



Interciencia

ISSN: 0378-1844

interciencia@ivic.ve

Asociación Interciencia

Venezuela

Morocoima, José A.; Bertsch, Annalisse; Domínguez, Gabriela D. J.; Mazzani, Claudio; Díaz, Isabel  
Optimización del cocultivo de *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de  
etanol a partir de los residuos del procesamiento agroindustrial de la papa (*Solanum tuberosum*)

Interciencia, vol. 38, núm. 4, abril, 2013, pp. 305-309

Asociación Interciencia

Caracas, Venezuela

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33926985011>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

---

## OPTIMIZACIÓN DEL COCULTIVO DE *Aspergillus niger* Y

## *Saccharomyces cerevisiae* PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE LOS RESIDUOS DEL PROCESAMIENTO AGROINDUSTRIAL DE LA PAPA (*Solanum tuberosum*)

---

José A. Morocoima, Annalisse Bertsch, Gabriela Domínguez, Claudio Mazzani e Isabel Díaz

### RESUMEN

Se llevó a cabo la caracterización del cocultivo de *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de etanol a partir de residuos del procesamiento agroindustrial de la papa (*Solanum tuberosum*). Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) mediante un diseño del compuesto central ortogonal (DCCO), para identificar las mejores condiciones en cuanto a volumen (%) de inóculo de *A. niger* y de *S. cerevisiae*, el tiempo para inocular la levadura (h) y la concentración de sustrato ( $g\cdot l^{-1}$ ) para la producción de etanol (%p/v). Los resultados obtenidos durante el proceso de fermentación revelaron que el cocultivo degradó 96,2% del almidón en el medio para producir 1,7% p/v de etanol (0,44g etanol/g sustrato), 91,3% del rendimiento teórico máximo. La

actividad enzimática en el caldo se incrementó hasta alcanzar un máximo de 39,21UA/ml a las 24h para la amilasa y 2,95UI/ml para la glucoamilasa a las 32h. El análisis de regresión señaló que el parámetro de mayor relevancia fue la concentración de sustrato. Se empleó el análisis Ridge para obtener las siguientes condiciones: concentración inicial del sustrato ( $79,4g\cdot l^{-1}$ ), tiempo de inoculación de *S. cerevisiae* (24h), inóculo de *A. niger* (6%) e inóculo de *S. cerevisiae* (10%), con lo que se podría obtener 2,76% p/v de etanol. La comparación del cocultivo en las condiciones optimizadas y sin optimizar señala que en 56h es posible superar en 41% la concentración de etanol producida originalmente.

## OPTIMIZATION OF *Aspergillus niger* AND *Saccharomyces cerevisiae* COCULTURE FOR THE PRODUCTION OF ETHANOL FROM POTATO (*Solanum tuberosum*) AGROINDUSTRIAL PROCESSING WASTES

José A. Morocoima, Annalisse Bertsch, Gabriela Domínguez, Claudio Mazzani and Isabel Díaz

### SUMMARY

The characterization of coculture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production from agroindustrial residues of potato was carried out. It was used the response surface methodology (SRM) was used, employing a central component orthogonal design (CCOD) to identify the best conditions for the volume (%) of *A. niger* and *S. cerevisiae* inocula, the time to inoculate yeast (h) and the substrate concentration ( $g\cdot l^{-1}$ ) for the production of ethanol (% w/v). The results obtained during the fermentation process revealed that coculture degraded 96.2% of starch in the medium to produce 1.7% w/v ethanol and 0.44g ethanol/g substrate (91.3% of theoretical maximum yield). The en-

zyme activity in the culture broth was increased to a maximum of 39.21AU/ml at 24h for amylase and 2.95IU/ml at 32h for glucoamylase. Regression analysis indicated that the most important parameter was the concentration of substrate. The Ridge analysis identified as better initial conditions: substrate concentration ( $79.4g\cdot l^{-1}$ ), time of inoculation of *S. cerevisiae* (24h), size of inoculum of *A. niger* (6%) and inoculum of *S. cerevisiae* (10%) to obtain 2.76% w/v of ethanol. Comparing the coculture in optimized and non-optimized conditions indicate that it is possible in 56h to obtain 41% more of ethanol than it was originally produced.

