

Levaduras autóctonas con capacidad fermentativa en la producción de etanol a partir de pulpa de excedentes de plátano *Musa (AAB Simmonds)* en el departamento de Córdoba, Colombia

Autoctonous yeasts having fermentation ability in producing ethanol from *Musa (AAB Simmonds)* plantain surplus pulp in the Córdoba department of Colombia

Luis Oviedo Zumaqué¹, Cecilia Lara Mantilla^{2*}, Mauricio Mizger Pantoja³

Resumen

Se evaluó la capacidad fermentativa de levaduras nativas de la zona costanera del departamento de Córdoba, Colombia, para la obtención de etanol a partir de la pulpa de excedentes de plátano *Musa (AAB Simmonds)*, con el objetivo de encontrar cepas eficientes. Los microorganismos utilizados correspondieron a las especies: *Kloeckera sp.*, *Candida guilliermondii* 14AD, *Candida albicans* y *Candida guilliermondii* 13AD (nativas), y una cepa comercial de referencia, *Saccharomyces cerevisiae* T73. La fermentación se realizó a diferentes concentraciones de sustrato, siendo la concentración del 40% la mejor; se evaluó la producción de etanol mediante el método colorimétrico del dicromato de potasio utilizando un equipo espectrofotómetro Lambda 11. Se observó que la levadura *Candida guilliermondii* 14AD nativa fue la más eficiente con una producción promedio de 3,45% v/v de etanol a las 72 horas de fermentación; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la producción de etanol a partir de la cepa de referencia, la cual produjo 3,59% v/v. Estos resultados sugieren la existencia de levaduras nativas con capacidad para ser utilizadas en la obtención de etanol a partir de material residuo de plátano.

Palabras clave: etanol, fermentación, levaduras, método del dicromato de potasio.

Abstract

Native yeasts' (Cordoba, Colombia) fermentation ability for producing ethanol from plantain (*Musa AAB Simmonds*) surplus pulp was evaluated; the object was to find efficient yeasts. The microorganisms used here came from the *Kloeckera sp.*, *Candida guilliermondii* (14AD), *Candida albicans* and *Candida guillier-*

1 M. Sc. Director proyecto investigación. Grubiodeq, Grupo de Biotecnología Departamento de Química, Universidad de Córdoba. luisoviedo59@hotmail.com, loviedo@sinu.unicordoba.edu.co

2 Ph. D. Coinvestigadora proyecto. Grubiodeq, Grupo de Biotecnología Departamento de Química, Universidad de Córdoba. lara_mantilla_cecilia@hotmail.com

3 Investigador. Grubiodeq, Grupo de Biotecnología Departamento de Química, Universidad de Córdoba.

mondii 13AD strains (native) and *Saccharomyces cerevisiae* T73 (a commercial reference yeast). Fermentation was carried out on different substrate concentrations, the 40% one giving the best result; ethanol production was evaluated by the potassium dichromate colorimetric method using a Lambda 11 spectrophotometer. It was observed that the *Candida guilliermondii* 14AD native yeast was the most efficient, having an average 3.45% v/v ethanol production after 72 hours' fermentation. There were no statistically significant differences compared to reference yeast strain ethanol production (3.59% v/v). These results suggest that native yeasts can be used in obtaining ethanol from residual plantain matter.

Key words: ethanol, fermentation, yeast, potassium dichromate method.

Recibido: marzo 2 de 2009

Aprobado: junio 15 de 2009

Introducción

El departamento de Córdoba se destaca por ser el primer productor de plátano en la región Caribe de Colombia, con una participación del 6,28% de la producción total nacional y una tasa de crecimiento anual del 20,7%; tiene un área aproximada de 30.000 hectáreas en las zonas productoras de los municipios de Tierralta, Lorica, Moñitos, Puerto Escondido, San Bernardo del Viento y Los Córdoba, lo que genera una productividad anual cercana a las 210.000 toneladas. En las zonas de cultivo existe una alta proporción de excedentes sin utilizar, y una pérdida poscosecha que se aproxima al 15% de su producción (Ortega et ál., 2003).

