

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**Obtención de bioetanol mediante digestión enzimática de
almidones de yuca, papa y camote**

Fernando Andrés Larrea Rosero

Ingeniería Química

Trabajo de integración curricular presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero Químico

Quito, 18 de diciembre de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
POLITÉCNICO

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Obtención de bioetanol mediante digestión enzimática de almidones de
yuca, papa y camote

Fernando Andrés Larrea Rosero

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

José Álvarez, Ph.D.

Firma del profesor:

Nombre del profesor, Título académico

Daniela Almeida, Ph.D.

Firma del profesor:

Quito, 18 de diciembre de 2019

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos:

Fernando Andrés Larrea Rosero

Código:

00125606

Cédula de identidad:

1717997140

Lugar y fecha:

Quito, 18 diciembre de 2019

RESUMEN

Aproximadamente el 60% de la producción global de bioetanol es generada a partir de materia orgánica con contenido de almidón, particularmente de papa y maíz. En el Ecuador, la producción anual de yuca, papa y camote, tubérculos ricos en almidón, es mayor a las 600 mil toneladas lo cual representa considerables cantidades de desechos agrícolas. La presente investigación tiene como objetivo comparar el potencial para la producción de bioetanol a partir de papa (*Solanum tuberosum*), yuca (*Manihot esculenta*) y camote (*Ipomea batatas*). Los almidones, previamente extraídos mecánicamente, se suspendieron en agua al 10% p/v y fueron sometidos a una licuefacción con α -amilasa (500 TAU/g, 4h, 80 °C). Para la producción de bioetanol, se realizaron dos procesos diferentes: 1) sacarificación y fermentación secuencial (SeqSF) y 2) sacarificación y fermentación simultánea (SSF). Para la SeqSF, el proceso de sacarificación utilizó glucoamilasa (1425 GAU/g, 3h, 60 °C) seguido de una fermentación a 30 °C durante 72 h, con una cepa de vino de *S. cerevisiae* a una concentración de 8 g/L previamente activada. Para la SSF, tanto la levadura como la glucoamilasa fueron añadidas al mismo tiempo y se emplearon las mismas condiciones de fermentación mencionadas. Los azúcares reductores presentes tras las digestiones fueron medidos mediante el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) mientras que el etanol fue cuantificado mediante GC-FID. Tras las digestiones, los almidones de papa y yuca poseían 44 g/L de azúcares reductores mientras que el de camote 33 g/L. En general, SSF generó una mayor eficiencia de etanol (40%) comparado con la de SeqSF (30%) sin embargo no se observó ninguna diferencia entre el tipo de almidón usado. Con esto, el proceso SSF mostró ser un proceso más conveniente que el SeqSF en términos de eficiencia teórica de etanol.

Palabras clave: bioetanol, digestión enzimática, almidón yuca, almidón papa, almidón camote, sacarificación-fermentación secuencial/simultánea.

ABSTRACT

Bioethanol from starchy biomass represents 60% of the global generation, particularly potato and corn. In Ecuador, there is an annual production of potato, cassava and sweet potato, starch rich tubers, of over 600 thousand tons, which represent large amounts of agri-waste. The present work aims to compare the potential for bioethanol production from starches of three different tubers produced in Ecuador: potato (*Solanum tuberosum*), cassava (*Manihot esculenta*), and sweet potato (*Ipomea batatas*). Mechanically isolated starches were suspended in water at 10% w/v, and then subjected to liquefaction with α -amylase (500 TAU/g, 4h, 80 °C). For bioethanol production, two different processes were assessed: sequential saccharification and fermentation (SeqSF), and simultaneous saccharification-fermentation (SSF). For SeqSF, saccharification was carried out with glucoamylase (1425 GAU/g, 3h, 60 °C). Fermentation was done at 30°C for 72h, with previously activated yeast (*S. cerevisiae*, a wine strain) at 8g/L. For SSF, glucoamylase and yeast were added at the same time, and the process was performed at fermentation conditions. Total reducing sugars, after enzymatic digestion and during fermentation, were quantified through the 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) method, and ethanol was quantified through GC-FID. After digestions, potato and cassava starches resulted in approx. 44 g/L of sugars, while sweet potato starch resulted in 33 g/L. In overall, SSF provided a higher ethanol efficiency (40%) compared so SeqSF (30%) but no difference between starches was observed. In terms of ethanol and theoretical efficiency SFF proved to be a more suitable process than SeqSF.

Keywords: bioethanol, enzymatic digestion, cassava starch, potato starch, sweet potato starch, sequential/simultaneous saccharification-fermentation.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	9
2. Materiales y metodología.....	13
2.1. Materiales.....	13
2.2. Extracción de almidones	13
2.3. Caracterización de almidones	13
2.4. Procesos de digestión enzimática.....	14
2.5 Fermentación.....	15
2.5.1 Caracterización del producto fermentado	16
2.6 Análisis estadístico.....	17
3. Resultados y Discusión	17
3.1 Caracterización de almidones	17
3.2 Digestiones enzimáticas	18
3.2.1 Azúcares reductores después de sacarificación	18
3.3 Fermentación.....	19
4. Conclusiones	24
Referencias.....	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Condiciones de operación utilizadas en procesos de licuefacción y sacarificación.	15
Tabla 3.1. Composición proximal de almidones de yuca, papa y camote.	18
Tabla 3.2. Sólidos totales suspendidos tras 72 horas de fermentación	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Diagrama de bloque de procesos de digestión enzimática.	14
Figura 3.1. Azúcares reductores presentes en 150 ml de digestión después de sacarificación de almidones.....	19
Figura 3.2. Consumo de azúcares reductores durante sacarificación/fermentación secuencial (SeqSF) por 72 horas para cada tipo de almidón digerido.	21
Figura 3.3. Consumo de azúcares reductores durante sacarificación/fermentación simultánea (SSF) por 72 horas para cada tipo de almidón digerido.....	21
Figura 3.4 Eficiencia de etanol para procesos de sacarificación/fermetación secuencial y simultánea de cada tipo de almidón.	23

