

INMOVILIZACIÓN DE *Bacillus licheniformis* Y *Saccharomyces cerevisiae* PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE ALMIDÓN DE PAPA

IMMOBILIZATION OF *Bacillus licheniformis* AND *Saccharomyces cerevisiae* FOR ETHANOL PRODUCTION FROM POTATO STARCH

Diana Sossa-Urrego, María Angélica Navarro-Acevedo, Adriana Matiz Villamil¹, Marcela Mercado-Reyes², Balkys Quevedo-Hidalgo¹, Aura Marina Pedroza-Rodríguez¹

¹ Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Facultad de Ciencias.
Pontificia Universidad Javeriana. Cra. 7 N° 43-82. Bogotá

² Grupo de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Ciencias.
Pontificia Universidad Javeriana. Cra. 7 N° 43-82. Bogotá

diana_sossa@latinmail.com, mariangelicanavarro@hotmail.com2,
amatiz@javeriana.edu.co, mmercado@javeriana.edu.co, bquevedo@javeriana.edu.co,
apedroza@javeriana.edu.co

Recibido: 25-01-2008; Aceptado: 14-10-2008;

Resumen

Se evaluó un sistema discontinuo secuencial compuesto por células de *Bacillus licheniformis* y *Saccharomyces cerevisiae* para producción de etanol, utilizando en la segunda fase del proceso, un hidrolizado de almidón de papa, obtenido con el uso de células de *B. licheniformis*. Ambos microorganismos fueron inmovilizados en matriz de alginato de calcio al 3,2% y 2,5% (p/v), observando que a estas concentraciones se retiene la mayor cantidad de células (26×10^6 y 10×10^7 UFC/g) y permite la difusión de los productos, obteniendo 3,3 g/L de azúcares reductores y 642 UA/L (unidades amilolíticas) para *B. licheniformis* y 0,866% (v/v) de etanol con *S. cerevisiae*. Mediante un diseño factorial 2² se seleccionaron las condiciones de operación a escala de reactor para la producción del hidrolizado, encontrando que al cultivar a *B. licheniformis* con 3 v.v.m. y 150 r.p.m. se produjeron 3,7 g/L de azúcares reductores y 669 UA/L a las 4 horas de proceso. El hidrolizado se caracterizó por cromatografía HPLC determinando que es rico en oligómeros, dextrinas y que tiene baja concentración de glucosa y maltosa. El uso del hidrolizado para la producción de etanol, generó porcentajes bajos (0,47% y 0,74% v/v), tanto en células libres como inmovilizadas, respectivamente.

Palabras claves: almidón de papa, amilasas, *Bacillus licheniformis*, etanol, inmovilización en alginato, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

We evaluated a sequential discontinuous system composed by *Bacillus licheniformis* and *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. For the second phase of the process potato starch hydrolyzed were used, which was obtained from *B. licheniformis* cells. Both microorganisms were immobilized in a calcium alginate matrix of 3,2% and 2,5% (w/v), where was observed that these concentrations retained the majority of the cells (26×10^6 and 10×10^7 UFC/g) and allowed dissemination of its products, gaining 3.3 g/L of reducing sugars and 642 AU/L (units Amylolytic) for *B. licheniformis* and 0,866% (v/v) ethanol with *S. cerevisiae*. By means of a 2² factorial design were selected operating conditions at a reactor scale for production of hydrolyzed, finding that by cultivating *B. licheniformis* with 3 v.v.m. and 150 r.p.m. there were 3.7 g/L of reducing sugars and 669 AU/L after 4 hours of the process. The hydrolyzed was characterized using HPLC chromatography, which determined that it is rich in oligomers and dextrin, and it has low concentration of glucose and maltose. The use of hydrolyzed for ethanol production, generated low percentages (0,47% and 0,74% v/v) in free and immobilized cells respectively.

Key words: potato starch, amylases, *Bacillus licheniformis*, ethanol, immobilization in sodium alginate, *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUCCIÓN

En el proceso de producción de etanol, se pueden emplear gran diversidad de sustratos orgánicos como la caña, almidón de papa, maíz, yuca, (O'Brien y Wang, 2008), bagazo de sorgo (Yu *et al.*, 2007), arroz, mijo, trigo (Haq *et al.*, 2005), Chayote (Jiménez-Hernández *et al.*, 2007) y residuos lignocelulósicos (Sun y Cheng, 2002; Moiser *et al.*, 2005). Una de las materias primas más estudiadas es la papa y sus subproductos debido a su contenido de carbohidratos fermentables (11,5-28,1% (p/p), lípidos (0,1% (p/p), proteínas (2% (p/p) y cenizas (1,0% (p/p) (Fedepapa, 1991). En Colombia, la papa ocupa en relación con los cultivos transitorios, el tercer lugar en área sembrada, con alrededor de 156.928 hectáreas (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2008), siendo este cultivo el más difundido en el país. Sin embargo, las pérdidas ocasionadas por las heladas, plagas, transporte, almacenamiento, deficiencia en los sistemas de mercadeo y comercialización; hacen que la papa y los remanentes de la producción se conviertan en un subproducto que se utiliza principalmente como semilla para nuevos cultivos y alimentación animal; desaprovechando la posibilidad de utilizarlo en otros procesos más rentables.

El almidón, principal componente de la papa, es un polímero de reserva, compuesto por unidades repetitivas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos alfa 1-4 y alfa 1-6, conformando la fracción lineal de amilosa y la ramificada de amilopectina (Kaur *et al.*, 2007). Para que el almidón de papa pueda ser utilizado en la producción de etanol requiere de un pretratamiento de licuefacción y sacarificación de tal manera que se liberen moléculas más sencillas y asimilables, como dextrinas y glucosa. El proceso de sacarificación por vía enzimática se realiza con bacterias del género *Bacillus* como: *B. licheniformes*, *B. amyloliqueniformis*, *B. megaterium*, *B. polymixa* y *B. subtilis*, entre otros. La mayoría de estas bacterias producen una o varias de las glucosilhidrolasas implicadas en el proceso de hidrólisis hasta obtener gran cantidad de azúcares fermentables como la glucosa y la maltosa.

Los trabajos en los que se utilizan microorganismos amilolíticos con células libres e inmovilizadas para la hidrólisis de almidón de papa son muy diversos, Dobrev y colaboradores (1996) inmovilizaron a *Bacillus licheniformis* 44MB82 en geles de alginato y agar para evaluar la producción de α -amilasa encontrando que la producción con células inmovilizadas en agar fue superior al alginato y a las células libres, alcanzando una actividad de 1100 U/mL (unidades amilolíticas). Konsoula y Kyriakides (2006) inmovilizaron células de *Bacillus subtilis* en alginato para la producción de una α -amilasa

termoestable encontrando que las perlas preparadas con alginato al 2% (p/v) fueron el mejor soporte para la producción de la enzima, alcanzando actividades enzimáticas 2,5 más altas en comparación con las células libres. Asgher y colaboradores (2007) evaluaron la producción de una α -amilasa sintetizada por una cepa moderadamente termófila de *Bacillus subtilis* empleando residuos de papa como sustrato y los resultados mostraron que la máxima producción fue de 72 U/mL a las 48 horas de cultivo a pH 7,9 y 50°C.