Teniendo en cuenta los desperdicios de plátano que se generan, surge el interés de su aprovechamiento mediante procesos biotecnológicos tales como fermentaciones alcohólicas que permitan darle un valor agregado a estos residuos, aprovechando el contenido de carbohidratos que posibilita el uso de microorganismos capaces de transformar dichos desechos en un producto industrial como el etanol.

El alcohol etílico se obtiene por vías muy distintas dependiendo del uso que se le quiera dar: por hidratación de eteno, para emplearlo a nivel industrial como solvente e intermediario sintético; por vía fermentativa, para preparar bebidas y usarlo también como oxigenante de combus-

tibles, debido a su potencial como aditivo de la gasolina (Vollhardt, 2007; Ecopetrol, 2005).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la capacidad fermentativa de levaduras nativas sobre sustrato de excedentes de plátano para conocer cepas nativas con capacidad fermentativa de la región costera cordobesa, pueda fin de brindar un valor agregado a los productos subutilizados de la producción de plátano.

Materiales y métodos

Levaduras utilizadas

Las levaduras utilizadas fueron cuatro cepas nativas y una cepa de referencia; levaduras nativas (Yarrow, 1998): *Kloeckera sp*, *Candida guilliermondii* (14AD), *Candida albicans* y *Candida guilliermondii* 13AD (banco de cepas del Laboratorio Grubiodeq) y la cepa comercial de referencia, *Saccharomyces cerevisiae* T73 (CECT 1894), adquirida del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia, España, identificada por Querol et ál. (2006) como una cepa de vinos tintos.

Evaluación de la producción de etanol

La evaluación de la producción de etanol se realizó de la siguiente forma:

Fermentación. Se utilizó como sustrato pulpa de plátano a diferentes concentraciones, 15, 40 o 60% p/v, ajustándose a pH = 1,5 con solución acuosa de H₂SO₄ 10% v/v; la hidrólisis se realizó en autoclave a 15 psi y 250° F por 15 min. Terminada la hidrólisis nuevamente se ajustó a pH = 4,5 con NaOH 10% p/v; el sustrato hidrolizado se repartió en frascos de capacidad 200 ml a los cuales se le adicionaron inóculos de levadura en concentración de 5,2x10⁸ ufc/mL; se completó a volumen de 100 mL con agua destilada y finalmente se adicionaron 10 mL de aceite mineral estéril para garantizar las condiciones fermentativas.

Cuantificación de la producción de etanol. Se tomaron 10 ml de la muestra anteriormente fermentada y se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 min. Se trabajó con el sobrenadante (solución a).

La cuantificación del etanol producido en la fermentación se llevó a cabo por el método colorimétrico del dicromato de potasio descrito por Tello-Hinojosa et ál. (2005) que consistió en depositar 4 ml de una solución oxidante (mezcla formada por 4.165 g de dicromato de potasio y 250 ml de ácido sulfúrico, aforando con agua destilada a 1000 ml) en tubos de ensayo; luego se adicionaron, gota a gota, 2 ml de solución saturada de carbonato de potasio hasta finalizado el burbujeo (solución b).

Se mezclaron 2 ml de la solución (a) con 2 ml de solución (b) homogeneizándose en vórtex a 1500 rpm durante 10 seg; seguidamente se realizó un calentamiento en baño termostataado a temperatura de 80-85 °C por espacio de 30 min. Se enfrió a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 440 nm en el equipo espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 11 UV-Vis. El monitoreo de la fermentación se realizó cada 24 horas durante tres días. Ensayos por triplicados

Para la estandarización del método se hizo el blanco y la curva patrón trazada a partir de estándares de etanol; se estimaron las ecuaciones de las respectivas rectas de regresión, los

coeficientes de determinación (r²), normalidad de residuales y test de proporcionalidad mediante el software *Analyse-it for Microsoft Excel*[®] (Miller y Miller, 1993; Aguirre et ál, 2001). La determinación del etanol se realizó utilizando la ecuación 1, obtenida de la estandarización de las curvas de calibrado.

$$\%EtOH(\text{v/v}) = \left(\frac{0.01}{3.947} \right) \times \left(-\frac{y - 0.002}{6 \times 10^{-5}} \right) \quad (1)$$

Resultados y discusión

Las levaduras utilizadas en la presente investigación (nativas y de referencia) correspondieron a cepas que en ensayos preliminares mostraron tolerancia máxima al etanol del 10% (Oviedo, et ál., 2007 a, b, c).

