

Optimización de la hidrólisis de arroz ñelen por *Aspergillus niger* para usarlo como sustrato en la obtención de etanol

Optimizing of the hydrolysis of broken rice by *Aspergillus niger* for using as substrate in the ethanol obtaining

Víctor H. Estela Romero¹ & Juan M. Garay Román²

Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo optimizar la hidrólisis de arroz ñelen por *Aspergillus niger* para usarlo como sustrato en la obtención de etanol. Para ello se construyeron 15 biorreactores de 21 cm de altura tipo tanque no agitado. La preparación del inóculo fue realizado a concentraciones de 10^5 , 10^6 y 10^7 esporas de *A. niger*/mL, realizando el conteo en cámara Neubauer. El medio de cultivo fue formulado a partir de diferentes concentraciones de arroz ñelen 200, 300 y 400 g de arroz ñelen/L de agua. El bioproceso se llevo a cabo a 45 °C; a pH de 5,5 - 6,0 y durante un tiempo de 4, 5 y 6 días. Se demostró que los parámetros óptimos para obtener 100 g de glucosa/L de hidrolizado a partir de arroz ñelen fueron a partir de una concentración de 400 g de ñelen/L de agua, 10^5 esporas de *A. niger*/mL de engrudo y un tiempo de 6 días.

Palabras claves: Optimización, ñelen, *Aspergillus niger*, etanol.

ABSTRACT

This research work aimed to optimize the hydrolysis of broken rice by *Aspergillus niger* to use as substrate in the ethanol yield. This 15 bioreactors were constructed of 21 cm high, not stirred tank type. The preparation of the inoculum was performed at concentrations of 10^5 , 10^6 and 10^7 spores of *A. niger*/mL by counting in Neubauer chamber. The culture medium was made from different concentrations of broken rice 200, 300 and 400 g broken rice/L water. The bioprocess was carried out at 45 °C. At pH 5,5 - 6,0 and for a time of 4, 5 and 6 days. It was shown that the optimal parameters to obtain 100 g glucose/L hydrolyzed from broken rice were from a concentration of 400 g broken rice/L water, 10^5 spores of *A. niger*/mL of paste and a time of 6 days.

Keywords: Optimizing, broken rice, *Aspergillus niger*, ethanol.

¹Ingeniero Agroindustrial; vhestelar@hotmail.com

²Ingeniero Químico, Profesor Asociado TC, UNAT-Amazonas

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ante el previsible agotamiento de las reservas petroleras a nivel mundial y la necesidad impostergable de proteger el medio ambiente se ha hecho más urgente la sustitución de combustibles fósiles por biocombustibles o combustibles de fuente renovable. Como respuesta a esa tendencia, nace el interés por optimizar la producción del etanol como un carburante alternativo a los hidrocarburos de origen fósil.

El uso del etanol como combustible es cada vez más importante a nivel internacional el mismo que puede producirse a partir de cultivos energéticos como caña de azúcar, maíz, soya, sorgo, cereales, oleaginosas, etc. (Ministerio de Agricultura, 2005), pero la tecnología más desarrollada es a partir de la caña de azúcar, logrando costos de proceso muy bajos. Brasil es el país que más ha desarrollado dicha tecnología (Asociación de Combustibles Renovables de Centroamérica, 2004).

El almidón es un carbohidrato complejo, inodoro e insípido, en forma de grano o polvo (Mathews y Van Holde, 1998). Es un polisacárido importante, se produce

en vegetales por medio del proceso de la fotosíntesis a partir del dióxido de carbono y agua. El almidón se halla en forma de gránulos de tamaño y forma características de la planta de la cual se obtiene. Cuando estos están intactos son insolubles en agua fría; si se rompe su membrana exterior al ser molidos, se hinchan en agua fría y forman un gel. Cuando se tratan los gránulos enteros con agua tibia, se difunde a través de sus membranas una parte soluble del almidón; sin embargo, en agua caliente se hinchan a tal extremo que revientan. Contiene generalmente alrededor de un 20 % de una fracción soluble en agua, llamada amilosa, y 80 % de una fracción insoluble, denominada amilopectina. La amilosa y la amilopectina, contienen D-glucosa, pero difieren en tamaño y forma molecular. Con la hidrólisis de la amilosa se obtiene la maltosa como único disacárido y la glucosa como único monosacárido (Mathews & Van Holde, 1998).