### Introducción

La creciente demanda mundial de bioetanol para su uso como combustible, solvente industrial o agente de limpieza ha generado la necesidad

de encontrar sustratos novedosos de bajo costo y disponibles para disminuir los costos de producción (Horta, 2006). Una alternativa ambientalmente amigable consiste en el uso de los residuos agroindustria-

les como sustrato en los procesos biotecnológicos. Entre estos residuos se encuentran aquellos del procesamiento agroindustrial de la papa (*Solanum tuberosum*), la cual es reportada como el segundo

alimento más consumido a nivel mundial, de la que puede generar entre 20 y 25% de residuos como la cáscara, con un alto contenido (>70%) de almidón (García y Olivares, 2007; Afifi *et al.*, 2011).

---

### PALABRAS CLAVE / *Aspergillus niger* / Cocultivo / Etanol / Residuos de Papa / *Saccharomyces cerevisiae* /

Recibido: 19/03/2012. Modificado: 11/04/2013. Aceptado: 24/04/2013.

**José A. Morocoima.** Ingeniero Agrónomo, Universidad Central de Venezuela (UCV). Supervisor de Producción, Del Monte Andina CA, turmero, Venezuela.

**Annalisse Bertsch.** Ingeniera Agrónoma y Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

UCV, Venezuela. Profesora-Investigadora, UCV, Venezuela. Dirección: Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, Instituto de Química y Tecnología, Av. Universidad, Maracay, Venezuela. Apartado 4579, Maracay, 2101, Venezuela. e-mail: bertscha@gmail.com.

**Gabriela DJ. Domínguez.** Ingeniera Agrónoma y Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos, UCV, Venezuela. Profesora e Investigadora, UCV, Venezuela.

**Claudio Mazzani.** Ingeniero Agrónomo y Doctor en Ciencias Agrícolas, UCV, Venezue-

la. Profesor-Investigador, UCV, Venezuela.

**Isabel Díaz.** Licenciada en Matemáticas y Magíster en Estadística, UCV, Venezuela. Directora, Facultad de Ingeniería, Núcleo UCV, Cagua, Aragua, Venezuela.

# OTIMIZACIÓN DEL CO-CULTIVO DE *Aspergillus niger* E *Saccharomyces cerevisiae* PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE LOS RESÍDUOS DEL PROCESAMIENTO AGROINDUSTRIAL DE LA BATATA (*Solanum tuberosum*)

José A. Morocoima, Annalisse Bertsch, Gabriela Domínguez, Claudio Mazzani e Isabel Díaz

## RESUMO

Realizou-se a caracterização do co-cultivo de *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae* para a obtenção de etanol a partir de resíduos do processamento agroindustrial da batata (*Solanum tuberosum*). Utilizou-se a metodologia de superfície de resposta (MSR) mediante um desenho do composto central ortogonal (DCCO), para identificar as melhores condições quanto a volume (%) de inoculo de *A. niger* e de *S. cerevisiae*, o tempo para inocular a levedura (h) e a concentração de substrato ( $g\cdot l^{-1}$ ) para a produção de etanol (%p/v). Os resultados obtidos durante o processo de fermentação revelaram que o co-cultivo degradou 96,2% do amido no meio para produzir 1,7% p/v de etanol (0,44g etanol/g substrato), 91,3% do

rendimento teórico máximo. A atividade enzimática no caldo se incrementou até alcançar um máximo de 39,21UA/ml em 24hs para a amilase e 2,95UI/ml em 32hs para a glucoamilase. A análise de regressão mostrou que o parâmetro de maior relevância foi a concentração de substrato. Empregou-se a análise Ridge para obter as seguintes condições: concentração inicial do substrato ( $79,4g\cdot l^{-1}$ ), tempo de inoculação de *S. cerevisiae* (24hs), inóculo de *A. niger* (6%) e inoculo de *S. cerevisiae* (10%), com o que se poderia obter 2,76% p/v de etanol. A comparação do co-cultivo nas condições otimizadas e sem otimizar mostra que em 56hs é possível superar em 41% a concentração de etanol produzida originalmente.

