

Ethanol production from *Oxalis tuberosa* starch: study of enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation

Anshela Rafael-Ayala, Ing.¹; Ricardo Vejarano, Dr.^{2*}

¹ Ingeniería Agroindustrial. Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Peru.

² Dirección de Investigación, Innovación y Responsabilidad Social. Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Peru.
ricardo.vejarano@upn.edu.pe

Abstract– *Andean tubers are an important source of starch. Although potatoes, sweet potatoes or cassava are the best known, there are other underutilised tubers such as oca, olluco, arracacha, mashua, among others. The aim of the study was to evaluate the potential use of oca starch (Oxalis tuberosa) to obtain ethanol, studying the optimal conditions of enzymatic hydrolysis of starch and subsequent alcoholic fermentation. An initial screening using a Plackett-Burman design to identify the independent variables with the highest impact on the hydrolytic process was applied. Subsequently, the identified variables were used in a Rotational Central Composite Design (CRDC) to determine the optimal values of these variables in the hydrolytic process. Among the main results, the concentration of the enzymes had a significant impact on the hydrolytic process, achieving a conversion of up to 93% in the starch hydrolysis to dextrins (liquefaction) at an optimal α -amylase concentration of 0.41%, as well as the subsequent hydrolysis of those dextrins into fermentable sugars (saccharification) at rates greater than 93% at an optimal glucoamylase concentration of 0.75%. In the alcoholic fermentation stage, a Conversion Efficiency of fermentable sugars into ethanol of 89% was obtained using yeast extract as N-source for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Based on the results, for every 1000 kg of oca, up to 30 L of ethanol could be produced, which can later be used for different purposes such as the production of alcoholic beverages, biofuel, medicinal use, among other applications.*

Keywords- *Oca starch, enzymatic hydrolysis, nitrogen source, alcoholic fermentation, ethanol.*

Digital Object Identifier: (only for full papers, inserted by LACCEI).
ISSN, ISBN: (to be inserted by LACCEI).
DO NOT REMOVE

Ethanol production from *Oxalis tuberosa* starch: study of enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation

Producción de etanol a partir de almidón de *Oxalis tuberosa*: estudio de la hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica

Anshela Rafael-Ayala, Ing.¹; Ricardo Vejarano, Dr.^{2*}

¹ Ingeniería Agroindustrial. Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Peru.

² Dirección de Investigación, Innovación y Responsabilidad Social. Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Peru.
ricardo.vejarano@upn.edu.pe

Abstract– Andean tubers are an important source of starch. Although potatoes, sweet potatoes or cassava are the best known, there are other underutilised tubers such as oca, olluco, arracacha, mashua, among others. The aim of the study was to evaluate the potential use of oca starch (*Oxalis tuberosa*) to obtain ethanol, studying the optimal conditions of enzymatic hydrolysis of starch and subsequent alcoholic fermentation. An initial screening using a Plackett-Burman design to identify the independent variables with the highest impact on the hydrolytic process was applied. Subsequently, the identified variables were used in a Rotational Central Composite Design (CRDC) to determine the optimal values of these variables in the hydrolytic process. Among the main results, the concentration of the enzymes had a significant impact on the hydrolytic process, achieving a conversion of up to 93% in the starch hydrolysis to dextrins (liquefaction) at an optimal α -amylase concentration of 0.41%, as well as the subsequent hydrolysis of those dextrins into fermentable sugars (saccharification) at rates greater than 93% at an optimal glucoamylase concentration of 0.75%. In the alcoholic fermentation stage, a Conversion Efficiency of fermentable sugars into ethanol of 89% was obtained using yeast extract as N-source for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Based on the results, for every 1000 kg of oca, up to 30 L of ethanol could be produced, which can later be used for different purposes such as the production of alcoholic beverages, biofuel, medicinal use, among other applications.

Keywords- Oca starch, enzymatic hydrolysis, nitrogen source, alcoholic fermentation, ethanol.

Resumen– Los tubérculos andinos constituyen una importante fuente de almidón. Si bien los más conocidos son la papa, camote o

Digital Object Identifier: (only for full papers, inserted by LACCEI).
ISSN, ISBN: (to be inserted by LACCEI).
DO NOT REMOVE

yuca, existen otros tubérculos como la oca, olluco, arracacha,

mashua, entre otros, que son menos comercializados, sin ser aprovechados en aplicaciones que permitan darles un mayor valor agregado. El objetivo del estudio fue evaluar el potencial aprovechamiento del almidón de oca (*Oxalis tuberosa*), para la obtención de etanol, estudiando las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática del almidón y posterior fermentación alcohólica. Se aplicó un screening inicial mediante un diseño Plackett-Burman para identificar las variables independientes con mayor impacto en el proceso hidrolítico, y posteriormente, las variables identificadas fueron utilizadas en un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) para determinar los valores óptimos de dichas variables. Entre los principales resultados, la concentración de las enzimas tuvo impacto significativo sobre el proceso hidrolítico, permitiendo obtener una conversión de hasta 93% en la hidrólisis del almidón en dextrinas (licuefacción) a una concentración óptima de enzima α -amilasa de 0.41%, así como la posterior hidrólisis de esas dextrinas en azúcares fermentables (sacarificación) a tasas superiores al 93% a una concentración óptima de enzima glucoamilasa de 0.75%. En la etapa de fermentación alcohólica se obtuvo una Eficiencia de conversión de azúcares en etanol del 89%, utilizando extracto de levadura como fuente de N para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. De acuerdo con los resultados, por cada 1000 kg de oca se podría producir hasta 30 L de etanol, el cual puede ser utilizado posteriormente con diferentes fines, como la elaboración de bebidas alcohólicas, biocombustible, uso medicinal, entre otras aplicaciones.

Palabras clave- Almidón de oca, hidrólisis enzimática, fuente de nitrógeno, fermentación alcohólica, etanol.

I. INTRODUCCIÓN

El almidón es históricamente utilizado como una fuente alimenticia, siendo las fuentes más comunes el maíz, trigo, papa, o yuca. Entre las aplicaciones principales del almidón se

incluyen como aglutinante, adsorbente, floculante, retardante de llama, emulsionante [1]. Otras aplicaciones incluyen su uso para elaborar edulcorantes [2], envases biodegradables [3], [4], obtención de bioetanol [5], entre otros usos.

