

## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA LEVADURA FLOCULANTE PARA PRODUCIR ETANOL DEL BANANO DE RECHAZO

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FLOCULANT YEAST TO PRODUCE ETHANOL FROM BANANA REFUSE

## ISOLAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LEVEDURA FLOCULANTE NA PRODUÇÃO DE ETANOL DA REJEIÇÃO DE BANANA

Carlos Guevara-Bravo<sup>1</sup>, José Acevedo<sup>2</sup>, Carlos Peláez-Jaramillo<sup>3</sup>

### RESUMEN

*Fue aislada y caracterizada una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* LEG-06, con características floculantes para fermentar jugo de banano extraído bajo condiciones básicas. Los rendimientos de etanol fueron comparados con levaduras comerciales y además fueron evaluados los efectos del pH y del agente neutralizante. Adicionalmente se evaluó el efecto sobre la eficiencia de 10 fermentaciones sucesivas usando la misma levadura. Finalmente, se escaló la fermentación a 40 L en reactor tubular con agitación mecánica y se determinaron los parámetros cinéticos de la levadura. Las condiciones ideales fueron: pH 5,5 utilizando ácido cítrico como neutralizante, 23,8 g/L de levadura, 14,5°Brix. La eficiencia estuvo entre 82-84% y el pH óptimo de floculación entre 5,5 y 6,0. La concentración de etanol obtenido en las mejores condiciones alcanzó el 7,5%. Estos resultados demuestran la levadura como la metodología usada, presentan las características adecuadas y deseadas para desarrollar un proceso a nivel de planta piloto para la producción de etanol a partir de banano de rechazo.*

---

**Recibido para evaluación:** 16 de noviembre de 2013. **Aprobado para publicación:** 15 marzo de 2014

- 1 Universidad del Quindío. Químico, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor. Armenia, Colombia.
- 2 Universidad de Antioquia. Biólogo, Coordinador área de microbiología, Grupo GIEM. Medellín, Colombia.
- 3 Universidad de Antioquia. Director grupo GIEM. Medellín, Antioquia.

**Correspondencia:** caguevara@uniquindio.edu.co

## ABSTRACT

*Was isolated and characterized a flocculant yeast strain Saccharomyces cerevisiae (LEG-06), to ferment banana juice, extracted under basic conditions. Yield ethanol was compared with commercial yeasts and were also evaluated the effects of pH and neutralizing agent. Additionally, the effect on efficiency of 10 successive fermentations using the same yeast. Finally, the fermentation was scaled in a 40 L tubular reactor with mechanical agitation and the kinetic parameters were determined from yeast. Ideal conditions were: pH 5,5 using citric acid as a neutralizer, 23,8 g/L yeast 14,5°Brix. The efficiency was between 82-84% and the optimum pH between 5,5 and 6,0 flocculation. The concentration of ethanol obtained under optimum conditions was 7,5%. These results demonstrate the yeast as the methodology used, have the right characteristics and desired to develop a process to pilot plant for the production of ethanol from banana rejection*

## RESUMO

*Foi isolado e caracterizado uma estirpe de levedura Saccharomyces cerevisiae LEG-06, floculantes para fermentar características banana suco extraído sob condições básicas. Rendimiento de etanol foi comparado com leveduras comerciais e também foram avaliados os efeitos do pH e um agente de neutralização. Além disso, o efeito sobre a eficácia de 10 fermentações sucessivas, utilizando o mesmo levedura. Finalmente, a fermentação foi escalado em um reactor tubular, de 40 L, com agitação mecânica e os parâmetros cinéticos foram determinados a partir de levedura. As condições ideais foram: pH 5,5 usando ácido cítrico como um neutralizador, 23,8 g/L de levedura 14,5°Brix. A eficiência foi entre 82-84% e o pH ótimo entre 5,5 e 6,0 de floculação. A concentração de etanol obtido nas melhores condições foi de 7,5%. Estes resultados demonstram a levedura como a metodologia utilizada, têm as características certas e desejado desenvolver um processo de instalação piloto para a produção de etanol a partir da rejeição de banana.*

## INTRODUCCION

Colombia es el segundo país productor de etanol en América Latina, después de Brasil, produciendo aproximadamente 1.050.000 L/día [1] a partir de caña de azúcar.

