones de almidón iniciales de 2, 4, y 8 g/100mL respectivamente. En cada experimento se realizaron los siguientes pasos: Primero hidrólisis del almidón de papa por *Aspergillus niger* a la concentración inicial de almidón indicada, para un volumen de 1 litro de cultivo y un tiempo de hidrólisis de 60 horas en la primera etapa y 48 horas después de cada suministro de medio nuevo. El segundo paso, una vez transcurrido el tiempo de la hidrólisis es la filtración de 500 mL de hidrolizados eliminando *Aspergillus niger* y la dextrina límite con el fin de "esterilizar" el futuro medio para la fermentación de los azúcares en el tercer paso. En este último paso el filtrado es recibido en el bioreactor de fermentación que contiene el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio de hidrolizado de almidón con el fin de eliminar la etapa de adaptación y arrancar en etapa de crecimiento exponencial para la producción de etanol. El tiempo de fermentación alcohólica fue de 48 horas a condiciones anaeróbicas.

El suministro de medio e inóculo nuevo, 500 mL, para el bioreactor de hidrólisis se realiza una vez se hayan evacuado los 500 mL de hidrolizado hacia el biofiltro transcurridas las 60 horas iniciales de hidrólisis, después el periodo de suministro se realiza cada 48 horas para un flujo volumétrico de 500 mL/48 horas en las dos etapas. Se consideraron tres suministros para cada experimento a intervalos de 48 horas.

Condiciones de cultivo para la etapa de hidrólisis.

Para todos los experimentos la inoculación fue de aproximadamente 10^5 conidiosporas, conteo realizado mediante cámara de Neubauer, las concentraciones de las sales del medio de cultivo corresponden al medio mineral Czapek (composición, g/litro de NaNO_3 , 3; K_2HPO_4 , 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; KCl , 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01) y almidón de papa como fuente de carbono. El volumen total del medio fue de 1000 mL, se suministró oxígeno al medio durante todo el proceso mediante bomba de acuario (Power 500, Aquarium Air Pump) con una tasa de volumen de aire aproximadamente de 90 litros por hora.

Condiciones para la etapa de fermentación.

Para todos los experimentos la inoculación fue de aproximadamente 10^6 levaduras, conteo realizado mediante cámara de Neubauer, las concentraciones de las sales del medio de cultivo corresponden al medio mineral proveniente del cultivo de la hidrólisis una vez retirado el *Aspergillus niger*, la fuente de carbono corresponde a los azúcares producto de la hidrólisis del almidón. El volumen total del medio fue de 1000 mL. Las concentraciones de azúcares están indicadas para cada experimento al igual que los intervalos de muestreo. Cada muestra tomada fue filtrada con el fin de separar la levadura a través de dos capas de papel filtro cualitativo Whatman. La masa celular fue secada a 110°C con pesos constantes para evaluar la proteína unicelular. Los filtrados fueron utilizados para la cuantificación del alcohol los azúcares reductores y la glucosa.

Determinación de nitrógeno y proteína en la biomasa.

La determinación de nitrógeno total se realizó por el método de Kjeldahl (2).

Determinación de carbohidratos totales.

Los azúcares totales fueron determinados en muestras duplicadas de filtrados fungales con el método de fenol-ácido sulfúrico (3).

Determinación de los azúcares reductores.

Los azúcares reductores fueron determinados en muestras duplicadas de filtrados fungales con el método de Bernfeld, utilizando el ácido 3,5-dinitrosalicílico.

Determinación del almidón en el medio.

La determinación de almidón se hizo mediante lecturas de absorbancias del complejo coloreado de yoduro-yodato más almidón a 640 nm contra una curva de calibración (4).

Determinación de glucosa.

La Glucosa fue determinada por el Método de Glucosa Oxidasa y peroxidasa utilizando el Kit de Sera-Pak.

Determinación de la concentración de etanol.

La concentración del etanol fue determinada mediante el método de gravedad específica por picnómetro, de acuerdo a la metodología de la A.O.A.C 9.012/80.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los experimentos fueron planeados con el fin de describir el proceso en semicontinuo para cada etapa usando las ecuaciones del Quimiostato, así las concentraciones de la masa celular y del sustrato en los reactores para cada

etapa pueden predecirse para un valor dado de la tasa de dilución si se conocen las constantes μ_{\max} , K_s y Y del organismo usado.

$$S = K_s D / \mu_{\max} - D$$

$$x = Y (S_0 - (K_s D / \mu_{\max} - D))$$

donde:

S = concentración de sustrato en el reactor en equilibrio estacionario.

x = concentración de masa celular en el reactor en equilibrio.