De las diferentes materias primas para obtener almidón en Perú, es considerable la producción de especies nativas que son consumidas principalmente por las poblaciones rurales alejadas a donde se producen, sin ser aprovechados para aplicaciones a gran escala que permitan darles un mayor valor agregado. Una de esas fuentes de almidón es la oca (*Oxalis tuberosa*), cuya producción nacional durante el año 2021 fue de 96 mil toneladas, mientras que en el año 2022 alcanzó 107 mil toneladas [6]. La oca es un tubérculo de textura harinosa y ligero sabor dulce con un contenido de almidón de hasta 79% b.s. [7]. Este almidón se caracteriza por presentar contenidos de amilosa y de amilopectina de hasta 30% y 77% [7], [8], los cuales son susceptibles de ser hidrolizados en azúcares simples en presencia de enzimas amilasas. Estos azúcares simples pueden ser usados posteriormente como fuente de carbono en procesos fermentativos para la obtención de etanol.

En tal sentido, el objetivo de la investigación fue evaluar el potencial aprovechamiento del almidón de oca (*O. tuberosa*), para la obtención de etanol, estudiando las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática del almidón en azúcares fermentables en presencia de las enzimas α -amilasa y glucoamilasa, así como la posterior fermentación alcohólica, evaluando la más adecuada fuente de nitrógeno que permita el mayor rendimiento fermentativo, es decir la máxima conversión de azúcares fermentables en etanol, por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1. Hidrólisis enzimática del almidón

La hidrólisis enzimática es el proceso de descomposición o desdoblamiento de polisacáridos, como el almidón, mediante catalizadores biológicos o enzimas. Durante este proceso, las estructuras constituyentes del almidón (amilosa y amilopectina, Figura 1) requieren de diferentes enzimas amilolíticas para su hidrólisis hasta mono- y disacáridos (azúcares fermentables). Estas enzimas amilolíticas incluyen la α -amilasa, que descompone los enlaces α -1,4-D-glucosídicos entre las unidades de glucosa adyacentes en la cadena lineal de amilosa, mientras que la β -amilasa corta los extremos no reductores de amilosa y amilopectina. Por su parte, la glucoamilasa (o amiloglicosidasa) hidroliza los enlaces α -1,4 en los extremos no reductores del almidón y los enlaces α -1,6 en los puntos de ramificación de la amilopectina, aunque a una tasa inferior a los enlaces α -1,4, generando glucosa [9].

La hidrólisis del almidón se realiza en dos etapas, siendo la primera la conversión del almidón en dextrinas, etapa conocida como licuefacción. Este proceso se lleva a cabo principalmente en presencia de la enzima α -amilasa, siendo determinantes parámetros como la temperatura, proporción de enzima/sustrato, tiempo, pH. Las dextrinas obtenidas en esta etapa posteriormente pueden ser convertidas en azúcares

menores, siendo los mono- y disacáridos (azúcares fermentables) los productos más deseados. Esta etapa se conoce como sacarificación, y es llevada a cabo en presencia de la enzima glucoamilasa [10], [11], [12].

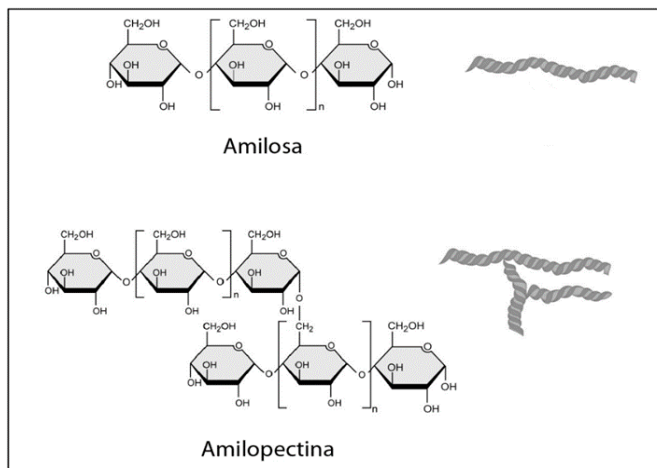
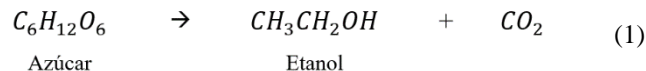


Fig. 1 Estructura química de la amilosa y amilopectina constituyentes del almidón. Adaptado de Alarcón y Arroyo [13].

Los azúcares fermentables obtenidos tras la hidrólisis del almidón pueden ser utilizados para la elaboración de diversos derivados, por ejemplo, para la fabricación de jarabes de glucosa y fructosa, así como sustratos para la síntesis de etanol mediante fermentación alcohólica [5], [10].

1.2. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso biológico que tiene como objetivo proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos implicados, principalmente levaduras, que metabolizan los azúcares para obtener la energía necesaria para sus funciones biológicas, generando etanol, dióxido de carbono (CO_2) y otros metabolitos [14]. En la industria alimentaria, este proceso se aprovecha para la elaboración de productos fermentados como pan, cerveza, vino, destilados, entre otros. La ecuación (1) permite expresar esta transformación desde una perspectiva química.



A nivel industrial, la levadura más utilizada es *S. cerevisiae*, la cual ha mostrado buen rendimiento fermentativo [15], es decir alta capacidad para finalizar el proceso fermentativo y convertir todos los azúcares fermentables, además de su tolerancia al etanol y su capacidad para adaptarse a diversas condiciones [16], [17].

El etanol obtenido a partir del proceso fermentativo llevado a cabo con la levadura *S. cerevisiae* puede ser destinado a diferentes aplicaciones.

a. Etanol como constituyente de bebidas alcohólicas

El etanol obtenido puede ser utilizado como constituyente de bebidas alcohólicas destiladas, por ejemplo, vodka, un destilado muy popular en diversos países, y que a diferencia de otros destilados no es sometido a procesos de añejamiento ni tampoco se caracteriza por una importante presencia de compuestos aromáticos, es decir que se considera como una bebida destilada neutra, donde la pureza etanólica es más importante [18], alcanzando un grado alcohólico de hasta 45 % v/v.

La producción de vodka a partir de materias primas amiláceas, por ejemplo, tubérculos nativos como la oca, puede ser una interesante alternativa de estudio y desarrollo a nivel industrial, con el fin de darle un mayor valor agregado a este tubérculo.

b. Etanol como biocombustible

Los biocombustibles constituyen fuentes de energía renovable generadas por organismos vivos, también conocidos como “biomasa”. A nivel industrial el etanol, o bioetanol, puede ser producido a partir de procesos productivos como los de primera generación, a partir de almidones y azúcares presentes en diversos vegetales, utilizando tecnologías convencionales como la hidrólisis del almidón y fermentación alcohólica. En la actualidad, Estados Unidos y Brasil producen más del 80% del bioetanol utilizado como combustible en el mundo [19].