Actualmente se conoce que ciertos tipos de levaduras silvestres como *Arxula adenivorans*, *Lipomyces*, *Saccharomycopsis*, *Schwanniomyces*, *Candida japonica* y *Filobasidium capsuligenum* son las únicas que pueden producir amilasas extracelulares; sin embargo, su empleo para la producción de etanol es muy limitado (Li *et al.*, 2007). Por esta razón para esta última transformación se utiliza con mayor frecuencia a *Saccharomyces cerevisiae*, pero este hongo levaduriforme es incapaz de utilizar directamente el almidón porque no produce enzimas amilolíticas (Jamai *et al.*, 2007); se requiere que el sustrato polimérico sea pretratado para que bajo condiciones anaeróbicas utilice la glucosa por la vía de Embden-Mereyhof-Parnas y produzca etanol y dióxido de carbono (Ingram *et al.*, 1998).

Para mejorar el rendimiento las levaduras se inmovilizan por atrapamiento en diferentes matrices poliméricas como la de alginato de calcio, presentando ventajas como mayor productividad, eliminación de la inhibición causada por las altas concentraciones de sustrato y producto, protección contra la fuerza en cizalla y fricción dentro de los reactores y la posibilidad de reutilizarlas con células en varios ciclos sin necesidad de recuperarlas (Birol *et al.*, 1998; Wen-Tao *et al.*, 2005; Swain *et al.*, 2007). Sin embargo, las células inmovilizadas pueden sufrir limitaciones en el suministro de nutrientes, razón por la cual, es necesario seleccionar una concentración apropiada del polímero de inmovilización para garantizar que las células no escapen de las perlas y así mismo, el sustrato y el producto puedan moverse satisfactoriamente a través de la red de alginato de calcio (Roca *et al.*, 1996; Najafpour *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo fue producir etanol a partir de almidón de papa mediante el desarrollo de un sistema discontinuo secuencial compuesto por *Bacillus licheniformis* y *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizados con alginato de sodio; inicialmente se estandarizó el proceso de inmovilización para los dos microorganismos, posteriormente se seleccionaron las condiciones de operación para la producción del hidrolizado de papa rico en azúcares fermentables, el cual fue empleado en la

segunda etapa que consistió en producir etanol evaluando las células libres e inmovilizadas de *S. cerevisiae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Los microorganismos evaluados fueron *Bacillus licheniformis* y *Saccharomyces cerevisiae*, los cuales pertenecen al cepario del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana. *B. licheniformis* se reactivó en agar almidón de papa al 1% (p/v) (Composición en g/L: Extracto de levadura 2,5, peptona 2,5, CaCl₂ 0,1, Na₂HPO₄ 0,1, NaH₂PO₄ 0,1, almidón de papa 10 y agar 20, pH 7,0 ± 0,2) y la levadura se cultivó en agar YGC (extracto de levadura 5 g/L, glucosa 20 g/L, cloramfenicol 0,1g/L, pH 6,9 ± 0,2) (Sanin, 1999; Alfaro y Pinzón, 2001).

Estandarización de la concentración de alginato de sodio para la inmovilización de *B. licheniformis* y *S. cerevisiae*

Inmovilización por Atrapamiento

Se evaluaron tres concentraciones de alginato de sodio para llevar a cabo la inmovilización por atrapamiento de los dos microorganismos evaluados. Cada cepa se cultivó por 24 horas a 150 r.p.m. en un agitador orbital termostataado; empleando erlenmeyers de 1000 mL que contenían 200 mL de caldo almidón al 1% (p/v) y 200 mL de caldo YGC, respectivamente. Como inóculo se empleó el 10% de una suspensión celular de concentración de 10x10⁷ UFC/mL para cada uno de ellos. Los erlenmeyers se mantuvieron a temperatura constante de 37°C para *B. licheniformis* y 30°C para *S. cerevisiae*, al finalizar se evaluó la viabilidad en UFC/mL y la pureza mediante coloración de Gram. Con estos cultivos se realizaron las mezclas con alginato de sodio para obtener concentraciones de: 1,35% (p/v), 2% (p/v) y 3,2% (p/v) para *B. licheniformis* y 2% (p/v), 2,5% (p/v) y 3% (p/v) para *S. cerevisiae*.

El proceso de inmovilización se realizó empleando la técnica de microgoteo sobre una solución refrigerada de CaCl₂ 0,1 M; la homogeneidad en el tamaño de las perlas se garantizó al mantener constante la velocidad de una bomba peristáltica en 50 r.p.m. Se dejaron por 12 horas a 4°C en CaCl₂ para su estabilización. Para determinar la concentración celular en las perlas, se llevó a cabo un proceso de solubilización que consistió en adicionar 1 g de perlas en 9 mL de tampón fosfato 0,25M, a continuación los tubos se colocaron en un baño termostataado a 30°C por 15 minutos y se sometieron a un proceso de homogeneización en vórtex por 10 minutos, el procedimiento se repitió hasta

obtener la solubilización completa de las perlas y a partir de esta suspensión se realizaron diluciones desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁸ y se sembraron en superficie en agar almidón al 1% (p/v) y agar YGC. La selección de la concentración adecuada de alginato se determinó tomando como variable dependiente la cantidad de células retenidas dentro de perla y expresadas como logaritmo 10 de UFC/g. Como análisis estadístico se realizó una comparación de medias entre concentraciones empleando el programa SAS 6.0 para Windows.

Para evaluar si las concentraciones de alginato seleccionadas permitían la liberación de productos como azúcares reductores y etanol se realizaron dos pruebas complementarias a escala de erlenmeyer. Para *B. licheniformis* se tomaron 50 perlas que equivalían a 0,352 g y se adicionaron a un erlenmeyer de 2000 mL, que contenía 200 mL de caldo almidón de papa al 1% (p/v), los erlenmeyers fueron incubados en un agitador orbital termostataado a 150 r.p.m. y 37°C durante 12 horas, los muestreos se realizaron a las 4 y 12 horas para determinar la concentración de azúcares reductores (Miller, 1959), consumo de almidón (Paifer, et al., 1994) y actividad amilolítica (Berfeld, 1995; Sugita et al., 1997). Con *S. cerevisiae* se realizó el mismo procedimiento en cuanto a la cantidad de perlas y volumen efectivo de trabajo, empleando como medio base caldo YGC, esta prueba se desarrolló a 30°C por 12 horas, 120 r.p.m. y los muestreos se realizaron en las mismas horas que para *B. licheniformis*. Los parámetros evaluados fueron la concentración de azúcares reductores y porcentaje de etanol empleando la técnica de titulación con sulfato ferroso amónico (Sossa y Navarro, 2003).