1. INTRODUCCIÓN

El uso y la aplicación de energías alternativas producidas a partir de fuentes biológicas ofrecen una solución para lidiar con la dependencia y el consumo mundial de fuentes no renovables, como el petróleo. A partir de estas reacciones, los líquidos metabólicos más producidos son etanol y butanol, ambos obtenidos a partir de desechos orgánicos (Tran, Cheirsilp, Hodgson, & Umsakul, 2010). A pesar de la importancia y las aplicaciones de ambos compuestos en muchas industrias, la producción de etanol se ha centrado en hacer una sustitución completa de los combustibles fósiles. Por ejemplo, en la región de Guangxi en China, 166.107 millones de litros de gas han sido sustituidos por etanol; sin embargo, se espera un reemplazo de más de 618.163 millones de litros de gas, lo que hace que este combustible alternativo sea una energía más eficiente que el gas o el diésel (Pu, Dai, Li, Hu, & Wang, 2005). Las materias primas más utilizadas para la producción mundial de etanol son las cañas de azúcar y la remolacha, con un 40% de la producción mundial, y las materias primas con alto contenido de almidón, como la papa, la camote y la yuca (Bušić et al., 2018). Aunque hay muchas materias primas orgánicas adecuadas para obtener etanol, el almidón es uno de los polímeros más abundantes y baratos para su producción.

Particularmente, en Ecuador se cultivan entre 27,000 y 30,000 hectáreas de yuca. Esta cantidad representa una producción anual de 114,000 toneladas de este tubérculo, según lo informado por el Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador para el año 2017. Sin embargo, esta producción no se utiliza por completo ni está destinada al consumo humano. Por ejemplo, solo en el Distrito Metropolitano de Quito, se estima que 36.500 toneladas de alimentos se desperdician cada año. De estos, el 65% están representados por tubérculos y vegetales (Dubbeling, Marielle, Bucatariu, Camelia, Santini, Guido, Vogt, Carmen, 2016), lo

que hace que estos desechos sean adecuados para producir combustibles alternativos, como el bioetanol, debido al almidón que contienen.

Para obtener etanol a partir de almidón, se necesita un proceso de hidrólisis, que puede ser químico, enzimático o ambos. Esta investigación utiliza una hidrólisis enzimática para convertir los polisacáridos del almidón, la amilosa y la amilopectina, en cadenas glucosídicas más pequeñas (Nielsen et al., 2012). La primera enzima del procedimiento es la α -amilasa que rompe las cadenas lineales de amilosa y las cadenas ramificadas de amilopectina en maltosa, un disacárido, en un proceso de licuefacción. Después de esto, se agregan glucoamilasa o amiloglucosidasa para convertir los disacáridos en monómeros de glucosa en un proceso llamado sacarificación (Nielsen et al., 2012). El último paso para obtener bioetanol es la etapa de fermentación, que se realiza mediante el uso de diferentes microorganismos, como el género *Saccharomyces*. En estudios anteriores, se optó por hidrolizar y fermentar el almidón de yuca (*Manihot esculenta*) en un proceso simultáneo de sacarificación / fermentación (Kim et al., 2010; Shanavas, Padmaja, Moorthy, Sajeev, & Sheriff, 2011). Ado, Olukotun, Ameh y Yabaya (2009), demostraron que el uso de *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger* para la fermentación, previene la acumulación de concentraciones inhibitorias de azúcares reductores, por lo tanto, se logra una mayor actividad enzimática y una mayor cantidad de almidón metabolizable. Debido a esto, se obtiene un mejor rendimiento de etanol.

Con respecto al uso de la papa (*Solanum tuberosum*), las investigaciones han demostrado con éxito que el uso de desechos industriales de este tubérculo permite mejorar el proceso de producción de bioetanol mediante el uso de diversos medios de fermentación o ayudando a la hidrólisis enzimática con ultrasonido. Por último, los estudios han demostrado que el uso del camote (*Ipomoea batatas*) en el proceso de fermentación también asegura resultados favorables en términos de rendimiento de etanol (Lima et al., 2017) generados por la cáscara o el almidón del tubérculo, lo que hace que este crudo material un candidato

interesante para reemplazar el uso del maíz en la producción de biocombustibles (Ziska et al., 2009). Vale la pena mencionar que los estudios citados han utilizado *Saccharomyces cerevisiae* en un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación. Recientemente, se han llevado a cabo investigaciones relacionadas con las propiedades fisicoquímicas del almidón de camote mediante fermentación espontánea (Ye, Xiao, Liang, Zhou, & Zhao, 2019).

The farming of cassava, potato and sweet potato in Ecuador is substantial. As mentioned earlier, the annual production of cassava is 114 tons, while potato and sweet potato are 410.000 and 10.000 tons respectively, being sweet potato the crop that has acquired greater agricultural growth in the last three years as the National Institute of Agriculture and Farming Investigations (INIAP) reports.

Due to the high quantity and availability of these tubers, their use for the generation of bioethanol is feasible. Particularly in the case of Ecuador, there is a project aimed to the partial addition of biofuels in oil cuts. Currently, it is called Ecopaís which is a light duty gasoline with a 5% of bioethanol in its composition. In the year 2016, fossil fuel consumption in Ecuador was 274.000 barrels per day being, a third of this figure intended for transport in the form of gasoline and diesel (US Energy Information Administration, 2017), while closing in 2017, the sale of Ecopaís was 310 millions of gallons (Agencia de Regulación y Control Hidrocarburífero, 2017).

El cultivo de yuca, papa y camote en Ecuador es sustancial. Como se mencionó anteriormente, la producción anual de yuca es de 114 toneladas, mientras que la papa y el camote son 410,000 y 10,000 toneladas respectivamente, siendo el camote el cultivo que ha adquirido un mayor crecimiento agrícola en los últimos tres años como reporta el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

Debido a la gran cantidad y disponibilidad de estos tubérculos, su uso para la generación de bioetanol es factible. Particularmente en el caso de Ecuador, existe un proyecto destinado a

la adición parcial de biocombustibles en los recortes de petróleo. Actualmente, se llama Ecopaís, que es una gasolina ligera con un 5% de bioetanol en su composición. En el año 2016, el consumo de combustibles fósiles en Ecuador fue de 274,000 barriles por día, un tercio de esta cifra destinado al transporte en forma de gasolina y diésel (US Energy Information Administration, 2017), mientras que en 2017 la venta de Ecopaís fue de 310 millones de galones (Agencia de Regulación y Control Hidrocarburífero, 2017).

