



**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA
DE AMAZONAS**

**CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



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

**TESIS
PARA OBTENER EL
TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

AUTORES : Br. VICTOR HUGO ESTELA ROMERO

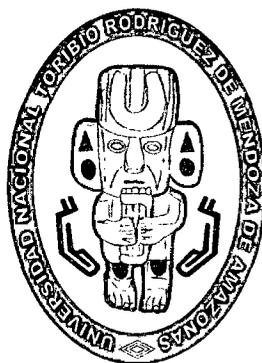
Br. GLADIS JANET VALDIVIA HERNÁNDEZ

ASESOR : Ing. JUAN MANUEL GARAY ROMÁN

**CHACHAPOYAS - PERÚ
2007**

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA
DE AMAZONAS**

**CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



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

**TESIS
PARA OBTENER EL
TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

AUTORES : Br. VICTOR HUGO ESTELA ROMERO

Br. GLADIS JANET VALDIVIA HERNÁNDEZ

ASESOR : Ing. JUAN MANUEL GARAY ROMÁN

CHACHAPOYAS – PERÚ

2007

DEDICATORIAS

Con todo mi amor y gratitud a mis padres

Alejandro y Gaudelia,

por su invaluable apoyo moral y
económico que me brindaron en el
momento que más lo necesitaba, así
mismo por confiar y hacer realidad mi
más anhelado sueño

A todos mis hermanos, amigos
incondicionales, quienes con
su ejemplo de lucha y esfuerzo
por seguir adelante, me
enseñaron el camino del éxito.

Con amor y admiración a mi esposa

Gladis Janet

por compartir conmigo penas,
alegrías, sueños y los mismos deseos
de superación personal y profesional

Con todo mi amor a mi hijo

Chris Franklin

por darme su cariño, amor y
fuerzas para salir adelante.

VICTOR HUGO E.

A la Santísima Cruz de Motupe,
por guiarme por el camino
del éxito

Con mucho cariño a mis padres
Silverio y Carmela
que me dieron la vida y han estado
conmigo en todo momento.

A mis hermanos quienes con su
cariño y apoyo contribuyeron para
realizarme profesionalmente.

A mi esposo Victor Hugo y a mi
hijo Chris Franklin por estar
conmigo y apoyarme siempre.

GLADIS JANET V.

AGRADECIMIENTOS

- A nuestro asesor **Ing. JUAN MANUEL GARAY ROMÁN**, por su gran amistad y valiosa orientación brindada para la elaboración, ejecución y análisis de los resultados de la presente Tesis.
- A la **Mblga. LUZ AZUCENA TORRES GARCIA** quien tuvo la generosidad de donarnos las cepas de *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* MIT L-51 procedentes de la Universidad Nacional de Trujillo, utilizadas en el presente trabajo de investigación.
- Al **Est. ELIAS ALBERTO TORRES ARMAS** por su colaboración en el análisis estadístico de los resultados del presente estudio de investigación.

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

La Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas fue creada el 18 setiembre del 2000, con Ley de Creación N° 27347, iniciando sus actividades el 25 mayo del 2001 con Resolución de Funcionamiento N° 114-2001-CONAFU.

Dr. JUAN BAUTISTA ASTORGA NEIRA
Presidente

Ing. VÍCTOR AUGUSTO DELGADO VÉLEZ
Vicepresidente Académico

Dr. JESÚS JORGE LÓPEZ VERGARA
Vicepresidente Administrativo

Ms. C. MIGUEL ANGEL BARRENA GURBILLÓN
Responsable (e) de la Carrera Profesional de Ingeniería Agroindustrial

VISTO BUENO DE ASESOR

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA
DE AMAZONAS**



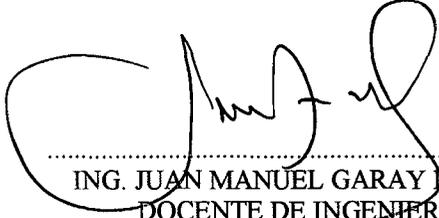
Yo, Ing. Juan Manuel Garay Román, identificado con DNI N° 17808601, docente de la Carrera Profesional de Ingeniería Agroindustrial con categoría de asociado, asesor de la Tesis:

Optimización de la hidrólisis de arroz ñelen por *Aspergillus niger* para usarlo como sustrato en la obtención de etanol, presentado por los bachilleres:

- Br. VICTOR HUGO ESTELA ROMERO
- Br. GLADIS JANET VALDIVIA HERNÁNDEZ

Habiendo revisado el informe final de la tesis en mención, doy la conformidad y el visto bueno para continuar con sus trámites correspondientes.

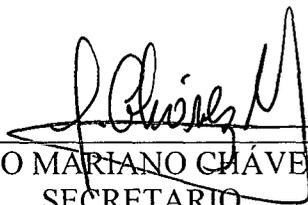
Chachapoyas, 22 de octubre del 2007


.....
ING. JUAN MANUEL GARAY ROMÁN
DOCENTE DE INGENIERÍA
ASESOR

JURADO



Ms. C. MIGUEL ANGEL BARRENA GURBILLÓN
PRESIDENTE



Ms.C. JULIO MARIANO CHÁVEZ MILLA
SECRETARIO



Ing. DANIEL JOSÉ SALVADOR RODRÍGUEZ
VOCAL

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	iii
AUTORIDADES UNIVERSITARIAS	iv
VISTO BUENO DEL ASESOR	v
JURADO	vi
TABLA DE CONTENIDOS	vii
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE FOTOGRAFIAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS	8
2.1. MATERIAL	8
2.1.1. Material Biológico	8
2.2. MÉTODOS	8
2.2.1. Reactivación de la cepa	8
2.2.2. Tratamiento del sustrato	9
2.2.3. Preparación del inóculo	9
2.2.4. Optimización con el diseño estadístico de Box-Behnken	10
2.2.5. Acondicionamiento de los biorreactores para hidrólisis del almidón	12
2.2.6. Proceso de hidrólisis del almidón	12
2.2.7. Contenido de azúcares reductores	12
2.2.7.1. Valoración del reactivo de Fehling	13
2.2.7.2. Equivalencia en glucosa del reactivo de Fehling	13
2.2.7.3. Determinación de azúcares reductores	14
2.2.8. Determinación de las operaciones y parámetros de procedimiento	15
2.2.8.1. Materia prima	15
2.2.8.2. Molienda	15

2.2.8.3. Hidratación	15
2.2.8.4. Cocción	16
2.2.8.5. Hidrólisis	16
2.2.8.6. Filtración	16
2.2.8.7. Fermentación alcohólica	17
2.2.8.8. Destilación simple	17
2.2.8.9. Destilación fraccionada	17
III. RESULTADOS	19
3.1. Optimización de la composición del medio de cultivo con el diseño de Box-Behnken	19
3.2. Estimación de la máxima producción de azúcares reductores con el Software estadístico Statgraphics plus 5.1. for Windows	22
3.3. Etanol obtenido en la destilación simple y fraccionada	28
3.4. Propiedades físicas y químicas del etanol obtenido	28
IV. DISCUSIÓN	29
V. CONCLUSIONES	31
VI. RECOMENDACIONES	32
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS	35
Secuencia de fotografías del trabajo de investigación	36
Conteo de esporas de <i>Aspergillus niger</i> en cámara Neubauer	41
Diluciones de la suspensión de esporas de <i>Aspergillus niger</i> /mL para obtener los inóculos deseados	42
Valoración del Fehling	43
Porcentaje de almidón hidrolizado	44
Composición del medio mineral Czapek	45
Preparación de Reactivo de Fehling	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Rango de valor de las variables a optimizar con el diseño estadístico de Box-Behnken	10
Tabla 2: Diseño estadístico de Box-Behnken para optimizar las tres variables independientes.	11
Tabla 3: Producción de azúcares reductores de cada medio de diferente concentración de componentes, aplicando el diseño de Box-Behnken.	20
Tabla 4: Azúcares reductores producidos por hidrólisis con <i>Aspergillus niger</i>	21
Tabla 5: Valores de las variables independientes, para el cálculo de los coeficientes de la ecuación polinomial.	23
Tabla 6: Coeficientes para la ecuación polinomial calculados con el Software Statgraphics 5.1.	24
Tabla 7: Valores óptimos de proceso calculado con el Software Statgraphics 5.1.	25
Tabla 8: Análisis de la varianza	25
Tabla 9: Etanol producido a partir de 1000 g de ñelen	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de flujo	18
Figura 2: Gráfica de superficie de respuesta de azúcares reductores (g/L) en función g ñelen/L de agua – tiempo (10^5 esporas <i>Aspergillus niger</i> /mL)	26
Figura 3: Gráfica de superficie de respuesta de azúcares reductores (g/L) en función tiempo - esporas <i>Aspergillus niger</i> /mL (400 g ñelen/L de agua)	26
Figura 4: Gráfica de contornos de respuesta estimada de azúcares reductores (g/L) en función tiempo – g de ñelen/L de agua (10^5 esporas de <i>Aspergillus niger</i> /mL)	27