Selección de las condiciones de producción de hidrolizado de papa con células inmovilizadas de *Bacillus licheniformis*

Se evaluaron dos condiciones de operación (aireación y velocidad de agitación) en un reactor de mezcla completa sobre la producción del hidrolizado de papa empleando células inmovilizadas de *B. licheniformis*. Las pruebas se realizaron en reactores de 2 litros que contenían 900 mL de caldo almidón de papa al 1% (p/v) y 100 mL de inóculo en células inmovilizadas, a 37°C durante 4 horas. Se cuantificaron azúcares reductores (g/L) y actividad amilolítica (UA/L) como variables dependientes, una unidad amilolítica (UA) fue definida como la cantidad enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol de glucosa por minuto a 37°C durante 30 minutos. Se planteó un diseño experimental 2², generando una matriz de 4 tratamientos realizados por duplicado, los factores estudiados fueron aireación en v.v.m., (Nivel bajo 1 y nivel alto 3) velocidad de agitación en r.p.m. (Nivel bajo 80 y nivel alto 150) (Montgomery,

2003). El análisis de datos se realizó usando los programas SAS 9,0 y Desing Expert 6,0 y los resultados fueron tratados con un modelo empírico el cual relaciona las respuestas cuantificadas con los factores evaluados y sus respectivos niveles. Para un diseño de dos factores el modelo de primer orden es:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2 \quad (1)$$

Donde: y, corresponde a la variable dependiente; b_0 es el intercepto, b_1 , b_2 , son los coeficientes lineales y X_1 , X_2 son los factores ó variables independientes.

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico, se seleccionaron las mejores condiciones y se realizó la producción del hidrolizado de papa, se centrifugó por 20 minutos a 2610 g y posteriormente se filtró por una membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0,22µm. El hidrolizado estéril se utilizó para evaluar la producción de etanol con células libres e inmovilizadas de *S. cerevisiae*. Al hidrolizado se le realizó un análisis de azúcares por cromatografía HPLC, usando una columna sugar Pak1 a 84°C, con fase móvil agua a 0.5 mL/min y con detector de índice de refracción (Waters Corporation, Milford, MA).

Producción de etanol con células libres e inmovilizadas de *S. cerevisiae* en hidrolizado de papa

Para comparar la producción de etanol con células inmovilizadas y libres de *S. cerevisiae* se realizaron fer-

mentaciones discontinuas en reactor de mezcla completa empleando el hidrolizado de papa obtenido previa hidrólisis enzimática con *B. licheniformis* como medio no convencional. Las células de *S. cerevisiae* se inmovilizaron siguiendo el protocolo descrito con anterioridad y se adicionaron 100 mL a cada uno de los biorreactores que contenían 900 mL de caldo hidrolizado de papa. El proceso se evaluó por 48 horas realizando muestreos cada 2 horas manteniendo la agitación en 50 r.p.m. a 30°C. Se cuantificaron azúcares reductores y porcentaje de etanol, en cada muestreo. Al final del proceso se recuperaron las perlas para realizar solubilización de las mismas y determinar la concentración final de células retenidas.

RESULTADOS

Estandarización de las concentraciones de alginato de sodio para la inmovilización por atrapamiento

De acuerdo con el análisis estadístico se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) que demuestran que las concentraciones de alginato que retuvieron la mayor cantidad de células tanto de *B. licheniformis* como de *S. cerevisiae* fueron al 3,2% (p/v) y 2,5% (p/v), respectivamente con concentraciones de 26×10^6 UFC/g y 10×10^7 UFC/g para cada microorganismo (Figura 1). Las perlas obtenidas a estas concentraciones eran compactas con diámetros promedio de 3 mm; por el contrario en las concentraciones de alginato del 1,35% (p/v) y 2,0% (p/v) evaluadas

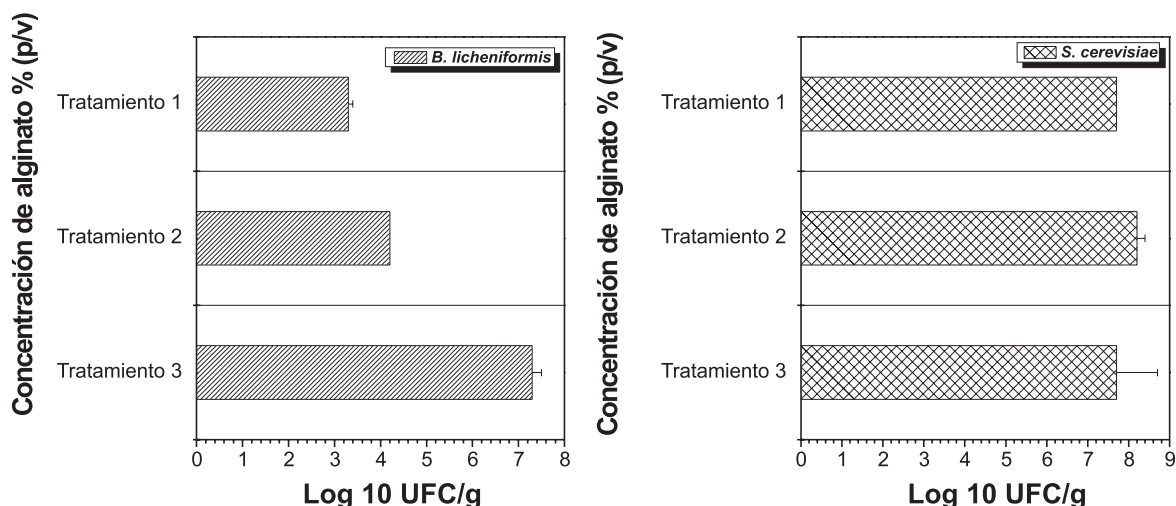


FIGURA 1. UFC/g para diferentes concentraciones de alginato de sodio para *B. licheniformis* y *S. cerevisiae* (Tratamiento 1) alginato al 1,35% (p/v), (Tratamiento 2) 2% (p/v), (Tratamiento 3) 3,2% (p/v). *S. cerevisiae* (Tratamiento 1) 2% (p/v), (Tratamiento 2) 2,5% (p/v), (Tratamiento 3) 3% (p/v).

para *B. licheniformis* solamente se retuvieron 20×10^2 UFC/g y 18×10^3 UFC/g, cinco y cuatro exponentes menos que los obtenidos con alginato al 3,2%, ya que la concentración inicial inmovilizada fue de 10×10^7 UFC/g. En cuanto a *S. cerevisiae* la concentración inicial inmovilizada fue de 23×10^7 UFC/g, al realizar la inmovilización con alginato al 2 y 3% (p/v), se retuvieron 50×10^6 UFC/g para las dos concentraciones un exponente menos que en alginato al 2,5% (p/v), los diámetros promedio de las perlas obtenidas en las cuatro concentraciones fueron de 4 mm.