La combinación de bioetanol con gasolina produce un biocombustible de alta energía, gasohol, con propiedades similares a la gasolina pura, pero con significativa reducción de emisiones contaminantes, es decir, es una mezcla amigable con el ambiente, ya que las emisiones de CO₂ se reciclan durante la fotosíntesis en las plantas, reduciendo así las emisiones de gases de efecto invernadero en aproximadamente un 12% [20].

II. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología y resultados reportados en el presente artículo se basan en el trabajo de tesis titulado “Optimización de la hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica para la obtención de etanol a partir de almidón de oca (*Oxalis tuberosa*)” de la Universidad Privada del Norte [21].

2.1. Extracción del almidón de oca

La oca (*O. tuberosa*), utilizada como materia prima, tuvo procedencia de Carabamba (provincia de Julcán, región La Libertad). La extracción del almidón se realizó considerando la metodología propuesta por Novelo-Cen & Betancur-Ancona [22]. Los tubérculos fueron pelados y cortados en cubos de 3 cm, para luego ser triturados durante 5 minutos. La masa resultante se suspendió en una solución de bisulfito de sodio de 1500 ppm obteniendo una lechada, la cual se filtró para separar

la fibra, después fue sometida tres veces a licuado para extraer la máxima cantidad posible de almidón. El filtrado se dejó sedimentar a 4 °C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, el líquido sobrenadante se eliminó y el sedimento de almidón se lavó con agua destilada y se dejó sedimentar nuevamente a 4 °C por 24 horas, repitiendo estos pasos tres veces. El almidón obtenido se secó en una estufa a 40 °C durante 48 horas, pasadas las 48 horas el almidón paso a molienda, y finalmente se almaceno en frascos con cierre de tapa hermética para su posterior uso.

2.2. Hidrólisis enzimática del almidón de oca

a. Licuefacción

Esta etapa se realizó mediante la adaptación de metodologías reportadas en trabajos previos [10], [11], [12] utilizando una enzima α -amilasa (Song Yuan Feng, China), encargada de hidrolizar el almidón en dextrinas.

Primero se aplicó un *screening* (o barrido) mediante un diseño factorial fraccionario Plackett-Burman (software Protimiza Experiment Design, Brasil), para identificar cuáles son las variables con mayor impacto en el proceso de hidrólisis del almidón a dextrinas, trabajando con 5 variables (Tabla 1): tiempo de hidrólisis (minutos), concentración de enzima α -amilasa (% m/m con respecto al almidón), pH, temperatura (°C), porcentaje de almidón (% m/v). Siendo el porcentaje de hidrólisis del almidón la variable respuesta.

TABLA 1
SCREENING APLICADO DURANTE LA LICUEFACCIÓN DEL
ALMIDÓN EN DEXTRINAS (DISEÑO PLACKETT-BURMAN)

Parámetro	Licuefacción		
	Mínimo -1	Medio 0	Máximo 1
Temperatura (°C)	75	85	95
Enzima α -amilasa (%)	0.2	0.3	0.4
Almidón de oca (%)	20	25	30
pH	6.5	7.1	7.7
Tiempo (min)	30	60	90

En la prueba Plackett-Burman se identificó la variable con mayor impacto sobre la licuefacción del almidón de oca: concentración de enzima α -amilasa. A partir de este resultado se aplicó un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) a fin de determinar la concentración óptima de enzima α -amilasa (Tabla 2), manteniendo constantes el pH (7.7), porcentaje de almidón (30%), y temperatura (85 °C). Además, se incluyó el tiempo de hidrólisis como variable independiente en el DCCR, considerando la implicancia práctica que puede tener el tiempo, por ejemplo, sobre los costos en un proceso de hidrólisis. Como variable dependiente se evaluó el porcentaje de hidrólisis del almidón en dextrinas.

Para evaluar la evolución de la hidrólisis del almidón con la enzima α -amilasa, se determinó de manera indirecta la reducción del contenido de amilosa aplicando el método

propuesto por Morrison & Laignelet [23], para lo cual se midió la absorbancia a 635 nm mediante espectrofotometría UV-visible utilizando una solución de yodo y yoduro de potasio (I₂-KI) para generar el complejo de color azul.

TABLA 2

DISEÑO COMPUESTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) – LICUEFACCIÓN DE ALMIDÓN CON ENZIMA α -AMILASA (100 mL DE SUSPENSIÓN DE ALMIDÓN EN AGUA)

Tratamiento	Variables independientes		Variable dependiente
	Enzima (%)	Tiempo (min)	Degradación de amilosa (%)
T1	0.20	30.00	
T2	0.40	30.00	
T3	0.20	90.00	
T4	0.40	90.00	
T5	0.16	60.00	
T6	0.44	60.00	
T7	0.30	17.57	
T8	0.30	102.43	
T9	0.30	60.00	
T10	0.30	60.00	
T11	0.30	60.00	

Valores constantes: pH (7.7), porcentaje de almidón (30%), temperatura (85 °C).

b. Sacarificación

Esta etapa se realizó mediante la adaptación de metodologías reportadas en trabajos previos [10], [11], [12] utilizando una enzima glucoamilasa (Song Yuan Feng, China), encargada de hidrolizar las dextrinas (procedentes de la etapa previa) en azúcares fermentables.

TABLA 3

SCREENING APLICADO DURANTE LA SACARIFICACIÓN DE LAS DEXTRINAS EN AZÚCARES FERMENTABLES (DISEÑO PLACKETT-BURMAN)

Parámetro	Sacarificación		
	Mínimo	Medio	Máximo
	-1	0	1
Temperatura (°C)	50	55	60
Enzima glucoamilasa (%)	0.5	0.6	0.7
pH	4.0	4.5	5.0
Tiempo (h)	4.0	6.0	8.0

En primer lugar, se hizo un *screening* aplicando un diseño factorial fraccionario Plackett-Burman (software Protimiza Experiment Design, Brasil), para identificar cuáles son las variables con mayor impacto en el proceso de sacarificación de las dextrinas en azúcares fermentables. Se consideró 4 variables (Tabla 3): tiempo de hidrólisis (horas), concentración de enzima glucoamilasa (% m/m con respecto al almidón), pH y temperatura (°C). La suspensión en todos los casos tuvo un

contenido de 24 % de dextrinas. Siendo el porcentaje de azúcares fermentables la variable respuesta.

