

# PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE ALMIDÓN DE YUCA UTILIZANDO LA ESTRATEGIA DE PROCESO SACARIFICACIÓN- FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS (SSF)

## ETHANOL PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH USING THE PROCESS STRATEGY SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION-FERMENTATION

Hader I. CASTAÑO P.<sup>1\*</sup>, Carlos E. MEJIA G.<sup>2</sup>

Recibido: Mayo 9 de 2008 Aceptado: Julio 8 de 2008

### RESUMEN

La tendencia mundial en el manejo de los combustibles, en especial los biocombustibles como el etanol, ha llevado a explorar nuevas metodologías de proceso para optimizar su producción; por tal razón se aborda en esta investigación el proceso sacarificación fermentación simultáneas, se evalúa la influencia de la concentración de azúcares reductores y la dosificación de la enzima Spirizyme fuel<sup>®</sup> sobre la productividad y concentración final de etanol, bajo el proceso SSF (sacarificación -fermentación simultáneas), partiendo del licuado de almidón de yuca como sustrato. El proceso SSF se compara con un control con características de sacarificación-fermentación independientes (SHF), proceso convencional. Sólo el factor concentración inicial de sustrato presenta efecto sobre la productividad de etanol. Las cinéticas de proceso, frente a las del control, presentan reducciones de tiempo de 47 y 33% para los niveles de sustrato evaluados. Los niveles de productividad son mayores en un 33% para el nivel de 150 g/l de AR (azúcares reductores) y se mantiene constante para 200 g/l. La glucosa en la estrategia SSF, conforme se produce se transforma en etanol, no permitiendo alcanzar concentraciones superiores a 100 g/l, lo que se traduce en que no se presentan inhibiciones por sustrato. La concentración de etanol no afecta la reacción de la enzima en el proceso de sacarificación. El proceso SSF demuestra su viabilidad técnica en la producción de alcohol, al reducir los tiempos y necesidades de energía en la producción de alcohol carburante a partir de almidón de yuca

**Palabras clave.** Bioetanol, almidón de yuca, SSF, SHF

### ABSTRACT

The world trend on fuel management, in special biofuels like ethanol, have gone to explorer new methodologies of process to optimize its production by this reason in this research is about simultaneous saccharification fermentation process and evaluate initial concentration of reducing sugar, and enzyme dosing of Spirizyme fuel<sup>®</sup> are evaluated on productivity and final concentration of ethanol, under SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) process, from the product of the licuefaction process of cassava starch as substrate. The SSF process is evaluated against SHF (Independent Saccharification and Fermentation) process as control. Only the factor, initial concentration of substrate presents effect over ethanol productivity. The kinetic of SSF process, in opposite to the SHF process, presents time diminution of the global process around 47 y 33% to substrate levels of 150 and 200 g/l respectively. The productivity values are most at a 33% to 150 g/l of reducing sugar, and they keep constant to 200 g/l reducing sugar. The

1 Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Facultad de Administración. A.A. 4932. Medellín, Colombia.

2 Universidad de Antioquia, Escuela de Microbiología. A.A. 1226 Medellín, Colombia.

\* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia: hicastano@elpoli.edu.co

glucose in SSF strategy, at the time it is producing, it is transformed to ethanol, does not allowing to reach superior concentration to 100 g/l of reducing sugar, this implicates there is not substrate inhibition. The ethanol concentration doesn't affect the enzymatic process of saccharification. The SSF process demonstrates his technical viability on the ethanol production, to reduce time an energy requirements on the ethanol production from cassava flour.

**Key words:** Bioethanol, cassava starch, simultaneous saccharification and fermentation (SSF), Separated hydrolysis and fermentation (SHF)

## INTRODUCCIÓN

El almidón se puede transformar en glucosa vía hidrólisis enzimática o vía hidrólisis ácida. La principal ventaja del proceso enzimático, comparado con la hidrólisis ácida, radica en la no formación de subproductos y la reducción en la demanda energética del proceso ya que no requiere el uso de grandes presiones ni elevadas temperaturas (1). El proceso enzimático consta de dos etapas consecutivas, denominadas licuefacción y sacarificación, en donde intervienen las enzimas amilasas y glucoamilasas, respectivamente. Recientes avances en el desarrollo de amilasas termoestables han permitido mejorar la eficiencia del proceso de licuefacción, entendiendo éste como el proceso de hidrólisis del almidón a maltodextrinas mediante el rompimiento de los enlaces glucosídicos  $\alpha$  D1-4 internos de la molécula del almidón, produciendo moléculas de diferentes número de unidades de glucosa (2). En la actualidad son importantes los avances de la tecnología del DNA recombinante para la producción de enzimas industriales de este tipo, con el objetivo de aumentar sus actividades catalíticas y capacidad de operar a mayores temperaturas (3). Una vez concluida la etapa de licuefacción actúa la enzima glucoamilasa, que transforma en glucosa los oligosacáridos producto de la licuefacción del almidón, mediante el ataque a los enlaces glucosídicos de los extremos no reductores, liberando siempre una molécula de glucosa, proceso denominado sacarificación (4).