La cantidad de células retenidas en las perlas no podía ser considerado como el único parámetro para la selección de la concentración de alginato por esta razón se realizaron dos pruebas complementarias para cada uno de los microorganismos valorando las concentraciones de 3,2 y 2% (p/v) respectivamente. Observando que en la prueba para *B. licheniformis* la concentración inicial de almidón fue de 11,4 g/L y al cabo de las 4 y 12 horas la concentración residual fue de 1 g/L y 0,339 g/L, reflejando un consumo rápido de sustrato (Figura 2); con respecto a la concentración de azúcares reductores liberados la mayor concentración se obtuvo a las 4 horas con 3,3 g/L, valor aproximadamente 2,5 veces más alto que a las 12 horas (1,49 g/L) demostrando su degradación correlacionada con

la actividad enzimática que para la hora 4 fue de 642 U/L y descendió a 256 U/L a las 12 horas, tendencia generada por la disminución en la concentración del sustrato inductor y posible producción de intermediarios represores. Al realizar una comparación de medias entre tiempos se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) que demuestran que la mayor cantidad de azúcares reductores se liberan a las 4 horas de proceso y en este tiempo se presenta la mayor actividad enzimática, adicionalmente se realizó un análisis de correlación entre variables encontrando una correlación significativa ($p = 0,15$) que permite inferir con un 85% de certeza que a medida que se consume el almidón se induce mayor actividad enzimática.

Con respecto al comportamiento de *S. cerevisiae* en caldo YGC la concentración inicial de glucosa fue de 20,7 g/L, al cabo de las 4 y 12 horas la concentración residual era de 16,5 g/L y 1,88 g/L reflejando un consumo gradual de la glucosa la cual fue utilizada por la levadura para el metabolismo y producción de etanol, el cual alcanzó porcentajes de 0,142% (v/v) y 0,866% (v/v) a las 4 y 12 horas respectivamente (Figura 3), se presentaron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) que demuestran que la mayor producción de etanol se alcanzó en la hora 12. Se

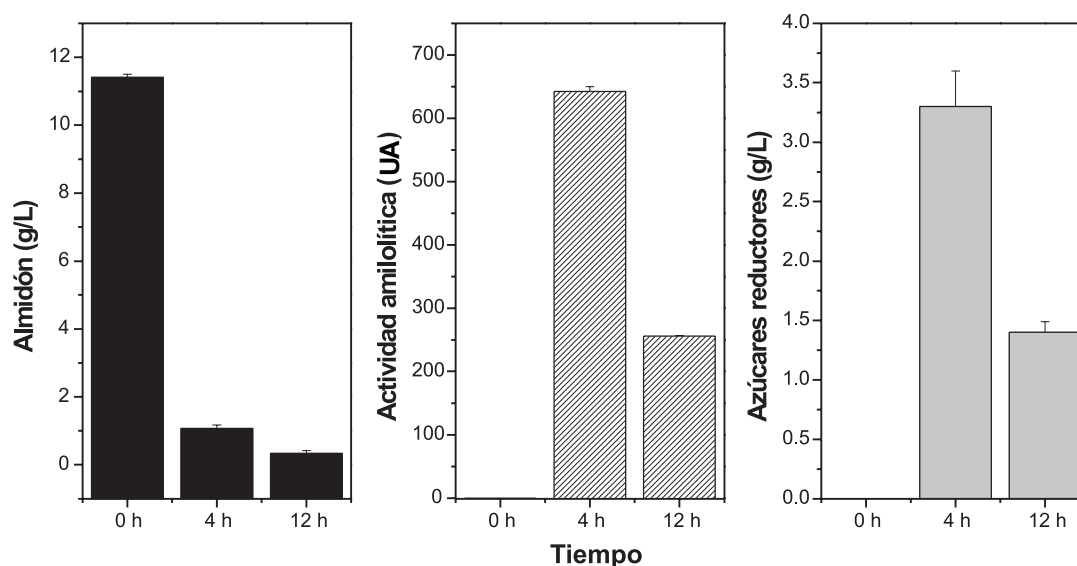


FIGURA 2. Pruebas complementarias a escala de erlenmeyer para sustrato y producto en el inmovilizado de *B. licheniformis* en alginato de sodio 3,2% (p/v), 12 horas 37°C, 150 r.p.m.

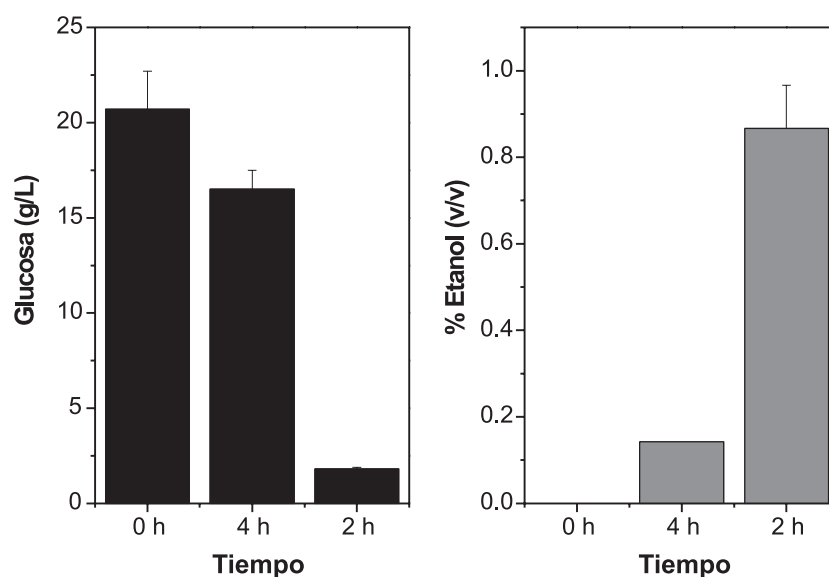


FIGURA 3. Pruebas complementarias a escala de erlenmeyer para sustrato y producto en el inmovilizado de *S. cerevisiae* en alginato de sodio 2,5% (p/v), 12 horas 37 °C, 150 r.p.m.

obtuvo una correlación significativa ($p=0,20$) que sugiere con un 80% de certeza que la producción de etanol se correlaciona con el consumo de glucosa.

La concentración de células retenidas en las perlas fue de 15×10^7 UFC/g para *S. cerevisiae* y 23×10^6 UFC/g para *B. licheniformis*, determinando que las diferentes transformaciones posiblemente se llevaron a cabo por la acción combinada de las células retenidas dentro de la matriz de alginato y las células localizadas en la parte superficial de la perla. Las cuales utilizaron los sustratos disponibles para favorecer la producción de etanol y azúcares reductores para cada microorganismo.

Estandarización de la producción del hidrolizado a partir de almidón de papa con *B. licheniformis* inmovilizado

De acuerdo con el análisis de varianza para concentración de azúcares reductores totales liberados a partir del almidón de papa la interacción de X_1 (Aireación) y X_2 (Agitación) tuvo un efecto significativo sobre la variable de respuesta ($p < 0,0001$); obteniendo la mayor concentración de azúcares reductores (3,7 g/L) cuando *B. licheniformis* se cultiva con una agitación de 150 r.p.m. y una aireación de 3 v.v.m. De la misma manera, con esta velocidad de agitación se obtiene mayor homogeneidad de nutrientes y

oxígeno, asegurando que las perlas no se sedimenten (Figura 4).

La interacción de X_1 y X_2 , en sus niveles altos tuvieron un efecto altamente significativo ($p < 0,0001$) sobre la actividad amilolítica, alcanzando valores de 669 UA cuando *B. licheniformis* se cultiva con agitación de 150 r.p.m y aireación de 3 v.v.m (Figura 5). Al realizar la comparación de medias entre los cuatro tratamientos se presentaron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) que demuestran que al emplear estas condiciones de operación se obtuvieron los valores más altos para las dos variables dependientes estudiadas, por consiguiente la producción del hidrolizado de papa en reactor de mezcla completa se trabajó bajo estas condiciones.