El almidón hidrolizado es materia prima de uso inmediato en procesos alimenticios, dulces naturales, detergentes, papel y alimentación animal y de uso posterior para la producción de etanol como energía renovable. Se han realizado varios estudios sobre la transformación

del almidón por hidrólisis de diversas fuentes vegetales, y se reportó hidrólisis ácida de almidón de cáscara de banano, obteniéndose un jarabe de 20 g glucosa/L de hidrolizado como máxima concentración (Monsalve *et al.*, 2006). Para la degradación del almidón, el inconveniente principal del método de hidrólisis enzimático radica en la pureza de los concentrados enzimáticos, lo cual eleva los costos que genera la extracción de la enzima (Wisseman, 1986). Frente a esta situación, en los últimos tiempos han surgido diversas propuestas para desdoblar el almidón en azúcares simples por métodos no convencionales. Una de las vías más prometedoras para incrementar la hidrólisis del almidón es la realizada por el *A. niger*, mediante fermentación anaeróbica (Gutiérrez *et al.*, 2003).

El arroz ñelen, es un subproducto de la industria molinera, que se encuentra prácticamente triturado y desde el punto de vista comercial no tiene demanda para el consumo humano, generando problemas logísticos y económicos, con una composición exquisita de almidón de 70,13 %, proteínas 6,90 %, grasa 5,33 %, fibra 2,16 %, humedad 13,8 % y cenizas 1,58 % (Escobar *et al.*, 1994).

Los hongos filamentosos son un grupo de interés industrial en la producción de enzimas. El *A. niger* es un organismo ampliamente utilizado en la producción de una gran variedad de enzimas con un espectro tal que puede lograrse la completa degradación del almidón. Las enzimas son utilizadas en muchos procesos industriales, como bioblanqueo, panificación, extracción y clarificación de jugos, elaboración de alimento animal, industria textil, entre otras. El *A. niger* muestra algunas ventajas para la producción industrial de enzimas: Tiene un alto nivel de producción, presenta buenas propiedades para el cultivo, lo que posibilita la producción a gran escala, permitiendo su aplicación en la industria de alimentos tanto para el hombre y animales (Villena y Gutiérrez, 2003).

Existen reportes de sistemas semicontinuos en dos etapas: hidrólisis - fermentación para la producción de etanol a partir de almidón de papa usando simultáneamente *A. niger* y *Saccharomyces cerevisiae*, con resultados comparables a los del clásico de monocultivo pero con tiempos de bioproducción inferiores. La hidrólisis del almidón y posterior fermentación produce cantidades significativas de biomasa, azúcares simples, y enzimas como productos colaterales al etanol (Callender y Barford, 1983). El mayor y menor rendimiento promedio de glucosa en la etapa de hidrólisis del almidón de *Solanum genicalix* con *A. niger* CECT-2089 se logra con los biorreactores tipo tanque no agitado al 8 % y 10 % de concentración inicial de almidón, con valores promedio de 40,64 % y 27,90 % en tiempos promedio de 126,6 y 105 horas, respectivamente (Gutiérrez *et al.*, 2003). El rendimiento de jarabe de glucosa obtenido por vía enzimática a partir de arroz ñelen, en términos de gramos de glucosa por cada 100 gramos de ñelen utilizado es de 65,79 % (Coronel *et al.*, 2003).

El etanol o alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) es un compuesto líquido, incoloro, inflamable y soluble en agua tiene innumerables aplicaciones: bebidas fermentadas para consumo humano como vinos, aguardiente, vodka, ron, brandy, etc.; en la industria se emplea en gran cantidad de procesos como: disolución de la nitrocelulosa,

disolvente de colorantes en las industrias alimenticias y textil; disolvente de resinas; jabón, aceites, ceras, etc.; oxidación en la fabricación de ácido acético, vinagre, acetaldehído. Así también se puede mezclar con la gasolina, para mejorar sus propiedades, se recomienda una mezcla en proporción del 10 al 25 %, ya que se logra un índice de octano entre 70 y 75, mayor que el de la gasolina sin mezclar. Las mezclas de etanol-gasolina permiten aumentar la compresión en el motor, dan un funcionamiento más regular, su recalentamiento es menor y por tanto se puede utilizar a un mayor número de revoluciones (Monsalve *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta la información encontrada sobre la hidrólisis del almidón usando *A. niger*, adecuándolo mediante diferentes concentraciones, a través de una tecnología de fermentaciones a temperaturas medianas, el tiempo de producción y la creciente demanda de etanol, garantizó la importancia técnico-económica del presente trabajo de investigación, el cual estuvo orientado a optimizar la hidrólisis de arroz ñelen por *A. niger* para usarlo como sustrato en la obtención de etanol.