Los métodos que reporta la literatura para la bio-producción de etanol a partir de fuentes amiláceas incluyen (1,2, 5, 6, 7):

1. Sacarificación-fermentación simultáneas, en cocultivo de microorganismos; uno de los microorganismos con capacidades amilolíticas y el otro con capacidades fermentativas. El cocultivo requiere energías de mantenimiento y consumo de sustrato para crecimiento por cada

microorganismo, lo que conduce, teóricamente, a la reducción de los rendimientos globales de sustrato en producto, afectando la rentabilidad del proceso.

2. Sacarificación enzimática-fermentación independientes. Proceso enzimático en dos etapas: licuefacción y sacarificación; y una tercera etapa fermentativa, mediada por microorganismos
3. Como estrategia de reducción de tiempo y requerimientos energéticos, se implementan procesos de sacarificación y fermentación simultáneas, previa licuefacción del almidón. El proceso simultáneo presenta dos variantes frente al uso de enzimas o microorganismos en la etapa de sacarificación
  - a. Sacarificación enzimática
  - b. Sacarificación con microorganismos
4. Fermentación alcohólica utilizando microorganismos con capacidad amilolítica. Los microorganismos que presentan actividad amilolítica natural generalmente tienen bajos rendimientos en la producción de etanol. Con los desarrollos de la técnica de recombinación genética se han creado microorganismos con la capacidad de biotransformar el almidón a etanol, mejorando los rendimientos. Ejemplo de ello es la transformación de levaduras que expresan los genes que codifican para las enzimas  $\alpha$  amilasas y glucoamilasas, permitiendo que las levaduras utilicen el almidón como fuente de carbono

Los sistemas de sacarificación-fermentación simultáneas tienen orígenes en la producción de etanol a partir de desechos y/o fuentes lignocelulósicas, que ofrecen ventajas frente a los procesos independientes (5, 8, 9,10), a saber:

- Reducción de la inhibición de las enzimas por sustrato
- Menos intensivos en capital si se comparan con los sistemas SHF (fermentación-sacarificación independientes)

- Los sistemas SSF (sacarificación-fermentación simultáneas) vs SHF (hidrólisis y fermentación separadas) han presentado mayores conversiones globales de etanol.
- Reducción de los tiempos de proceso al desarrollar la sacarificación enzimática y la fermentación en forma simultánea. La menor temperatura del proceso de sacarificación enzimática se compensa con una mayor adición de enzimas, de forma tal que no afecte la velocidad global del proceso. La reducción en el tiempo de proceso permite aumentar la capacidad instalada de las plantas, mejorando la productividad y reduciendo los costos de producción.