μ_{\max} = velocidad específica máxima de crecimiento.

D = tasa de dilución.

Y = constante de conversión o rendimiento que describe la relación entre la biomasa formada y el sustrato consumido.

Para la etapa de hidrólisis.

Ver tablas 1 y 2.

Para evaluar la constante específica de crecimiento (μ) se gráfica el logaritmo natural de la biomasa (X) versus tiempo, de acuerdo a la ecuación de Monod ($dx/dt = \mu x$) integrada $\ln(X) = \mu t + \text{cte}$ de Integración; que no es más que la ecuación de una recta donde el valor de la pendiente es μ .

Calculamos μ una vez aplicada la regresión lineal a los datos con el fin de ajustarlos a la ecuación de una recta. Calculamos la pendiente de la recta (Y) graficando X contra S , mediante regresión lineal.

Para la etapa de fermentación.

Ver tablas 3 y 4.

Tabla 1. Datos de crecimiento celular y disminución del sustrato a través del tiempo en la etapa de hidrólisis (para los tres experimentos).

EXPERIMENTO N° 1			EXPERIMENTO N° 2		EXPERIMENTO N° 3	
Tiempo (Horas)	Biomasa (X) g/100mL	% Almidón (S) g/100mL	Biomasa (X) g/100mL	% Almidón (S) g/100mL	Biomasa (X) g/100mL	% Almidón (S) g/100mL
0	0.24	2.00	0.26	4.00	0.51	8.00
12	0.51	1.42	0.74	2.62	1.44	5.46
24	0.75	1.12	1.25	1.78	2.63	4.21
36	0.94	0.92	1.78	1.24	3.08	3.74
48	1.24	0.81	2.46	0.95	3.74	2.58
60	1.36	0.42	2.87	0.64	4.21	2.12

Tabla 2. Datos de biomasa, concentración de almidón y azúcar reductor en los tiempos de suministro de nuevo medio de cultivo en la etapa de hidrólisis (para los tres experimentos).

EXPERIMENTO N° 1				EXPERIMENTO N° 2			EXPERIMENTO N° 3		
Tiempo (Horas)	Biomasa (X) g/100mL	% Almidón (S) g/100mL	% Azúcar Reductor g/100mL	Biomasa (X) g/100mL	% Almidón (S) g/100mL	% Azúcar Reductor g/100mL	Biomasa (X) g/100mL	% Almidón (S) g/100mL	% Azúcar Reductor g/100mL
0	0.24	2.0	0	0.26	4.0	0	0.28	8.0	0
60.0	1.36	0.42	1.84	2.87	0.64	3.25	5.21	2.12	5.24
60.5 R1	0.88	1.24	1.02	1.34	2.62	1.72	2.74	5.72	2.64
108.5	1.84	0.21	1.94	3.21	0.16	4.20	5.23	1.64	7.42
109.0 R2	0.94	1.12	0.81	1.64	2.38	2.06	2.92	5.32	3.64
157.0	1.74	0.14	1.56	3.56	0.22	4.42	7.47	1.24	8.25
157.5 R3	1.01	1.32	0.74	2.84	2.64	2.24	3.94	5.74	4.23
205.5	1.87	0.10	1.62	3.92	0.24	4.12	8.12	0.96	8.76

R1 : Primera recarga con medio nuevo e inóculo.

R2 : Segunda recarga con medio nuevo e inóculo.

R3 : Tercera recarga con medio nuevo e inóculo.

Tabla 3. Datos de crecimiento celular y disminución del sustrato a través del tiempo en la etapa de fermentación alcohólica (para los tres experimentos).