Es posible utilizar el banano no apto para exportación (banano de rechazo) y que no es consumido por el mercado nacional, en la producción de etanol. Este sustrato posee tres características fundamentales: La fruta está concentrada en las empacadoras, alto contenido de carbohidratos (22-28%) en peso húmedo [2] y su volumen de producción que actualmente alcanza las 116.000 ton/año. Estudios previos en laboratorio, han demostrado que a partir del jugo banano maduro es posible obtener fermentos con alto contenido alcohólico, utilizando levaduras comerciales [3]. Para mejorar el proceso fermentativo, se utilizan levaduras aisladas del medio, con características deseadas, como la propiedad de floculación [4].

## PALABRAS CLAVES:

Fermentación, Jugo, Cinética, Comparación.

## KEYWORDS:

Fermentation, Juice, Isolation, Characterization

## PALAVRAS CHAVE:

Comparação, Cinética, Fermentação, Suco.

La floculación en levaduras es un proceso reversible, asexual y dependiente de calcio, en el cual las células se adhieren para formar floculos consistentes en miles de células [5]. Estas levaduras han sido utilizadas para facilitar la recuperación de la biomasa de los productos de fermentación, a bajo costo [6] y sin pérdidas de viabilidad y vitalidad. Además se obtienen ventajas operativas que reducen los gastos energéticos y la compra de equipos. Por ejemplo, incrementando las densidades celulares dentro de los reactores para reducir los tiempos de proceso, eliminando el uso de centrifugas en el reciclaje levaduras para fermentaciones sucesivas (sistema "Melle-Boinot") y prescindiendo de agentes inmovilizadores para retener y proteger las levaduras dentro del reactor.

Se han empleado las levaduras floculantes para producir alcohol, por ejemplo, a partir de remolacha azucarera usando sacarificación secuencial o simultánea y comparando el rendimiento por el obtenido con levaduras no floculantes [7]. También, Fermentaciones continuas, utilizando vinazas recirculadas para determinar su efecto sobre el rendimiento [8], hidrolizados enzimáticos de residuos de cocina [9], melazas no tratadas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [10], medios sintéticos con glucosa [11], hidrolizados enzimáticos de cassava [12].

El presente trabajo significó el aislamiento y caracterización de una cepa floculante de *Saccharomyces cerevisiae* (LEG-06), obtenida de fermentaciones espontáneas con características deseadas para la fermentación eficiente y sucesiva de jugo de banano. Esta cepa fue comparada con levaduras comerciales, caracterizada bioquímicamente y evaluada de acuerdo a la capacidad para fermentar el jugo a diferente pH y con diferentes agentes neutralizantes. Posteriormente se evaluó el efecto de diez fermentaciones sucesivas sobre la eficiencia, viabilidad y capacidad de floculación sin ajuste de pH. Finalmente, bajo condiciones óptimas de fermentación, se establecieron los parámetros cinéticos, el pH óptimo de floculación a escala de 40 L.

## MÉTODO

### Análisis cuantitativo

La cuantificación del etanol se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N, con detector FID, H<sub>2</sub> como gas de arrastre, columna carbowax 20 M de 50 m de longitud; la metodología fue la siguiente: 50°C durante 1 minuto, calentamiento a 20°C/min

hasta 150°C, y estabilización por 2 minutos, rampa a 30°C/min hasta 200°C y estabilización por 1 minuto. La concentración celular fue determinada por turbidimetría, por diluciones adecuadas de una alícuota de suspensiones de células, con agua destilada estéril, hasta obtener una densidad óptica no superior a 0,60 de Absorbancia (donde se encuentra linealidad entre la densidad óptica y la concentración celular) a 700 nm. La Absorbancia fue convertida a peso seco usando curvas de calibración. Los Carbohidratos totales fueron cuantificados por reacción con el reactivo de antrona, la absorbancia del complejo fue medida a 625 nm y la concentración se determina por interpolación en la curva de calibración.