Existen antecedentes del uso de la estrategia de proceso SSF en la producción de etanol a partir de sustratos como harina integral de trigo y harina integral de maíz. Montesinos y Navarro (6), desarrollando los procesos de sacarificación fermentación simultáneos, encontraron rendimientos de 87-89% de valor teórico, además de reducir en 5 horas el tiempo de proceso, lo que aumentó la productividad. Mojovic (11), realizó ensayos de sacarificación-fermentación simultáneos a partir de hidrolizados de harina de maíz a una temperatura de 32° C, disminuyendo los costos energéticos del proceso de sacarificación, que generalmente se realizan a 60° C. Los resultados obtenidos por SSF fueron muy similares a los obtenidos por el proceso convencional (etapas separadas), demostrando que el etanol no presenta ningún efecto inhibitorio sobre la cinética de la enzima glucoamilasa utilizada en los ensayos (Supersan®). Durante el proceso SSF, la concentración de glucosa fue mantenida por debajo de concentraciones inhibitorias (100 g/l), lo que favorece la cinética de crecimiento celular y, por ende, la cinética de formación de etanol, al ser éste un metabolito primario. Mojovic (11), alcanzó concentraciones de 8% en volumen de etanol al cabo de 35 horas de proceso, partiendo de un hidrolizado de harina de maíz 1:3 (harina/agua), 85° C, pH 6.0 y 1 hora de proceso como condiciones de la licuefacción. Las condiciones de sacarificación-fermentación simultáneas fueron pH 5.0, T 32° C, 1.35% p/p inóculo y 36 AGU de Supersan®. Pese a desarrollar el proceso a una temperatura inferior a la óptima para la enzima, su actividad a 32° C no se afectó drásticamente, factor importante para extrapolar esta estrategia en los procesos de obtención de etanol a partir de almidón de yuca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Almidón de yuca refinado (Empresa Productos del Maíz, Cali Colombia), adquirido localmente se utiliza como sustrato para la obtención de etanol utilizando la estrategia de proceso de sacarificación-fermentación simultánea (SSF). Se determinan los contenidos de humedad y almidón del producto comercial. Como control de los procesos de SSF, se realiza un proceso en el que las etapas se realizaron en forma independiente (SHF), con las siguientes condiciones de operación: licuefacción (T 83°C, pH 5.5, dosis de enzima 0.5 ml/l Liquozyme® (α amilasa), agitación 400 rpm); sacarificación (T 60° C, pH 4.5, dosis de enzima 1.5 ml/l Spirizyme fuel® [glucoamilasa], agitación 400 rpm); fermentación alcohólica (T 30° C, pH 4.5, inóculo 8 g/l en peso seco, agitación 400 rpm).

La estrategia de proceso de SSF se realiza bajo las siguientes condiciones de operación: la etapa previa de licuefacción se realiza en las mismas condiciones de operación descritas previamente para el proceso de SHF; temperatura 30° C, pH 4.5, concentración de azúcares reductores según diseño de experimentos, dosis de enzima spirizyme fuel® según diseño de experimentos, inóculo 8.0 g/l peso seco de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (0.8% p/v) y agitación 400 rpm. El diseño experimental (Véase Tabla 1) se basa en el uso de un diseño factorial completamente aleatorizado de dos factores evaluados a dos niveles, con dos réplicas. Los análisis de laboratorio se desarrollaran por duplicado. El análisis estadístico se realiza con la ayuda del paquete estadístico Stat Graphics 4.0®, empleando la herramienta de

### ANOVA tipo II

**Tabla 1.** Valores de los niveles de los factores a evaluar en el proceso de obtención de etanol utilizando la estrategia de proceso SSF.

Ensayo	Sustrato g/l AR	Enzima/sustrato ml/l	Proceso
Control	200	1,5	SSH
1	150	3,0	SSF
2	150	1.5	SSF
3	200	3,0	SSF
4	200	1,5	SSF

En los procesos de licuefacción, sacarificación, SSF y fermentación se hace seguimiento a las concentraciones de biomasa (x), azúcares reductores

(AR), glucosa (S) y etanol (P); a partir de los valores de concentración se calculan:

Rendimiento de biomasa en sustrato  $Y_{x/s} = (X_f - X_0) / (S_0 - S_f)$ , gramos de biomasa formada / g sustrato consumido, rendimiento de producto en sustrato  $Y_{p/s} = (P_f - P_0) / (S_0 - S_f)$  gramos de producto obtenido / gramos de sustrato consumido, productividad =  $(P_f - P_0) / t$  gramos de producto formados por unidad de volumen y unidad de tiempo y rendimiento =  $(P_f - P_0) / ((S_0 - S_f) * 0.51)$  en gramos de producto formados / gramos de producto formados si todo el sustrato se transforma en producto. Los subíndices  $_0$  y  $_f$  describen el tiempo cero y tiempo final del proceso.

### Descripción del proceso SHF (control)

#### Preparación de la dispersión de almidón

Se toman 2 Kg. de almidón de yuca refinado, con una humedad del 10%, y se dispersan en frío en 3.5 litros de agua potable, hasta alcanzar un volumen final de 5 litros. Se procede a ajustar el pH con HCl 1N hasta un valor de 5.5. Se ajusta la concentración de  $Ca^{2+}$  a 30 ppm mediante la adición de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  grado analítico. La mezcla anterior se transfiere a un biorreactor B Braund® de 5 litros, con control de temperatura, pH y velocidad de agitación con precisión de 0.1 °C, 0.01 y 1 rpm, respectivamente.