A partir del diseño Plackett-Burman se identificó las variables con mayor impacto sobre la sacarificación de las dextrinas: concentración de enzima glucoamilasa (%) y tiempo de hidrólisis (h). En base a lo cual se aplicó un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) a fin de determinar los valores óptimos de concentración de enzima glucoamilasa y tiempo de hidrólisis (Tabla 4), manteniendo constantes el pH (4.5) y temperatura (55 °C). Como variable dependiente se evaluó el porcentaje de azúcares fermentables.

TABLA 4

DISEÑO COMPUESTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) – SACARIFICACIÓN DE DEXTRINAS CON GLUCOAMILASA (100 mL DE SUSPENSIÓN DE DEXTRINAS A 24 °BRIX)

Tratamiento	Variables independientes		Variable dependiente
	Enzima (%)	Tiempo (h)	Azúcares fermentables (%)
T1	0.50	4	
T2	0.70	4	
T3	0.50	8	
T4	0.70	8	
T5	0.46	6	
T6	0.74	6	
T7	0.60	3.2	
T8	0.60	8.8	
T9	0.60	6	
T10	0.60	6	
T11	0.60	6	

Valores constantes: pH (4.5), porcentaje de dextrinas (24%), temperatura (55 °C).

Para evaluar la hidrólisis de las dextrinas en azúcares fermentables se aplicó el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Este método se fundamenta en la reducción del DNS (color amarillo) en presencia de glucosa u otro azúcar reductor, hacia un complejo de color rojo ladrillo, con una intensidad de coloración en función a la concentración de los azúcares reductores presentes en la muestra [24].

2.3. Fermentación alcohólica

El proceso fermentativo se realizó con la levadura *S. cerevisiae* 7VA, proveída por el Grupo de Investigación EnotecUPM de la Universidad Politécnica de Madrid, España [25], evaluando el efecto de dos fuentes de N: una fuente de N-inorgánico (fosfato diamónico) y una fuente de N-orgánico (extracto de levadura), sobre el rendimiento fermentativo de *S. cerevisiae* (Tabla 5).

Se dosificó la levadura en los fermentadores llenados hasta un 70% de su volumen de operación con el medio fermentativo a base de los azúcares fermentables obtenidos del almidón de oca (22.3 % de azúcares fermentables), siguiendo el proceso fermentativo hasta el cese de producción de CO₂. Procediendo posteriormente a determinar el grado alcohólico mediante destilación y densimetría, de acuerdo con el Método Oficial MA-AS312-01A [26], así como los azúcares residuales

mediante el método DNS [24] para comprobar que la levadura *S. cerevisiae* los ha convertido en etanol.

TABLA 5
DOSIFICACIÓN DE DIFERENTES FUENTES DE N PARA LA
LEVADURA *S. cerevisiae* 7VA

Tratamiento	Extracto de levadura	Fosfato diamónico (NH ₄) ₂ HPO ₄
Control (C)	-	-
N-inorgánico (i)	-	1 g/L
N-orgánico (O)	2 g/L	-
N-mixto (Mx)	1 g/L	0.5 g/L

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Licuefacción: hidrólisis del almidón en dextrinas

En un estudio para producir etanol a partir de almidón de papa se obtuvo un efecto estadísticamente significativo de la concentración de enzima α -amilasa y de la concentración de sustrato, siendo favorecida la hidrólisis de almidón en azúcares reductores a valores de 0.8 mL/kg y 20 %, respectivamente [27].

Al analizar los resultados del diseño Plackett-Burman, la variable con impacto significativo sobre la licuefacción del almidón de oca (degradación de amilosa) fue la concentración de enzima α -amilasa (variable X₂: Figura 2). Las demás variables, al parecer, no tuvieron un impacto estadísticamente significativo en el proceso llevado a cabo con la enzima α -amilasa utilizada.

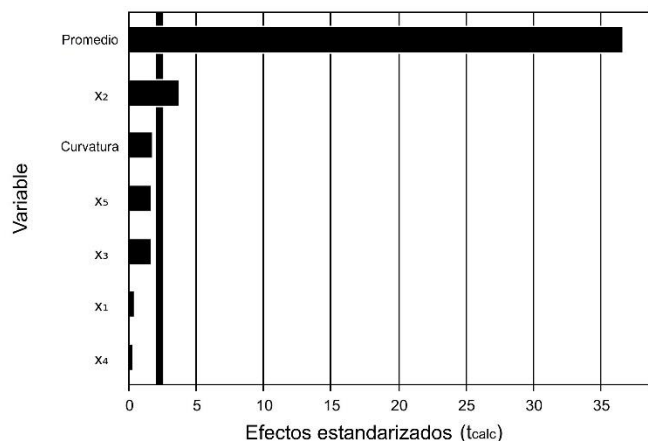


Fig. 2 Diagrama de Pareto del diseño Plackett-Burman para determinar el efecto de las variables independientes durante la licuefacción del almidón de oca por la enzima α -amilasa.

Para optimizar las condiciones de licuefacción del almidón en dextrinas se aplicó un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) considerando la concentración (%) de la enzima α -amilasa como variable independiente. Adicionalmente, se

incluyó el tiempo como variable independiente, manteniendo constantes la temperatura (85 °C), pH (7.7) y concentración de almidón (30%) (Tabla 2). El DCCR es un diseño estadístico que permite obtener un rango de valores de las variables independientes, en donde la hidrólisis (licuefacción) del almidón en dextrinas sea óptima. Se obtuvieron los porcentajes de licuefacción del almidón de oca (degradación de amilosa) mostrados en la Figura 3.

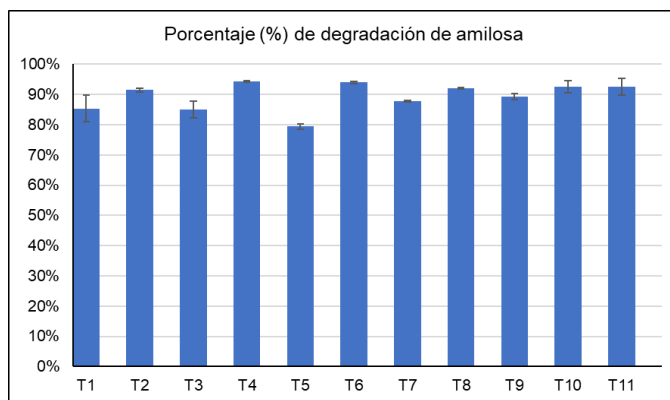


Fig. 3 Hidrólisis del almidón de oca (% degradación de amilosa) en dextrinas luego de aplicar el Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) para determinar la concentración óptima de enzima α -amilasa. Almidón (30%), temperatura (85 °C), pH (7.7).