Con respecto al análisis cromatográfico se encontró que el hidrolizado contenía glucosa, maltosa, dextrinas y oligómeros de alto peso molecular (Datos no mostrados), éstos últimos que son difíciles de metabolizar por *S. cerevisiae* estaban presentes en gran proporción.

Producción de etanol con células libres e inmovilizadas de *S. cerevisiae* en hidrolizado de papa

El proceso de células libres se realizó con el caldo hidrolizado de papa obtenido por previo proceso hidrolítico con

$$\text{Azúcares reductores (g/L): } +2,57 + 0,39X_1 + 0,56X_2 + 0,039X_1X_2$$

$$\text{CV: 1,64. R}^2: 0,9971$$

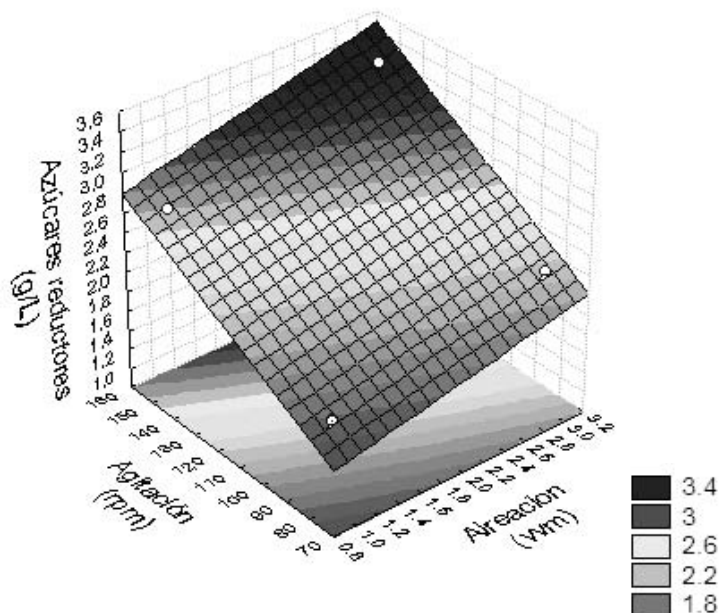


FIGURA 4. Efecto de la velocidad de agitación y aireación sobre la concentración de azúcares reductores hidrolizados por *B. licheniformis* inmovilizado en alginato de sodio al 3,2% (p/v) a partir de almidón de papa al 1% (p/v).

$$\text{Actividad amilolítica (U/L): } + 374 + 175X_1 + 163X_2 + 208X_1X_2$$

$$\text{CV: 1,29. R}^2: 0,9997$$

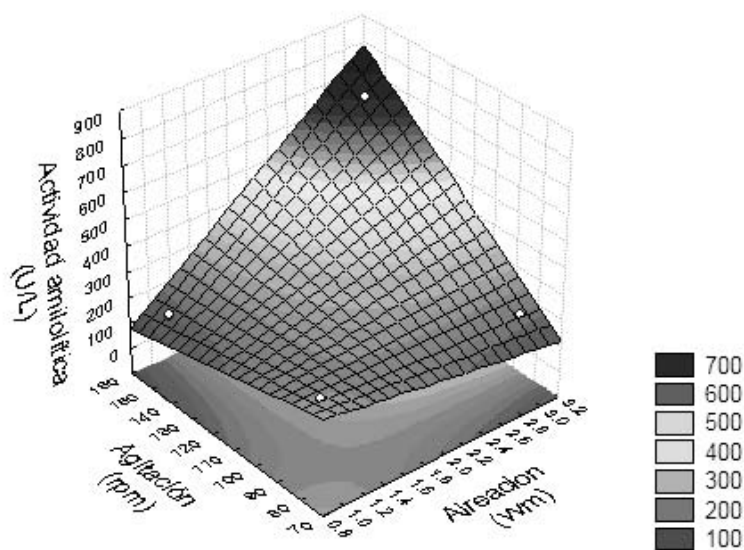


FIGURA 5. Efecto de la velocidad de agitación y aireación sobre la concentración de azúcares reductores hidrolizados por *B. licheniformis* inmovilizado en alginato de sodio al 3,2% (p/v) a partir de almidón de papa al 1% (p/v).

B. licheniformis inmovilizado. Analizando los resultados obtenidos en esta fermentación, se observa en la figura 6 que la concentración inicial de azúcares reductores en el hidrolizado fue de 3,15 g/L; el consumo de azúcares fue lento y mínimo durante toda la fermentación finalizando con 2,51 g/L; solamente el 20,17% de los azúcares existentes en el hidrolizado al iniciar la fermentación fueron utilizados por la levadura para su metabolismo. Esta situación también se reflejó en la cantidad de biomasa ya que inició con un recuento de 14×10^5 UFC/mL y finalizó en 35×10^6 UFC/mL, demostrando que los azúcares presentes en el hidrolizado no son fácilmente metabolizados por la levadura, debido a la mayor proporción de oligómeros y dextrinas que se obtuvieron en el análisis cromatográfico, que podrían exponer un extremo reductor pero al mantener cierta cantidad de enlaces glucosídicos se dificulta su utilización. Por otro lado, se observó que la producción de etanol sólo inició a partir de la hora 8 con 0,012% (v/v) alcanzado la concentración más alta a las 30 horas con 0,47% (v/v). Este valor confirma que *S. cerevisiae* no está usando con facilidad los azúcares presentes en el medio; por el contrario posiblemente está tomando otra fuente de carbono para su mantenimiento.

En el proceso de fermentación del hidrolizado de papa con *S. cerevisiae* inmovilizada, inició con 70×10^6 UFC/g células retenidas en la perla y una concentración de azúcares

3,51 g/L. Nuevamente el consumo fue lento y la tendencia fue muy similar a lo ocurrido con células libres, demostrando que el sustrato puede ser de difícil asimilación y el transporte hacia el interior de la perla pudo ser deficiente; sin embargo, la producción de etanol se incrementó en 60% con respecto a células libres, alcanzando 0,74% (v/v) a la hora 28 (Figura 6); demostrando que inmovilizar la biomasa resultó una buena alternativa, para incrementar los rendimientos del proceso sin llegar a ser igual o superior a lo obtenido en el medio control.

Como análisis estadístico se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para probar si los datos se distribuyen normalmente, posteriormente se realizó el “test” de One Way AOV, para conocer si existían diferencias entre los dos tratamientos, demostrando que los tratamientos poseen diferencias significativas ($p < 0.0001$) y que la mayor producción de etanol se logró al inmovilizar las células de *S. cerevisiae* tanto en el control como en el medio alterno.