En la tabla 1 se resumen los datos obtenidos en la producción de etanol a diferentes concentraciones de sustrato: 15, 40 y 60%, y a diferentes tiempos de fermentación, utilizando las levaduras nativas y la cepa comercial de referencia.

En la obtención del etanol se evaluaron tres concentraciones de sustrato, 15, 40 y 60%, encontrándose que al 40% se obtuvieron los valores más altos en la producción del alcohol.

Se nota claramente que con la utilización del 15% de sustrato la producción de alcohol fue muy escasa observándose que la cepa de referencia *S. cerevisiae* T73(CECT 1894), y la cepa nativa *C. guilliermondii* 14AD fueron las únicas productoras de etanol. Lo anterior sugiere que a este nivel de concentración de sustrato utilizado no existe una fuente de carbono o de nutrientes suficientes para las demás levaduras evaluadas.

Al 60% se observó producción del etanol por la cepa de referencia y las levaduras nativas *Candida guilliermondii* (14AD) y *Candida guilliermondii* (13AD), mientras que las cepas *Candida albicans* y *Kloeckera sp.* no lo produjeron. Aunque a esta concentración de sustrato existe mayor contenido de carbohidratos que implicaría un mayor crecimiento microbiano y por ende ma-

Tabla 1. Evolución de la producción de etanol por levaduras nativas del departamento de Córdoba, Colombia, en la fermentación de la pulpa de plátano verde hidrolizada

Microorganismo	Tiempo (h)	Concentración de sustrato					
		15% p/v		40% p/v		60% p/v	
		Promedio señal corregida (ABS)	[EtOH] (%v/v)*	Promedio señal corregida (ABS)	[EtOH] (%v/v)	Promedio señal corregida (ABS)	[EtOH] (%v/v)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> T73(CECT 1894) (referente)	24	-0,0140	NA	-0,0477	2,10	-0,0257	1,17
	48	-0,0363	1,62	-0,0673	2,93	-0,0390	1,73
	72	-0,0217	1,00	-0,0823	3,59	-0,0467	2,06
<i>Kloeckera sp</i>	24	-3,33x10 ⁻⁴	NA	-	-	-	-
	48	-3,67x10 ⁻³	NA				
	72	-1,33x10 ⁻³	NA				
<i>Candida guilliermondii</i> (14AD)	24	-8,00x10 ⁻³	NA	-0,0437	1,93	-0,0183	0,86
	48	-5,33x10 ⁻³	NA	-0,0610	2,66	-0,0373	1,66
	72	-0,0237	1,08	-0,0786	3,45	-0,0337	1,51
<i>Candida albicans</i>	24	-2,33x10 ⁻³	NA	-0,0433	1,91	-	-
	48	-3,67x10 ⁻³	NA	-0,0580	2,53		
	72	-5,00x10 ⁻³	NA	-0,0740	3,21		
<i>Candida guilliermondii</i> (13D)	24	-4,00x10 ⁻³	NA	-0,0320	1,44	0,92	0,92
	48	-5,67x10 ⁻³	NA	-0,0517	2,27	1,57	1,57
	72	-0,0107	NA	-0,0767	3,32	1,38	1,38

*NA = No Aplica, debido a que el valor promedio de la señal de absorbancia corregida no figura en el intervalo de señales de la curva de calibrado.

por producción de etanol, este resultado no es sorprendente; es sabido que a elevadas concentraciones de soluto, algunas levaduras experimentan una plasmólisis celular, reducción del poro y otras alteraciones que disminuyen el crecimiento microbiano (Deak y Beuchat, 1996; Casas, 1999; Alfenore et ál., 2002) lo cual sugeriría la baja o nula producción de etanol.