La determinación de sólidos solubles reportados como °Brix en el medio de fermentación fue realizada por medición directa en refractómetro óptico (Marca: American Optical ABBE). La viabilidad celular fue determinada a través de la técnica de reducción de azul de metileno [13, 14]. Este método se basa en que las células vivas reducen el colorante azul de metileno a azul leucometileno, tornándose incoloras. Las células muertas no presentan esa capacidad y continúan azules cuando son observadas al microscopio. La viabilidad fue calculada siguiendo la ecuación:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \left( \frac{\text{número de células vivas}}{\text{número de células totales}} \right) * 100. \quad (\text{Ec. 1})$$

### Medios de Crecimiento y fermentación

**Medio de aislamiento.** Agar saboreau conteniendo en g L<sup>-1</sup>, Dextrosa 40,0, Peptona de Caseína 5,0, digerido Pancreático de Tejido Animal 5,0, Agar Bacteriológico 15,0, pH 5,6 ± 0,2. **Medio de pre-inoculación.** YPD líquido, conteniendo en (g L<sup>-1</sup>): glucosa 20,0; peptona 20,0; extracto de levadura 10,0. **Medio de crecimiento para inoculación de las fermentaciones.** Bananos sometidos a hidrólisis endógena, fueron molidos enteros y mezclados con una solución acuosa al 10% (p/v) de Ca(OH)<sub>2</sub> a 80°C, para aglomerar los sólidos y extraer los azúcares fermentables. El volumen de la solución corresponde al 10% del peso de bananos utilizados. Después de 15 minutos, se procedió a la filtración, neutralización con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado hasta pH 5,5, esterilización a 121°C durante 15 minutos en autoclave y finalmente filtración. Este medio fue suplementado con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5,0 g L<sup>-1</sup> en relación al N) como fuente de Nitrógeno, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2 g L<sup>-1</sup>) como fuente de Fósforo, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1 g L<sup>-1</sup>) como fuente de Magnesio. **Medio de fer-**

**mentación.** El jugo de banano obtenido anteriormente sin suplementar nutrientes

### Microorganismos

Fueron utilizadas levaduras de diferentes fuentes: Levadura floculante aislada de fermentaciones espontáneas de jugos de banano a pH inicial de 3,5, usando el método de siembra por agotamiento sobre Agar saboreau. Levaduras comerciales secas para la producción de etanol Ethanol-Red®, marca Fermentis (nombrada, Comercial 1) y de panadería, marca Mauripan® (nombrada, Comercial 2). Levadura comercial marca Mauripan y utilizada en varias fermentaciones con jugo de banano antes de las pruebas (nombrada, Comercial adaptada).

### Selección y caracterización de levadura floculante

**Selección.** Las levaduras aisladas (en agar saboreau), de las fermentaciones espontáneas de banano a pH 3,5, fueron sembradas individualmente en tubos de ensayo conteniendo medio YPD líquido, en buffer citrato a pH 6,0. Después de 72 horas a 30°C, los tubos fueron agitados fuertemente hasta la visualización de floculos [15, 16].

**Comparación con levaduras comerciales.** Para todos los ensayos, las levaduras usadas (levadura floculante, Comercial 1, Comercial 2, Comercial adaptada), fueron propagadas en jugo de banano suplementado, agitados y aireados durante 48 horas, recolectadas en plena fase exponencial con una viabilidad superior al 98%, centrifugadas y lavadas dos veces con agua destilada.

Se realizaron micro fermentaciones en recipientes cilíndricos de vidrio de 110 mL de capacidad (acoplados a trampas de agua), donde se depositaron 70 mL del jugo de banano clarificado y esterilizado, sin suplementar. Los jugos de banano a 13 °Brix y pH 5,5 se inocularon con cada una de las levaduras por triplicado, a una concentración aproximada de 4 g L<sup>-1</sup>. La fermentación se llevó a cabo por 48 horas en agitador orbital a 125 rpm. Tanto al inicio como al final de la fermentación se determinó la concentración celular, % v/v de etanol, concentración de azúcares totales, °Brix.

**Caracterización bioquímica de LEG-06.** Se empleó la galería API 20C AUX®, constituida por 20 cúpulas que contienen 19 sustratos deshidratados para ensayos de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semi-agar. La lectura se realizó a las 24 y 48

horas después de inoculación. Para la identificación se empleó la base de datos proporcionada por el proveedor. También se realizaron pruebas de crecimiento sobre Nitrato, Urea y Lisina. Además de la determinación de la morfología celular.

**Efecto del pH sobre fermentación.** El jugo de banano a 16 Brix, fue ajustado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a diferentes pH (6,0, 5,5, 5,2, 4,6, 4,2).