El almidón de este tipo de sustrato puede ser fermentado directamente por algunos microorganismos, pero en la mayoría de los casos debe ser previamente hidrolizado a azúcares simples (Nigam y Singh, 1995). En años recientes se ha intentado, con resultados prometedores, eliminar el paso de la sacarificación y licuefacción enzimática mediante el empleo de un cultivo simbiótico de organismos amilolíticos y fermentadores de azúcares (Robertson *et al.*, 2006). En este sentido, diferentes estudios han demostrado que *Aspergillus niger*, a través de las enzimas amilolíticas que genera ( $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa principalmente), puede hidrolizar este polisacárido a azúcares que posteriormente pueden ser fermentados anaeróbicamente por *Saccharomyces cerevisiae* (Mujica, 2006; Ado *et al.*, 2009). Se ha reportado que a partir de los residuos del procesamiento de la papa se alcanza un rendimiento teórico máximo de 56,7g de etanol/100g de almidón crudo, así como la obtención de  $74l\cdot t^{-1}$  de bioetanol (Abou-zied y Reddy, 1986; Afifi *et al.*, 2011).

El uso de cocultivos permite disminuir los tiempos de retención, producir cantidades significativas de biomasa, azúcares simples y enzimas como productos colaterales, en comparación con los monocultivos; así mismo permite prevenir las altas concentraciones inhibitorias

de los azúcares, mejora la actividad amilolítica y por ende el rendimiento en etanol (Abou-zied y Reddy, 1986; León *et al.*, 1997; Ado *et al.*, 2009). Aunque en el proceso de obtención de etanol el uso de residuos agroindustriales disminuye los costos, existen otros aspectos de la fermentación y recuperación del producto, tales como el uso de cepas altamente productoras de etanol, control de la viscosidad del proceso, recuperación de la biomasa, tamaño del inóculo y temperatura del proceso, entre otros, que requieren de su optimización para que el proceso sea económicamente rentable y competitivo (Zhang *et al.*, 2011).

El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar el cocultivo de *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* y optimizar los parámetros que influyen en el proceso de fermentación para la obtención de etanol a partir de los residuos del procesamiento agroindustrial de la papa.

## Materiales y Métodos

### Acondicionamiento del sustrato

Los desechos del procesamiento agroindustrial de la papa fueron donados por una empresa de la localidad y trasladados a las instalaciones de la Planta de Vegetales del Instituto de Química y Tecnología, Facultad de

Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Fueron deshidratados en un secador de bandejas Proctor Schwartz (Philadelphia, PA, EEUU) a 60°C y velocidad de aire de 5m·s<sup>-1</sup>. Posteriormente se redujo su tamaño en un molino de martillos Rietz Manufacturing (Santa Rosa, CA, EEUU) como acondicionamiento previo a los análisis físicos químicos. La harina obtenida fue caracterizada siguiendo la metodología de la AOAC (1990) y su composición (expresada en base seca) resultó ser: grasa 0,52%; cenizas 2,75%; proteínas 6,97%; glucosa 0,56%; almidón 89,61%; extracto libre de N2 88,05%; fibra cruda 2,12%.

### Proceso de fermentación

Para hidrolizar el almidón se empleó un aislado de *Aspergillus niger* ANM-1 perteneciente a la colección del cepario del Laboratorio de Micotoxincología de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Para la obtención del etanol se utilizó una levadura deshidratada comercial de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los microorganismos fueron cultivados en fiolas de 500ml, donde se incorporó 100ml de una solución salina conteniendo (por litro de agua): sulfato de magnesio 5g; sulfato de amonio 2g; carbonato de calcio 0,5g; fosfato potásico monobásico 2g; extracto de levadura 2g; y sus-

trato (residuos de papa) 40g. El pH se ajustó a 5 con ácido clorhídrico para luego ser esterilizado a 121°C por 15min (García y Olivares, 2007).