Con la utilización del 40% de pulpa de plátano se obtuvieron, en el experimento, los valores más altos en la producción de etanol siendo el mejor tiempo las 72 horas de fermentación para cuatro de las 5 cepas evaluadas: *S.*

cerevisiae T73(CECT 1894), *Candida guilliermondii* (14AD), *Candida guilliermondii* (13AD) y *Candida albicans*. Es de anotar que la levadura *Kloeckera sp.*, a pesar de ser tolerante al 10% de etanol en los ensayos previos (Oviedo et ál., 2007 a, b, c), no produjo el alcohol a las diferentes concentraciones de plátano.

En la tabla 2 se muestran los coeficientes de variación obtenidos en el experimento cuando se utilizó el sustrato al 40%; la precisión de un método analítico engloba diferentes tipos de estudios como son la repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad, los cuales

se expresan generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas, y se calcula matemáticamente por medio de la ecuación 2 (Aguirre et ál., 2001).

$$CV = \frac{s}{x} \times 100\% \quad (2)$$

donde: s = desviación estándar

x = promedio

Los datos obtenidos del coeficiente de variación se encuentran dentro de los límites propuestos por Aguirre et ál. (2001), quienes establecen que dicho parámetro estadístico no debe ser superior al 5%.

Una comparación de la producción de etanol entre la cepa de referencia *Saccharomyces cerevisiae* T73(CECT 1894) y las 3 nativas:

Candida guilliermondii (14AD), *Candida albicans* y *Candida guilliermondii* (13D) demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas (análisis de varianza con la prueba de Tukey, $p > 0,05$), sin embargo, la cepa nativa *Candida guilliermondii* (14AD) mostró un mejor comportamiento; también se observó que la tendencia hacia la producción de etanol fue aumentando a medida que se incrementó el tiempo de fermentación.

En la figura 1 se observa el comportamiento del proceso fermentativo.

El proceso para la obtención del etanol es llevado a cabo en dos etapas (Montes et ál., 2003): a) hidrólisis, que consiste en la conversión de carbohidratos en azúcares fermentables, con la utilización de ácidos minerales; y b) fermentación, que es la etapa de conversión de

Tabla 2. Señales de absorbancia de las muestras a 72 horas de fermentación utilizando pulpa de plátano al 40% p/v

Cepa	Señal (ABS)	Señal corregida (ABS)	\bar{x}	s	CV (%)
Matriz	0,599	0,598*	NA [†]	NA [†]	
	0,600				
	0,596				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> T73(CECT 1894) (referente)	0,515	-0,0830	-0,0823	2,08x10 ⁻³	3,44
	0,514	-0,0840			
	0,518	-0,0800			
<i>Candida guilliermondii</i> (14AD)	0,520	-0,0780	-0,0786	3,46x10 ⁻³	4,40
	0,519	-0,0790			
	0,519	-0,0790			
<i>Candida albicans</i>	0,524	-0,0740	-0,0740	1,00x10 ⁻³	1,35
	0,525	-0,0730			
	0,523	-0,0750			
<i>Candida guilliermondii</i> (3)	0,521	-0,0770	-0,0767	5,79x10 ⁻⁴	0,75
	0,521	-0,0770			
	0,522	-0,0760			