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1	: Siembra de <i>Aspergillus niger</i>	36
Fotografía 2	: Siembra de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
Fotografía 3	: Suspensión de esporas de <i>Aspergillus niger</i> en medio mineral	37
Fotografía 4	: Suspensión de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio mineral	37
Fotografía 5	: Conteo de esporas de <i>Aspergillus niger</i> en cámara Neubauer	38
Fotografía 6	: Biorreactores empleados para hidrolizar arroz ñelen	38
Fotografía 7	: Biorreactores en bañomaria para favorecer la hidrólisis del arroz ñelen	39
Fotografía 8	: Determinación de azúcares reductores por el método de Lane-Eynon	39
Fotografía 9	: Destilación simple del mosto fermentado	40
Fotografía 10	: Destilación fraccionada	40

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo optimizar la hidrólisis de arroz ñelen por *Aspergillus niger* para usarlo como sustrato en la obtención de etanol. Para ello se construyeron 15 biorreactores de 21 cm de altura y 6 cm de diámetro; de 0,5 L, tipo tanque no agitado. El inóculo fue de 10^5 , 10^6 y 10^7 esporas de *Aspergillus niger*/mL, conteo realizado en microscopio con cámara Neubauer. El medio de cultivo fue formulado a las concentraciones de 200, 300 y 400 g de arroz ñelen/L de agua. El bioproceso se llevó a cabo a 45 °C; pH de 5,5 – 6,0 y durante un tiempo de 4, 5 y 6 días. Experimentalmente se obtuvo 100 g de azúcares reductores (AR)/L de hidrolizado con un medio constituido por 400 g de arroz ñelen/L de agua, 10^5 esporas de *Aspergillus niger*/mL de medio y 6 días de fermentación. Al tratar los resultados experimentales con el software Statgraphics 5.1., se estimó que la máxima producción será 90,4955 g de AR/L de medio a igual valor de las variables con las que se obtuvo experimentalmente 100 g de AR/L. Con los valores óptimos de las variables se hidrolizó 1000 g de arroz ñelen, obteniéndose también 100 g de AR/L, el que se fermentó con *Saccharomyces cerevisiae* MIT L-51 obteniéndose 150 mL de etanol de 96 °G.L.

ABSTRACT

The present work of investigation was as carried to optimize the hidrólisis of rice ñelen for *Aspergillus niger* to use it as substratum in the obtaining of ethanol. For they were built it 15 biorreactores of 21 cm of height and 6 cm of diameter; of 0,5 L, type not agitated tank. The inóculo was of 10^5 , 10^6 and 10^7 spores of *Aspergillus niger*/mL, count carried out in microscope with Neubauer chamber. The means of cultivation was formulated to the concentrations of 200, 300 and 400 g of rice ñelen/L of water. The bioproceso was carried out to 45 °C; pH of 5,5 - 6,0 and during a time of 4, 5 and 6 days. Experimentally was obtained 100 g of reducers sugars (AR)/L of hidrolizado with a half constituted by 400 g of rice ñelen/L of water, 10^5 spores of *Aspergillus niger*/mL of half and 6 days of fermentation. When treating the results experimental with the software Statgraphics 5.1., considering that the maximum production will be 90,4955 g of AR/L of half to same value of the variables with those that it was obtained experimentally 100 g of AR/L. With the good values of the variables you hidrolizó 1000 g of rice ñelen, obtained being also 100 g of AR/L, the that was fermented with *Saccharomyces cerevisiae* MIT L-51 being obtained 150 mL of ethanol of 96 °G.L.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ante el previsible agotamiento de las reservas petroleras a nivel mundial y la necesidad impostergable de proteger el medio ambiente se ha hecho más urgente la sustitución de combustibles fósiles por biocombustibles o combustibles de fuente renovable. Como respuesta a esa tendencia, nace el interés por optimizar la producción del etanol como un carburante alternativo a los hidrocarburos de origen fósil. El uso del etanol como combustible es cada vez más importante a nivel internacional el mismo que puede producirse a partir de cultivos energéticos como caña de azúcar, maíz, soya, sorgo, cereales, oleaginosas, etc. (Ministerio de Agricultura, 2005), pero la tecnología más desarrollada es a partir de la caña de azúcar, logrando costos de proceso muy bajos. Brasil es el país que más ha desarrollado dicha tecnología (Asociación de Combustibles Renovables de Centroamérica, 2004).

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

tamaño y forma molecular. Con la hidrólisis de la *amilosa* se obtiene la maltosa como único disacárido y la glucosa como único monosacárido (Mathews y Van Holde, 1998).

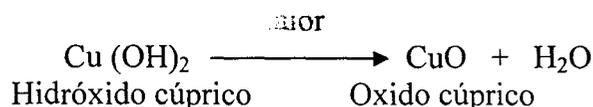
El almidón hidrolizado es materia prima de uso inmediato en procesos alimenticios, dulces naturales, detergentes, papel y alimentación animal y de uso posterior para la producción de etanol como energía renovable. Se han realizado varios estudios sobre la transformación del almidón por hidrólisis de diversas fuentes vegetales, y se reportó hidrólisis ácida de almidón de cáscara de banano, obteniéndose un jarabe de 20 g glucosa/L de hidrolizado como máxima concentración (Monsalve y cols., 2006).

En la actualidad, los procesos más utilizados, aunque no tan rentables para la obtención de etanol a partir de almidón, son los que realizan una hidrólisis previa para transformar el almidón a glucosa y posteriormente fermentar estos con *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de etanol. Se ha intentado, con resultados prometedores eliminar el paso de sacarificación y licuefacción enzimática mediante el empleo de un cultivo simbiótico de organismos amilolíticos y fermentadores de azúcares, disminuyendo así, los tiempos de producción (Gutiérrez y cols., 2003).

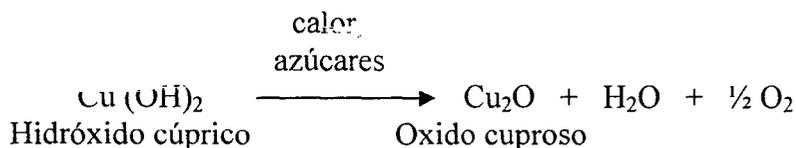
Para la degradación del almidón, el inconveniente principal del método de hidrólisis enzimático radica en la pureza de los concentrados enzimáticos, lo cual eleva los costos que genera la extracción de la enzima (Wissemann, 1986). Frente a esta situación, en los últimos tiempos han surgido diversas propuestas para desdoblar el almidón en azúcares simples por métodos no convencionales. Una de las vías más prometedoras para incrementar la hidrólisis del almidón es la realizada por el *Aspergillus niger*, mediante fermentación anaeróbica (Gutiérrez y cols., 2003).

Los azúcares reductores son aquellos que en solución acuosa presentan o generan un grupo aldehído (-CHO) libre, siendo el más importante de ellos la glucosa que se encuentra en el jugo de frutas. El grupo de aldehído libre o potencialmente libre, en medio alcalino tiene la capacidad de reducir a ciertos metales como cobre, bismuto, fierro, plata, etc. Cuando una solución alcalina de hidróxido cúprico se calienta, se convierte en óxido cúprico insoluble de color negro (reacción I); pero si está presente un agente reductor (algunos azúcares) el hidróxido cúprico es reducido a óxido cuproso (cambia el estado de oxidación de cobre desde Cu^{2+} a Cu^{1+}) produciéndose un precipitado insoluble de color rojo ladrillo (reacción II) (Pearson, 1986).

Reacción I: En ausencia de agente reductor.



Reacción II: En presencia de un agente reductor (algunos azúcares).



El reactivo de Fehling es empleado para determinar azúcares reductores. Esta constituido por la mezcla en partes iguales de Fehling A y Fehling B. El Fehling A es una solución acuosa de CuSO_4 en agua y es de color celeste. El Fehling B es una solución acuosa de NaOH y tartrato de sodio y potasio, y es incolora. Cuando se mezclan ambas soluciones tiende a formarse un precipitado gelatinoso, pero la agitación lo disuelve y la solución adquiere un color azul añil. Este reactivo es un oxidante suave de aldehídos y el resultado positivo es cuando el color cambia al originarse un precipitado rojo ladrillo, empleando como indicador una solución de azul de metileno y se titula en caliente (Pearson, 1986).

Existen varias razones que originan la oportunidad de hidrolizar el almidón para la producción de etanol, entre ellas está la próxima escasez de combustibles fósiles a nivel mundial, elevación de los precios del petróleo, balanza comercial deficitaria de los hidrocarburos en el Perú, interés en reducir la contaminación ambiental, necesidad de reducir el contrabando y adulteración de alcoholes, desarrollo de proyectos agrícolas con impacto positivo en lo económico, social y ambiental e insuficientes fuentes energéticas (MINAG, 2005).

En Shinanomachi, a 200 kms al noroeste de Tokio, se producirá etanol a partir del arroz, que se conseguirá con ayuda de los granjeros locales que donarán la cantidad suficiente para que se lleve a cabo este proyecto que incluirá una población de 10000 productores de arroz. "Queremos presentar a las nuevas generaciones una nueva energía renovable que parta de fuentes locales", dijo Yasuo Igarashi, profesor de microbiología aplicada de la Universidad de Tokyo, que ha estado liderando durante tres años este proyecto. El profesor aseguró, que si el proyecto tiene éxito entre los productores de arroz locales, cada vez se irá expandiendo más por todo Japón, por lo que en un futuro, podremos ver que los coches japoneses funcionen con combustibles que no dañen el entorno" (Reuters, 2007).