A partir de los resultados de la Figura 3 se aplicó un diseño de superficie de respuesta, determinando una concentración óptima de enzima α -amilasa [E] (X₁, %) para la hidrólisis del almidón de oca a dextrinas, de 0.41 %, con una capacidad de hidrólisis del almidón de hasta 93.4% (Figura 4).

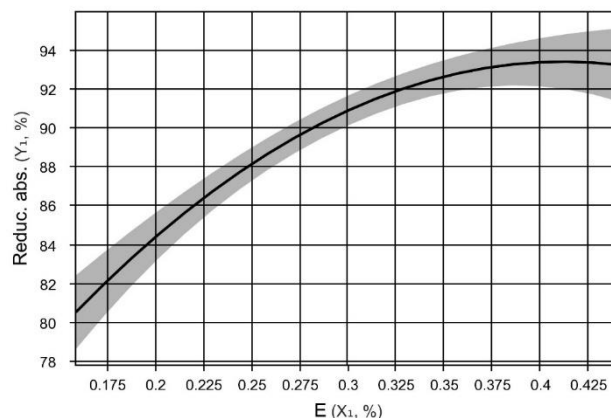


Fig. 4 Efecto de la concentración de enzima α -amilasa (E, %) sobre la licuefacción del almidón de oca (reducción de absorbancia por degradación de amilosa), utilizando el diseño de superficie respuesta.

3.2. Sacarificación: hidrólisis de las dextrinas en azúcares fermentables

En la sacarificación (conversión de dextrinas en azúcares fermentables), el *screening* con Plackett-Burman mostró un

mayor impacto de la concentración de enzima glucoamilasa (variable X_2 : Figura 5). Las demás variables, al parecer, no tuvieron impacto sobre la hidrólisis realizada con la enzima glucoamilasa utilizada.

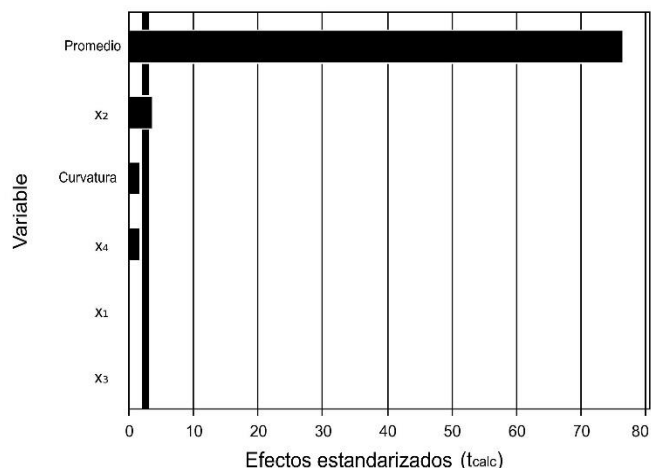


Fig. 5 Diagrama de Pareto del diseño Placket-Burman para determinar el efecto de las variables durante la sacarificación de las dextrinas de oca por la enzima glucoamilasa.

Para optimizar las condiciones de sacarificación de las dextrinas se aplicó un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) para determinar el rango de valores en donde la sacarificación sea óptima, incluyendo como variables independientes la concentración de enzima glucoamilasa, así como el tiempo de hidrólisis, considerando la implicancia práctica del tiempo, por ejemplo, sobre los costos en un proceso de hidrólisis, manteniendo constantes el pH (4.5) y la temperatura (55 °C) (Tabla 4). Se obtuvieron los porcentajes de azúcares fermentables mostrados en la Figura 6.

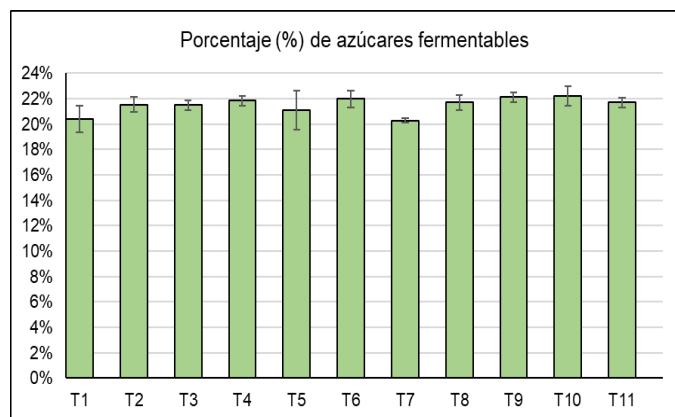


Fig. 6 Azúcares fermentables obtenidos de la hidrólisis de las dextrinas de oca aplicando el Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) para determinar la concentración óptima de enzima glucoamilasa y tiempo de hidrólisis. Dextrinas (24%), temperatura (55 °C), pH (4.5).

A partir de esos resultados se aplicó un diseño de superficie de respuesta (Figura 7), determinando una concentración

óptima de enzima glucoamilasa (X_1 , %) de 0.75 %, a un tiempo óptimo de hidrólisis de 6.96 horas (X_2 , h). Valores óptimos que permitirían producir hasta un 22.4% de azúcares fermentables, a partir de un medio con 24 % de dextrinas, es decir una conversión de dextrinas en azúcares fermentables de 93.3%.

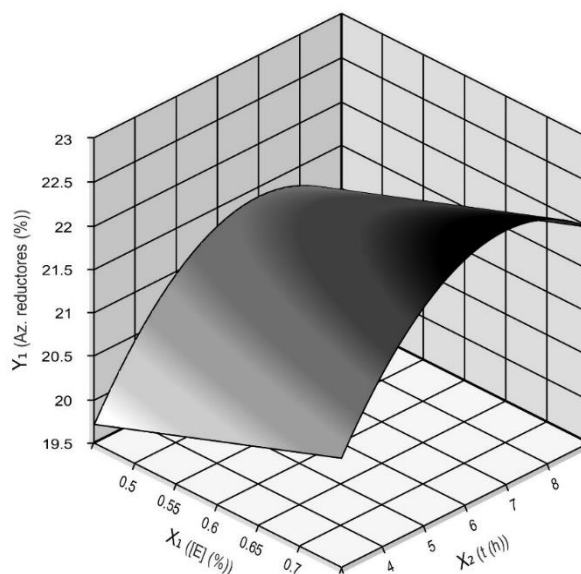


Fig. 7 Efecto de la concentración de enzima glucoamilasa X_1 (E, %) y tiempo de hidrólisis X_2 (t, h) sobre la síntesis de azúcares fermentables a partir de las dextrinas de oca utilizando el diseño de superficie respuesta.