La concentración de levadura LEG-06 inicial fue 5 g L<sup>-1</sup>. El tiempo de fermentación fue de 48 horas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

**Efecto del agente neutralizante y suplemento.** El jugo de banano encalado (adición de Ca(OH)<sub>2</sub>) fue neutralizado con diferentes agentes: Acido Sulfúrico y Acido Cítrico hasta pH 5,5 y con CO<sub>2</sub> a pH 6,8, para determinar el efecto del neutralizante sobre la concentración final de etanol. Además, se evaluó el efecto conjunto de todos los agentes neutralizantes con la adición de urea a 0,5 g L<sup>-1</sup>. Los experimentos fueron realizados por triplicado. La biomasa inicial fue a 5 g L<sup>-1</sup>. El tiempo de fermentación fue de 48 horas.

**Efecto de fermentaciones sucesivas.** Se desarrollaron 10 fermentaciones sucesivas, utilizando concentraciones de levadura a 20 g L<sup>-1</sup>, por duplicado, de la siguiente forma: La agitación fue parada después de completar la primera fermentación en bache y el fermento fue mantenido quieto por 60 minutos para esperar la separación de las levaduras floculantes. Entonces la fase líquida fue decantada y el reactor era cargado con un volumen igual de jugo de banano para arrancar la siguiente fermentación. El fermento extraído era utilizado para la cuantificación de etanol, la viabilidad y % de floculación de las levaduras. Para el siguiente ciclo fermentativo generalmente fue necesario extraer levaduras del recipiente para obtener la concentración de inóculo deseado.

### Fermentaciones de 40 L

**Cinética de la Fermentación con LEG-06.** El Jugo de banano a 14,5 Brix, pH 5,5, fue inoculado con 4,0 g/L de levadura. Se tomaron muestras de 2 mL cada 2 horas durante 24 horas. El experimento se realizó por duplicado.

Las fermentaciones se realizaron en un reactor tubular de 50 L de capacidad, equipado con agitador rotatorio, chaqueta para calentamiento y enfriamiento.

to, dotado con medidores en línea de pH, oxígeno disuelto y temperatura.

**Parámetros cinéticos.** La concentración celular producida de acuerdo a la siguiente ecuación:  $X = X_f - X_0$ , donde X = Concentración celular producida, (g L<sup>-1</sup> de materia seca);  $X_f$  = Concentración celular final (g L<sup>-1</sup> de materia seca);  $X_0$  = Concentración celular inicial (g L<sup>-1</sup> de materia seca); Porcentaje de células producidas  $X\% = (X/X_f) \cdot 100$ ; Consumo de azúcar :  $S = (S_0 - S_f)$ , donde: S = azúcar usado (g L<sup>-1</sup> de carbohidratos totales);  $S_f$  = Concentración final de azúcares (g L<sup>-1</sup> de carbohidratos totales);  $S_0$  = Concentración inicial de azúcares (g L<sup>-1</sup> de carbohidratos totales); Factor de conversión para el sustrato a biomasa:  $Y_{x/s} = X/S$ ; Etanol producido:  $P = P_f - P_i$ , donde: P = Etanol producido (g L<sup>-1</sup>);  $P_f$  = Concentración final de etanol (g L<sup>-1</sup>);  $P_i$  = Concentración inicial de etanol (g L<sup>-1</sup>); Factor de conversión para el sustrato a etanol:  $Y_{p/s} = P/S$ ; Productividad de etanol:  $PR = P/t$  (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), t = Periodo de fermentación (h); Eficiencia de la fermentación basado en el rendimiento teórico obtenido de la ecuación de Gay-Lussac (51,1 g de etanol por 100 g de glucosa).  $\eta_p(\%) = (Y_{p/s} / 0,511) \cdot 100$ . Adicionalmente se calculó la relación de (g/L) de etanol producido/ (g/L) de biomasa \* hora.

**Rango de pH de la floculación en el fermento.** Terminada la fermentación del numeral 4.3.3. las levaduras suspendidas en el fermento fueron distribuidas en 7 recipientes que fueron ajustados pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 con NaOH concentrado. Cada recipiente fue colocado en agitación a 400 rpm durante 10 minutos y posteriormente dejadas en reposo por otros 10 minutos. Transcurrido éste tiempo, se tomaron alícuotas de 0,2 mL a 0,5 cm por debajo del tope del líquido. Los 0,2 mL de muestras fueron diluidos con 0,8 mL de solución EDTA 25 mM y 1,0 mL de agua destilada, para eliminar los floculos. Finalmente, se leyeron las Absorbancias a 700 nm para determinar la concentración de células en suspensión en cada recipiente. Se construyó una curva donde se relaciona el % de células floculadas (% de células en suspensión – 100) vs pH.