Japón, el segundo consumidor de gasolina en todo el mundo, después de EE.UU., depende de la importación del crudo cuyo precio internacional es inestable. Además, con el protocolo de Kyoto, Japón necesita el uso de los biocombustibles para no rebasar los límites de CO₂. El equipo de Igarashi espera demostrar que los biocombustibles son más baratos (1 kg de arroz = 0,5 L de etanol) que la gasolina actual y lo demostrarán con las 10000 personas que probarán en un principio dicho

combustible. Además, este tipo de energía es renovable, y contrario al actual combustible, que acabará rechazándose, (Reuters, 2007).

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

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

Muchos hongos filamentosos están naturalmente adaptados al crecimiento sobre superficies. Los hongos requieren un contacto cercano con el sustrato debido a su nutrición heterótrofa, secreción de enzimas extracelulares, absorción de nutrientes a través de la pared celular y el crecimiento apical de sus hifas (Jones, 1994). Sin embargo, algunos sistemas de producción como la fermentación sumergida no considera

estos importantes aspectos de su fisiología. Algunos procesos utilizan hongos inmovilizados en distintos soportes sintéticos, y en el caso del *Aspergillus niger* se ha probado la inmovilización para la producción de ácidos orgánicos. Sin embargo, esta técnica de cultivo está principalmente enfocada hacia la obtención de ventajas operativas del proceso, como son la reutilización de biomasa, la facilidad para la recuperación del producto y también una mayor productividad. Esta última característica resulta importante para considerar que la forma de crecimiento de estos microorganismos es determinante en su comportamiento fisiológico (Anderson, 1983).

Existen reportes de sistemas semicontinuos en dos etapas: hidrólisis - fermentación para la producción de etanol a partir de almidón de papa usando simultáneamente *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*, con resultados comparables a los del clásico de monocultivo pero con tiempos de bioproducción inferiores. La hidrólisis del almidón y posterior fermentación produjo cantidades significativas de biomasa, azúcares simples, y enzimas como productos colaterales al etanol, (Callender y Barford, 1983).

El mayor y menor rendimiento promedio de glucosa en la etapa de hidrólisis del almidón de *Solanum genicalix* con *Aspergillus niger* CECT-2089 se logra con los biorreactores tipo tanque no agitado al 8 % y 10 % de concentración inicial de almidón, con valores promedio de 40,64 % y 27,90 % en tiempos promedio de 126,6 y 105 horas respectivamente (Gutiérrez y cols., 2003). El rendimiento de jarabe de glucosa obtenido por vía enzimática a partir de arroz ñelen, en términos de gramos de glucosa por cada 100 gramos de ñelen utilizado es de 65,79 % (Coronel y cols., 2003).

El etanol o alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) es un compuesto líquido, incoloro, inflamable y soluble en agua. Tiene innumerables aplicaciones: bebidas fermentadas para consumo humano como vinos, aguardiente, vodka, ron, brandy, etc.; en la industria se emplea en gran cantidad de procesos como: disolución de la nitrocelulosa, disolvente de colorantes en las industrias alimenticias y textil; disolvente de resinas; jabón, aceites, ceras, etc.; oxidación en la fabricación de ácido acético, vinagre, acetaldehído. Así también se puede mezclar con la gasolina, para mejorar sus propiedades, se recomienda una mezcla en proporción del 10 al 25 %, ya que se logra un índice de octano entre 70 y 75, mayor que el de la gasolina sin mezclar. Las mezclas de etanol-gasolina permiten aumentar la compresión en el motor, dan un funcionamiento más regular, su recalentamiento es menor y por tanto se puede utilizar a un mayor número de revoluciones (Monsalve y cols., 2006).

Teniendo en cuenta la información encontrada sobre la hidrólisis del almidón usando *Aspergillus niger*, adecuándolo mediante diferentes concentraciones, a través de una tecnología de fermentaciones a temperaturas medianas, el tiempo de producción y la creciente demanda de etanol, garantizó la importancia técnico-económico del presente trabajo de Tesis, el cual estuvo orientado a optimizar la hidrólisis de arroz ñielen por *Aspergillus niger* para usarlo como sustrato en la obtención de etanol.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Material Biológico

- Cepa de *Aspergillus niger* proveniente de la Universidad Nacional de Trujillo.
- Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* MIT L-51 proveniente de la Universidad Nacional de Trujillo.
- Arroz ñelen de la variedad capirona proveniente de molinos de las Provincias de Bagua y Utcubamba, Región Amazonas.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Reactivación de la cepa

La cepa se reactivó en agar dextrosa papa (PDA) (Beever y Bollard, 1970). Para preparar 400 mL se lavó, peló, cortó en trozos largos (tipo papas fritas) y pesó 100 g de papa blanca, se depositó en un vaso de precipitados de 600 mL, adicionándole 400 mL de agua destilada. Luego se sancochó obteniendo caldo de papa, posteriormente se filtro 400 mL de caldo, seguidamente se adicionó 8 g de agar y 8 g de glucosa, y se calentó para disolver el agar. Se sirvió en botellas planas y se les puso un tapón de algodón, después se esterilizó en autoclave a 121 °C x 15 minutos, se retiró las botellas y se las dejó inclinadas sobre la mesa para su gelificación y posterior siembra con cepas de *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* MIT L-51

La siembra del *Aspergillus niger* se realizó por el método de puntura (Fotografía 1), que consiste en sembrar en el centro de la placa mediante un punto en ambiente estéril. La siembra de *Saccharomyces cerevisiae* se realizó por el método de estrías (Fotografía 2), que consiste en realizar la siembra formando estrías sobre el PDA.

2.2.2. Tratamiento del sustrato

Se empleó arroz ñelen de los molinos de las Provincias de Bagua y Utcubamba, sometiéndose a una molienda y posterior tamizado (Tamiz “Tyler” número 70) a una humedad de 13 % (Escobar y cols., 1994), utilizándose concentraciones de 200, 300 y 400 g de ñelen/L de agua, hidratándose por 24 horas, posteriormente éste fue esterilizado en autoclave a 121 °C x 20 minutos, luego se determinó azúcares reductores iniciales según el método de Lane–Eynon (Escobar y cols., 1994).

2.2.3. Preparación del inóculo

La cepa de *Aspergillus niger* fue sembrada en el medio PDA y se incubó hasta esporulación durante 5 días a 30 °C. (Villena y Gutiérrez, 2003). Del desarrollo de este cultivo se cosecharon en condiciones estériles las esporas en medio mineral Czapek.

La suspensión de esporas de *Aspergillus niger* de cada botella se trasvasó a un matraz estéril (Fotografía 3), luego se realizó el conteo de esporas en el microscopio en cámara Neubauer (Fotografía 5), determinándose que contenía $9,8 \times 10^8$ esporas/mL, el que fue diluido hasta obtener suspensiones de 10^5 , 10^6 y 10^7 esporas/mL que son los inóculos deseados.

Se sembró *Saccharomyces cerevisiae* MIT L-51 en botellas planas con medio PDA y se incubó por 24 horas a 30 °C. De cada botella se suspendió las células en medio mineral Czapek y se trasvasaron a un matraz estéril, donde se tuvo una concentración de $6,4 \times 10^8$ células/mL de medio (Fotografía 4).

2.2.4. Optimización con el diseño estadístico de Box-Behnken

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

Tabla 1: Rango de valor de las variables a optimizar con el diseño estadístico de Box-Behnken

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

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

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

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

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

2.2.5. Acondicionamiento de los biorreactores para hidrólisis del almidón

Se emplearon 15 biorreactores de vidrio de 0,5 L de capacidad; con 21 cm de altura y 6 cm de diámetro, previamente desinfectados por agua caliente (70 °C por 30 minutos), se les adaptó una tapa de jebe microporoso con manguera de 5 mm de diámetro para salida de gases. Los biorreactores fueron incubados en bañomaria a una temperatura de 45 °C \pm 0,5 °C (Fotografía 6 y 7).

2.2.6. Proceso de hidrólisis del almidón

En cada biorreactor se adicionó 200 mL de caldo a las concentraciones de estudio (200, 300 y 400 g de ñelen/L), y esporas de *Aspergillus niger* (10^5 , 10^6 y 10^7 esporas/mL), según el diseño de Box-Behnken.

El proceso se realizó a un pH de 5,5 – 6,0 hidrolizándose por un lapso de 4, 5 y 6 días a una temperatura de 45 °C \pm 0,5 °C en bañomaria.

2.2.7. Contenido de azúcares reductores

Se utilizó la metodología de Lane-Eynon (Amaga y Altamirano, 1999) para determinar la cantidad de azúcares reductores.

Los carbohidratos cuyas moléculas contienen un grupo carbonilo libre, se denominan reductores. Se basa en que ciertos azúcares que presentan carácter reductor, reducen a las sales de cobre a óxido cuproso (Cu_2O) en solución alcalina y en presencia de una sal orgánica que lleva en su molécula radicales alcohólicos.