En un estudio previo [28], en las etapas de licuefacción y sacarificación se obtuvieron rendimientos de 51.9% y 24.9%, respectivamente. En el presente estudio, se obtuvieron rendimientos de 93.4% en el proceso de licuefacción y de 93.3% en el proceso de sacarificación. Lo que sugiere que las enzimas utilizadas en la presente investigación son eficientes en términos de rendimiento. Estos resultados sugieren que para optimizar la conversión del almidón de oca en azúcares fermentables con las enzimas α -amilasa y glucoamilasa utilizadas, se debe prestar especial atención a la concentración de las mismas, con importantes implicancias prácticas para mejorar la eficiencia del proceso de hidrólisis y guiar futuras investigaciones para obtención de azúcares fermentables a partir de otras fuentes de almidón, sobre todo a partir de fuentes amiláceas de bajo consumo, que pueden ser la arracacha, mashua [3], [7], entre otras.

3.3. Fermentación alcohólica

En la fermentación alcohólica se utilizaron diferentes fuentes de nitrógeno para *S. cerevisiae*, una fuente de N-orgánico (O: extracto de levadura), N-inorgánico (i: fosfato diamónico: $(NH_4)2HPO_4$) y una mezcla de ambas fuentes (Mx: mixta), además de un control (C) sin N, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 6.

TABLA 6
RENDIMIENTO FERMENTATIVO DE LA LEVADURA
Saccharomyces cerevisiae 7VA EN MOSTOS A BASE DE
 AZÚCARES FERMENTABLES OBTENIDOS DE ALMIDÓN DE OCA,
 DOSIFICADOS CON DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO
 (MOSTO: 23 °BRX)

Parámetro fermentativo	Control (C)	Nitrógeno inorgánico (i)	Nitrógeno orgánico (O)	Nitrógeno mixto (Mx)
Etanol (% v/v)	10.70±0.35 ^c	12.23±0.29 ^a	12.40±0.00 ^a	11.90±0.00 ^b
Etanol (g/L)	83.89±2.72 ^c	95.91±2.26 ^a	97.22±0.00 ^a	93.30±0.00 ^b
Días de fermentación	24	14	7	7
Horas de fermentación	576	336	168	168
Azúcar residual (g/L)	19.15±0.86 ^a	8.87±0.14 ^b	8.87±0.12 ^b	8.59±0.32 ^b
Conversión de sustrato (Yp/s: g/g)	0.41±0.01 ^c	0.45±0.01 ^{ab}	0.45±0.00 ^a	0.44±0.00 ^b
Eficiencia de conversión (%)	80.83±2.46 ^c	87.97±2.10 ^a	89.17±0.05 ^a	85.46±0.13 ^b
Productividad volumétrica de etanol (Qp: g/L-h)	0.15±0.00 ^d	0.29±0.01 ^c	0.58±0.00 ^a	0.56±0.00 ^b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (LSD de Fisher).

Parámetros de rendimiento fermentativo de acuerdo con Duarte et al. [29]:

- Conversión de sustrato (Yp/s: g/g) = etanol producido/azúcar consumido (valor ideal 51 %).
- Eficiencia de conversión (Ef: %) = Conversión de sustrato respecto al 51 % ideal.
- Productividad volumétrica de etanol (Qp: g/L h) = etanol producido/tiempo.

Las fermentaciones que presentaron el mejor rendimiento fermentativo para la producción de etanol son las dosificadas con extracto de levadura como fuente de N, alcanzando valores de *Productividad volumétrica de etanol* (Qp) de 0.58 g/L-h con el N-orgánico (O) y de 0.56 g/L-h con el N-mixto (Mx). Por su parte, la mayor *Eficiencia de conversión* de azúcares en etanol se logró con el N-orgánico, con un valor de 89.17%, determinado a partir de la relación entre la *Conversión de sustrato* Yp/s (0.45 g etanol / g azúcar) respecto al valor teórico ideal de 0.51 g etanol / g azúcar [29]. De acuerdo con los resultados de la Tabla 6, por cada 1000 kg de oca se podría producir aproximadamente 30 L de etanol.

Respecto a la preferencia de N-orgánico por parte de las levaduras, *S. cerevisiae* ha mostrado preferencia por NH⁴⁺ y aminoácidos [30], [31]. El extracto de levadura, utilizado como fuente de N-orgánico en el presente estudio contiene aminoácidos de las células de levadura de la que se ha obtenido. Estos aminoácidos al ser metabolizados durante el proceso

fermentativo liberan NH⁴⁺, que es utilizado como fuente primaria de N. Lo cual explica que en el tratamiento con N-orgánico, se haya obtenido la mejor *Productividad volumétrica de etanol* (Qp: 0.58 g etanol/L-h) (Tabla 6), con un tiempo de fermentación de 7 días, respecto a los 14 días en presencia de la fuente de N-inorgánico ((NH₄)₂HPO₄).

Así mismo, se sabe que entre las diversas funciones del N destacan la reproducción y crecimiento celular, la síntesis de enzimas y de proteínas de transporte de azúcares, además de las funciones que cumplen los aminoácidos como precursores de compuestos aromáticos [32]. Mientras que la deficiencia en los niveles de N puede conllevar el riesgo de fermentaciones lentas o estancadas [33]. Esta deficiencia en N se puede corregir mediante el uso de fuentes adicionales de N, como el (NH₄)₂HPO₄. No obstante, se ha reportado que la excesiva utilización de esta sal puede generar problemas en el proceso fermentativo, como una alta acidificación del medio, favorecer la producción de compuestos dañinos como carbamato de etilo y aminos biógenas, entre otros efectos indeseables [34], [35], [36], [37]. Lo cual podría explicar el menor valor de *Productividad volumétrica de etanol* (Qp: 0.29 g etanol/L-h) y el mayor tiempo de fermentación, 14 días (Tabla 6), obtenidos en presencia de (NH₄)₂HPO₄ (N-inorgánico).

De modo que una adecuada proporción entre N-orgánico (extracto de levadura) y N-inorgánico ((NH₄)₂HPO₄) podría tener implicancias prácticas respecto a mejoras en el rendimiento fermentativo, considerando la diferencia en la accesibilidad y costos de ambas fuentes de nitrógeno. Una proporción 1/1 entre ambas fuentes, como la usada en el tratamiento N-mixto (Mx) (Tabla 5), podría ser de utilidad para lograr un rendimiento fermentativo favorable, con valores de *Productividad volumétrica de etanol* Qp de 0.56 g etanol/L-h, y un tiempo de fermentación de 7 días, similares a los obtenidos con la fuente de N-orgánico (0.58 g etanol/L-h y 7 días, respectivamente) (Tabla 6).