EXPERIMENTO N° 1			EXPERIMENTO N° 2		EXPERIMENTO N° 3	
Tiempo (Horas)	Levaduras (m.o./mL) *10 ⁶	% Azúcar Reductor g/100mL	Levaduras (m.o./mL) *10 ⁶	% Azúcar Reductor g/100mL	Levaduras (m.o./mL) *10 ⁶	% Azúcar Reductor g/100mL
0	2.4	1.84	1.4	3.25	4.2	5.24
12	48.2	1.36	56.2	2.41	46.2	2.54
24	94.3	1.02	108.3	1.86	121.4	1.25
36	286.2	0.76	321.6	0.94	392.3	0.86
48	621.3	0.14	716.1	0.21	784.2	0.12

Tabla 4. Datos de concentración celular, concentración de azúcar reductor y de alcohol en los tiempos de suministro de nuevo medio de cultivo en la etapa de fermentación (para los tres experimentos).

EXPERIMENTO N° 1				EXPERIMENTO N° 2			EXPERIMENTO N° 3		
Tiempo (Horas)	Levad. m.o./mL *10 ⁶	% Azúcar Reduc. g/100mL	Etanol g/100mL	Levad. m.o./mL *10 ⁶	% Azúcar Reduc. g/100mL	Etanol g/100mL	Levad. m.o./mL *10 ⁶	% Azúcar Reduc. g/100mL	Etanol g/100mL
0 Suministro Hidrolizado de Almidón	2.4	1.84	0	1.4	3.25	0	4.2	5.24	0
48.0	621.3	0.14	1.04	716.1	0.07	1.86	784.2	0.12	2.54
48.5 Segundo Suministro Hidrolizados	304.5	1.04	0.47	364.2	2.16	0.78	382.3	3.86	1.31
96.5	824.3	0.25	1.31		0.05	2.42	824.3	0.02	2.92
97.0 Tercer Suministro Hidrolizados	425.3	0.92	0.56	495.3	2.38	0.56	472.2	4.23	1.52
145	921.3	0.12	1.34	1124.2	0.02	2.62	1221.6	0.04	3.42

Cálculo de μ_{max} , K_s , X y S para las etapas de hidrólisis y fermentación.

Para etapa de hidrólisis del almidón de papa: ver tabla 5.

Para la etapa de la fermentación alcohólica: ver tabla 6.

Con los datos de las tablas 5 y 6 graficamos velocidad específica versus concentración de sustrato, para así obtener los valores de μ_{max} igual a 0.038 h^{-1} y de K_s igual a 2.30 g/100mL en la etapa de hidrólisis, y los valores de μ_{max} igual a 0.124 h^{-1} y de K_s igual a 1.10 g/100mL en la etapa de fermentación alcohólica. El valor de Y se obtiene del promedio de los calculados en los tres experimentos, resultando igual

a 1.24 en la etapa de hidrólisis y 147.30 en la etapa de fermentación.

El valor de la dilución, D , ($D = F/V$, flujo volumétrico entre el volumen de cultivo) fue de 0.5L/48h/1L para todos los experimentos.

A nivel industrial, teniendo en cuenta la cinética de crecimiento en cultivo continuo es posible en función de la productividad deseada, dimensionar con precisión los fermentadores y las instalaciones anexas (bomba, compresor, extractor, columna de destilación) y de este modo reducir al máximo las inversiones y los gastos de funcionamiento. Los cultivos continuos permiten igualmente tener una producción homogénea, de calidad constante, lo

Tabla 5. Datos de velocidad específica de crecimiento y de la constante de conversión para las diferentes concentraciones de sustrato iniciales, en la etapa de hidrólisis.

EXPERIMENTO	SUSTRATO INICIAL Almidón g/100mL	VELOCIDAD ESPECIFICA μ (h^{-1})	CONSTANTE DE CONVERSIÓN (Y) g biomasa/g almidón
1	2	0.016	1.10
2	4	0.037	1.22
3	8	0.038	1.40

Tabla 6. Datos de velocidad específica de crecimiento y de la constante de conversión para las diferentes concentraciones de azúcar reductor inicial, en la etapa de fermentación.

EXPERIMENTO	SUSTRATO INICIAL Azúcar reductor inicial, g/100mL	VELOCIDAD ESPECIFICA μ (h^{-1})	CONSTANTE DE CONVERSIÓN (Y) No. levad. $\times 10^8$ /g azúcar
1	1.84	0.090	3.68
2	3.25	0.124	295.4
3	5.24	0.115	142.8

cual es importante para las transformaciones ulteriores.

En el diseño y puesta en marcha del reactor semicontinuo en dos etapas se logró, dentro de las limitaciones propias del diseño, describir las más importantes variables del proceso continuo.