Es muy importante tener en cuenta que, dado que el almidón es un tipo de biomasa primaria, su uso y aplicación para la producción de biocombustibles debe usarse solo a partir de residuos o tubérculos sobrantes para evitar la competencia con el sector alimenticio, proporcionando así una generación de energía alternativa limpia, tanto ética como ambientalmente.

Los estudios relacionados con la síntesis de bioetanol a partir de almidones es un área ampliamente explorada, sin embargo, no se han llevado a cabo estudios extensivos y comparativos de bioetanol obtenidos de yuca, papa y camote. Asimismo, la literatura no informa el uso de variedades existentes de estos tubérculos (yuca, papa, camote) en Ecuador, por eso es obligatoria una caracterización proximal de los almidones. De manera similar, la concentración óptima de α -amilasa en el proceso de licuefacción y la concentración de glucoamilasa en el proceso de sacarificación no se han estudiado ni comparado entre diferentes almidones en trabajos previos. Por esta razón, es necesario determinar los rendimientos de producción de bioetanol utilizando la digestión enzimática de diferentes fuentes de almidón, como la yuca, la papa y el camote.

2. MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1. Materiales

Para esta investigación se utilizaron 2 kg de cada materia prima. Para el proceso de digestión y fermentación se requirieron 5 g de *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin Bourgorouge RC212, α -amilasa (Gamalpha Spezial AB Enzymes), glucoamilasa (Gammadex Cal AB Enzymes). Para la caracterización proximal de los almidones se utilizaron ácido 3,5-dinitro salicílico al 1%, hexano, ácido bórico al 4%, ácido sulfúrico al 98%, hidróxido de sodio al 35% y ácido clorhídrico al 0,2 N.

2.2. Extracción de almidones

Para este proceso se utilizó el método patentado Kirkpatrick y Speakman para la extracción de almidón (Kirkpatrick & Speakman, 2018). Se realizó una extracción mecánica de los tres almidones diferentes mezclando los tubérculos con agua, precipitando el almidón y lavándolo con etanol al 70%. El almidón obtenido se secó a 40 ° C hasta peso constante, en un horno de convección.

2.3. Caracterización de almidones

Se realizaron análisis de humedad, cenizas, lípidos, proteínas, azúcares reductores por triplicado para cada uno de los tres almidones diferentes.

Para la humedad y las cenizas, se aplicaron los métodos AOAC 934.01 y 932.01 (Thiex, 2009) respectivamente.

La cuantificación de los lípidos se realizó mediante una extracción sólido-líquido utilizando la metodología AOAC 2003.05 y 2003.06 (Thiex, Anderson, & Gildemeister, 2003) con 2 g de muestra en un equipo de extracción de solvente Soxhlet Velp Scientifica SER 148 durante tres horas usando hexano.

El contenido de proteína se obtuvo por el método Kjeldahl con ácido bórico al 4%, como se muestra en AOAC 960.52. Se realizó una digestión en un digestor DK6 Velp, utilizando 0,5 g de muestras de almidón. La destilación de la solución digerida se realizó en un destilador semiautomático UDK 139 y finalmente se tituló con ácido clorhídrico 0,2 N e indicador Tashiro. El contenido de proteína se calculó utilizando la ecuación (1).

$$\% \text{ Proteína} = \left[\frac{V_{HCl} * N_{HCl} * W_{N_2}}{M_{muestra}} \right] \times 6.25 * 100\% \quad (1)$$

V_{HCl} : Volumen de titulación de ácido clorhídrico [ml]

N_{HCl} : Concentración exacta de ácido clorhídrico [N]

W_{N_2} : Peso molecular del nitrógeno $\left[\frac{g}{mol} \right]$

$M_{muestra}$: Peso inicial de la muestra [mg]

2.4. Procesos de digestión enzimática

Para encontrar las condiciones de digestión más apropiadas, se evaluó la actividad de cada enzima por la cantidad de azúcares reductores obtenidos después de los procesos de licuefacción y sacarificación. Este método se muestra en la Figura 2.1.

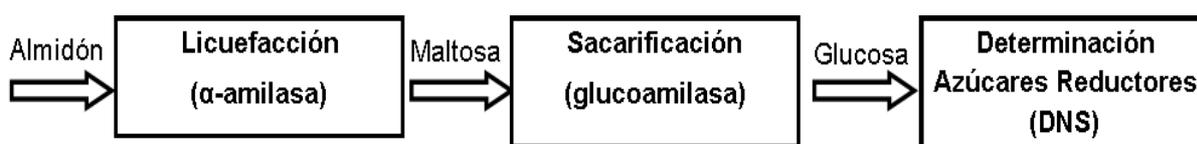


Figura 2.1. Diagrama de bloque de procesos de digestión enzimática.

Las condiciones de operación para los procesos en la Figura 2.1 se han determinado a partir de la información proporcionada por el fabricante. La Tabla 2.1 muestra las condiciones utilizadas en esta etapa.

Tabla 2.1. Condiciones de operación utilizadas en procesos de licuefacción y sacarificación.

Proceso	Tiempo digestión [horas]	Temperatura [°C]	Concentración almidón [%]
Licuefacción	3	80	20
Sacarificación	2	60	3, 6, 10, 15, 20

Para la licuefacción, se usaron 30 g de almidón en un volumen de digestión de 150 ml (20% p/v). La digestión se realizó con 500 TAU/g de α -amilasa (Gamalpha Spezial AB Enzymes) durante 3 horas a 80 ° C en presencia de condensador de reflujo en un manto calefactor con agitación.

Después de la licuefacción, la solución digerida se diluyó para obtener concentraciones de almidón del 20%, 15%, 10%, 6% y 3% p/v. En tubos Falcon, se añadieron 15 ml de cada concentración de almidón con 1425 GAU/g de glucoamilasa (Gammadex Cal AB Enzymes). La sacarificación se llevó a cabo en una incubadora HYSC SI-64 150 con agitación durante 2 horas a 60 ° C con agitación a 50 rpm.

Los azúcares reductores, después de la licuefacción y la sacarificación, se estimaron mediante el método DNS (Bernfeld, 1955) utilizando 1 ml de la muestra además de 5 ml de agua destilada y 1 ml de ácido 3,5-dinitro salicílico al 1% en un tubo de ensayo. La solución preparada se colocó durante 5 minutos en un baño de agua a 100 ° C y se enfrió a temperatura ambiente. Finalmente, la solución se midió en un colorímetro Hach DR 800 a 550 nm. La concentración de almidón al 10% se seleccionó como la mejor opción para la sacarificación/fermentación secuencial y simultánea, como se explicará más adelante.