IV. CONCLUSIONES

Durante la licuefacción y sacarificación, el *screening* con Plackett-Burman ha permitido identificar como variables significativas la concentración de las enzimas α -amilasa y glucoamilasa, respectivamente. Las demás variables, al parecer no tuvieron impacto sobre el proceso hidrolítico bajo las condiciones del estudio.

Aplicando el DCCR y el análisis de superficie de respuesta, para el proceso de licuefacción se ha determinado un porcentaje óptimo de enzima α -amilasa de 0.41%, que permitiría alcanzar una conversión máxima de almidón en dextrinas de 93.4%. Mientras que, para la sacarificación, se ha obtenido un porcentaje óptimo de enzima glucoamilasa de 0.75%, con un tiempo de hidrólisis de 6.96 horas, con una conversión de dextrinas en azúcares fermentables del 93.3%, en base a lo cual, por cada 1000 kg de oca se podría producir aproximadamente 30 L de etanol.

Por otro lado, además de la concentración de enzima, el tiempo desempeña un papel relevante en los costos asociados a un proceso industrial. Por consiguiente, se recomienda considerar este parámetro en el diseño y la ejecución de los procesos de licuefacción y sacarificación, para maximizar la hidrólisis del almidón en azúcares fermentables y optimizar la eficiencia económica de la operación.

Así mismo, el extracto de levadura (N-orgánico), permite obtener el mayor rendimiento de etanol por la levadura *S. cerevisiae*, alcanzando una *Productividad volumétrica de etanol* (Qp) de 0.58 g/L-h, así como una *Eficiencia de conversión* de azúcares en etanol de 89.17%. Con lo cual se evidencia el potencial aprovechamiento del almidón de oca para la obtención de etanol.

Finalmente, es necesario realizar validaciones adicionales para confirmar la reproducibilidad del proceso optimizado en el presente estudio, así como la realización de pruebas piloto para evaluar la viabilidad a mayor escala y un análisis económico para evaluar la rentabilidad y la viabilidad potencial de mercado del etanol producido a partir de almidón de oca. También se debe considerar un análisis de la sostenibilidad ambiental e impacto social de la producción de etanol a partir de almidón de oca en comparación con otras materias primas, como oportunidad para el desarrollo rural.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo forma parte del Proyecto 20231002 “Producción de bioetanol a partir de tubérculos andinos de bajo consumo”, de la Universidad Privada del Norte. Los autores agradecen al Grupo de Investigación EnotecUPM de la Universidad Politécnica de Madrid (España) por proporcionar la levadura *S. cerevisiae* 7VA. Así mismo, agradecen al Ing. Alonzo Viera Moreno del Laboratorio de Producción de la Universidad Privada del Norte, campus San Isidro, Trujillo, por su asistencia técnica en la ejecución de las pruebas experimentales.

REFERENCIAS

[1] S. Wang *et al.*, «Recent advances and future challenges of the starch-based bio-composites for engineering applications», *Carbohydrate Polymers*, vol. 307. 2023. doi: 10.1016/j.carbpol.2023.120627.

[2] J. M. García-Almeida, G. M. Casado Fdez, y J. García Alemán, «A current and global review of sweeteners. Regulatory aspects», *Nutr Hosp*, vol. 28, n.º SUPPL.4, pp. 17-31, 2013, Accedido: 23 de febrero de 2024. [En línea]. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112013001000003

[3] J. P. Cruz-Tirado, R. Vejarano, D. R. Tapia-Blácido, G. Barraza-Jáuregui, y R. Siche, «Biodegradable foam tray based on starches isolated from different Peruvian species», *Int J Biol Macromol*, vol. 125, pp. 800-807, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.111.

[4] J. P. Cruz-Tirado, R. Siche, A. Cabanillas, L. Díaz-Sánchez, R. Vejarano, y D. R. Tapia-Blácido, «Properties of baked foams from oca (*Oxalis tuberosa*) starch reinforced with sugarcane bagasse and asparagus peel fiber», *Procedia Eng*, vol. 200, pp. 178-185, 2017, doi: doi.org/10.1016/j.proeng.2017.07.026.

[5] T. Zamora-Hernández, A. Prado-Fuentes, J. Capataz-Tafur, B. E. Barrera-Figueroa, y J. M. Peña-Castro, «Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales», *Educación Química*, vol. 25, n.º 2, 2014, doi: 10.1016/S0187-893X(14)70534-8.

[6] BCRP, «Producción agropecuaria por principales productos - Agrícola - Mercado Interno - Oca», Banco Central de Reserva del Perú. Accedido: 16 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://estadisticas.bcrp.gob.pe/estadisticas/series/anuales/resultados/PM05078AA/html>

[7] S. Espín, E. Villacrés, y B. Brito, «Caracterización físico-química, nutricional y funcional de raíces y tubérculos andinos», en *Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador*, 2004, pp. 91-116. Accedido: 16 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3264>

[8] F. Velásquez-Barreto y C. Velezmoro, «Rheological and viscoelastic properties of Andean tubers starches», *Scientia Agropecuaria*, vol. 9, n.º 2, pp. 189-197, 2018, doi: 10.17268/sci.agropecu.2018.02.03.

[9] A. Pandey y J. A. C. Teixeira, *Current developments in biotechnology and bioengineering: Foundations of biotechnology and bioengineering*. 2016. doi: 10.1016/j.focart.2016.06.049.

[10] R. A. Cripwell, L. Favaro, M. Viljoen-Bloom, y W. H. van Zyl, «Consolidated bioprocessing of raw starch to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*: Achievements and challenges», *Biotechnol Adv*, vol. 42, p. 107579, 2020, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107579.

[11] W. Nuriana y Wuryantoro, «Ethanol synthesis from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) stone waste as renewable energy source», en *Energy Procedia*, 2015, pp. 372-377. doi: 10.1016/j.egypro.2015.01.066.

[12] C. Quitiguiña y S. Santacruz, «Obtención de jarabe de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática de almidón de banano, *Musa cavendish*», *Revista Boliviana de Química*, vol. 29, n.º 1, 2012, [En línea]. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602012000100005

[13] H. Alarcón y E. Arroyo, «Evaluación de las propiedades químicas y mecánicas de biopolímeros a partir del almidón modificado de la papa», *Revista de la Sociedad Química del Perú*, vol. 82, n.º 3, pp. 315-323, 2016, doi: 10.37761/rsqp.v82i3.92.