DISCUSIÓN

Estandarización de las concentraciones de alginato de sodio para la inmovilización por atrapamiento

De acuerdo con Peinado y colaboradores (2006), la inmovilización de bacterias y levaduras tiene grandes ven-

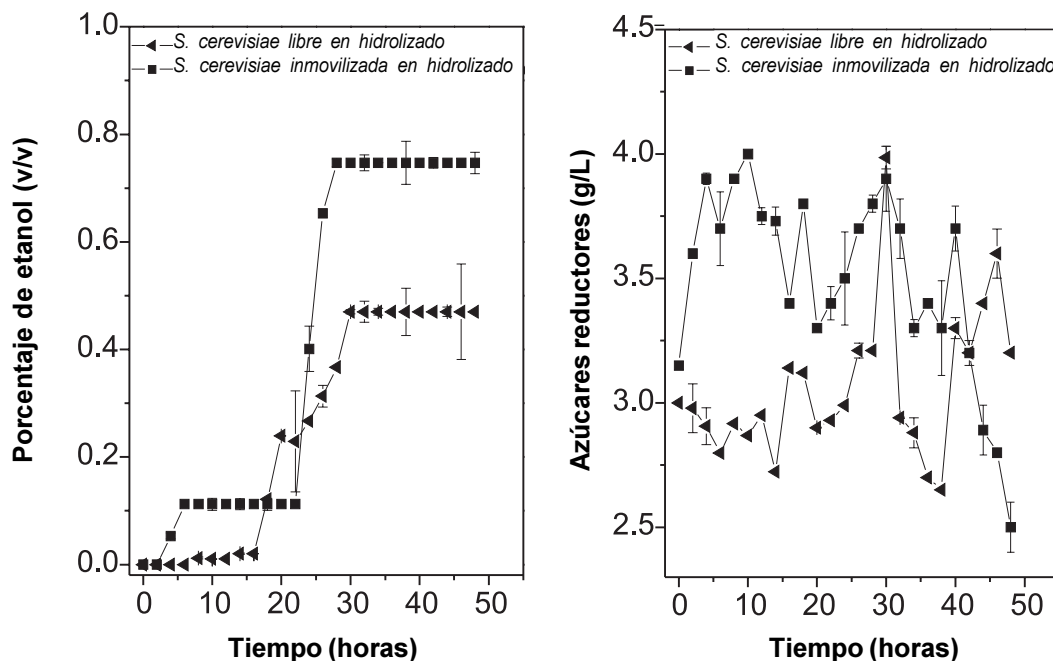


FIGURA 6. Producción de etanol y consumo de azúcares reductores en función del tiempo para *S. cerevisiae* libre e inmovilizada en hidrolizado de papa.

tajas para las fermentaciones industriales como lo es el incremento en el rendimiento de los procesos, estabilidad celular y la facilidad para recuperar las células. Sin embargo, antes de emplear las células se deben estandarizar ciertas variables como la concentración de alginato de sodio para obtener las condiciones óptimas de inmovilización que favorezcan la difusividad, tanto de sustratos como de productos y mantengan la actividad celular implicando la unión estable de la célula a la matriz con el fin de evitar la pérdida de células en el inmovilizado. Las células de *B. licheniformis* y *S. cerevisiae* fueron inmovilizadas en diferentes concentraciones de alginato de sodio encontrando que para *B. licheniformis* las concentraciones bajas (1,35 y 2% (p/v)), dejaron liberar al medio gran cantidad de células reteniendo 20×10^2 y 18×10^3 UFC/g, esta liberación excesiva se atribuyó a las bajas concentraciones de alginato ya que se ha demostrado que la cantidad de células que se mezcla con el alginato y la porosidad, la cual aparentemente es altamente dependiente de la concentración de alginato, cloruro y del tiempo de polimerización juegan a papel importante en la estabilidad operacional y eficiencia de las perlas (Konsoula y Kyriakides, 2006) a bajas concentraciones de alginato, se obtuvo una red con poros muy grandes que permitían la difusión de sustrato, productos y células. Adicionalmente, las perlas eran muy frágiles ante la presión mecánica y se fracturaban con facilidad.

Con *S. cerevisiae* se presentó un fenómeno similar en la concentración baja, pero a diferencia de *B. licheniformis* solamente se disminuyó en una unidad logarítmica la población inicial retenida, esta situación se pudo presentar porque las levaduras tienen un tamaño de 5-7 mm (Alcaide, 2008), que impide que sean liberadas al medio de cultivo ya que el diámetro de poro para alginato al 2% (p/v) es de 7 mm (Najafpour et al., 2004). En la concentración de alginato al 3% (p/v) también se perdió una unidad logarítmica, pero de acuerdo con el análisis estadístico la mejor concentración para inmovilizar la levadura fue alginato al 2,5% (p/v), esta concentración ha sido reportada por autores como Najafpour y colaboradores (2004), en su trabajo demostraron que la concentración de alginato está directamente relacionada con la difusión de la glucosa y el etanol hacia el interior y exterior del material polimérico, a la vez determinaron que a concentraciones muy bajas, las perlas son suaves y se fragmentan con facilidad, generando un proceso de expansión de las perlas con la consecuente liberación de la levadura, por el contrario a concentraciones de alginato superiores al 3% (p/v) las perlas son muy rígidas, dificultan la transferencia de materiales y la producción de etanol disminuye drásticamente en el transcurso de la fermentación.

Kanasawud y colaboradores (1989); Mamo y Gessesse (1997) sugieren que la inmovilización de células genera bajos niveles de producción enzimática en comparación con las células libres, debido a una barrera difusional generada por el alginato y la reducida disponibilidad de oxígeno que pueden tener las células aeróbicas inmovilizadas. Sin embargo, los resultados encontrados en este estudio difieren con sus hallazgos porque al realizar las pruebas complementarias de difusividad para sustratos y productos se observó que *B. licheniformis* hidroliza el almidón hasta dejar una concentración residual de 1 g/L y 0,339 g/L a las 4 y 12 horas de proceso; muy posiblemente (tendría que ser comprobado experimentalmente), el sustrato polimérico no ingresó dentro de perla por su elevado peso molecular tal como lo reportó Konsoula y Kyriakides (2006); pero en la parte superficial de la perla quedaron retenidas células las cuales fueron las responsables de llevar a cabo la primera etapa de hidrólisis, generando moléculas de menor tamaño que si ingresaron al interior de la perla para ser utilizadas por el resto de la población. La presencia de células en la parte superficial de la perla ha sido visualizada por medio de microscopía electrónica de barrido en los trabajos de Najafpour y colaboradores (2004) y Jamai y colaboradores (2007); razón por la cual, es factible que una situación similar se haya presentado para *B. licheniformis* aunque no se llevaron a cabo estudios de microscopía. De manera complementaria las bacterias localizadas en el interior también pudieron producir más enzima y ésta, por ser extracelular atravesó la matriz para continuar con el proceso de hidrólisis, ya que para el hora 4 y 12 la actividad fue de 642 UA/L y 256 UA/L, respectivamente.

Por otro lado, al realizar cuantificaciones de sustrato y producto en dos tiempos diferentes permitió establecer que el almidón funciona como inductor de la actividad, ya que a medida que su concentración disminuyó la actividad fue menor posiblemente porque la proporción de enlaces glucosídicos fue disminuyendo y la presencia de ciertos productos de la hidrólisis actuaron como represores de la actividad enzimática. Esta tendencia también permite suponer que el tipo de enzima que se está produciendo es una α -amilasa la cual libera oligómeros de glucosa, por esta razón los picos más elevados correspondían a los compuestos de elevado peso molecular y menor proporción glucosa y maltosa.