2.5 Fermentación

Las fermentaciones se realizaron durante 72 horas a 30 ° C en una incubadora con agitación a 50 rpm. Se usaron tubos Falcon como recipiente de fermentación con tapones de

algodón /gasa y mangueras de PVC dirigidas a una trampa de hidróxido de sodio 2M para atrapar CO₂. Todos los materiales mencionados se esterilizaron en una autoclave de vapor a 150 °C durante 15 minutos a una presión de 0,17 MPa.

Para el proceso de fermentación, se añadieron 30 ml de la solución digerida del proceso enzimático en los recipientes con 0,24 g (Shanavas et al., 2011) de levadura de vino *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin Bourgorouge, que se activó previamente durante 30 minutos a 30 °C en el mismo medio de fermentación. Para la sacarificación/fermentación simultánea (SSF), se agregaron 1425 GAU/g de glucoamilasa junto con la levadura después de la licuefacción. Para la sacarificación/fermentación secuencial (SeqSF) solo se añadió levadura después del proceso de sacarificación.

Cada 24 horas se tomaron muestras de la fermentación para analizar azúcares reductores y cuantificar etanol.

2.5.1 Caracterización del producto fermentado

Los sólidos totales suspendidos se calcularon siguiendo el método APHA (Greenberg, Clesceri, & Eaton, 2017) usando 5 ml de muestra y secándola en un horno durante 24 horas a 105 °C.

El contenido de etanol de las fermentaciones se midió en un cromatógrafo de gases Thermo Scientific con detector FID utilizando un estándar interno.

El método requirió una extracción líquido-líquido utilizando 1 ml de la muestra con 2 ml de diclorometano. Se recuperó 1 ml de la fase orgánica, se filtró y se mezcló con 12,5 µl de alcohol isopropílico como estándar interno.

2.6 Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado ($n = 3$). Los resultados se informan como el promedio \pm desviación estándar. El análisis de los datos y las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA con comparaciones por pares Tukey-HSD. Se usó un intervalo de confianza del 95%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, este estudio tiene como objetivo comparar la producción de etanol utilizando almidones enzimáticos hidrolizados de yuca, papa y camote para determinar el almidón de tubérculo más apropiado para la fermentación secuencial y simultánea.

3.1 Caracterización de almidones

La composición química de los almidones de yuca, papa y camote se muestra en la Tabla 3.1. Los tres almidones muestran un alto contenido de humedad, que podría deberse a la absorción de agua de los alrededores durante el almacenamiento. El contenido de proteínas, cenizas y lípidos fue bajo como se informó en investigaciones anteriores (Horstmann, Lynch, & Arendt, 2017; Moorthy, 2002; Zheng et al., 2016). Se obtuvo una pequeña cantidad de azúcares reductores, siendo la yuca el almidón con el mayor contenido de azúcares libres.

Tabla 3.1. Composición proximal de almidones de yuca, papa y camote.

	Fuente Almidón		
	Yuca (<i>M. esculenta</i>)	Papa (<i>S. tuberosum</i>)	Camote (<i>I. batatas</i>)
Rendimiento Extracción [g Almidón/g Tubérculo]	0.122	0.126	0.123
Proteína [%]	0.840 ± 0.002	1.095 ± 0.008	0.2098 ± 0.002
Grasas [%]	0.020 ± 0.0003	0.0321 ± 0.001	0.0263 ± 0.001
Humedad [%]	14.690 ± 0.004	14.254 ± 0.001	9.241 ± 0.001
Cenizas [%]	0.371 ± 0.001	0.644 ± 0.001	0.094 ± 0.001
Azúcares reductores [g/L]	8.027 ± 0.122	3.640 ± 0.106	3.493 ± 0.061

3.2 Digestiones enzimáticas

3.2.1 Azúcares reductores después de sacarificación

Para el proceso de sacarificación, se han estudiado diferentes concentraciones de almidón a una concentración enzimática constante, como se muestra en la Figura 3.1, la cantidad de azúcares reductores aumentó linealmente a concentraciones de almidón más altas hasta 20% de almidón. Se observa un aumento menor en la concentración de azúcares reductores entre el 15% y el 20% del almidón, alcanzando gradualmente una meseta de producción de azúcar reductora al aumentar la concentración de almidón. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre estas dos concentraciones ($p > 0.05$). Mientras tanto, las concentraciones de almidón al 3% y 6% proporcionaron una conversión de azúcar reductora baja, por lo que se seleccionó la concentración de almidón al 10% para los procesos de fermentación. Además, la digestión del 10% mostró una viscosidad más baja que las obtenidas de las digestiones de almidón con 15% y 20%, especialmente para el almidón de camote, que eran difíciles de manejar y analizar debido a su alto contenido de sólidos.

Según los análisis estadísticos realizados para esta sección, la concentración de azúcar reductora solo depende de la concentración de almidón utilizada, pero no se encontraron diferencias entre los almidones de diferentes tubérculos ($p > 0.05$).

El contenido de azúcares reductores después del proceso de licuefacción no se presenta en esta sección debido a las dificultades e interferencias encontradas al medir las muestras con el método DNS debido a su alta densidad y la presencia de sólidos.