MATERIAL Y MÉTODOS

En la presente investigación se empleó arroz ñelen proveniente de los molinos de las provincias de Bagua y Utcubamba, sometiéndose a una molienda y posterior tamizado (tamiz "Tyler" N° 70) a una humedad de 13 %; utilizándose concentraciones de 200, 300 y 400 g de ñelen/L de agua, hidratándose por 24 horas, posteriormente éste fue esterilizado en autoclave a 121 °C x 20 minutos, luego se determinó azúcares reductores iniciales según el método de Lane-Eynon (Escobar *et al.*, 1994).

Para la preparación del inóculo la cepa de *A. niger* fue sembrada en medio agar dextrosa papa (PDA) y se incubó hasta esporulación durante 5 días a 30 °C (Villena y Gutiérrez, 2003), a partir de este cultivo se cosecharon. En condiciones estériles las esporas en medio mineral Czapek. La suspensión de esporas de *A. niger* de la botella se trasvasó a un matraz estéril, realizando el recuento de esporas con ayuda de la cámara de Neubauer, luego diluyó la suspensión hasta obtener concentraciones de 10^6 y 10^7 esporas/mL que son los inóculos deseados; posteriormente, se sembró *S. cerevisiae* cepa MIT L-51 en botellas planas con medio PDA y se incubó por 24 horas a 30 °C. De cada botella se suspendió las células en medio mineral Czapek y se trasvasaron a un matraz estéril, donde se tuvo una concentración de $6,4 \times 10^8$ células/mL de medio. En la hidrólisis del almidón se emplearon 15 biorreactores de vidrio de 0,5 L de capacidad; con 21 cm de altura y 6 cm de diámetro, previamente desinfectados por agua caliente (70 °C por 30 minutos), se les adaptó una tapa de jebe microporoso con manguera de 5 mm de diámetro para salida de gases. En cada biorreactor se adicionó 200 mL de caldo a las concentraciones de estudio (200, 300 y 400 g de ñelen/L), y esporas de *A. niger* (10^6 , 10^7 y 10^7 esporas/mL), según el diseño de Box-Behnken; el proceso se realizó a un pH de 5,5 - 6,0 hidrolizándose por un lapso de 4, 5 y 6 días a una temperatura de $45 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ en bañomaria. El contenido de azúcares reductores se determinó mediante la

metodología de Lane-Eynon..

La influencia de las tres variables independientes (Tabla 1) sobre la producción de azúcares reductores se determinó por aplicación del diseño estadístico de Box-Behnken (Greasham & Inamine, 1989), el que permite optimizar los valores siguiendo la distribución mostrada en la Tabla 2; donde cada columna representó una variable y cada fila un experimento. Los elementos +, 0, -, representaron los niveles alto, medio y bajo, respectivamente, de cada variable.

Tabla 1. Rango de valor de las variables a optimizar en la hidrólisis de arroz ñelen por *A. niger* empleando el diseño estadístico de Box-Behnken

Concentración	Arroz ñelen g/L (A)	<i>A.niger</i> esporas/mL (B)	Tiempo días (C)
Alta (+)	400	10 ⁷	6
Media (0)	300	10 ⁶	5
Baja (-)	200	10 ⁵	4

Tabla 2. Diseño estadístico de Box-Behnken para optimizar las tres variables independientes.

Número de experimento	Variables		
	A	B	C
1	+	+	0
2	+	-	+
3	-	0	0
4	-	+	-
5	+	0	0
6	+	0	-
7	-	-	+
8	-	0	-
9	0	+	+
10	0	+	0
11	0	-	+
12	0	-	-
13	0	0	0
14	+	+	+
15	-	-	-

(+): valor alto; (0): valor medio y (-): valor bajo.

Una vez realizados los experimentos, se procedió a calcular los coeficientes del modelo polinomial usando el software estadístico Statgraphics 5.1. Con los que se escribió las ecuaciones que se usaron para generar gráficas de contornos de respuestas en superficies versus el nivel de variables, que indicó la región donde se encuentra la respuesta óptima.

RESULTADOS

Las variables a optimizar fueron gramos de arroz ñelen/L de agua, esporas de *A. niger*/mL y tiempo de hidrólisis, encontrándose que la mayor cantidad de azúcares reductores (g/L) se obtuvo cuando se empleó

400 g/L de arroz ñelen, 10⁵ esporas de *A. niger* y un tiempo de hidrólisis de 6 días (Tabla 3).