## RESULTADOS

### Aislamiento de levaduras

Fueron analizados 20 aislados de la fermentación espontánea del jugo de banano y solo uno de ellos dio prueba positiva de floculación. Este aislado fue deno-

minado LEG-06. Las levaduras provenientes de otras fuentes habían sido reportadas como no floculantes.

### Caracterización de levadura LEG-06

La caracterización Morfológica y Bioquímica arrojó los siguientes resultados: células ovaladas, redondeadas. textura cremosa, superficie lisa y brillante, bordes lobulados. Crecimiento en Nitrato (-), Prueba de Ureasa (+). Formación de ascosporas (+), Test agar lisina (-). (Cuadro 1).

Mediante el test de consumo de diferentes fuentes de Carbono, se determinó que la cepa LEG-06 es *Saccharomyces cerevisiae* con un 98,7% de probabilidad.

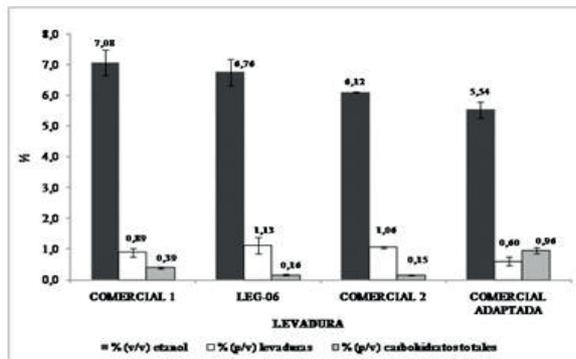
### Comparación de levaduras

El análisis ANOVA, determinó que hay diferencias estadísticamente significantes El P-valor (<0,05) para las concentraciones de etanol producido, concentración celular y azúcares residuales, entre las levaduras (figura 1). Con un nivel de confianza del 95%. Con el test de rango múltiple por el método LSD, se pudieron identificar tres grupos homogéneos con respecto a la producción de alcohol: Grupo 1: Comercial 1 y LEG-06 que producen la mayor concentración de alcohol (7,08 y 6,76 % v/v de alcohol respectivamente); Grupo 2: Comercial 2 y Grupo 3: Comercial adaptada

**Cuadro 1.** Ensayos de asimilación de sustrato.

Sustrato		Sustrato	
D-Glucosa	+	N-Acetil-Glucosamina	-
Glicerol	-	D-Celobiosa	-
D-Sorbitol	-	D-Lactosa	-
L-Arabinosa	-	D-Maltosa	+
D-Xilosa	-	D-Sacarosa	+
Adonitol	-	D-Trehalosa	-
Xilitol	-	D-Melezitosa	-
D-Galactosa	+	D-Rafinosa	+
Inositol	-	Lisina	-
2-ceto-Gluconato cálcico	-	Metil- $\alpha$ -D-Glucopiranosido	-
Ureasa	+		

Figura 1. Comparación de levaduras.



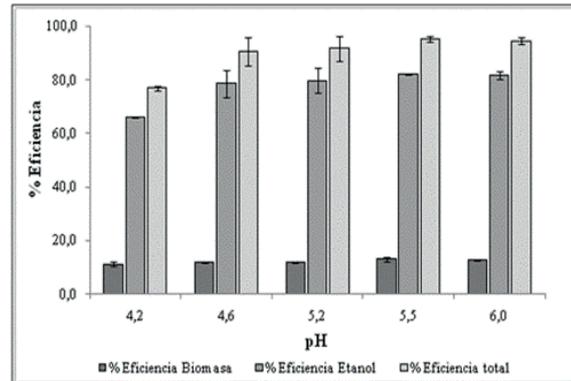
Bajo el mismo test, se pudieron identificar 3 grupos homogéneos con respecto al crecimiento celular. Nuevamente la cepa LEG-06 hace parte del grupo con mayor producción junto a Comercial 2 (1,13 y 1,06 % (p/v) de biomasa en peso seco). Esta producción de biomasa es conveniente si se tiene en cuenta su valor agregado como proteína unicelular.