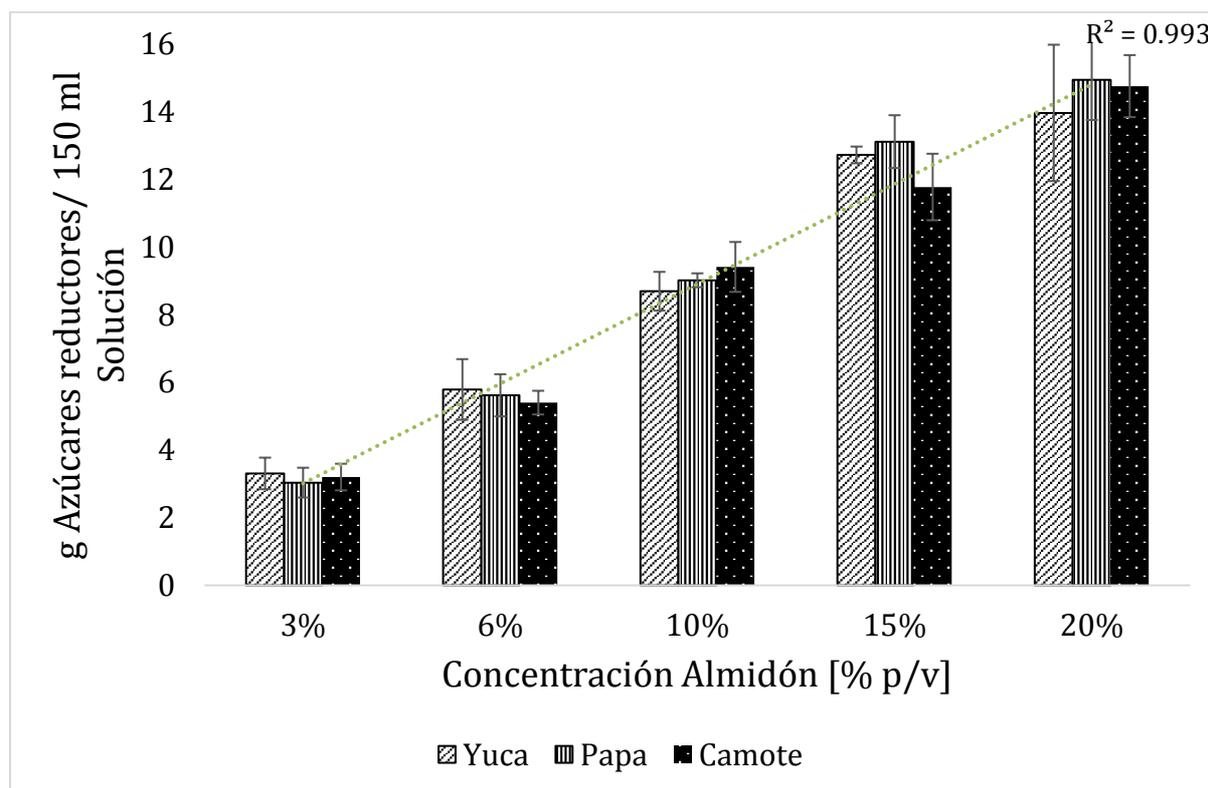


Figura 3.1. Azúcares reductores presentes en 150 ml de digestión después de sacarificación de almidones.

3.3 Fermentación

La cuantificación del consumo de azúcar sirvió para dos propósitos en esta sección. El primero fue evaluar cómo la levadura estaba utilizando el sustrato, para poder comparar los resultados de producción de etanol, y el segundo fue usarlo como un método indirecto de crecimiento de la levadura.

El consumo de azúcar durante las 72 horas de sacarificación/fermentación secuencial (SSF) y simultánea (SeqSF) se muestra en las Figuras 3.2 y 3.3, respectivamente. Para los dos métodos, se usó una cantidad considerable de azúcar dentro de las primeras 24 h, con hasta 62-70 g de azúcares reductores/L para almidones de yuca y papa.

El almidón de camote muestra un comportamiento interesante ya que, a diferencia de los almidones de yuca y papa los cuales la levadura consume rápidamente en ambos procesos de fermentación, este tiene un consumo lento de azúcar durante SeqSF, con 20 g de azúcares reductores/L después del primer día. Esto podría suceder porque la solución mostró un alto contenido de sólidos disueltos y una gran cantidad de las azúcares mencionadas, por lo tanto, una alta viscosidad. Estas características están presentes en fermentaciones de muy alta gravedad (VHG), aunque las fermentaciones realizadas en estas investigaciones no se realizaron en las condiciones mencionadas (Zhang et al., 2010)

Cuando se trabaja en condiciones de VHG, el alto contenido de sólidos y azúcares disueltos puede aumentar la presión osmótica de la solución, proporcionando estrés a la levadura y creando una inhibición por retroalimentación para la glucoamilasa (Lareo et al., 2013; Zhang et al., 2010). Como se usa una concentración más baja de azúcares iniciales en la SSF, los factores de inhibición explicados anteriormente desaparecen debido a una tasa de producción / consumo más equilibrada de azúcares reductores que favorecen el crecimiento celular de la levadura en lugar de la actividad enzimática en las condiciones operativas dadas (Shanavas et al., 2011).

Además, el análisis estadístico mostró que el consumo de azúcar en SSF es significativamente más lento que en SeqSF, y que las mediciones de azúcar a las 48 y 72 horas no muestran diferencias, lo que indica que la mayor parte del azúcar se ha consumido y la fermentación ha terminado después de las primeras 24 horas. Esto significa que la fase de crecimiento exponencial de la levadura ocurre dentro del primer día de fermentación, por lo

que la mayor parte del etanol se producirá en esta etapa, ya que es un metabolito primario (Henderson, Lozada-Contreras, Jiranek, Longo, & Block, 2013). Para extender la fase de crecimiento celular exponencial a 48 y 72 horas, se podría usar una mayor cantidad de azúcar al comienzo de las fermentaciones.