#### Proceso de licuefacción

Se adicionan al biorreactor 2.5 ml de enzima Liquozyme SC®, de la empresa Novozymes, a la temperatura de la dispersión de almidón (25.0 ± 0.1 °C). Se inicia el calentamiento del medio de licuefacción en el biorreactor con agitación de 400 ± 1 rpm, con la ayuda de un baño termostadado que bombea agua en la chaqueta a una temperatura de 90.0 ± 0.1 °C. La temperatura de equilibrio del sistema de licuefacción se mantiene a 83.0 ± 1.0 °C. La cinética de licuefacción se monitorea a partir del momento en que se alcanza el equilibrio térmico; desde este momento se monitorea la concentración de azúcares reductores por el método de DNS (Ácido 3,5 Dinitrosalicílico), por espacio de dos horas, a intervalos de 0.5 horas.

#### Proceso de sacarificación

Después de dos horas de licuefacción, la temperatura y pH se ajustan dando por finalizado el proceso de licuefacción. El pH se ajusta a un valor

de 4.50 ± 0.01 con HCl 1.0 N y la temperatura se lleva a 60.0 ± 0.1 °C, por medio de enfriamiento con agua a través de la chaqueta. Se toman datos del proceso para definir los tiempos de calentamiento y enfriamiento en los procesos de licuefacción y sacarificación. Una vez se ajustan los parámetros de pH y T, se transfieren 7.5 ml de la enzima Spirizyme fuel®. La cinética del proceso se sigue por espacio de 20 horas. La concentración de glucosa y azúcares reductores se determina cada tres horas.

#### Proceso de fermentación

Concluido el proceso de sacarificación, la concentración de glucosa se ajusta a 200 g/l mediante dilución con agua potable; la temperatura a 30.0 ± 0.1 °C con la ayuda del sistema de refrigeración del biorreactor, y el pH a 4.50 ± 0.01 mediante la adición de HCl 1.0 N. El medio fermentativo se suplementa con  $(NH_4)_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $KH_2PO_4$  en concentraciones de 6 g/l, 2 g/l y 3 g/l, respectivamente. El inóculo se prepara mediante la activación en 500 ml del medio fermentativo, de 40 g de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (marca Instant Yeast) durante cuatro horas en un agitador orbital marca Boekel Grant a 110.0 ± 1 rpm y a una temperatura de 30.0 ± 0.1 °C. Después de la inoculación fueron evaluadas las concentraciones de biomasa por la técnica de peso seco, etanol y glucosa por cromatografía líquida de alto rendimiento en cromatógrafo marca Agilent modelo 1200 y azúcares reductores por el método DNS usando espectrofotómetro UV visible Genesys 20.