Por cada 100ml de medio de cultivo se inoculó una suspensión de esporas de *A. niger*, la cual se obtuvo por raspado de superficie de una colonia en crecimiento en papa dextrosa agar en cuña. Este raspado fue arrastrado con agua destilada y la suspensión formada se filtro eliminando los restos de micelio y conidióforos, para unificar el inóculo con la presencia de los conidios. La concentración del inóculo fue de  $1\times 10^6$  esporas/ml, contabilizadas en cámara de Newbauer. Así mismo, por cada 100ml de medio se inoculó una suspensión de *S. cerevisiae* previamente hidratada en agua estéril a razón de 20g·l<sup>-1</sup> por 30min. La fermentación se llevó a cabo a 38°C y 90 oscilaciones/min durante un total de 72h, incluyendo la fase aeróbica de hidrólisis y la anaeróbica de fermentación alcohólica (Bertsch *et al.*, 2010).

### Cinética de fermentación

Durante la fermentación, los cambios fueron monitoreados mediante las mediciones de pH medido con un equipo Orión modelo 420A con electrodo de vidrio; almidón según el método colorimétrico de Mc Cready modificado (Mc Cready *et al.*, 1956); azúcares reductores por



47g·l<sup>-1</sup>; X<sub>2</sub>= 23,56h; X<sub>3</sub>= 7,21%; X<sub>4</sub>= 7,5%) y éste no resultó ser un punto óptimo, por lo que se partió de él para encontrar una combinación de factores que generaran una mejor respuesta. Mediante esto último se logró como resultado la obtención de un valor máximo de 2,8g/100ml (%p/v) de etanol con el que se requiere utilizar 79,4g·l<sup>-1</sup> del sustrato en el cultivo, inocular al *A. niger* en una proporción del 6% y 24h después inocular 10% de la levadura *S. cerevisiae*.

Bajo estas condiciones óptimas se procedió a realizar el cultivo y a comparar los datos con los obtenidos en condiciones no optimizadas. Estos resultados se pueden observar en la Figura 3(a-f). Este nuevo proceso fermentativo permite incrementar en 49,6% la incorporación en el medio de cultivo del residuo del procesamiento de papa y por ende del almidón, respecto al cultivo sin optimizar. Adicionalmente, durante la fermentación es posible lograr la desaparición de este sustrato al ser transformado en etanol al cabo de 56h. Una mayor utilización de éste en el proceso permite incrementar la contribución en la prevención de la acumulación de estos desechos en el medio ambiente.

El aumento en la concentración del inóculo de la levadura en 24% coincide con lo reportado por Abouzied y Reddy (1986), quienes indican que un mayor inóculo de *S. cerevisiae* reduciría el tiempo de fermentación, resultando beneficioso sobre todo cuando las concentraciones de sustrato son altas.

La disminución en 41% del volumen de inóculo de *A. niger* ANM-1 requerido es un factor que incide en la disminución del costo de producción de los pre-cultivos del moho a mayor escala y muestra la capacidad de este aislado para degradar este tipo de sustrato. En este mismo orden de ideas, la optimización del proceso resultó en el incremento en 27,9 y 17,24% de las actividades de las enzimas  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas (Figuras 3d y e), respecto a las actividades

máximas alcanzadas sin optimizar. Este comportamiento de las enzimas permitió transfor-

mar los azúcares y obtener el etanol a razón de 0,68g·l<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, así como superar en 41,1% el

valor de la concentración de etanol obtenido sin optimizar al cabo de 56h.

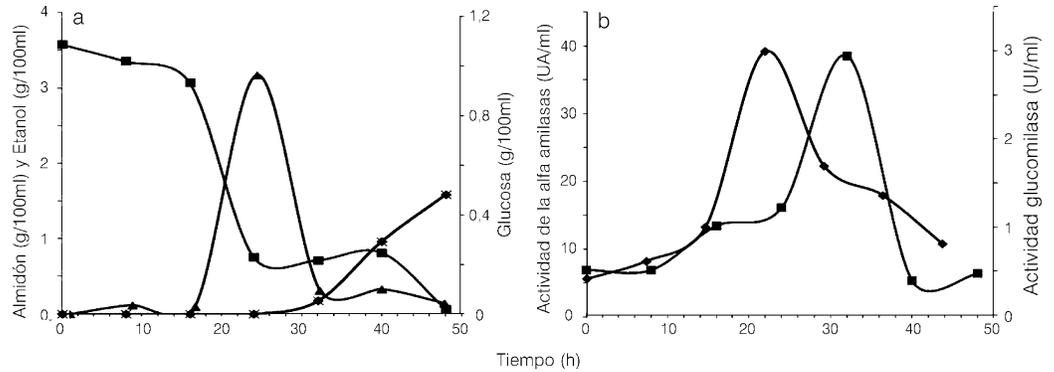


Figura 1. a: Variación de las concentraciones de almidón (■), glucosa (▲), y etanol (◆); b: variación de la actividad enzimática de amilasas (●) y glucoamilasas (■), durante el proceso de fermentación sin optimizar.