Su ecuación general es la siguiente:



2.2.7.1. Valoración del reactivo de Fehling

Se llenó la bureta de 50 mL con una solución de glucosa al 0,5 %, después se depositó en un matraz Erlenmeyer 5 mL de Fehling A y 5 mL de Fehling B, luego se agregó al matraz con reactivo de Fehling, 4 gotas de azul de metileno al 1 % y se calentó con un mechero de alcohol hasta ebullición. Enseguida se tituló en caliente el licor de Fehling con la solución de glucosa al 0,5 %. La ebullición se mantuvo durante toda la valoración. Se finalizó la valoración cuando el sulfato cúprico se redujo totalmente, lo cual se comprobó por el cambio de color azul a un precipitado rojo ladrillo, anotándose el volumen de gasto (C mL) de glucosa al 0,5 %.

2.2.7.2. Equivalencia en glucosa del reactivo de Fehling

Se determinó la equivalencia del Fehling A y B con el consumo de solución de glucosa (C mL) en la valoración:

Solución de glucosa al 0,5% equivale a decir 0,5 g de glucosa contenidos en 100 mL de solución.

$$\text{C mL solución glucosa consumidos} = \text{D g de glucosa}$$

Entonces:

10 mL de Fehling A y B = D g de glucosa

2.2.7.3. Determinación de azúcares reductores

Se llenó la bureta con el jugo hidrolizado filtrado. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se adicionó 5 mL de Fehling A y 5 mL de Fehling B, homogenizándose la solución, posteriormente se adicionó 4 gotas de azul de metileno al 1 % dando un color azul intenso. Se calentó el matraz que contiene el Fehling A y B hasta ebullición, se dejó caer de la bureta el jugo filtrado en goteo rápido, procurando mantener siempre la ebullición (Fotografía 8). Se finalizó la titulación cuando la solución de Fehling A y B cambió a color rojo ladrillo, anotándose el volumen del jugo gastado (Y mL) en la titulación.

Determinación de g glucosa/L:

$$\frac{D \text{ g glucos}}{10 \text{ mL Fehling}} \times \frac{10 \text{ mL Fehling}}{Y \text{ mL jugo consumido}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}}$$

$$= E \frac{\text{g glucos}}{\text{L}}$$

2.2.8. Determinación de las operaciones y parámetros de procedimiento

En la Figura 1 se presenta el diagrama de flujo para la hidrólisis de arroz ñelen y fermentación de este hidrolizado para obtener etanol.

2.2.8.1. Materia Prima

Se empleó arroz ñelen para hidrolizar su almidón y posterior obtención de etanol, el arroz ñelen es un subproducto de la industria molinera, que se encuentra desmenuzado y sin valor comercial.

2.2.8.2. Molienda

El arroz ñelen fue molido en forma mecánica, con un molino sinfín, con la finalidad de dar libertad a los granos de almidón y favorecer la hidratación, así como la de aumentar la superficie de contacto con el *Aspergillus niger*. Luego, se realizó un tamizado (tamiz “Tyler” número 70) para enseguida trabajar con este producto molido.

2.2.8.3. Hidratación

Con el fin de ablandar las partículas de almidón en el arroz ñelen molido, se puso a remojar en las proporciones de 200 , 300 y 400 g de ñelen/L de agua, según el diseño de Box-Behnken a temperatura ambiente (18-20 °C) durante 24 horas.

2.2.8.4. Cocción

De la etapa anterior se pasó el material hidratado al autoclave a una temperatura de 120 °C x 20 minutos, donde se logró la cocción y esterilización al mismo tiempo, quedando el producto en forma de engrudo o goma, determinándose los azúcares reductores iniciales antes de la inoculación con *Aspergillus niger*.

2.2.8.5. Hidrólisis

Después de obtenido el engrudo, en los biorreactores se adicionó esporas de *Aspergillus niger* a concentraciones de 10^5 , 10^6 , 10^7 esporas/mL, e incubados a una temperatura de 45 °C a un pH de 6,0, durante 4, 5 y 6 días según el diseño estadístico de Box-Benhken.

La acción del *Aspergillus niger* es desdoblar el almidón en azúcares directamente fermentables. como la glucosa, lo que viene a ser el punto central de la presente investigación.

2.2.8.6. Filtración

Una vez terminada la hidrólisis en diferentes días (4, 5 y 6 días) según el diseño de Box-Behnken se procedió a filtrar para separar el mosto de los sólidos insolubles (afrecho) y de las esporas de *Aspergillus niger*.

2.2.8.7. Fermentación alcohólica

Se usó el proceso directo de fermentación. Se utilizó como cuba de fermentación un depósito de plástico de 1,7 litros de capacidad de cuya tapa sale una manguera para escape de gas carbónico sumergida en un envase con agua. Para 1 litro de mosto se le adicionó 200 mg de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, y se le dejó fermentar 4 días a una temperatura de 30 °C, con un inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* MIT L-51 de $6,4 \times 10^8$ células/mL.

2.2.8.8. Destilación simple

Una vez obtenido el mosto fermentado, este fue llevado al equipo de destilación simple (Fotografía 9). La finalidad de esta operación fue separar la mayor cantidad de etanol que se encuentra en el mosto fermentado, para hacer luego la destilación fraccionada.

2.2.8.9. Destilación fraccionada

Una vez terminada la destilación simple, el destilado fue llevado a una destilación fraccionada (Fotografía 10) para obtener un producto de mayor grado alcohólico.

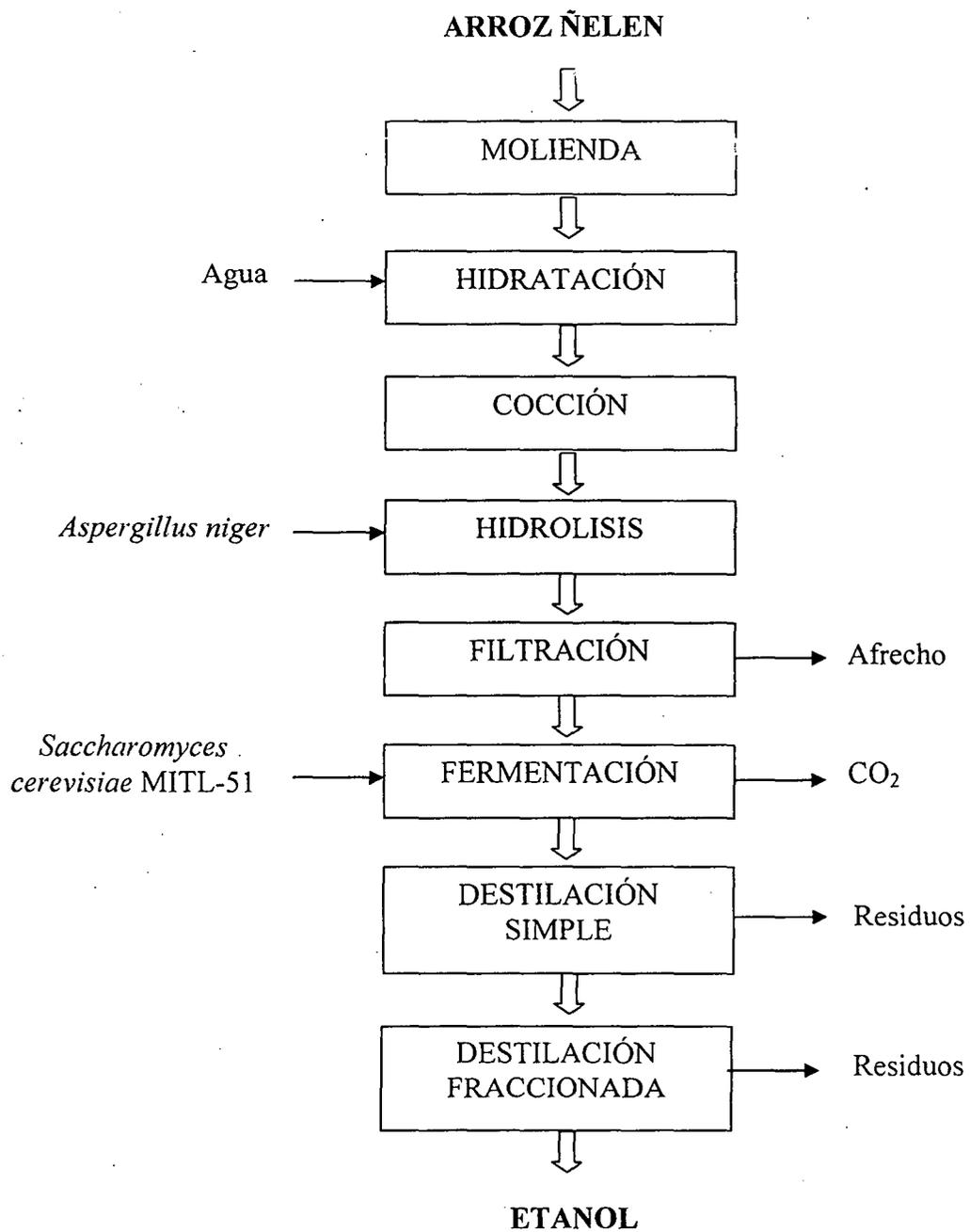


Figura 1: Diagrama de flujo

III. RESULTADOS

3.1. Optimización de la composición del medio de cultivo con el diseño de Box-Behnken

Las variables a optimizar fueron A: g de arroz ñelen/L de agua, B: esporas de *Aspergillus niger*/mL y C: tiempo de hidrólisis, cuyos valores se encuentran en la Tabla 1.