Con respecto al comportamiento de *S. cerevisiae* la concentración inicial de glucosa fue de 20,7 g/L y por ser un monómero de bajo peso molecular pudo difundir a través de la perla para ser metabolizado por la levadura, la cual al cabo de las 4 y 12 horas dejó una concentración residual

de 16,5 g/L y 1,88 g/L. A diferencia de *B. licheniformis* la mayor limitante del proceso fue el transporte del sustrato y no la difusión de oxígeno hacia el interior de la matriz ya que la producción de etanol se lleva a cabo bajo condiciones de anaerobiosis (Wen-tao *et al.*, 2005).

Con respecto a la cantidad de producto formado, el porcentaje de etanol fue bajo (0,142% (v/v) y 0,866% (v/v)) para las 4 y 12 horas respectivamente. Si se compara con otros trabajos con *S. cerevisiae* inmovilizada en este matriz los porcentajes fueron bajos, la posible razón se relaciona con la concentración inicial de glucosa ya que autores como Baptista y colaboradores (2006) parten de 100 g/L de glucosa obteniendo 28 g/L de etanol en 196 horas de cultivo. Yu y colaboradores (2007) inmovilizaron a *S. cerevisiae* sobre residuos de sorgo y obtuvieron muy buenos rendimientos de etanol pero suplementan el sistema con 200 g/L de glucosa. La cantidad de células inmovilizadas pudo ser otra de las causas que determinaron la baja producción de etanol. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos en esta investigación con el artículo publicado por Wen-tao y colaboradores (2005), se observa que en los dos trabajos la inmovilización de 10^7 UFC/g de levaduras fue la mejor concentración celular, pero ellos obtuvieron mayor concentración de etanol porque trabajaron una mezcla de alginato-quitosano-alginato como polímeros para formar perlas con mayor fluidez interna sin tener una liberación excesiva de células, lo que favoreció que no se formaran agregados celulares que compiten por el sustrato disponible.

Estandarización de la producción del hidrolizado a partir de almidón de papa

El almidón es un compuesto que se encuentra de forma abundante en la naturaleza, sirve como fuente de carbono para el crecimiento de varios microorganismos; sin embargo, *Saccharomyces cerevisiae* no posee la batería enzimática necesaria para la hidrólisis y posterior producción de etanol, por consiguiente es necesario llevar a cabo un tratamiento previo para obtener azúcares fermentables que puedan ser utilizados por la levadura.

Por lo anterior, el almidón de papa fue hidrolizado por vía enzimática empleando células de *B. licheniformis* inmovilizadas a escala de reactor de 2 litros. Las condiciones de 150 r.p.m. y una aireación de 3 v.v.m. favorecieron la producción de azúcares reductores y actividad amilolítica, a las 4 horas de tratamiento. *B. licheniformis* es un bacilo grampositivo que requiere condiciones aeróbicas para su crecimiento y producción de metabolitos, la respuesta positiva bajo estas condiciones se puede analizar desde tres puntos de vista. El primero hace referencia

al efecto de la velocidad de agitación, a 150 r.p.m. probablemente se incrementó la transferencia de oxígeno hacia la parte superficial e interior de las perlas de alginato, zonas en las cuales se encontraban distribuidas las células, a su vez una mayor velocidad de agitación permitió una recirculación constante de las perlas sin que se generara un proceso de sedimentación excesivo o daño mecánico sobre las perlas. La segunda tiene que ver con la solubilidad del oxígeno en soluciones acuosas, se sabe que este gas a temperatura ambiente tiene una solubilidad de aproximadamente 10 ppm, por lo tanto, es consumido rápidamente por los microorganismos aeróbicos y se necesita renovar constantemente por medio de inyección de aire en profundidad, por esta razón un incremento en el suministro (3 v.v.m.) jugó un papel fundamental porque la molécula de oxígeno debió superar una serie de barreras incluyendo la matriz de alginato antes de ser utilizada por *B. licheniformis* como aceptor final de electrones; autores como Wind y colaboradores (1994) reportaron que a aireaciones elevadas se favorece la producción de α -amilasas. La tercera se relaciona con el sustrato inductor, en este caso almidón de papa, Haq y colaboradores (2005) sugieren que el tipo de fuente de carbono afecta el modo en que se forma la amilasa y la velocidad con la cual los carbohidratos son metabolizados; almidones solubles o tratados químicamente pueden favorecer el crecimiento pero reducen la formación de producto y por el contrario almidones crudos como el de papa generan un crecimiento lento del microorganismo con niveles significativamente altos de α -amilasa, situación que se pudo presentar en este trabajo porque el almidón fue obtenido a partir de residuos de papa sin tratamiento previo. Finalmente la presencia de calcio en el hidrolizado puede estabilizar y activar la enzima, favoreciendo su producción y protegiéndola de estrés mecánico generado por la velocidad de agitación y la inyección del aire (Li *et al.*, 2007).

Producción de etanol con células libres e inmovilizadas de *S. cerevisiae* en hidrolizado de papa

La conversión de glucosa a etanol es llevada a cabo por levaduras y a nivel industrial generalmente es utilizada levadura del género *Saccharomyces*, ya que posee un rendimiento teórico de 51,1% p/p (Glazer y Nikaido, 1998), son tolerantes a diferentes concentraciones de etanol, es un microorganismo no patógeno anaerobio facultativo y algunas de las especies pueden utilizar diferentes subproductos agroindustriales.

Con respecto a la concentración de etanol obtenidos al utilizar el hidrolizado de papa como medio alterno fueron bajos, arrojando valores de 0,47% (v/v) y 0,74% (v/v) respectivamente para biomasa libre e inmovilizada. Bertoft

(2007) afirma que el almidón de papa crudo está compuesto por 20% de amilosa y 80% de amilopectina, siendo éste el componente mayoritario, el cual está constituido por pequeños grupos de 6-35 residuos de glucosa unidos por enlaces alfa 1-4, la parte interna del grupo contiene ramificaciones α 1-6 entre la cadena y la lamela amorfa. Cuando este almidón se hidroliza con α -amilasas de *B. amiloliquefaciens* y *B. licheniformis* los principales productos son a-dextrinas de tamaño variable. Este hallazgo concuerda con los resultados de cromatografía para el hidrolizado de papa evaluado en este artículo, porque se presentaron dos picos grandes uno ellos asociado con oligómeros de alto peso molecular y otro con dextrinas; en menor cantidad se observaron picos que corresponden a maltosa y glucosa. Por esta razón, la cantidad de azúcares reductores no fue superior a 3,6 g/L determinando que en el hidrolizado estuvieran productos de difícil degradación para *S. cerevisiae* y la conversión se llevó a cabo en función de los pocos azúcares disponibles en el sustrato y por el uso de otras fuentes de carbono presentes en el hidrolizado. Por otro lado, el análisis químico demostró que el hidrolizado posee una baja concentración de nitrógeno de 12 ppm incluidos en forma de amonio y nitratos.