Aunque la cepa LEG-06 ocupa el segundo lugar con respecto a la producción de etanol después de comercial 1, presenta dos características fundamentales: Permite tener independencia con respecto al suministro del inoculo y además de separarse fácilmente del fermento debido a su capacidad de floculación. Por tanto, analizando los anteriores resultados, se tomó la decisión de usar la cepa LEG-06 para los siguientes ensayos.

### Efecto del pH sobre la fermentación

En la determinación del efecto del pH sobre las fermentaciones con LEG-06 (figura 2), el análisis ANOVA, indica que hay diferencias estadísticamente significantes entre la concentración de etanol final de un valor de pH y otro (P-valor es < 0,05). Con un nivel de confianza del 95%. El test de rango múltiple por el método LSD indica las fermentaciones realizadas a pH inicial de 4,2, presentan las menores concentraciones de etanol final con eficiencias cercanas al 68%. Los demás tratamientos forman un grupo homogéneo, con eficiencias entre el 80 y 83%. Por lo tanto el rango óptimo de la fermentación con la levadura LEG-06 ubicado entre los pH 4,6 y 6,0. No hay diferencias estadísticamente significantes (P-valor > 0,05), en la producción de biomasa entre los tratamientos. El pH utilizado en los siguientes experimentos fue 5,5.

Figura 2. Efecto del pH.



### Efecto del agente neutralizante y el suplemento

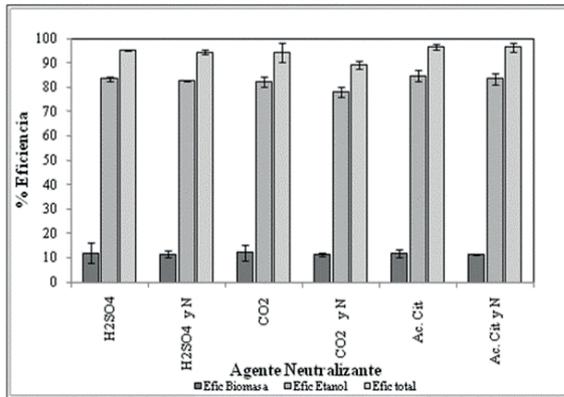
En la determinación del efecto del agente neutralizante y el suplemento (figura 3), se presenta que, El P-valor del F-test es menor que 0,05, por tanto, hay una diferencia estadísticamente significativa entre la medida "eficiencia etanol" desde un nivel de neutralizante a otro a un nivel de confianza del 95,0%. El agente neutralizante CO<sub>2</sub> con la adición de Urea presenta las menores eficiencias de fermentación (78%). Los restantes tratamientos forman un grupo homogéneo y sus eficiencias varían entre 81 y 84%. El P-valor del test F es más grande que 0,05, No hay diferencias estadísticamente significantes entre la medida "Eficiencia Biomasa" de un nivel de "Neutralizante" a otro, con un nivel del 95,0% de confianza. La adición de N (0,5 g/L) en forma de Urea, no aumentó la eficiencia de la fermentación en ninguno de los tratamientos.

### Efecto de las fermentaciones sucesivas

Se utilizaron los neutralizantes CO<sub>2</sub> y Acido cítrico, como alternativas al H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que tiene restricciones comerciales y además produce altas concentraciones de H<sub>2</sub>S durante la metanogénesis de las vinazas. El CO<sub>2</sub>, es producido durante la fermentación y no tiene costo, pero el pH final del jugo neutralizado es de 6,8, por la formación de un buffer de carbonatos, que podría favorecer la contaminación bacteriana. El Acido cítrico es de fácil adquisición y el Citrato de calcio formado en la neutralización tiene valor comercial para la alimentación humana o animal.