La hidrólisis del almidón y posterior fermentación produjo cantidades significativas de biomasa, azúcares simples, y enzimas como productos colaterales al etanol, que se pueden ir retirando durante el proceso semicontinuo. El sistema también demostró una mejor relación y producción de etanol, si lo comparamos con el monocultivo (5).

La fermentación bajo el sistema tiene la ventaja particular de producir etanol industrial, siempre y cuando dicho etanol pueda ser económicamente removido. El almidón es menos costoso que la glucosa como sustrato de inventario y el sistema produce directamente su propia amilasa. Se puede observar que la tasa de productividad ($P = X \cdot D$) para transformar el almidón en etanol, está cercana a los valores reportados para la transformación de la glucosa en etanol mediante la *Saccharomyces cerevisiae* (6).

BIBLIOGRAFÍA

1. Ballesteros, M.; Martínez, J. y Carrasco, J. Obtención de Bioalcohol. *Ingeniería Química*. Madrid, España Febrero 1994.
2. AOAC. *Oficial Methods of Analysis of the Association Oficial Anality Chemist*. De. Sidney William. 1984.
3. Wistler Roy, L. "Methods in Carbohydrate Chemistry" Vol. 1, II, III y IV. Academic Press 1964.
4. Nielson, J. Rapid determination of Starch: An index to maturity in starchy vegetables, *Industrial & Engineering Chemistry*, 15(3), 1963.
5. Abouzied, M.M.; Reddy, A.C. Direct Fermentation of Potato Starch to Ethanol by Cocultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*., *Appl. Environ. Microbiol.* 1986, 52(5), 1055-1059.
6. Grosz, R.; Stephanopoulos, G. Physiological, Biochemical, and Mathematical Studies of Micro-Aerobic Continuous Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. I: Mathematical Model of Cellular Energetics and Catabolism., *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 1030-1040, 1990.
7. Banerjee, M.; Debnath, S.; Majumdar, S.K. Production of Alcohol from Starch by Direct Fermentation., *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 831-834, 1988.
8. Fujii, M.; Homma, T.; Taniguchi, M. Synergism of alpha Amylase and Glucoamylase on Hydrolysis of Native Starch Granules., *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 910-915, 1988.
9. García G., Mariano; Quintero R., Rodolfo y López M., Agustín; *Biología Alimentaria*. Limusa Noriega Editores. Mexico, 1993.
10. Godfrey, T. y Reichelt, J. *Industrial Enzymology*, The Nature Press, 1983.
11. Goulter, P.R.; Potter, O.E. The Rate at Which Starch Becomes Suceptible to Hydrolysis by Enzymes., *Ind. Eng. Chem.*, 13(4), 324-327, 1984.
12. Hong, J. and Lee, C.K. Unsteady-state operation of continuous fermentor for enhancement of cell mass production. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 187, 1987.
13. Hyun, H.H.; Zeikus, J.G. Simultaneous and Enhanced Production of Thermostable Amylases and Ethanol

- from Starcha by Colcultures of *Clostridium thermosulfurogenes* and *Clostridium thermohydrosulfuricum.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 49(5), 1174-1181, **1985.**
14. Kim Hock; Lynda Ferguson and Carlton Constance. Conversion of Cassava Starch to Biomass, Carbohydrates, and Acids by *Aspergillus niger*. *J. Appl. Biochem.* 80-90, **1984.**
15. Mihail, R. and Straja, S. An analysis of the steady states of a chemostat with applications to its design. *Biotechnol. Bioeng.* 29, 775, **1987.**
16. Murphy, T; Cyanamid, A. Design and analysis of industrial experiments. *Chem. Ing.* June. **1977.**
17. Olsvik, E.; Tucker, K.G.; Thomas, C.R.; Kristiansen, B. Correlation of *Aspergillus niger* Broth Rheological Properties with Biomass Concentration and the Shape of Mycelial Aggregates., *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 1046-1052, **1993.**
18. Quintero R., Rodolfo. *Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones.* Ed. Alambra. Mexico, **1981.**
19. Renick, M. Genetic control of radiation sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 62:519-531, **1995.**
20. Roukas, T. Ethanol Production from Nonsterilized Carob Pod Extract by Free and Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells Using Fed-Batch Culture., *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 189-194, **1994.**