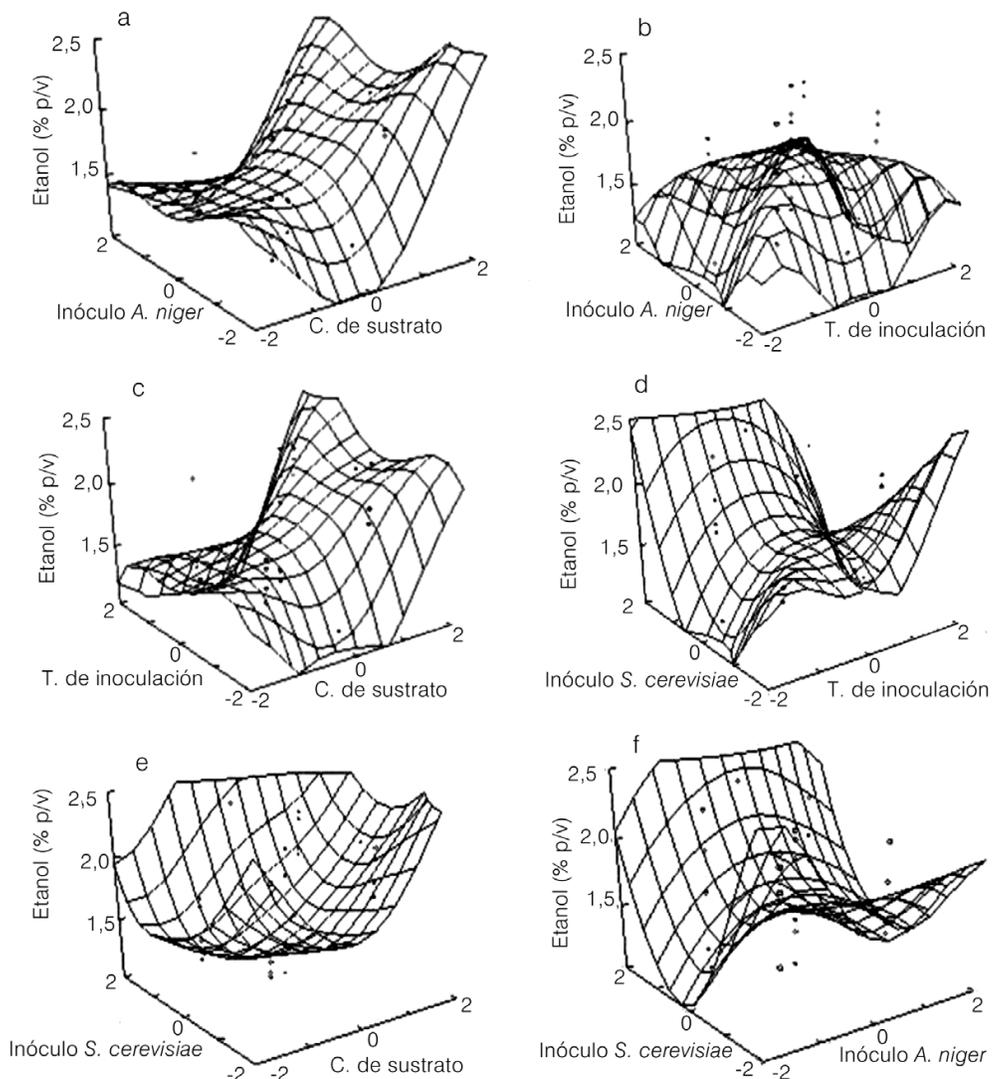


Figura 2. Superficies de respuesta ajustadas al DCCO. a: Concentración del sustrato y tiempo de inoculación de *A. niger*, b: tiempo de inoculación e inóculo de *A. niger*, c: concentración del sustrato y tiempo de inoculación, d: tiempo de inoculación e inóculo de *S. cerevisiae*, e: concentración del sustrato e inóculo de *S. cerevisiae*, y f: inóculo de *A. niger* e inóculo de *S. cerevisiae*.