Durante los diez ciclos no hubo reducción significativa de la eficiencia, pérdida de viabilidad, aunque la floculación se no fue rápida (60 minutos) porque no se ajustó el pH. Los valores en términos de eficiencia

**Figura 3.** Efecto del agente neutralizante.



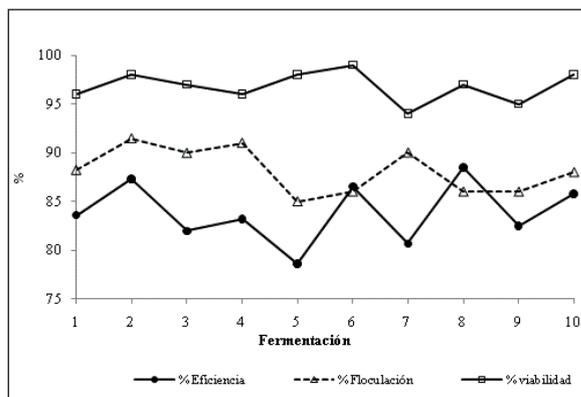
de la fermentación fluctuaron entre un mínimo de 79% y un máximo de 89%. La viabilidad durante todos los experimentos no se redujo más del 94%. El porcentaje de floculación se redujo durante las últimas fermentaciones a cerca del 80% (figura 4).

### Fermentaciones a nivel de 40 L

Cinética de la fermentación. A partir de la cinética de fermentación realizada por duplicado a 40 L (figura 5) se obtuvieron los parámetros cinéticos del cuadro 2. Las productividades mayores a 1 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, son valores normales para un sistema en batch. Para sistemas continuos las productividades pueden alcanzar 10 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> o más.

En procesos industriales, un valor de  $\mu_{max}$  es útil para la comparación del desempeño de una cepa en relación con otra; es deseable que el valor de éste parámetro quede en torno a 0,50 h<sup>-1</sup>, el cual es considerado satisfactorio para la fermentación [17]. En los anteriores

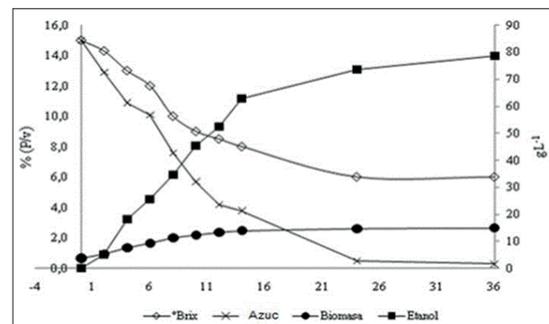
**Figura 4.** Efecto de las Fermentaciones sucesivas.



experimentos no se determinó el valor de  $\mu$  a diferentes concentraciones de sustrato, solo en los rangos de trabajo, por lo que el valor obtenido es más bajo.

**Floculación.** De acuerdo a la figura 6, se puede concluir que existe un rango óptimo de floculación en

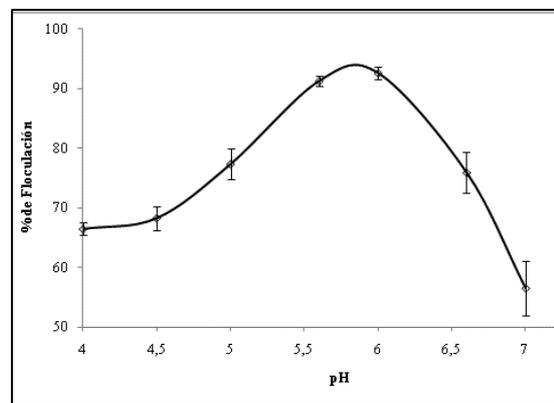
**Figura 5.** Cinética de la fermentación a 40 L.



**Cuadro 2.** Parámetros cinéticos de levadura LEG-06.

Parámetros	LEG-06		Unidad
t	36	30	h
X <sub>0</sub>	3,8	5,1	g L <sup>-1</sup>
X <sub>f</sub>	15,0	17,3	g L <sup>-1</sup>
X%	74,7	70,8	%
S	147	146	g L <sup>-1</sup>
Y <sub>x/s</sub>	0,076	0,084	
P	62,8	60,8	g L <sup>-1</sup>
Y <sub>p/s</sub>	0,43	0,42	
$\eta_{p(\%)}$	83,6	81,5	%
$\mu$	0,28	0,25	h <sup>-1</sup>
Productividad	1,74	2,03	g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

**Figura 6.** Determinación del pH óptimo de floculación.



el fermento en el pH comprendido entre 5,5 y 6,0. Que es un rango muy estrecho, a diferencia de los encontrados con levaduras floculadas en medios de crecimiento [15], lo que hace pensar sobre el efecto de las sales u otro tipo de sustancias en el fermento en la floculación.

## CONCLUSIONES

Fue aislada una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (llamada LEG-06) de las fermentaciones espontáneas de banano con características floculantes deseadas

La cepa LEG-06 fue comparada con cepas comerciales para determinar su capacidad para producir alcohol.