#### Procesos de sacarificación-fermentación simultáneos (SSF)

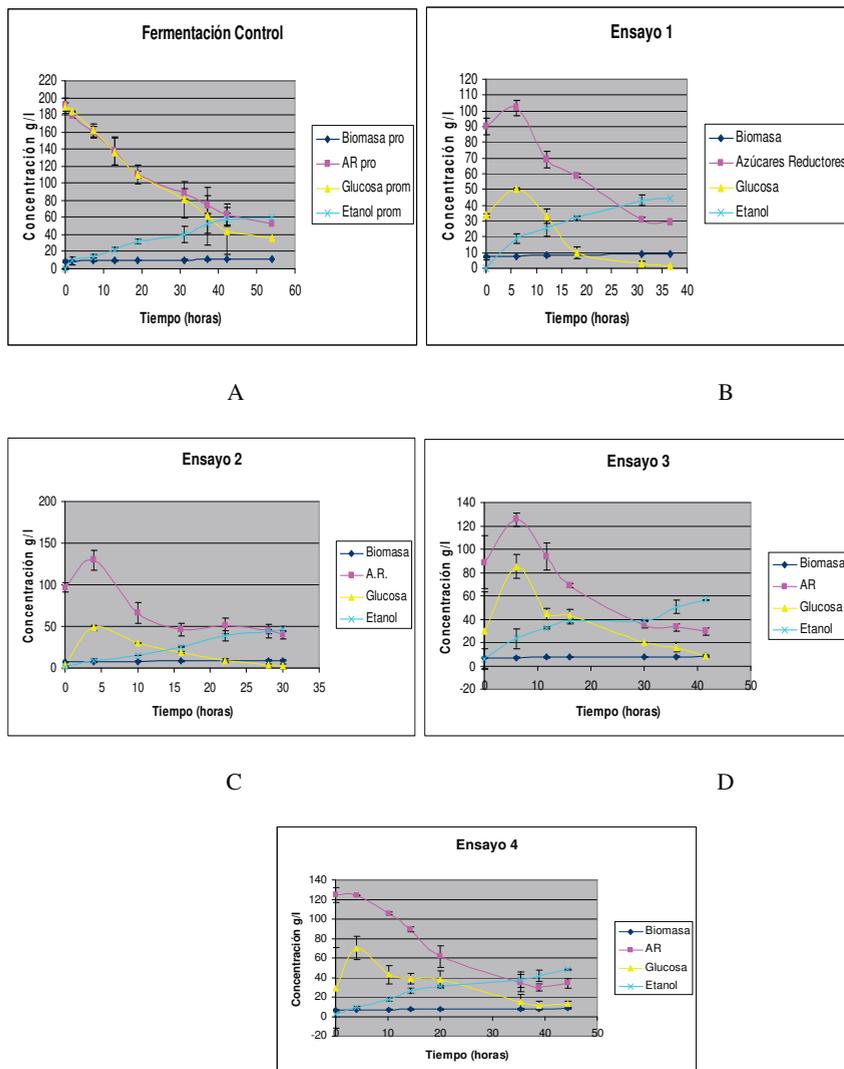
Una vez finaliza el proceso de licuefacción, el sistema se lleva a las condiciones de operación de los procesos simultáneos (temperatura de 30.0 ± 0.1 °C y un pH de 4.50 ± 0.01), mediante enfriamiento con agua potable a través de la chaqueta del biorreactor y adición de HCl 1.0 N. El producto de la licuefacción se suplementa con  $(NH_4)_2HPO_4$  6.0 g/l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2.0 g/l y  $KH_2PO_4$  3.0 g/l, respectivamente. En este momento se adiciona la enzima Spirizyme fuel® en cantidades correspondientes con los niveles de evaluación del diseño de experimentos. Después de la adición de la enzima, se procede a la adición del inóculo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* marca Instant Yeast, en un volumen correspondiente al 10% del volumen útil del biorreactor. El inóculo se prepara en el hidrolizado

de la licuefacción, enriquecido con las sales descritas en la preparación del sistema SSF y activado durante cuatro horas, a  $30.0 \pm 0.1^\circ \text{C}$ , en un agitador orbital a  $110 \pm 1 \text{ rpm}$ , a partir de levadura *Saccharomyces cerevisiae* granulada. Durante los procesos SSF se determinan las concentraciones de glucosa y azúcares reductores por los métodos de glucosa oxidasa y DNS respectivamente; adicionalmente se hace seguimiento a la biomasa por la técnica de peso seco. El etanol se cuantifica por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), utilizando una columna Supelcogel C-160H, 300x 7.8 mm; como fase móvil se utiliza una solución de 0.1% ácido fosfórico grado HPLC con un flujo de 0.5 ml/min, utilizando detector de IR. El proceso SSF se desarrolla en un biorreactor B-Braund® con un volumen útil de 5 litros, agitado mecánicamente con control de pH, temperatura y frecuencia de agitación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso de licuefacción del almidón de yuca en las condiciones de proceso descritas anteriormente, presenta una conversión de almidón a maltodextrinas de un  $47.2 \pm 1.1 \%$  al cabo de 2.5 horas. En el caso del seguimiento al proceso de sacarificación de las maltodextrinas producto de la etapa de licuefacción, se alcanza una conversión de  $98.0 \pm 1.4 \%$  de almidón a glucosa en un tiempo de proceso de 12 horas.

Los perfiles de concentración de etanol, biomasa, glucosa y azúcares reductores para el control y los tratamientos se muestran en la figura 5. Cada gráfica muestra el comportamiento medio de las dos réplicas de cada tratamiento experimental. El tratamiento de control (SHF) presenta un perfil de concentración de los analitos característico de un proceso de fermentación por lotes, con un tiempo de proceso de 60 horas.



**Figura 5.** Concentración de biomasa, azúcares reductores (AR), glucosa y etanol durante experimentos SHF (A) y SSF (B, C, D y E) con inóculo de 8 g/l, utilizando como sustrato glucosa proveniente de hidrólisis total de almidón de yuca (A) y maltodextrinas productos del proceso de licuefacción del almidón de yuca (B, C, D y E); T  $30.0 \pm 0.1^\circ \text{C}$ , pH  $4.50 \pm 0.01$  y agitación mecánica  $400 \pm 1 \text{ rpm}$ . (A) So 200 g/l glucosa, (B) So como AR 150 g/l, relación enzima/sustrato 3.0, (C) So como AR 150 g/l y relación enzima sustrato 1.5, (D) So como AR 200 g/l y relación enzima/sustrato 3.0, (E) So como AR 200 g/l y relación/ enzima sustrato 1.5. En todos los experimentos se usa Spirizyme fuel® como enzima sacarificante. En el proceso de licuefacción se usa la enzima Liquozyme® a una dosis 0.5 ml/l dispersión