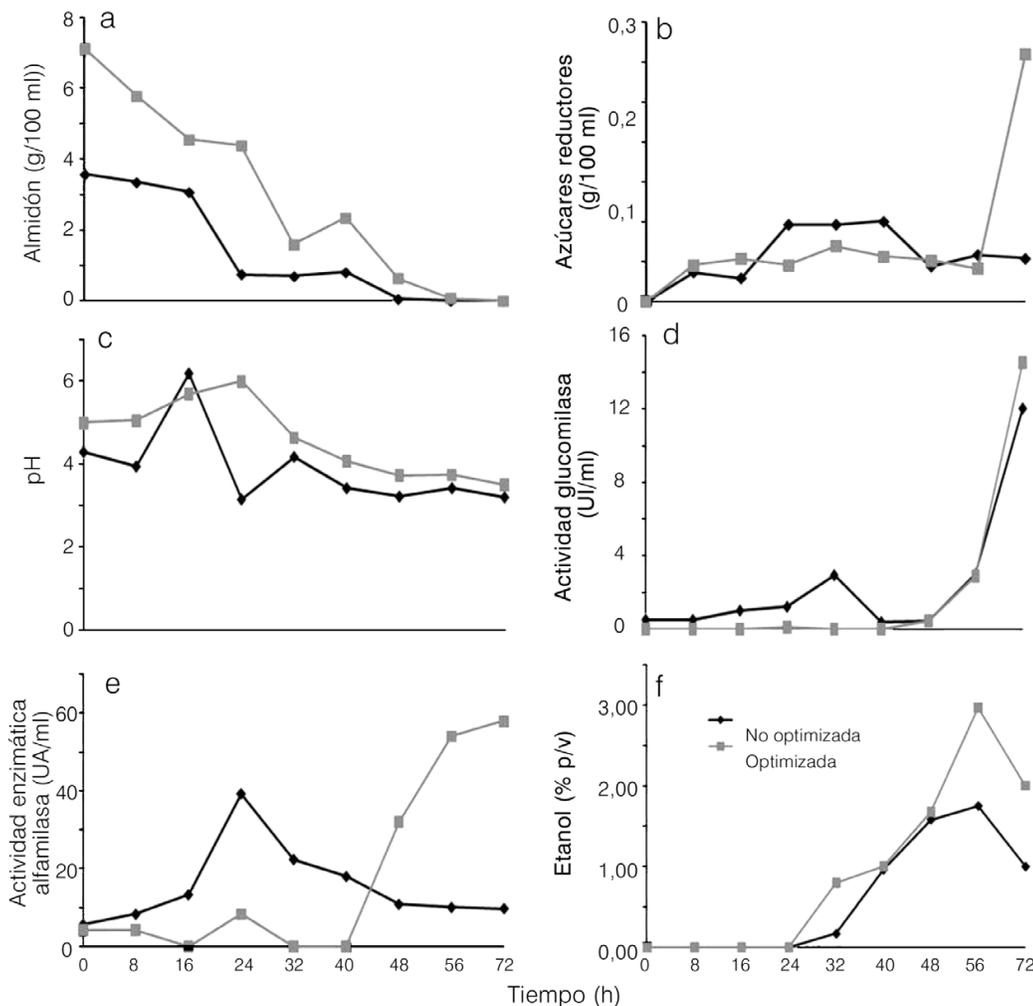


Figura 3. Comparación de las concentraciones de almidón (a), azúcares reductores (b), el pH (c), la actividad de las glucoamilasas (d) y de las  $\alpha$ -amilasas (e), y el etanol producido (e) durante la fermentación en condiciones optimizadas (■) y sin optimizar (◆).