[14] R. Vejarano, A. Morata, I. Loira, M. C. González, y J. A. Suárez-Lepe, «Theoretical considerations about usage of metabolic inhibitors as possible alternative to reduce alcohol content of wines from hot areas», *European Food Research and Technology*, vol. 237, n.º 3, pp. 281-290, 2013, doi: 10.1007/s00217-013-1992-z.

[15] C. P. Larralde-Corona, F. J. De la Torre-González, P. A. Vázquez-Landaverde, D. Hahn, y J. A. Narváez-Zapata, «Rational selection of mixed yeasts starters for Agave must

- fermentation», *Front Sustain Food Syst*, vol. 5, p. 684228, 2021, doi: 10.3389/fsufs.2021.684228.
- [16] M. Parapouli, A. Vasileiadis, A. S. Afendra, y E. Hatziloukas, «Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications», *AIMS Microbiol*, vol. 6, n.º 1, pp. 1-31, 2020, doi: 10.3934/microbiol.2020001.
- [17] L. Petruzzi *et al.*, «Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits», *Front Microbiol*, vol. 8, n.º 995, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00995.
- [18] C. Prentice y N. Handsjuk, «Insights into Vodka consumer attitude and purchasing behaviors», *Journal of Retailing and Consumer Services*, vol. 32, pp. 7-14, 2016, doi: 10.1016/j.jretconser.2016.05.009.
- [19] Renewable Fuels Association, «Annual world fuel ethanol production», <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>, Accedido: 23 de febrero de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>
- [20] C. Castro-Martínez, L. I. Beltrán-Arredondo, y J. C. Ortiz-Ojeda, «Producción de biodiesel y bioetanol: ¿Una alternativa sustentable a la crisis energética?», *Ra Ximhai*, vol. 8, n.º 3, pp. 93-100, 2012, doi: 10.35197/rx.08.03.e2.2012.09.cc.
- [21] A. Rafael, «Optimización de la hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica para la obtención de etanol a partir de almidón de oca (*Oxalis tuberosa*)», Undergraduate thesis, Universidad Privada del Norte, Trujillo, 2024.
- [22] L. Novelo-Cen y D. Betancur-Ancona, «Chemical and functional properties of Phaseolus lunatus and Manihot esculenta starch blends», *Starch - Stärke*, vol. 57, n.º 9, pp. 431-441, 2005, doi: <https://doi.org/10.1002/star.200500398>.
- [23] W. R. Morrison y B. Laignelet, «An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches», *J Cereal Sci*, vol. 1, n.º 1, pp. 9-20, 1983, doi: 10.1016/S0733-5210(83)80004-6.
- [24] T. Khivorotova y J. Sereikaite, «Determination of fructan exohydrolase activity in the crude extracts of plants», *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 17, n.º 6, pp. 329-333, nov. 2014, doi: 10.1016/J.EJBT.2014.09.005.
- [25] A. Morata, «Influencia de la maduración antociánica de la uva y de la biotecnología fermentativa en color, aroma y estructura de vinos tintos», Doctoral thesis, Universidad Politécnica de Madrid, 2004. [En línea]. Disponible en: <https://oa.upm.es/28/>
- [26] OIV, «Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Volume I.» International Organization of Vine and Wine (OIV), Geneva (Switzerland), 2023. Accedido: 21 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.oiv.int/sites/default/files/publication/2023-05/Compendium%20MA%20complet_EN.pdf
- [27] J. González y M. Molina, «Estudio de los factores que afectan la hidrólisis enzimática y el proceso fermentativo para la producción de alcohol a partir de papa (*Solanum tuberosum*)», *Revista Ingeniería*, vol. 16, n.º 1, pp. 27-37, 2011, doi: 10.15517/ring.v16i1.642.
- [28] L. C. Rojas-Pérez, L. A. Caicedo-Mesa, J. L. Aguilar-Arias, y L. R. Martínez-Ramírez, «Evaluación de la sacarificación de yuca mediante el proceso convencional y el proceso low-energy, para su posterior determinación de la cinética de reacción», *TecnoLógicas*, vol. 21, pp. 81-98, 2008, doi: 10.22430/22565337.253.
- [29] W. F. Duarte, J. C. Amorim, y R. F. Schwan, «The effects of co-culturing non-Saccharomyces yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process», *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 103, n.º 1, pp. 175-194, 2013, doi: 10.1007/s10482-012-9798-8.
- [30] A. Gutiérrez, R. Chiva, M. Sancho, G. Beltran, F. N. Arroyo-López, y J. M. Guillamon, «Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must», *Food Microbiol*, vol. 31, n.º 1, pp. 25-32, 2012, doi: 10.1016/j.fm.2012.02.012.
- [31] R. Martínez-Moreno, P. Morales, R. Gonzalez, A. Mas, y G. Beltran, «Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source», *FEMS Yeast Res*, vol. 12, n.º 4, pp. 477-485, 2012, doi: 10.1111/j.1567-1364.2012.00802.x.
- [32] A. Gobert *et al.*, «Non-Saccharomyces yeasts nitrogen source preferences: Impact on sequential fermentation and wine volatile compounds profile», *Front Microbiol*, vol. 8, p. 2175, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.02175.
- [33] K. J. Prior, F. F. Bauer, y B. Divol, «The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-Saccharomyces yeasts associated with wine», *Food Microbiol*, vol. 79, pp. 75-84, 2019, doi: 10.1016/j.fm.2018.12.002.
- [34] V. M. Burin, T. M. Gomes, V. Caliarí, J. P. Rosier, y M. T. B. Luiz, «Establishment of influence the nitrogen content in musts and volatile profile of white wines associated to chemometric tools», *Microchemical Journal*, vol. 122, pp. 20-28, 2015, doi: 10.1016/j.microc.2015.03.011.
- [35] A. Mendes-Ferreira, C. Barbosa, P. Lage, y A. Mendes-Faia, «The impact of nitrogen on yeast fermentation and wine quality», *Ciencia e Técnica Vitivinícola*, vol. 26, n.º 1, pp. 17-32, 2011.
- [36] J. Q. Sturgeon, J. C. Bohlscheid, y C. G. Edwards, «The effect of nitrogen source on yeast metabolism and H₂S formation», *J Wine Res*, vol. 24, n.º 3, pp. 182-194, 2013, doi: 10.1080/09571264.2013.793175.
- [37] P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, y D. Dubourdieu, «Nitrogen compounds», *Handbook of Enology the Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. John Wiley and Sons Ltd., pp. 109-140, 2006.