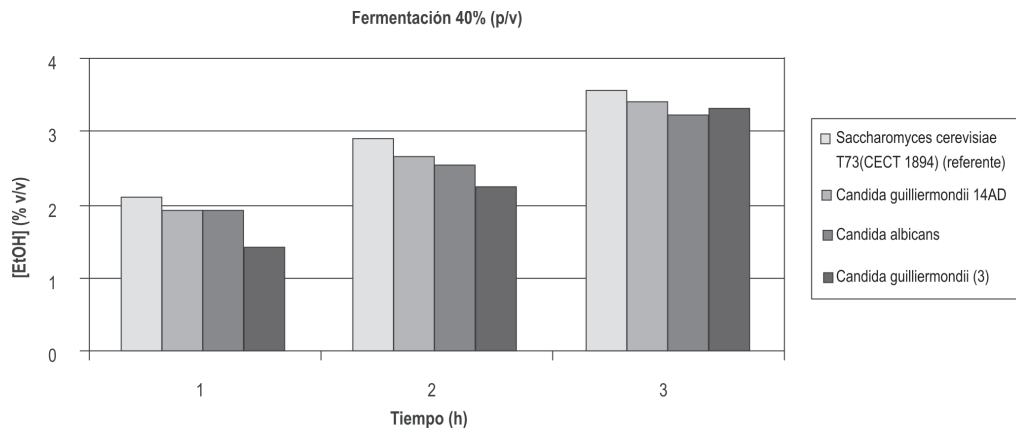


Figura 1. Fermentación de la pulpa de plátano verde hidrolizada al 40% p/v, llevado a cabo por levaduras autóctonas del departamento de Córdoba, Colombia.

azúcares fermentables a etanol por medio de las levaduras seleccionadas.

La fermentación está influenciada por varios factores como la temperatura, pH, concentración de azúcares y otras variables que influyen en el crecimiento de los microorganismos (Corpodib, 2003; Caridi, 2003). En el trabajo realizado las condiciones de fermentación fueron pH inicial de 4,5 y temperatura ambiente (28-30 °C); se ha encontrado que la fermentación se efectúa satisfactoriamente cuando se ajusta el pH en un valor entre 4,0 y 5,0, debido a que es favorable para la levadura y bastante bajo para inhibir la multiplicación de las bacterias. La temperatura óptima para la formación de alcohol se estima en el rango de 32 °C a 35 °C (Navarro et ál., 1986).

La fermentación alcohólica es un proceso muy complejo; el incremento de la concentración de etanol a medida que transcurre la fermentación supone un obstáculo para el correcto crecimiento y desarrollo microbiano por los efectos negativos que esto conlleva. El etanol afecta la permeabilidad de la membrana celular disminuyendo su selectividad, de forma que las levaduras en un medio con alta concentración alcohólica pierden propiedades funcionales y no pueden retener cofactores y coenzimas (Leao y Van Uden, 1984).

La producción de etanol obtenido en los trabajos realizadas por Ban-Koffi y Han (1990), Joshi et ál. (2005) y Ray et ál. (2006), denotan concentraciones del alcohol del 8, 10,8-11,8 y 7%, utilizando células de *S. cerevisiae* en pulpa de piña, durazno y marañón, y adicionando sales minerales. En la presente investigación se observó como importante la evaluación de cepas nativas con potencial en la producción de etanol, a partir de excedentes de plátano dando un valor agregado a los residuos poscosecha.

La síntesis de etanol por vía microbiana es, a nivel mundial, una alternativa interesante para la actual demanda de combustibles así como para la obtención de bebidas alcohólicas. Los estudios sobre selección y evaluación de levaduras nativas productoras de etanol son de fundamental importancia para conocer especies eficientes en términos de adaptación a nuevos sustratos y resistentes al alcohol, para llevar a cabo fermentaciones alcohólicas completas. El trabajo realizado permitió encontrar en las condiciones experimentales descritas, cepas nativas productoras de etanol, en valores semejantes a la cepa de referencia.

Este aporte contribuye al desarrollo regional en la implementación de tecnologías con eficientes rendimientos, ecológicamente limpias y orientadas principalmente a dar valor agregado a nuestros recursos naturales y agroindustriales.

Conclusiones

El estudio de la biodiversidad microbiana productora de alcohol etílico, existente en la región, es de suma importancia porque contribuye al desarrollo de tecnologías de conservación del ambiente y a la utilización de los recursos propios para la agroindustria del plátano.

La obtención de etanol a partir de excedentes de producción de cultivo de plátano representa un alternativa viable para el aprovechamiento de materias primas de bajo valor comercial de una manera más sustentable permitiendo a la comunidad un mejoramiento socioeconómico.

Agradecimientos

A la Universidad de Córdoba por el apoyo financiero para el desarrollo de esta investigación.