Tabla 3. Producción de azúcares reductores de cada medio de diferentes concentraciones de componentes, aplicando el diseño de Box-Behnken.

Medio	Arroz ñelen g/L (A)	<i>A. niger</i> esporas/mL (B)	Tiempo días (C)	Azúcares Reductores g/L
E1	400	10 ⁷	5	80,0
E2	400	10 ⁵	6	100,0
E3	200	10 ⁶	5	38,3
E4	200	10 ⁷	4	34,3
E5	400	10 ⁶	5	58,7
E6	400	10 ⁶	4	26,3
E7	200	10 ⁵	6	64,3
E8	200	10 ⁶	4	35,0
E9	300	10 ⁷	6	60,5
E10	300	10 ⁷	5	26,3
E11	300	10 ⁵	6	64,3
E12	300	10 ⁵	4	44,3
E13	300	10 ⁶	5	44,3
E14	400	10 ⁷	6	36,5
E15	200	10 ⁵	4	32,9

Los resultados aplicando el diseño de optimización Box-Behnken a través del Software estadístico Statgraphics 5.1, predice que se puede lograr hidrolizar el almidón con el *A. niger* hasta un máximo de 90,5 g de glucosa/L (Figura 1), empleando 400 g de ñelen/L de agua, inoculando 10⁵ esporas de *A. niger*/mL y en un tiempo de 6 días.

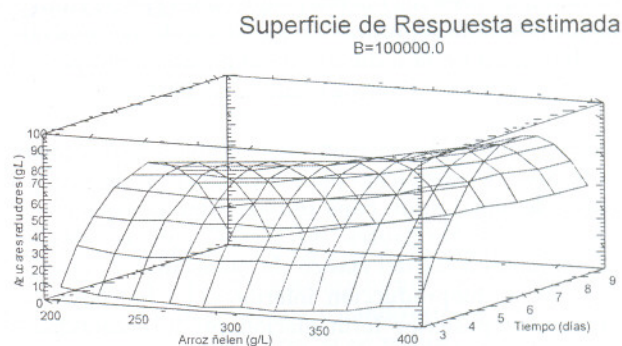


Figura 1. Superficie de respuesta de azúcares reductores (g/L) en función g ñelen/L de agua, tiempo de hidrólisis y concentración de esporas de *A. niger*/mL.

A partir de 1 kg de arroz ñelen, y trabajando con los valores óptimos de las variables estudiadas se obtuvieron 100 g de AR/L, el que enseguida fue fermentado con *S. cerevisiae* cepa MIT L-51 para convertir los AR en etanol y CO₂, habiéndose obtenido 150 mL de etanol de 96 °G.L.

DISCUSIÓN

La optimización de los valores de las tres variables con el diseño de Box-Behnken permitieron obtener un máximo de 100 g de AR/L de hidrolizado (Tabla 3), con 400 g de ñelen/L de agua, 10⁵ esporas de *A. niger*/mL y 6 días de fermentación. Una concentración de 400 g de ñelen/L de agua fue suficiente para asegurar el buen desarrollo

del *A. niger*, demasiada agua disminuye la porosidad del sustrato, esto se argumenta en base a que con concentraciones menores de ñelen se ha obtenido menor cantidad de azúcares reductores; o sea, que la hidrólisis del ñelen ha sido menor. Del análisis de los resultados mostrados en la Tabla 3, podemos deducir que la concentración de *A. niger* de 10^5 esporas/mL ha hidrolizado mejor en las tres concentraciones de ñelen, produciendo un máximo de AR cuando la concentración fue de 400 g de ñelen/L de agua. Por tanto, 10^5 esporas de *A. niger*/mL será una concentración óptima para producir el máximo de AR, con cada concentración de ñelen que se emplee. Es posible que concentraciones mayores de *A. niger* causen inhibición en su desarrollo, lo cual se refleja en la menor cantidad de AR producidos. La máxima producción de AR a los 4 días ha sido 44,3 g/L, a los 5 días 80 g/L y a los 6 días 100 g/L, por lo que podemos mencionar que mientras más tiempo este en contacto el *A. niger* con el ñelen a la concentración promedio de 10^5 esporas/mL, producirá mayor cantidad de AR. Los resultados experimentales mostrados en la Tabla 3, con el Software Statgraphics 5.1; permite predecir que se obtendrá un máximo de 90,50 g AR/L; cuando se utilice 400 g de ñelen/L de agua, 10^5 esporas de *A. niger*/mL y 6 días de fermentación (Figura 1). Este valor es 10 % menor al obtenido experimentalmente en las mismas condiciones, siendo satisfactorios los resultados experimentales. Investigadores lograron hidrolizar el 40,64 % de almidón de *Solanum genioicalix* con la cepa de *A. niger* CECT-2089 a un recuento entre $10^5 - 10^7$ esporas/mL en un biorreactor con concentración inicial de almidón de 8 %, en un tiempo promedio de 126,6 horas (Gutiérrez *et al.*, 2003). El valor de 35,6 % de almidón de arroz ñelen hidrolizado en 6 días es inferior, lo cual puede deberse a que ellos emplearon una cepa plenamente identificada y con la garantía de la Colección Española de Cultivos Tipo, que quizá era muy eficiente para hidrolizar almidón. En este trabajo de investigación se ha empleado un cultivo puro procedente de la Universidad Nacional de Trujillo, no teniendo datos sobre su eficiencia para hidrolizar almidón a partir de arroz.