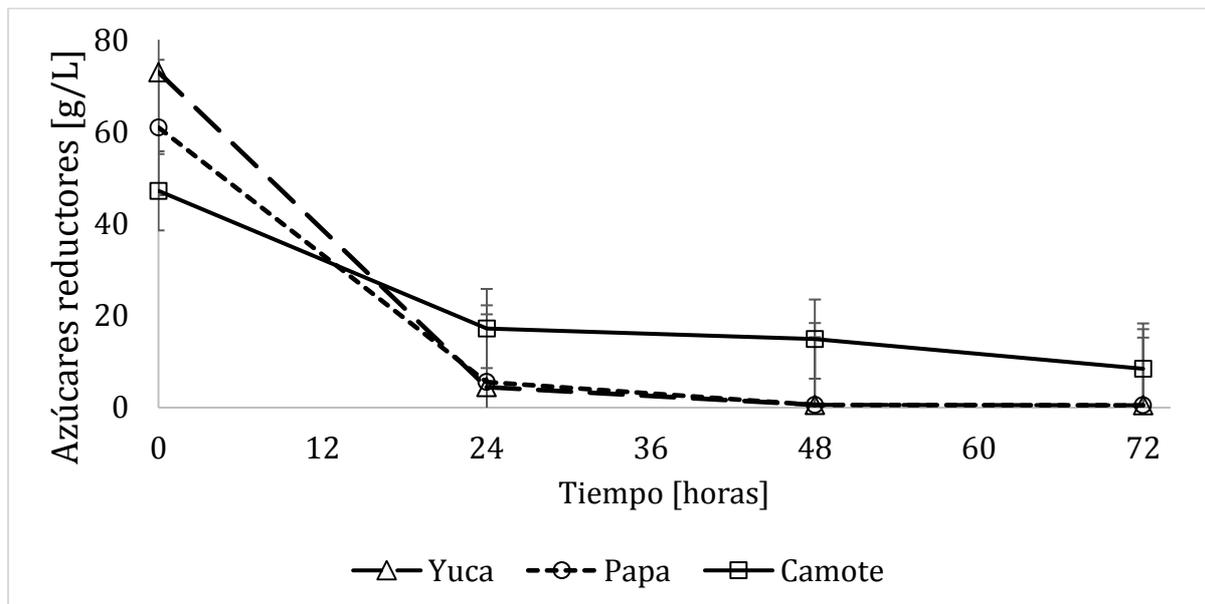


Figura 3.2. Consumo de azúcares reductores durante sacarificación/fermentación secuencial (SeqSF) por 72 horas para cada tipo de almidón digerido.

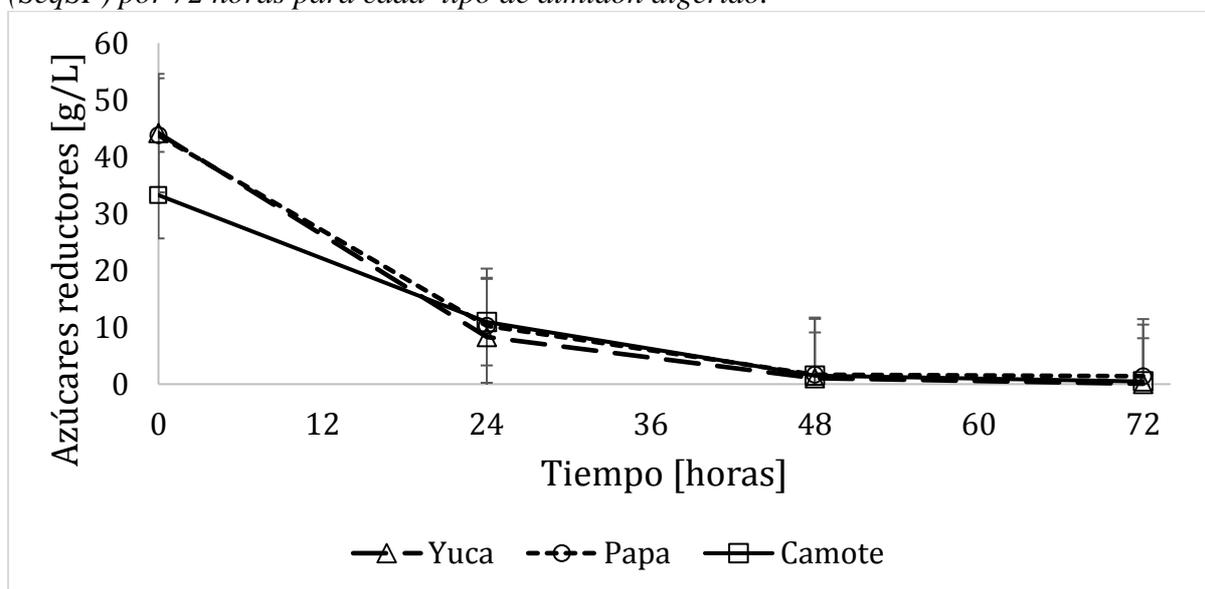


Figura 3.3. Consumo de azúcares reductores durante sacarificación/fermentación simultánea (SSF) por 72 horas para cada tipo de almidón digerido.

Los resultados de los sólidos totales suspendidos después de cada fermentación se muestran en la Tabla 3.2. El total de sólidos en suspensión se puede usar como un indicador del crecimiento de la levadura (Galinha, Sanches, & Crespo, 2018) y la digestión del almidón. Sin embargo, no existe un patrón claro en la cantidad de sólidos en cada una de las fermentaciones analizadas, por lo que para encontrar una tendencia, este ensayo debe hacerse antes de la fermentación. Parece que el mayor crecimiento de levadura podría tener lugar con el almidón de papa en SeqSF.

Tabla 3.2. Sólidos totales suspendidos tras 72 horas de fermentación

Almidón	Fermentación	g Sólidos Totales/L
Yuca	SeqSF	13.760
	SSF	17.700
Papa	SeqSF	23.980
	SSF	14.980
Camote	SeqSF	16.100
	SSF	16.520

La eficiencia del etanol se muestra en la Figura 3.4 comparando el rendimiento teórico de etanol con el experimental. En SeqSF, los almidones de yuca y papa tienen una eficiencia similar más alta que la obtenida por el almidón de camote, mientras que en SSF este almidón alcanza casi un 50% de eficiencia. A pesar de esto, no existe una diferencia significativa entre los almidones ($p > 0.05$), por lo que el único factor importante es el tipo de fermentación. Para esto, la fermentación simultánea tiene mayores valores que la secuencial, asegurando que es un proceso más adecuado para la producción de etanol independientemente del tipo de almidón utilizado para los diferentes métodos de fermentación.