Los procesos de producción de etanol que hacen uso de la estrategia de proceso SSF, presentan, en su totalidad, perfiles de concentración de azúcares reductores muy similares; se presenta al inicio del proceso un leve incremento de su concentración al cabo de las 5 horas, para luego descender por efecto del metabolismo de la levadura; esto se explica por una menor velocidad de consumo de sustrato de la levadura frente a la velocidad de hidrólisis de las maltodextrinas por efecto de la enzima Spirizyme fuel®. Un comportamiento similar presentan los perfiles de concentración de glucosa, pero muestran una variación en concentración más pronunciada frente a los azúcares reductores; los puntos de inflexión de las curvas de concentración coinciden en tiempo con las concentraciones de azúcares reductores, hecho que se explica porque la glucosa se cuantifica como azúcar reductor.

El cambio brusco de concentración de glucosa en las primeras horas de proceso se puede interpretar por la diferencia de las dos velocidades de reacción asociadas al proceso SSF (sacarificación enzimática y la fermentación). En la primera zona donde el perfil de concentración crece hasta un

máximo, la velocidad de producción de glucosa (sacarificación) es mayor que la velocidad de consumo de glucosa (fermentación). En el punto de inflexión las dos velocidades se hacen iguales; y en la zona donde el perfil de concentración disminuye en el tiempo, prima la velocidad de consumo frente a la velocidad de formación. Después de la hora 10 se observa un cambio en el perfil de glucosa, haciendo que su velocidad neta de consumo descienda, lo que se explica por una mayor velocidad de consumo de glucosa si se compara con la etapa anterior.

En la tabla 4 aparecen los valores medios de las réplicas de rendimiento de biomasa en sustrato  $Y_{x/s}$ , producto en sustrato  $Y_p/s$ , rendimiento de conversión en etanol y productividad. Para la cuantificación del tiempo del proceso se toma como tiempo cero el momento en que fue adicionada la enzima Liquozyme a la solución de almidón, inicio del proceso de licuefacción. Los valores que aparecen en la tabla 4 son los promedios de las dos réplicas para cada tratamiento del diseño experimental incluyendo el control que se desarrolló bajo el referente de SHF.

**Tabla 4.** Resultados de la determinación de los parámetros cinéticos, rendimientos y productividades de los procesos SHF y SSF.

Ensayo	Tiempo (h)	$Y_{x/s}$ g/g	Etanol g/l	$Y_p/s$ g/g	Rendimiento (%)	Productividad g/lh
SSF	72,0 ± 2.2	0,025± 0.005	61,0± 5.6	0,41± 0.01	80,7± 0.1	1,02± 0.08
1	36,2± 4.20	0,017± 0.002	44,4± 3.0	0,37± 0.01	72,2± 0.1	1,32± 0.07
2	39,0± 3.4	0,015± 0.001	47,2± 2.1	0,40± 0.01	78,0± 0.1	1,33± 0.04
3	48,8± 3.1	0,007± 0.001	58,0± 0.6	0,34± 0.01	66,4± 0.1	1,07± 0.02
4	47,4± 0.7	0,009± 0.001	49,0± 0.7	0,30± 0.01	57,0± 0.1	1,09± 0.01

Bajo las condiciones de proceso utilizadas en la integración de las etapas en SSF, no se requiere hacer la inoculación del microorganismo un tiempo después de iniciado el proceso de sacarificación, como lo sugieren varios investigadores, trabajando como sustrato con trigo y maíz (2, 4), ya que la velocidad de formación de glucosa al inicio del proceso soporta el crecimiento de la levadura.

Las concentraciones de glucosa en el proceso SSF están siempre por debajo de 100 g/l, lo que no per-

mite que se presente el fenómeno de inhibición por sustrato que la literatura reporta en concentraciones mayores de 100 g/l. El hecho anterior se traduce en mayores velocidades de reacción, lo que influye en forma natural en mayor productividad.