Se aplicó la distribución de la Tabla 2 y para cada combinación se evaluó la cantidad de azúcares reductores (AR) producidos en g/L, que se muestran en la Tabla 3, donde cada columna representó una variable independiente y cada fila un experimento.

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

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

Tabla 4: Azúcares reductores producidos por hidrólisis con *Aspergillus niger*

Experimento	AR iniciales g/L	AR finales g/L	AR producidos g/L
E1	3,3	83,3	80,0
E2	3,3	103,3	100,0
E3	3,5	41,8	38,3
E4	3,5	37,8	34,3
E5	3,3	62,0	58,7
E6	3,3	29,6	26,3
E7	3,5	67,8	64,3
E8	3,5	38,5	35,0
E9	4,0	64,5	60,5
E10	4,2	30,5	26,3
E11	4,0	68,3	64,3
E12	4,0	48,3	44,3
E13	4,0	48,3	44,3
E14	3,3	39,8	36,5
E15	3,5	36,4	32,9

3.2. Estimación de la máxima producción de azúcares reductores con el software estadístico Statgraphics plus 5.1. for Windows

Con los datos de la Tabla 3, se obtuvo la Tabla 5 cuyos valores fueron ingresados a la computadora para ser evaluados con el software estadístico Statgraphics 5.1 y calcular los coeficientes b_i de la siguiente ecuación polinomial cuadrática adaptada para tres variables:

$$Y = b_0 - b_1xA - b_2xB + b_3xC - b_4xAxB - b_5xAxC - b_6xBxC + b_7xA^2 + b_8xB^2 - b_9xC^2$$

Donde:

Y : AR/L

A, B y C : Variables independientes;

b_0 : Coeficiente de regresión al punto central

b_1, b_2 y b_3 : Coeficientes lineales

b_4, b_5 y b_6 : Coeficientes de interacción de segundo orden

b_7, b_8 y b_9 : Coeficientes cuadráticos

Los valores de dichos coeficientes se presentan en la Tabla 6.



Tabla 5: Valores de las variables independientes, para el cálculo de los coeficientes de la ecuación polinomial.

	A	B	C	AB	AC	BC	AXA	BXB	CXC	AR (g/L)
F1	400	1E+07	5	4E+09	2000	5E+07	160000	1E+14	25	80,0
F2	400	1E+05	6	4E+07	2400	6E+05	160000	1E+10	36	100,0
F3	200	1E+06	5	2E+08	1000	5E+06	40000	1E+12	25	38,3
F4	200	1E+07	4	2E+09	800	4E+07	40000	1E+14	16	34,3
F5	400	1E+06	5	4E+08	2000	5E+06	160000	1E+12	25	58,7
F6	400	1E+06	4	4E+08	1600	4E+06	160000	1E+12	16	26,3
F7	200	1E+05	6	2E+07	1200	6E+05	40000	1E+10	36	64,3
F8	200	1E+06	4	2E+08	800	4E+06	40000	1E+12	16	35,0
F9	300	1E+07	6	3E+09	1800	6E+07	90000	1E+14	36	60,5
F10	300	1E+07	5	3E+09	1500	5E+07	90000	1E+14	25	26,3
F11	300	1E+05	6	3E+07	1800	6E+05	90000	1E+10	36	64,3
F12	300	1E+05	4	3E+07	1200	4E+05	90000	1E+10	16	44,3
F13	300	1E+06	5	3E+08	1500	5E+06	90000	1E+12	25	44,3
F14	400	1E+07	6	4E+09	2400	6E+07	160000	1E+14	36	36,5
F15	200	1E+05	4	2E+07	800	4E+05	40000	1E+10	16	32,9

Tabla 6: Coeficientes (b_i) para la ecuación polinomial calculados con el Software Statgraphics 5.1.

Coeficiente	Valor
b_0	- 101,414
b_1	- 0,44591
b_2	- 0000147991
b_3	71,0763
b_4	- 1,09145E-9
b_5	- 0,0347713
b_6	- 0,00000135593
b_7	- 0,000609389
b_8	0,0
b_9	- 6,52224

Con los coeficientes presentados en la Tabla 6, completamos la ecuación polinomial y con el software Statgraphics 5.1 se calcularon los valores óptimos de cada una de las variables en estudio, los resultados se muestran en la Tabla 7.

La ecuación del modelo ajustado es

$$\begin{aligned}
 Y = & -101,414 - 0,44591xA - 0,0000147991xB + 71,0763xC - 1,09145 \times 10^{-9}xAxB \\
 & + 0,0347713xAxC - 0,00000135593xBxC + 0,000609389xA^2 + 0,0xB^2 \\
 & - 6,52224xC^2
 \end{aligned}$$

Tabla 7: Valores óptimos del proceso calculado con el Software Statgraphics 5.1.

Valor Optimo = 90,4955 g de AR/L

Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
A	200	400	400
B	100000	10000000	100000
C	4	6	6

Tabla 8: Análisis de la varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:A	105.654	1	105.654	0.25	0.6367
B:B	98.5654	1	98.5654	0.24	0.6480
C:C	66.3394	1	66.3394	0.16	0.7070
AA	65.048	1	65.048	0.16	0.7097
AB	0.759699	1	0.759699	0.00	0.9677
AC	60.5816	1	60.5816	0.14	0.7192
BB	273.707	1	273.707	0.65	0.4554
BC	112.733	1	112.733	0.27	0.6259
CC	54.8508	1	54.8508	0.13	0.7321
Error Total	2092.52	5	418.504		
Total (corr.)	6265.25	14			

$R^2 = 66,6012 \%$

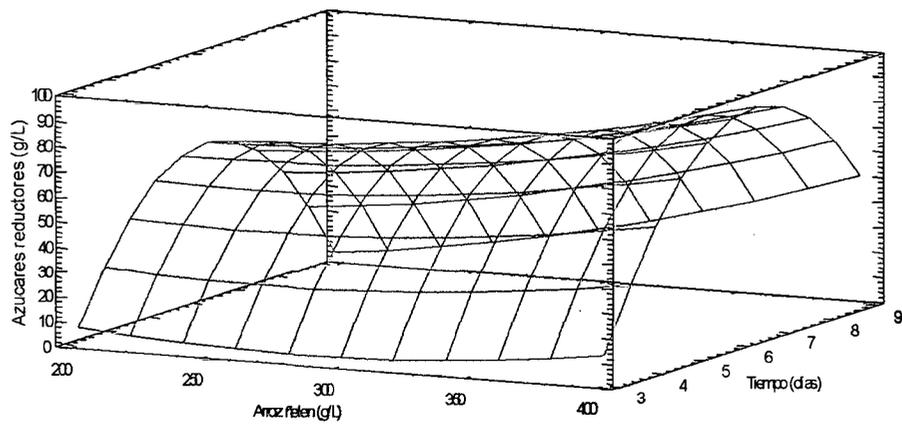


Figura 2: Gráfica de superficie de respuesta de azúcares reductores (g/L) en función g ñelen/L de agua – tiempo (10^5 esporas de *Aspergillus niger*/mL)

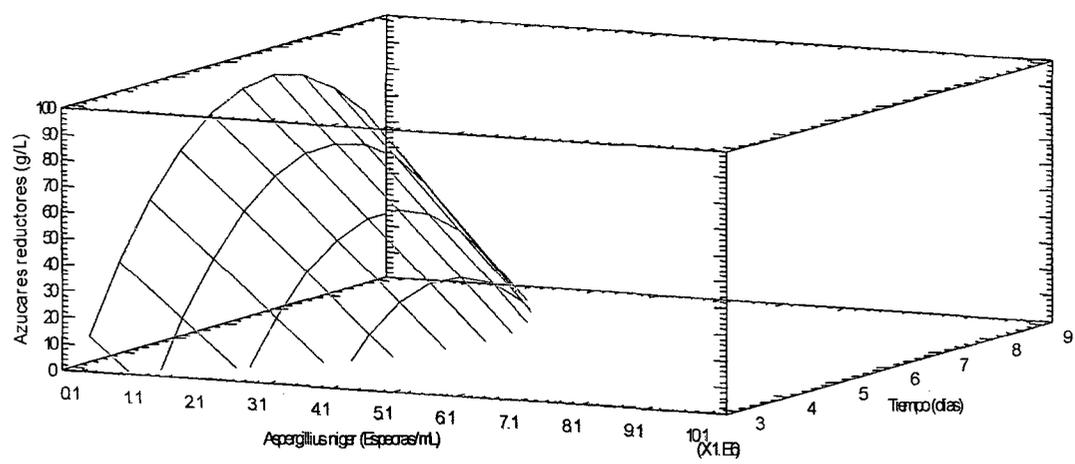


Figura 3: Gráfica de superficie de respuesta de azúcares reductores (g/L) en función tiempo - esporas de *Aspergillus niger*/mL (400 g ñelen/L de agua)