CONCLUSIONES

Los procesos de inmovilización en matriz de alginato de calcio de *S. cerevisiae* y *B. licheniformis* retuvieron la mayor concentración de células a 2,5 y 3,2% (p/v) respectivamente y fueron más eficientes que en células libres, demostraron que se puede producir etanol a partir de almidón de papa empleando el proceso de producción de etanol con *B. licheniformis* y *S. cerevisiae* inmovilizados en perlas de alginato; sin embargo, la producción del hidrolizado como medio alternativo debe ser mejorada para inducir durante la primera etapa un proceso paralelo de licuefacción y sacarificación de tal manera que se logre incrementar la concentración de azúcares reductores de fácil asimilación para la levadura.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio forma parte del proyecto No. 000632 registrado en la oficina de Fomento a la Investigación de la Vicerrectoría Académica. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

LITERATURA CITADA

- ALCAIDE, R. Detección de los estados fisiológicos de células en trampas ópticas. ICFO- INSTITUT DE CIÈNCIES FOTÒNIQUES. París, Francia. 2008, 33 p.
- ALFARO, I. y PINZÓN, M.P. *Aislamiento y caracterización de bacterias mesófilas aerobias con actividad amilolítica, proteolítica a partir de compost elaborado con residuos de café*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2001.
- ASGHER, M.; JAVAID-ASAD, M.; RAHMAN, S.U. y LEGGE, R.L. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 2007, 79, 950-955.
- BAPTISTA, C.M.S.G.; C'OIAS, J.M.A.; OLIVEIRA, A.C.M.; OLIVEIRA, N.M.C.; ROCHA, J.M.S.; DEMPSEY, M.J.; LANNIGAN, K.C.; BENSON, P.S. Natural immobilization of microorganisms for continuous ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 40, 127-131.
- BERFELD, P. Amylase. *Methods in Enzymology*, 1995, 1, 149-158.
- BERTOFT, E. Composition of building blocks in clusters from potato amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 2007, 70, 123-136.
- BIROL, G.; DORUKER, P.; KARDAR, B.; ONSAN, Z. y ULGEN, K. Mathematical description of ethanol fermentation by immobilised *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 1998, 33, 763-771.
- DOBREVA, E.; IVANOVA, V.; TONKOVA, A. y RADULOVA, E. Influence of the immobilization conditions on the efficiency of α -Amylase production by *Bacillus licheniformis*. *Process Biochemistry*, 1996, 3, 229-234.
- FEDEPAPA. Formas de industrialización de la papa. En: *Boletín informativo*, N° 73, 1991, 4 págs.
- GLAZER, A., y NIKAIDO, H. *Microbial technology: fundamentals of applied microbiology*. Primera edición. WH Freeman. New York, USA. 1995, 390 págs.
- HAQ, I.; ASHRAF, H.; QADEER, M.A. y IQBAL, J. Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology*, 2005, 96, 1201-1204.
- INGRAM, L.O.; GOMEZ, P.F.; LAI, X.; MONIRUZAMAN, M. y WOOD, B.E. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnology Bioengineering*, 1998, 58, 204-214.
- JAMAI, L.; ETTAYEBI, K.; EL YAMANI, J. y ETTAYEBI, M. Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amylase. *Bioresource Technology*, 2007, 98, 2765-2770.

- JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, J.; SALAZAR-MONTOYA, J.A. y RAMOS-RAMÍREZ, E.G. Physical, chemical and microscopic characterization of a new starch from chayote (*Sechium edule*) tuber and its comparison with potato and maize starches. *Carbohydrate Polymers*, 2007, 68, 679-686.
- KANASAWUD, P.; HJORLEIFSDOTTIR, S.; HOLST, O. y MATTIASSON, B. Studies on immobilization of the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus* YT-1 by entrapment in various matrices. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1989, 31, 228-233.
- KAUR, L.; SINGH, J.; MCCARTHY, O. y SINGH, H. Physico-chemical, rheological and structural properties of fractionated potato starches. *Journal of Food Engineering*, 2007, 82, 383-394.
- KONSOULA, Z. y KYRIAKIDES, M. Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 2006, 41, 343-349.
- LI, H.; CHI, Z.; WANG, X.; DUAN, X.; MA, L. y GAO, L. Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40, 1006-1012.
- MAMO, G. y GESSESSE, A. Thermostable amylase production by immobilized thermophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Technology*, 1997, 11, 447-450.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. *Acuerdo de competitividad de la cadena agroalimentaria de la papa*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá., Colombia, 2008, 67 págs.
- MILLER, G. Use of dinitrosalicylic-acid reagent for determination of reducing sugar. *Annales Chemistry*, 1959, 31: 426-428.
- MOISER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 2005, 96, 673-686.
- MONTGOMERY, D.C. *Diseño y análisis de experimentos*. Segunda edición. Limusa Wiley, México D.F., México, 2003, 218 págs.
- NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; SYAHIDAH, K. y ISMAIL, K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 2004, 92, 251-260.
- O'BRIEN, S. y WANG, Y. Susceptibility of annealed starches to hydrolysis by α -amylase and glucoamylase. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 72, 597-607.
- PAIFER, E.; MARGOLLES, E.; CREMATA, J.; MONTESINO, R.; HERRERA, L.; DELGADO, J. Expressions and secretions of recombinant α amylase in *Pichia pastoris*, using two different signal sequence. *Yeast*, 1994, 10, 1415-1419.
- PEINADO, R.; MORENO, J.; VILLALBA, J.; GONZÁLEZ-REYES, J.; ORTEGA, J. y MAURICIO, J.C. Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 40, 79-84.
- ROCA, E.; FLARES, J.; NTFIEZ, M.J. y LEMA, J.M. Ethanolic fermentation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a semipilot pulsing packed-bed bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 19, 132-139.
- SANIN, I. *Aislamiento, identificación, caracterización bioquímica y producción de etanol con células inmovilizadas de Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 1999.
- SOSSA, D. y NAVARRO M.A. Obtención de etanol a partir de almidón de papa proveniente del sector agrícola. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2003.
- SUGITA, H.; KURUMA, A.; DEGUCHI, Y. Purification and some properties of an α -amylase from an anaerobic bacterium isolate from coastal sediment. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 1997, 10, 1757-1759.
- SUN, Y. y CHENG, J.J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 2002, 83, 1-11.
- SWAIN, M.R.; KAR, S.; SAHOO, A.K. y RAY, R.C. Ethanol fermentation of mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers using free and immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Research*, 2007, 162, 93-98.
- TUITE, M. y OLIVER, S. *Saccharomyces cerevisiae*. Primera edición. Plenum Press. New York., USA. 1991, 120 págs.
- WEN-TAO, Q.; WEI-TING, Y.; YU-BING, X. y XIAOJUN, M. Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* culture in alginate-chitosan-alginate microcapsule. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 25, 151-157.

WIND, R.; BUITELAAR, R.; EGGINK, G.; HUIZING, H.; DIJKHUIZEN, L. Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate: a high thermostable α -amylase-producing strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 41, 155-162.

YU, J.; ZHANG, X. y TAN, T. An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *Journal of Biotechnology*, 2007, 129, 415-420.