Fueron determinados los efectos del pH y agente neutralizante sobre la eficiencia de la fermentación.

La floculación de la levadura LEG-06 puede ser utilizada a nivel industrial en fermentaciones sucesivas, usando altas concentraciones de celulares para disminuir los tiempos de fermentación y manipulando los rangos pH óptimo durante la floculación.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Colciencias por la financiación de éste estudio.

## REFERENCIAS

- [1] FEDECOMBUSTIBLES. Federación Nacional de Biocombustibles [online]. 2013. Available: [http://www.fedebiocombustibles.com/files/Cifras%20Informativas%20del%20Sector%20Biocombustibles%20-%20ETANOL\(52\).pdf](http://www.fedebiocombustibles.com/files/Cifras%20Informativas%20del%20Sector%20Biocombustibles%20-%20ETANOL(52).pdf) [citado 6 de Diciembre 2013].
- [2] AUROREA, G. and FAHRASMANEB, L. Bananas, raw materials for making processed food products. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 2009, p. 78-91.
- [3] HAMMOND, J.B., DIGGINS, D. and COBLE, C.G. Alcohol From Bananas. *Bioresource Technology*, 56, 1996, p. 125-130.
- [4] XIN-QING, Z., QIAN, L., LEI-YU, H., FAN, L., WEN-WEN, Q. and FENG-WU, B. Exploration of a natural reservoir of flocculating genes from various *Saccharomyces cerevisiae* strains and improved ethanol fermentation using stable genetically engineered flocculating yeast strains. *Process Biochemistry*, 47, 2012, p. 1612-1619.
- [5] STRATFORD, M. Yeast flocculation: calcium specificity. *Yeast*, 5, 1989, p. 487-496.
- [6] VERSTREPEN, K.J. and KLIS, F.M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*, 60(1), 2006, p. 5-15.
- [7] ZHANG, N., GREEN, S., GE, X., SAVARY, B. and XU, J. Ethanol fermentation of energy beets by self-flocculating and non-flocculating yeast. *Bioresource Technology*, 155, 2014, p. 189-197.
- [8] ZI, L.H., LIU, C.G., XIN, C.B., and BAI, F.W. Stillage backset and its impact on ethanol fermentation by the flocculating yeast. *Process Biochemistry*, 48, 2013, p. 753-758.
- [9] TANGA, Y., LIUA, K., ANA, M., MORIMURA, S., WUC, X. and KIDAA, K. Ethanol production from kitchen waste using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7. *Biomass and Bioenergy*, 32, 2008, p. 1037-1045.
- [10] YUE-QIN, T., MING-ZHE, A., YA-LING, Z., MORIMURA, S., XIAO-LEI, W. and KENJI, K. Continuous ethanol fermentation from non-sulfuric acid-washed molasses using traditional stirred tank reactors and the flocculating yeast strain KF-7. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(1), 2010, p. 41-46.
- [11] ANDRIETTA S.R. Seleção de leveduras floculantes para uso em reatores (tipo torre) fluidizados na produção de etanol. Campinas (Brasil): Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA, Divisão de Biotecnologia e Processos, 2004, p. 2-15.
- [12] CHOI, G.W. and MOON, S.K. Repeated-batch fermentation using flocculent hybrid, *Saccharomyces cerevisiae* CHFY0321 for efficient production of bioethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 2009, p. 261-269.
- [13] YOSHIDA, N., MINAMIMURA, T., YOSHIDA, T. and OGAWA, K. Effect of hypergravitational stress on microbial cell viability. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88, 1999, p. 342-344.
- [14] MORENO, A., IBARRA, D., BALLESTEROS, I., GONZÁLEZ, A. and BALLESTEROS, M. Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase. *Bioresource Technology*, 135, 2013, p. 239-245.

- [15] STRATFORD, M. Induction of flocculation in brewing yeasts by change in pH value. *FEMS Microbiology Letters*, 136, 1996, p. 13-18.
- [16] MONDAL, S., LEONG, Y., LIOW, J., and WICKRAMASINGHE, S. Flocculation of yeast suspensions by a cationic flocculant. *Powder Technology*, 235, 2013, p. 426-430.
- [17] STEKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas [Tese de doutorado]. Campinas (Brasil): Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2001, 215 p.