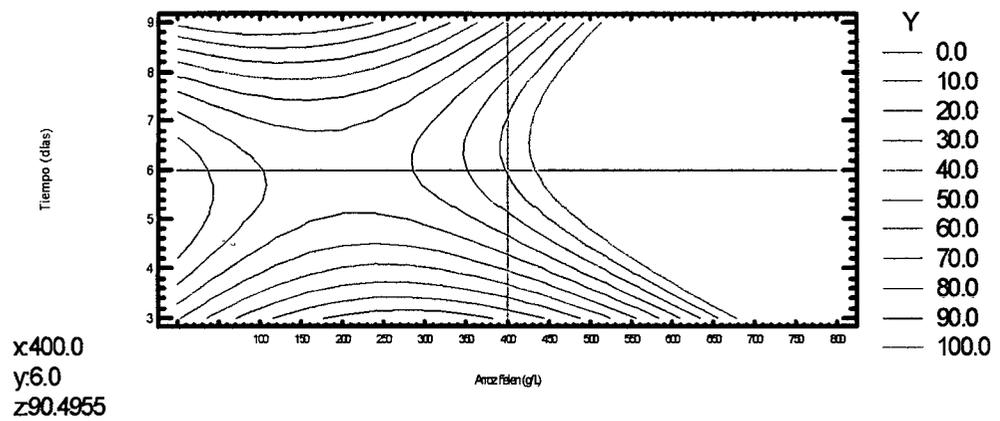


Figura 4: Gráfica de contornos de la respuesta estimada de azúcares reductores (g/L) en función tiempo - g ñelen/L de agua (10^5 esporas de *Aspergillus niger*/mL)

El tratamiento computarizado con el Software estadístico Statgraphics 5.1, de los resultados de aplicar el diseño de Box-Behnken, predicen que se puede lograr hidrolizar el almidón con el *Aspergillus niger* hasta un máximo de 90,4955 g de glucosa/L (Figuras 2, 3 y 4), empleando 400 g de ñelen/L de agua, inoculando 10^5 esporas de *Aspergillus niger*/mL y en un tiempo de 6 días.

3.3. Etanol obtenido en la destilación simple y fraccionada

A partir de 1000 g de arroz ñelen, y trabajando con los valores óptimos de las variables estudiadas se ha obtenido nuevamente una concentración de 100 g de AR/L, el que enseguida fue fermentado con *Saccharomyces cerevisiae* MIT L-51 para convertir los AR en etanol y CO₂, habiéndose obtenido 150 mL de etanol de 96 °G.L.

Tabla 9: Etanol producido a partir de 1000 g de ñelen

Variable	Destilación simple	Destilación fraccionada
Volumen (mL)	800	150
° G.L.	20	96

3.4. Propiedades físicas y químicas del etanol obtenido

El etanol obtenido tuvo las siguientes propiedades:

Olor	: Característico
Color	: Incoloro
Sabor	: Ardiente
Inflamable	: Si
pH	: 5,8
°GL a 18 °C	: 96
Densidad	: 0,8560 g/mL

IV. DISCUSIÓN

La optimización de los valores de las tres variables con el diseño de Box–Behnken permitieron obtener un máximo de 100 g de AR/L de hidrolizado (Tabla 3), con 400 g de ñelen/L de agua, 10^5 esporas de *Aspergillus niger*/mL y 6 días de fermentación. Una concentración de 400 g de ñelen/L de agua fue suficiente para asegurar el buen desarrollo del *Aspergillus niger*, demasiada agua disminuye la porosidad del sustrato, esto se argumenta en base a que con concentraciones menores de ñelen se ha obtenido menor cantidad de azúcares reductores; o sea, que la hidrólisis del ñelen ha sido menor.

Del análisis de los resultados mostrados en la Tabla 3, podemos deducir que la concentración de *Aspergillus niger* de 10^5 esporas/mL ha hidrolizado mejor en las tres concentraciones de ñelen, produciendo un máximo de AR cuando la concentración fue de 400 g de ñelen/L de agua. Por tanto, 10^5 esporas de *Aspergillus niger*/mL será una concentración óptima para producir el máximo de AR, con cada concentración de ñelen que se emplee. Es posible que concentraciones mayores de *Aspergillus niger* causen inhibición en su desarrollo, lo cual se refleja en la menor cantidad de AR producidos.

La máxima producción de AR a los 4 días ha sido 44,3 g/L, a los 5 días 80 g/L y a los 6 días 100 g/L, por lo que podemos mencionar que mientras más tiempo este en contacto el *Aspergillus niger* con el ñelen, a la concentración promedio de 10^5 esporas/mL, producirá mayor cantidad de AR.

El tratamiento de los resultados experimentales de la Tabla 3, con el Software Statgraphics 5.1; permite predecir que se obtendrá un máximo de 90,4955 g AR/L;

cuando se utilice 400 g de ñelen/L de agua, 10^5 esporas de *Aspergillus niger*/mL y 6 días de fermentación (Figura 2, 3 y 4). Este valor es 10 % menor al obtenido experimentalmente a las mismas condiciones. Por tanto, nuestros resultados experimentales son satisfactorios.

Investigadores lograron hidrolizar el 40,64 % de almidón de *Solanum genicalix* con la cepa de *Aspergillus niger* CECT-2089 a un recuento entre $10^5 - 10^7$ esporas/mL en un biorreactor con concentración inicial de almidón de 8 %, en un tiempo promedio de 126,6 horas (Gutiérrez y cols, 2003). El valor de 35,6 % de almidón de arroz ñelen hidrolizado en 6 días es inferior, lo cual puede deberse a que ellos emplearon una cepa plenamente identificada y con la garantía de la Colección Española de Cultivos Tipo, que quizá era muy eficiente para hidrolizar almidón. En este trabajo de investigación se ha empleado un cultivo puro procedente de la Universidad Nacional de Trujillo que era el único disponible, no teniendo datos sobre su eficiencia para hidrolizar almidón.

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

V. CONCLUSIONES

- Las condiciones óptimas para la hidrólisis del arroz ñelen fueron las siguientes: 400 g de ñelen/L de agua, 10^5 esporas de *Aspergillus niger*/mL de medio y durante un tiempo de 6 días, considerando que el arroz ñelen fue molido, hidratado por 24 horas y esterilizado en autoclave a 121 °C por 20 minutos.
- Se obtuvo etanol del arroz ñelen en una proporción de 1 Kg de arroz ñelen = 150 mL de etanol de 96 °G.L., dando una alternativa agroindustrial nueva para los agricultores de Bagua y Utcubamba, de la Región Amazonas.

VI. RECOMENDACIONES

- Es necesario hacer trabajos a escala planta piloto, teniendo en cuenta el valor óptimo de la concentración de ñelen de arroz, esporas de *Aspergillus niger* y el tiempo de hidrólisis obtenidos, a fin de obtener su máximo rendimiento para estimar indicadores económicos del bioproceso.
- Realizar un estudio de otras variables, para evaluar su grado de influencia en la hidrólisis del almidón y en el posible mayor rendimiento de etanol a partir de arroz ñelen.
- Aplicar este bioproceso como una alternativa para producir combustibles para motores que permitan reducir la contaminación ambiental, ya que provendrían de fuentes renovables, similar a lo que ocurre con el etanol producido a partir de caña de azúcar.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

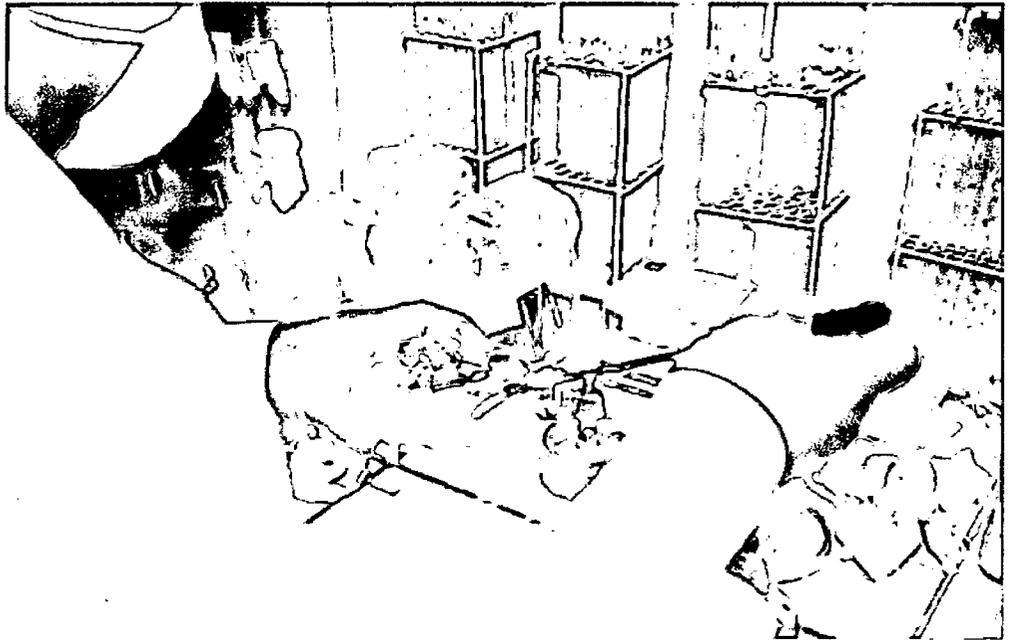
- Amaga W. y Altamirano L. 1999. Obtención de alcohol etílico utilizando pulpa de algarroba (*Ceratonia Siliqua* L.). Tesis para optar el Título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de Trujillo.
- Anderson, J. G. 1983. Immobilized cell and film reactor systems for filamentous fungi. The Filamentous Fungi, Volume 4, Chapter 6 (J. E. Smith, D.R. Berry, B. Kristiansen, eds.). E. Arnold, London.
- Asociación de Combustibles Renovables de Centroamérica. 2004. Programa de Oxigenación de Combustibles Carburantes.
- Beaver, R. E. y Bollard, E. G. 1970. The nature of the simulation of fungal growth by patata extract. – J. Gen. Microbiol, 60; 273-279.
- Callender, I. J. y Barford, J. P. 1983. Biotechnol Letters. USA.
- Coronel P., Mendoza W., Castillo L y Bazan L. 2003. Obtención de jarabe de glucosa por el método enzimático a partir de fielen de arroz (*Oriza sativa* L). VI CONACYTA. Arequipa. Perú.
- Escobar R., Ñique A. y Ulloa S. 1994. Obtención de etanol a partir de arroz. Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
- Greasham, R. & Inamine, E. 1989. Nutritional Improvement of Processes. In Manual of Industrial Microbiolgy and Biotechnology, ed. N. Solomon & A Demain, American Society for Microbiology. Washington DC, USA.