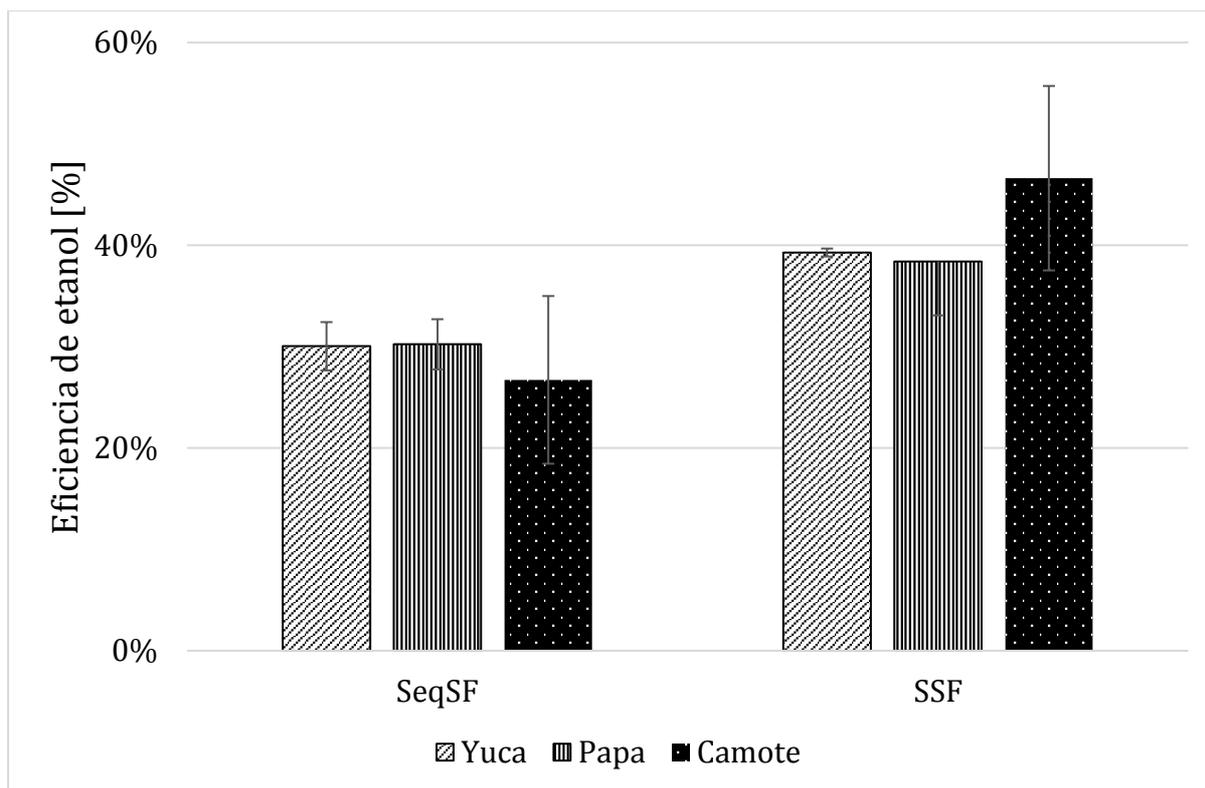


Figura 3.4 Eficiencia de etanol para procesos de sacarificación/fermentación secuencial y simultánea de cada tipo de almidón.

Los valores de eficiencia de etanol obtenidos son más bajos que los reportados en la literatura, pero debe tenerse en cuenta que en esta investigación no se aplicaron las condiciones de VHG (Zhang et al., 2010).

Como se ha mostrado en estudios anteriores, SSF es un proceso que garantiza una mayor productividad debido a: una reducción en los problemas de inhibición del producto final con enzimas, un mejor tiempo de reacción general y menores costos de inversión y operación (Olofsson, Bertilsson, & Lidén, 2008; Pinaki, Lhakpa, & Joginder, 2015), por lo que en términos de producción de bioetanol a gran escala, SSF es un proceso más adecuado para obtener este biocombustible. Dado el hecho de que no hay diferencia en el uso de almidones de diferentes fuentes para producir más etanol, la producción a gran escala podría realizarse a partir de desechos de biomasa con alto contenido de almidón, como los tubérculos utilizados en esta investigación y una alta productividad, Se debe lograr rendimiento y eficiencia.

4. CONCLUSIONES

Este estudio comparativo reveló que la fuente de almidón no es un factor que afecte significativamente la cantidad de azúcares reductores después de los procesos de digestión y, por lo tanto, la producción de bioetanol durante la fermentación. Este hecho implica que el uso de cualquier residuo agrícola con alto contenido de almidón podría ser igualmente efectivo y adecuado para la producción del biocombustible.

El proceso de fermentación de sacarificación simultánea (SSF) demostró ser un mejor proceso general en términos de productividad, rendimiento y eficiencia de etanol en comparación con la sacarificación secuencial y la fermentación (SeqSF), independientemente del tipo de almidón utilizado. Además, se observó un mayor consumo de azúcares reductores en la SSF, lo que demuestra que este proceso proporciona condiciones más apropiadas para el crecimiento celular. Como los azúcares se consumieron rápidamente durante las primeras 24 horas, se cree que las fermentaciones podrían llevarse a cabo en períodos más cortos, y se debe tomar una muestra más frecuente dentro de este período de tiempo para observar un comportamiento más detallado del crecimiento de la levadura y producción de etanol en las fermentaciones. Para una mayor producción de etanol, se podría usar una mayor concentración de almidón con una cepa más resistente de *S. cerevisiae* y en presencia de un tampón dentro del medio de fermentación.

Las cáscaras y los desechos de tubérculos, como los utilizados en esta investigación, podrían ser una opción de biomasa interesante para futuros estudios de producción de bioetanol utilizando SSF. Para dar un mejor enfoque a la producción a gran escala de bioetanol a partir de estos desechos, se deben realizar estudios de pre factibilidad y factibilidad.

REFERENCIAS

- Ado, s. A. Olukotun, g. B. Ameh, j. B. & yabaya, A. (2009). Full Length Research Article Bioconversion Of Cassava Starch To Ethanol In A Simultaneous Saccharification And Fermentation Process By Co-Cultures Of *Aspergillus niger* AND *Saccharomyces cerevisiae* . *Science World Journal*, 4(1), 19–22.
- Agencia de Regulación y Control Hidrocarburífero. (2017). Análisis de Combustibles- Gasolina EcoPaís. *Recurso Revista Hidrocarburífera Del Ecuador*, 22,23.
- Bernfeld, P. (1955). Amylase α and β . *Methods in Enzymology. Tufts University School of Medicine*, 1, 149–158.
- Bušić, A., Mardetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Šantek, M. I., ... Šantek, B. (2018). Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: A review. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3), 289–311. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5546>
- Chuquin, H. (2012). *Alternativas de uso de la papa de desecho en la Provincia del Carchi y la contaminación con plástico. Universidad Politécnica Estatal del Carchi.*
- Dubbeling, Marielle, Bucatariu, Camelia, Santini, Guido, Vogt, Carmen, E. (2016). *City Region Food Systems and Food Waste Management Linking Urban and Rural Areas for Sustainable and Resilient Development UAF FOUNDATION R.* Retrieved from www.fao.org/publications%0Ahttp://www.fao.org/3/a-i6233e.pdf
- Galinha, C., Sanches, S., & Crespo, J. (2018). *Fundamental Modelling of Membrane Systems Membrane and Process Performance.* (P. Luis, Ed.). Oxford: Elsevier Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813483-2.00006-X>
- Greenberg, E., Clesceri, C., & Eaton, A. (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (23rd ed.). Washington: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation.
- Henderson, C. M., Lozada-Contreras, M., Jiranek, V., Longo, M. L., & Block, D. E. (2013). Ethanol production and maximum cell growth are highly correlated with membrane lipid composition during fermentation as determined by lipidomic analysis of 22 *saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 91–104. <https://doi.org/10.1128/AEM.02670-12>
- Horstmann, S., Lynch, K., & Arendt, E. (2017). Starch Characteristics Linked to Gluten-Free Products. *Foods*, 6(12), 29. <https://doi.org/10.3390/foods6040029>