Para determinar el rendimiento de etanol a partir de ñelen, se procedió a hidrolizar 1000 g de ñelen en las proporciones y valores de las variables evaluadas que permitieron maximizar su hidrólisis; habiéndose obtenido la proporción de 1000 g de ñelen = 150 mL de etanol de 96 °G.L., representando el 15 % de rendimiento; Escobar *et al.*, (1994) obtuvo de 1000 g de ñelen hidrolizado con malta y fermentado con levadura *Fleishman* (levadura prensada que tiene empleo en panificación y fermentación alcohólica industrial) 124 mL de etanol de 94 °G.L., representando el 12,4 %. En vista de estos resultados podemos decir, que utilizando esta tecnología el rendimiento de etanol es superior en 2,6 %.

CONCLUSIONES

Las condiciones óptimas para la hidrólisis del arroz ñelen fueron las siguientes: 400 g de ñelen/L de agua, 10^5 esporas de *A. niger*/mL de medio y durante un tiempo de 6 días, considerando que el arroz ñelen fue molido, hidratado por 24 horas y esterilizado en autoclave a 121 °C por 20 minutos.

Se obtuvo etanol del arroz ñelen en una proporción de 1000 g de arroz ñelen = 150 mL de etanol de 96 °G.L., dando una alternativa agroindustrial nueva para los agricultores de Bagua y Utcubamba, de la Región Amazonas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asociación de Combustibles Renovables de Centroamérica. 2004. Programa de Oxigenación de Combustibles Carburantes.
- Beever, R. E. & E.G. Bollard. 1970. The nature of the simulation of fungal growth by patata extract. - J. Gen. Microbiol, 60; 273-279.
- Callender, I. J. & J.P. Barford. 1983. Biotechnol Letters. USA.
- Coronel, P.; W. Mendoza, L. Castillo & L. Bazan. 2003. Obtención de jarabe de glucosa por el método enzimático a partir de ñelen de arroz (*Oriza sativa* L). VICONACYTA. Arequipa. Perú.
- Escobar, R.; A. Ñique & S. Ulloa. 1994. Obtención de etanol a partir de arroz. Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
- Greasham, R. & E. Inamine. 1989. Nutritional Improvement of Processes. In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, ed. N. Solomon & A. Demain, American Society for Microbiology. Washington DC, USA.
- Gutiérrez, M.; V. Vásquez & J. Paredes. 2003. Producción de etanol a partir de tres concentraciones de almidón de *Solanum genioicalix* hidrolizados con *A. niger* CECT-2089 y fermentado con *Saccharomyces cerevisiae* CECT-1319. VI CONACYTA. Arequipa. Perú.
- Mathews, C.K. & K.E. Van Holde. 1998. Bioquímica. 2ª Edic. Edit. McGraw Hill Interamericana, España.
- MINAG, 2005. Estudio de Competitividad del etanol.
- Monsalve, J.; V. Medina & A. Ruiz. 2006. Producción de etanol a partir de cáscara de banano y de almidón de yuca. Universidad Nacional de Colombia. Volumen 73. Medellín - Colombia.
- Villena, G. & M. Gutiérrez. 2003. Biopelículas de *A. niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. Laboratorio de Micología y Biotecnología, Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.
- Wissemann, A. 1986. Principios de biotecnología. Edit. Acirbia. España.