- Gutiérrez M., Vásquez V. y Paredes J. 2003. Producción de etanol a partir de tres concentraciones de almidón de *Solanum genicalix* hidrolizados con *Aspergillus niger* CECT-2089 y fermentado con *Saccharomyces cerevisiae* CECT-1319. VI CONACYTA. Arequipa. Perú.
- Jones, J. B. G. (1994). Fungal adhesion. *Mycological Research* 98: 961-981.
- Mathews C. K. y Van Holde, K. E. 1998. *Bioquímica*, McGraw Hill Interamericana, 2ª. Edición. España.
- MINAG, 2005. Estudio de Competitividad del etanol.
- Monsalve, J., Medina, V. y Ruiz, A. 2006. Producción de etanol a partir de cáscara de banano y de almidón de yuca. Universidad Nacional de Colombia. Volumen 73. Medellín – Colombia.
- Pearson, D. 1986. *Técnicas de laboratorio para análisis de alimentos*. Editorial Acribia. España.
- Reuters. El sake será el combustible del futuro
 Disponible en <http://www.biocombustibles/sake.com.ja>
 Publicado el 14.05.2007- 11:49h
 Acceso: 25/08/2007
- Villena G. y Gutiérrez M. 2003. Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. Laboratorio de Micología y Biotecnología, Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.
- Wisseman A. 1986. *Principios de biotecnología*. Editorial Acribia. España

ANEXOS

SECUENCIA DE FOTOGRAFÍAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

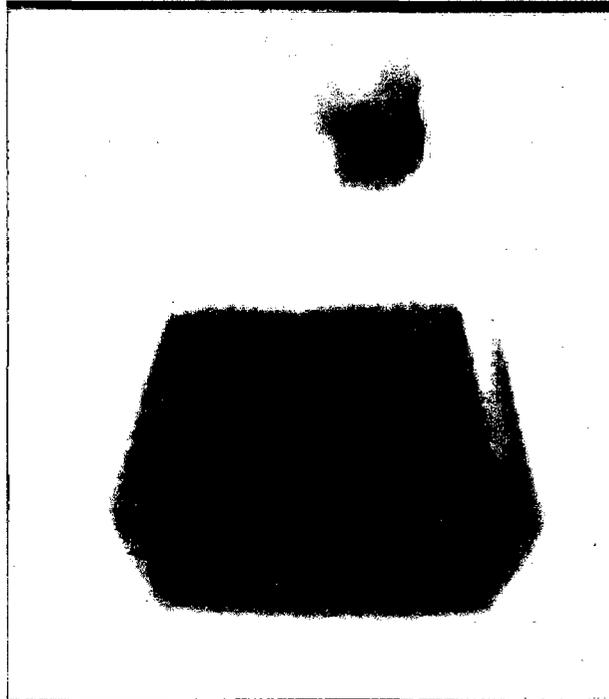
Fotografía 1: Siembra de *Aspergillus niger*



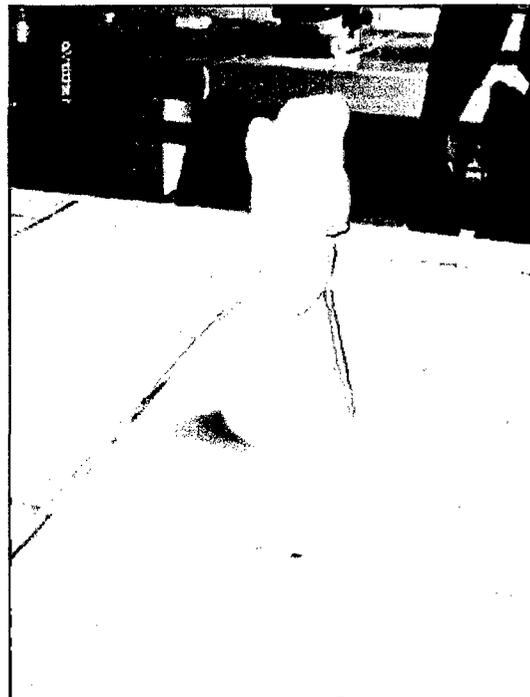
Fotografía 2: Siembra de *Saccharomyces cerevisiae*



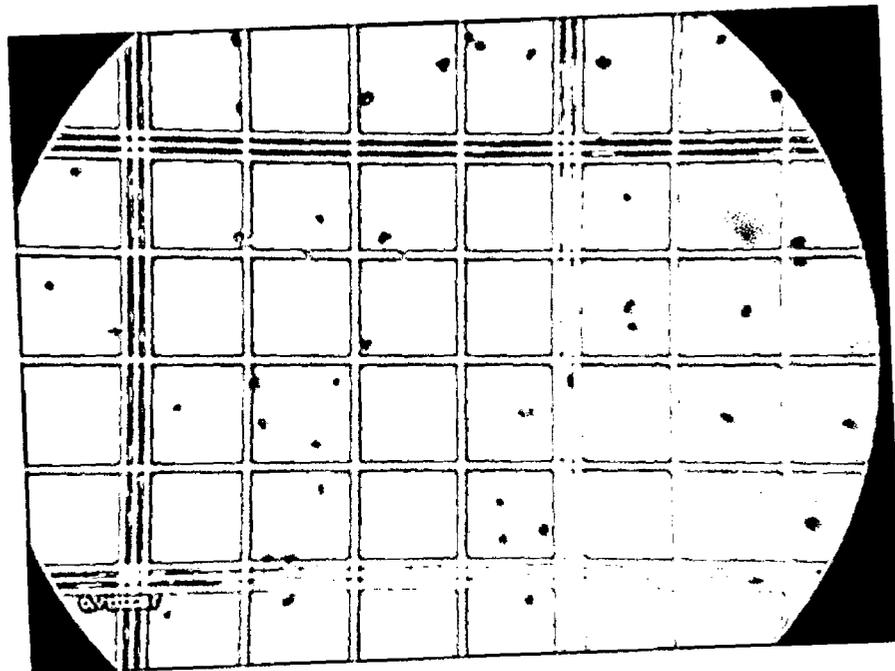
Fotografía 3: Suspensión de esporas de *Aspergillus niger* en medio mineral



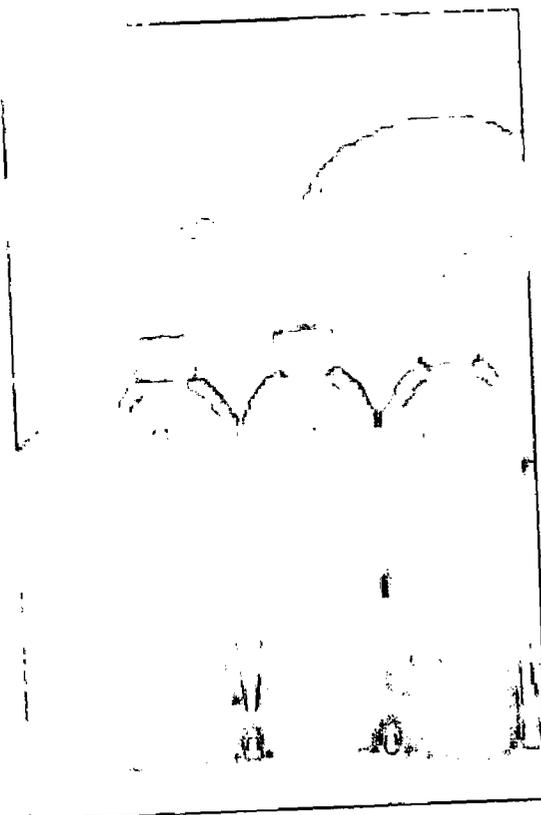
Fotografía 4: Suspensión de células de *Saccharomyces cerevisiae* en medio mineral