- Kim, M., Kim, Y.-H., Choi, G.-W., Kang, H.-W., Um, H.-J., Kim, Y., & Chung, B.-W. (2010). Isolation and characterization of two soil derived yeasts for bioethanol production on Cassava starch. *Biomass and Bioenergy*, *34*(8), 1223–1231. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.03.019>
- Kirkpatrick, R., & Speakman, N. (2018). United States Patent No. US 8,123,865 B2. United States.
- Lareo, C., Ferrari, M. D., Guigou, M., Fajardo, L., Larnaudie, V., Ramírez, M. B., & Martínez-garreiro, J. (2013). Evaluation of sweet potato for fuel bioethanol production : hydrolysis and fermentation. *SpringerPlus*, 1–11.
- Lima, V. A., Knob, A., Resende, J. T. V., Martins, M. D., Guerra, E. P., & Pereira, C. R. (2017). Enzymatic conversion of sweet potato granular starch into fermentable sugars: Feasibility of sweet potato peel as alternative substrate for α -amylase production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *11*, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.07.011>
- Lynch, J., & Barbano, D. (1999). Kjeldahl Nitrogen Analysis as a Reference Method for Protein Determination in Dairy Products. *Journal Of AOAC International*, *82*(6), 1389–1398.
- Moorthy, S. N. (2002). Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: A review. *Starch/Staerke*, *54*(12), 559–592. [https://doi.org/10.1002/1521-379X\(200212\)54:12<559::AID-STAR2222559>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1521-379X(200212)54:12<559::AID-STAR2222559>3.0.CO;2-F)
- Nielsen, J. W., Kramhoft, B., Bozonnet, S., Abou Hachem, M., Stipp, S. L. S., Svensson, B., & Willemoës, M. (2012). Degradation of the starch components amylopectin and amylose by barley α -amylase 1: Role of surface binding site 2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *528*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.08.005>
- Olofsson, K., Bertilsson, M., & Lidén, G. (2008). A short review on SSF - An interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, *1*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-7>
- Pinaki, D., Lhakpa, W., & Joginder, S. (2015). Simultaneous saccharification and fermentation (SSF), an efficient process for bio-ethanol production: An overview. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, *12*(1), 87–100. <https://doi.org/10.13005/bbra/1639>
- Pu, G., Dai, D., Li, H., Hu, Z., & Wang, C. (2005). Energy efficiency and potentials of cassava fuel ethanol in Guangxi region of China. *Energy Conversion and Management*,

- 47(13–14), 1686–1699. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2005.10.019>
- Shanavas, S., Padmaja, G., Moorthy, S. N., Sajeev, M. S., & Sheriff, J. T. (2011). Process optimization for bioethanol production from cassava starch using novel eco-friendly enzymes. *Biomass and Bioenergy*, *35*(2), 901–909. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.11.004>
- Thiex, N. (2009). Evaluation of analytical methods for the determination of moisture, crude protein, crude fat, and crude fiber in distillers dried grains with solubles. *Journal of AOAC International*, *92*(1), 61–73.
- Thiex, N., Anderson, S., & Gildemeister, B. (2003). Crude Fat, Diethyl Ether Extraction, in Feed, Cereal Grain, and Forage (Randall/Soxtec/Submersion Method): Collaborative Study. *Journal Of AOAC International*, *86*(5), 888–898.
- Tran, H. T. M., Cheirsilp, B., Hodgson, B., & Umsakul, K. (2010). Potential use of *Bacillus subtilis* in a co-culture with *Clostridium butylicum* for acetone-butanol-ethanol production from cassava starch. *Biochemical Engineering Journal*, *48*(2), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.001>
- US Energy Information Administration. (2017). *Country Analysis Brief: Ecuador* (Vol. 2016). Retrieved from <https://www.connaissancedesenergies.org/sites/default/files/pdf-pt-vue/ecuador.pdf>
- Wang, D., Ma, X., Yan, L., Chantapakul, T., Wang, W., Ding, T., ... Liu, D. (2017). Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of starch catalyzed by glucoamylase: Investigation on starch properties and degradation kinetics. *Carbohydrate Polymers*, *175*, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.093>
- Ye, F., Xiao, L., Liang, Y., Zhou, Y., & Zhao, G. (2019). Spontaneous fermentation tunes the physicochemical properties of sweet potato starch by modifying the structure of starch molecules. *Carbohydrate Polymers*, *213*, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.077>
- Zhang, L., Chen, Q., Jin, Y., Xue, H., Guan, J., Wang, Z., & Zhao, H. (2010). Energy-saving direct ethanol production from viscosity reduction mash of sweet potato at very high gravity (VHG). *Fuel Processing Technology*, *91*(12), 1845–1850. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2010.08.009>
- Zheng, Y., Wang, Q., Li, B., Lin, L., Tundis, R., Loizzo, M. R., ... Xiao, J. (2016). Characterization and prebiotic effect of the resistant starch from purple sweet potato. *Molecules*, *21*(7). <https://doi.org/10.3390/molecules21070932>

Ziska, L. H., Runion, G. B., Tomecek, M., Prior, S. A., Torbet, H. A., & Sicher, R. (2009). An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland. *Biomass and Bioenergy*, 33(11), 1503–1508. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.07.014>