#### Efecto de los factores evaluados

Según los resultados del ANOVA, la variable concentración de sustrato presenta efecto significativamente estadístico sobre la productividad

del proceso ( $p \leq 0.05$ ). El análisis del efecto de la relación enzima/sustrato sobre la productividad, al menos para los niveles evaluados, no presenta significancia estadística, lo que implica que se puede trabajar con el nivel inferior evaluado, con el objetivo de reducir costos de enzima en el proceso (Véanse tablas 5 y 6).

**Tabla 5.** Efecto cruzado de la concentración de sustrato y dosis de enzima sobre el tiempo total de proceso

Sustrato g/l	Enzima ml/l	
	1.5	3.0
150	39	36,2
200	47,4	48,85

**Tabla 6.** Efecto cruzado de la concentración de sustrato y dosis de enzima sobre la productividad de etanol

Sustrato g/l	Enzima ml/l	
	1.5	3.0
150	1,33	1,32
200	1,09	1,07

### Análisis del tiempo de proceso

Se observa una reducción muy importante en el análisis comparativo del tiempo total del proceso para la estrategia SSF. El control demanda 72 horas de proceso por causa de efectos inhibitorios de sustrato, mientras que los ensayos 1 y 2 demandaron 36 y 38 horas respectivamente, lo que equivale a reducciones del 50 y 47%, muy significativas a la hora de valorar el ahorro en tiempo y el incremento en productividad. Los ensayos 3 y 4 presentan reducciones del 33% en el tiempo de la cinética del proceso. Los menores porcentajes de reducción de los ensayos 3 y 4, frente a los ensayos 1 y 2, se explican por la mayor concentración de sustrato al inicio del proceso SSF (Véase tabla 4). El tiempo total de proceso se aumenta al incrementar la concentración inicial de sustrato, sin presentar ningún efecto al incrementar en un 100% la dosis de enzima usada en el proceso, lo que permite inferir que el proceso de sacarificación-fermentación simultáneos está gobernado por el metabolismo de la levadura y no por el proceso enzimático de sacarificación.

### Análisis de la productividad

Los valores de productividad de etanol se ven afectados, tanto por la concentración final como por el tiempo en el que se obtiene dicha concentración.

De esta forma se puede evidenciar que los ensayos 1 y 2 presentan valores de  $1.32 \pm 0.07$  g/lh y  $1.33 \pm 0.04$  g/lh de productividad respectivamente, lo que permite concluir que no hay efecto significativo de la variable dosis enzima/sustrato sobre la productividad a concentraciones iniciales de sustrato de 150 g/l ( $p$  menor 0.05 análisis de varianza); pero dan como resultado una productividad 33% mayor frente al control del diseño experimental ( $1.33 \pm 0.07$  g/lh vs  $1.02 \pm 0.08$  g/lh respectivamente). Si bien los valores de concentración final de etanol son mayores para el control, los procesos de producción de etanol demandan mucho menor tiempo ( $50\%$ ,  $72.0 \pm 2.2$  vs.  $36.2 \pm 1.2$  horas) en los ensayos 1 y 2, presentando mayor efecto sobre la productividad la reducción en el tiempo de proceso. Si se comparan las productividades del ensayo SSH con las productividades de los ensayos 3 y 4, se observa que no hay diferencia significativa estadística entre las dos estrategias de proceso según prueba de análisis de varianza ( $p$  menor 0.05).

La menor concentración de etanol al final del proceso en las cinéticas de los ensayos 3 y 4 frente al control ( $58.0 \pm 0.6$ ,  $49.0 \pm 0.7$  vs.  $61.0 \pm 5.6$ ), se ve compensada en la reducción de un 33% en los tiempos de proceso ( $48.8 \pm 3.1$ ,  $47.74 \pm 0.71$  vs.  $72.0 \pm 2.2$  horas). (Véase tabla 4). Al cruzar el efecto de los factores de concentración inicial de sustrato y dosis de enzima sobre la productividad de etanol, se presenta la misma reducción en la productividad para las dos dosis de enzima evaluadas (Véanse tablas 5 y 6).

## CONCLUSIONES

La estrategia de proceso de sacarificación-fermentación simultáneas permite reducir en promedio 24 horas (33%) el tiempo de los procesos evaluados a una concentración inicial de sustrato de 200 g/l, y en 36 horas (50%), el tiempo de los procesos cuya concentración inicial de sustrato fue de 150 g/l.