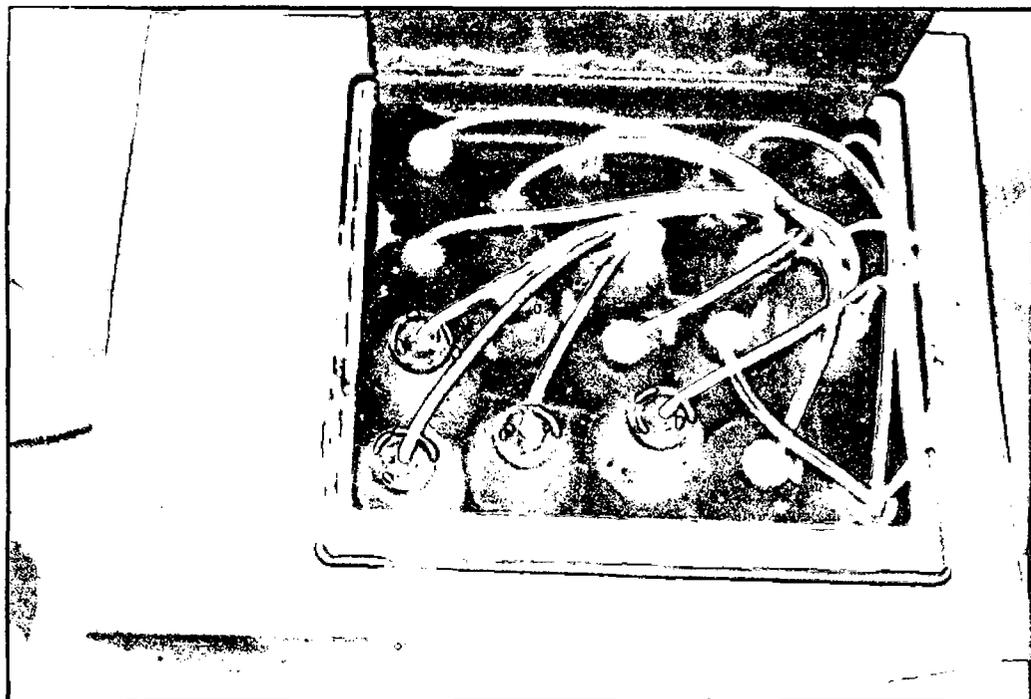
Fotografía 5: Conteo de esporas de *Aspergillus niger* en cámara Neubauer



Fotografía 6: Biorreactores empleados para hidrolizar arroz fielen



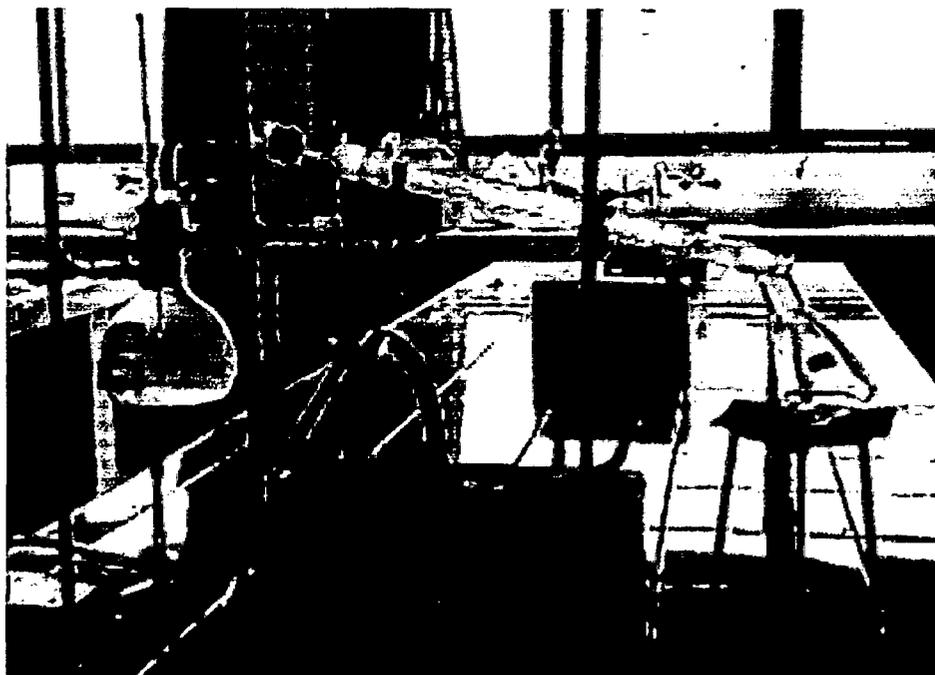
Fotografía 7: Biorreactores en bañomaria para favorecer la hidrólisis del arroz ñelen



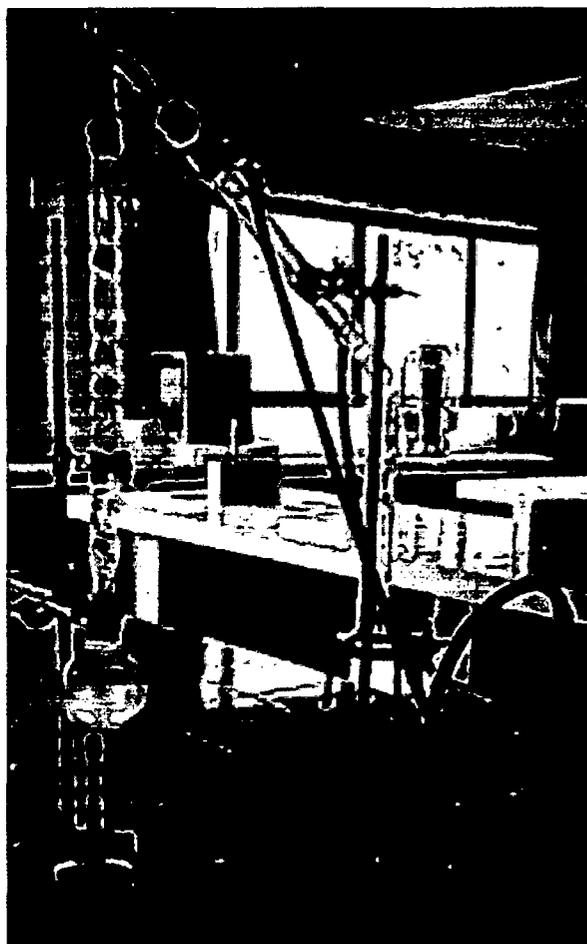
Fotografía 8: Determinación de azúcares reductores por el método de Lane-Eynon



Fotografía 9: Destilación simple del mosto fermentado



Fotografía 10: Destilación fraccionada



Conteo de esporas de *Aspergillus niger* en cámara Neubauer

Volumen de cámara Neubauer : 0,00025 cm³ = 0,00025 mL

Número de esporas de *Aspergillus niger* : 49 en 5 cuadrillos; dilución 10⁻²

49 x 5 = 245 esporas en los 25 cuadrillos de la cámara Neubauer

$$\frac{245 \text{ esporas}}{0,00025 \text{ mL}} \times \frac{1}{D} =$$

$$\frac{245 \text{ esporas}}{0,00025 \text{ mL}} \times \frac{1}{10^{-2}} =$$

9,8 x 10⁸ esporas/mL

**Diluciones de la suspensión de esporas de *Aspergillus niger* para obtener los
diferentes inóculos**

Original: $9,8 \times 10^8$ esporas/mL

Muestra: 200 mL (ñelen + agua)

Para 10^5

$$10^5 \text{ esporas/mL} \times 200 \text{ mL} = 2 \times 10^7 \text{ esporas}$$

Diluir el original a 10^{-1} : 1 mL del original en 9 mL de agua destilada estéril

Se tomó 0,21 mL de la dilución $10^{-1} = 2 \times 10^7$ esporas/mL

Para 10^6

$$10^6 \text{ esporas/mL} \times 200 \text{ mL} = 2 \times 10^8 \text{ esporas}$$

Se tomó 0,21 mL del original

Para 10^7

$$10^7 \text{ esporas/mL} \times 200 \text{ mL} = 2 \times 10^9 \text{ esporas}$$

Se tomó 2 mL del original

Valoración del Fehling

En 10 mL de Fehling se gastó 8,65 mL de glucosa al 0,5 % p/v

$$\frac{0,5 \text{ g glucos}}{100 \text{ mL solución de glucosa}} \times 8,65 \text{ mL de solución de glucosa}$$

0,043 g glucosa

Entonces:

En 10 mL de Fehling existe 0,043 g glucosa

Porcentaje de almidón hidrolizado

Muestra	: 400 g de arroz ñelen
Porcentaje de almidón en arroz ñelen	: 70,13 % (Escobar y cols., 1994)
Peso aproximado de almidón	: 400 g de arroz ñelen (0.7013) 280,52 g de almidón
Peso de azúcar reductor en muestra	: 100 g de glucosa
% de almidón hidrolizado	: $\frac{100}{280,52} \times 100$: 35,7 %

Composición del medio mineral Czapek

NaNO_3	:0,3 g/100 mL
K_2HPO_4	:0,1 g/100 mL
MgSO_4	:0,05 g/100 mL
FeSO_4	:0,001 g/100 mL

Preparación de Reactivo de Fehling

Preparación de Fehling "A"

Sulfato cúprico (CuSO_4)	34,65 g
Agua destilada	1 L

Preparación de Fehling "B"

Tartrato de sodio y potasio	34,65 g
Hidróxido de sodio	50,00 g
Agua destilada	1 L