## Conclusiones

La optimización de los parámetros del cocultivo de *A. niger* y *S. cerevisiae* permitió el mejoramiento en la obtención de etanol empleando las cáscaras descartadas durante el procesamiento de la papa. Se logró establecer una alternativa de manejo ecológicamente apropiado y tecnológicamente eficiente sobre los residuos generados por este subsector de manufactura.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo a FUNDACITE-Aragua (subvención 2008-DTH-01-15-14-3) y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (PG-01-7557-2009/2).

## REFERENCIAS

- Abouzi M, Reddy A (1986) Direct fermentation of potato starch to ethanol by cocultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Env. Microbiol.* 52: 1055-1059.
- Abu EA, Ado SA, James DB (2005) Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 785-790.
- Ado A, Kachalla G, Tijjani M, Aliyu M (2009) Ethanol production from corn cobs by co-cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*. *Bayero J. Pure Appl. Sci.* 2: 99-101.
- Ado A, Olukotun GB, Ameh JB, Yabaya A (2009) Bioconversion of cassava starch to ethanol in a simultaneous saccharification and fermentation process by co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. World J.* 4: 19-23.
- Afifi M, El-ghany A, Al abboud M, Taha T, Ghaleb K (2011) Biorefinery of industrial potato wastes to ethanol by solid state fermentation. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 7: 126-134.
- AOAC (1990) *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD, EEUU.
- Bertsch A, Domínguez G, De Basilio V, Mazzani C, Luzón O, Díaz I (2010) Caracterización de aditivos enzimáticos obtenidos por monocultivo (*Aspergillus niger*) y cocultivo (*Aspergillus niger*-*Saccharomyces cerevisiae*) y su efecto sobre el comportamiento productivo de pollos de engorde. *Rev. Fac. Cs. Vet. UCV* 51: 27-35.
- García D, Olivares L (2007) *Producción de Biomasa a Partir de los Residuos del Procesamiento Agroindustrial de la Papa por Aspergillus niger*. Tesis. Universidad de Carabobo. Venezuela. 52 pp.
- González J, Molina M (2006) Estudio de los factores que afectan la hi-

drólisis enzimática y el proceso fermentativo para la producción de alcohol a partir de papa (*Solanum tuberosum*). *Ingeniería (Costa Rica)* 16: 29-39.

Hopkins R, Bird R (1945) The action of some  $\alpha$ -amylases on amylose. *Biochem. J.* 56: 86-96.

Horta L (2006) *Costos y Precios para Etanol Combustible en América Central*. Comisión Económica Para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile. 98 pp.

León A, Chalela G, Roa A (1997) 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*. *Rev. Col. Quím.* 26: 1-12.

Manikandan K, Viruthagiri T (2010) Kinetic and optimization studies on ethanol production from corn flour. *Int. J. Chem. Biol. Eng.* 3:65-69.

Mc Cready R, Guggols J, Silveira H (1956) Determination of starch and amylase in vegetable. *Anal. Chem.* 22: 1156-1158.

Mujica M (2006) *Bioconversión de los Residuos del Procesamiento de Pasta Alimenticia en Etanol por Aspergillus niger y Saccharomyces cerevisiae*. Tesis. Universidad Central de Venezuela. 88 pp.

Nelson N (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Biol. Chem.* 153: 375-380.

Nigam P, Singh D (1995) Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enz. Microb. Technol.* 17: 770-778.

Olmos A (1987) Enzimas. En *Reportes de Biotecnología* 5. pp. 36-39.

Robertson G, Wong D, Lee C, Wagschal K, Smith M, Orts W (2006) Native or raw starch digestion: A key step in energy efficient biorefining of grain. *J. Agric. Food Chem.* 54: 353-365.

Sánchez O, Cardona C (2005) Producción biotecnológica de alcohol carburante. I: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia* 30: 571-678.

Somogyi M (1945) A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160: 61-68.

Vogt E (1972) *La Fabricación de Vinós*. Acribia. Zaragoza, España. pp. 56-86.

Zhang L, Zhao H, Gan M, Jin Y, Gao X, Chen Q, Jiafa G, Zhongyan W (2011) Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technol.* 102: 4573-4579.