Las productividades de los procesos de producción de alcohol a partir de almidón de yuca, usando la estrategia SSF, para concentraciones iniciales de sustrato de 200 g/l y los dos niveles de la enzima Spizyme fuel<sup>®</sup> evaluados (1.5 y 3.0ml/l), se mantienen constantes frente al proceso convencional, donde las etapas de sacarificación y fermentación se realizan en forma independiente. Para el nivel de concentración inicial de sustrato de 150 g/l, se alcanza una

productividad de  $1.33 \pm 0.07$  g/lh de etanol, 33 % mayor que el control, para los dos niveles evaluados de la enzima. La productividad alcanzada de etanol, haciendo uso de la estrategia SSF, sólo depende de la concentración inicial de sustrato. El factor dosis de enzima, al menos para los niveles evaluados, no afecta la productividad del proceso.

Los rendimientos en la producción de etanol utilizando la estrategia SSF, son menores frente al proceso convencional. Se presenta una mayor reducción del rendimiento para el nivel de concentración inicial de sustrato de 200 g/l. La reducción en los rendimientos de producción de etanol se compensa por los menores tiempos de proceso, lo que permite que la productividad en la producción de etanol se conserve y se incremente para los niveles de concentración inicial de sustrato de 200 y 150 g/l respectivamente. Desafortunadamente, las productividades obtenidas son bajas frente a los procesos discontinuos que utilizan caña de azúcar como sustrato (1.5 g/lh) (12).

La temperatura del proceso SSF (30° C), no afecta marcadamente la actividad catalítica de la enzima Spirizyme fuel®. El seguimiento cinético de la concentración de glucosa deja ver que, conforme la glucosa se hidroliza de las maltodextrinas, es transformada por la levadura a etanol y subproductos de la fermentación. La velocidad de la hidrólisis de maltodextrina a glucosa por efecto de la Spirizyme fuel® es suficiente para satisfacer la demanda de la levadura para desarrollar su metabolismo, hecho que representa no requerir una etapa previa de sacarificación que soporte una concentración de glucosa inicial para el crecimiento de la levadura.

Las concentraciones de glucosa durante el tiempo de proceso en la etapa de sacarificación-fermentación simultánea, no alcanzan valores mayores a 100 g/l, con lo que se validan las ventajas de los sistemas SSF, ya que se elimina del proceso el fenómeno de inhibición por sustrato.

## AGRADECIMIENTOS

A la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia, a FUNDAUNIBAN, a la Secretaría de Agricultura de Antioquia y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) por la financiación del Proyecto.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mielenz J. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Curr. Opin. Microbiol.* 2001; 4:324-329.
2. Rutz D, Janssen R. *Biofuel technology handbook*. Munich: WIP Renewable Energies; 2007.
3. Novozymes & BBI Internacional. "Fuel Ethanol, a technological evolution." (Sitio en Internet). Disponible en [www.bbibiofuels.com/ethanolevolution/](http://www.bbibiofuels.com/ethanolevolution/) Consultado: 30 Junio 2006.
4. Amutha R, Gunareskaran P. Production of ethanol from liquefied cassava starch using co-immobilized cells of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2001; 92 (6):560-564.
5. Sassner P, Galbe M, Zacchi G. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated salix at high dry-matter content. *Enzyme Microbial Technol.* (Sitio en Internet) Disponible en: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com). Consultado: 24 Septiembre de 2006.
6. Montesinos T, Navarro J. Production of alcohol from raw wheat flour by amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzymes Microbial. Technol.* 2000; 27: 362-370.
7. Sureh K, Sree K, Rao V. Utilization of damaged sorghum and rice grains for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Biosources Technology* 1998; 68: 301-304.
8. Zhu S, Wu Y, Yu Z, Zhanp X, Wang C, Yu F, et al. Simultaneous saccharification and fermentation of microwave/alkali pre-treated rice straw to ethanol. *Biosystem Engineering* 2005; 92 (2):229-235.
9. Alkasrawi M, Eriksson T, Borjesson J, Wigren A, Galbe M, Tjerneld F, et al. The effect of Tween 20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. *Enzyme Microbial. Technol.* 2003;33: 71-78.
10. Clark M, Moehlman M. Enzymatic simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of biomass to ethanol in a 130 liter multistage continuous Reactor separator. *Bio-process Innovations, Inc.* (Sitio en Internet) Disponible en [www.bioprocess.com](http://www.bioprocess.com). Consultado: 10 de Mayo de 2006.
11. Mejovic L, Nikolik S, Rakin M, Vukasinovik M. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Fuel.* 2006; 85:1750-1755.
12. Sánchez, O, Cardona C. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. (Sitio de Internet) Disponible en [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442005001100005&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005001100005&lng=pt&nrm=iso). Consultado: 16 Octubre de 2007.