Referencias bibliográficas

- Aguirre, O. L., García, G. F., García, J., Ilera, F. M., Juncadella, R. M., Lizondo, C. M. et ál. 2001. Validación de métodos de análisis en materias primas y especialidades farmacéuticas. En Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Barcelona: AEFL.
- Alfenore, S., Molina, C., Guillouet, S., Goma, G. 2002. Improving ethanol production and viability of *S. cerevisiae* by a vitamin feeding. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 67-72.
- Ban-Koffi, L., Han, Y. W. 1990. Alcohol production from pineapple waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 6 (3): 281-284.
- Caridi, A. 2003. Effect of Protectants on the fermentation performance of wine yeasts subjected to osmotic stress. *Food Technol Biotechnol* 41 (2): 145-148.
- Casas, E. 1999. Microorganismos responsables de alteraciones en alimentos altamente azucarados. Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología.
- Corpodib. 2003. Corporación para el Desarrollo Industrial de la Biotecnología y Producción limpia. Programa estratégico nacional para la producción de alcohol carburante para gasolina colombiana. www.corpodib.com/estudios1.htm Bogotá D.C.
- Deak, T., Beuchat, L. 1996. Handbook of food Spoilage Yeasts. Boca Raton: CRC Press.
- Ecopetrol. Mayo-Junio de 2005. Carta petrolera, 111 Disponible en: http://www.ecopetrol.com.co/especiales/carta_petrolera2005/portada.htm
- Joshi, V. K., Shah, P. K., Kumar, K. 2005. Evaluation of peach cultivars for wine preparation. *Journal of Food Science and Technology* 42(1): 83-89.
- Leao, C. Y., Van Uden, N. 1984. Effects of ethanol and other 306 alkanols on the kinetics and the activation on the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 26: 403-411.
- Miller, J. C., Miller, J. N. 1993. Estadística para química analítica. 2 edición. Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana.
- Montes, A. R., Rigo, M., Joekes I. 2003. Ethanol Fermentation of a Diluted Molasses Medium by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chrysoile Braz. *Archives of Biology and Technology* 46 (4): 32-36.
- Navarro, A., Marangoni, H., Callier, D. 1986. Producción de etanol por fermentación con alta concentración levaduras. *Revista Argentina de Microbiología* 18 (1): 7-11.
- Ortega, J., Marrugo, J., Alvis, A. 2003. Contribución al desarrollo del acuerdo de competitividad de la cadena productiva del plátano en una zona del departamento de Córdoba (informe parcial). Centro de Investigaciones Universidad de Córdoba. Montería, Colombia.
- Oviedo, L. E., Doria, J. A., Arrieta, A. 2007a. Identificación y caracterización de levaduras nativas con potencial fermentador asociadas a cultivos de plátano (*Musa paradisiaca*) en los municipios de Los Córdoba y Moñitos, departamento de Córdoba. Tesis pregrado Biología, Universidad de Córdoba, Montería, Córdoba, Colombia.
- Oviedo, L. E., Doria, J. A., Arrieta, A. 2007b. Capacidad de tolerancia al etanol de levaduras aisladas de cultivo de plátano (*Musa paradisiaca*) en Córdoba, Colombia. *Labslatin American Biodegradation and Biodegradation Symposium. Biotecnología, Agricultura y Ambiente en el siglo XXI*. Pontificia Universidad Javeriana. Ponencia. Memorias, Bogotá.
- Oviedo, L. E., Doria, J. A., Arrieta, A. 2006c. Evaluación de levaduras autóctonas con potencial fermentador para la producción de etanol a partir de Plátano (*Musa pa-*

- radiata*) en el departamento de Córdoba. Ponencia. VII Simposio Latinoamericano de Química Analítica Ambiental y Sanitaria, Medellín.
- Querol, S. A., Pando, B. R., Suárez, V. B., Fernández, T. N., Rodríguez, M. R. 2006. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. Food Microbiology 24: 25-31.
- Ray, R. C., Mohanty, S., Ray, P., Swain, M. R. 2006. Fermentation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) “apple” into wine. Journal of Food Processing and Preservation 30 (3): 314-322.
- Vollhardt, M., Schore, N. L. 2007. Organic chemistry. Structure and function. 5 edition. New York: W. H. Freeman and Company.
- Yarrow, D. 1998. Methods for isolation, maintenance and identification of yeasts. En Kurtzman, C. P. J. W. The yeasts a Taxonomic Study. 4 ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.