

INFORME DE PASANTÍA REALIZADA EN LA PLANTA DE DESTILERIA DEL
INGENIO DEL CAUCA (INCAUCA S.A.S)

Angie Natalia Suarez Quintana

PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS



UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
PAMPLONA, Diciembre 16 del 2019

INFORME DE PASANTÍA REALIZADA EN LA PLANTA DE DESTILERIA DEL
INGENIO DEL CAUCA (INCAUCA S.A.S)

Angie Natalia Suarez Quintana

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
MICROBIOLOGO

Director: Yesid Fabián Acevedo Granados
Microbiólogo

PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
PAMPLONA, Diciembre 16 del 2019

Nota de aceptación:

Firma del Primer Jurado

Firma del Segundo Jurado

Pamplona (Norte de Santander - Colombia), Diciembre 2019

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	9
1. OBJETIVOS	10
1.1 OBJETIVO GENERAL	10
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	10
2. MARCO TEORICO	11
2.1 ANTECEDENTES	11
3. ESTADO ACTUAL	12
3.1 BIOCOMBUSTIBLES.....	12
3.1.1 ETANOL ANHIDRO DESNATURALIZADO	13
3.1.2 PROCESO DE OBTENCIÓN DEL ETANOL A PARTIR DE LA CAÑA DE AZUCAR.	14
3.2 FERMENTACIÓN	15
3.2.1 METABOLISMO DE LA LEVADURA	19
3.2.2. CONDICIONES A CONTROLAR EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN	22
3.2.2.1CONTAMINACIÓN MICROBIANA.....	22
3.2.2.2LEVADURA SALVAJE.....	23
3.3BACTERIOFAGOS COMO HERRAMIENTAS ANTIMICROBIANAS.....	24
3.3.1 MECANISMO DE INFECCIÓN DE LOS FAGOS.....	25
3.3.2IMPACTO EN LA FERMENTACIÓN	26
4. METODOLOGIA	28
4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	28
4.2 ANALISIS DE ACIDO LACTICO	28
4.3. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LA LEVADURA	28
4.4 EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL TREN FERMENTATIVO (R311-R312-R313- R314-R315-L124-L347).....	29
4.5. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA UTILIZADA EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN, MEDIANTE EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA.....	30
4.6 DETECCIÓN DE BACTERIÓFAGOS.....	30
4.6.1 DETECCIÓN DEL BACTERIÓFAGO POR EL MÉTODO DE DOBLE CAPA.	31
4.6.2 DETECCIÓN DEL BACTERIÓFAGO POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN.....	31

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y VIABILIDAD DE LA LEVADURA.....	33
6.2 EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS PRINCIPALES REACTORES.....	35
6.2.2 PERFIL MICROBIOLÓGICO DEL PROPAGADOR 305	36
6.2.3 PERFIL MICROBIOLÓGICO DE LA MEZCLA 124	38
6.2.4. PERFIL MICROBIOLÓGICO DE LA MEZCLA 347.....	39
6.2.5 PERFIL MICROBIOLÓGICO DE LA VINAZA DEL 311.....	40
6.2.6 PERFIL MICROBIOLÓGICO DEL TREN FERMENTATIVO.....	42
7. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA	44
8. AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS	46
9. CONCLUSIONES.....	55
10. RECOMENDACIONES.....	56
11. BIBLIOGRAFIA	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Producción de alcohol carburante	14
Tabla 2. Resumen de los análisis llevados a cabo en el laboratorio de microbiología en la destilería del ingenio INCAUCA.....	29
Tabla 3. Comparativo de ácido láctico vs levaduras.	34
Tabla 4. Informe de propagador 304	36
Tabla 5. Informe propagador 305.....	36
Tabla 6. Informe de la mezcla 124.....	38
Tabla 7. Informe de la mezcla 347.....	39
Tabla 8. Informe de vinaza del 311.....	40
Tabla 9. informe microbiológico del tren fermentativo.....	42
Tabla 10. Informe de determinación microbiológica del agua	44
Tabla 11. Descripción macroscópica de las colonias	47
Tabla 12. Resultados del método de doble capa	48
Tabla 13. Resultados del método de difusión en pozo.....	48

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1. Determinación de ácido láctico.....	33
Grafica 2. Comparativo Ácido Láctico Vs Viabilidad De Las Levaduras	35
Grafica 3. Comparativo mes R-305.	37
Grafica 4. Comparativo mes de lodos T-124.	38
Grafica 5. Comparativo mes de lodos T-347	39
Grafica 6. Comparativo mes vinaza 311	41
Grafica 7. Resultados del tren fermentativo del mes de octubre	43
Grafica 8. Comparativo de filtración por membrana.	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones Químicas para la obtención de etanol.....	16
Figura 2. Esquema de Fermentación Continua en la producción de etanol	17
Figura 3. Esquema de fermentación en lotes alimentados en la producción de etanol (López, M. et al, 2016).....	17
Figura 4. Flujograma Del Proceso De Fermentación.....	18
Figura 5. Visualización De Conteo En Placa De Neubauer	20
Figura 6. Fermentación del etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figura 7. Visualización en Cámara De Neubauer de Levadura Salvaje Muerta	24
Figura 8. Muestra del último reactor dilución 10^{-2}	46
Figura 9. Método de doble capa, ensayo 1, aislamiento 1	49
Figura 10. Método de doble capa, ensayo 1, aislamiento 2.....	49
Figura 11. Método de doble capa, ensayo 2, aislamiento 1	50
Figura 12. Método de doble capa, ensayo 2, aislamiento 2.....	50
Figura 13. Método de difusión, ensayo 3, aislamiento 1	51
Figura 14. Método de difusión, ensayo 3, aislamiento 2	51
Figura 15. Método de difusión, ensayo 4, aislamiento 1	52
Figura 16. Sistema de bloqueo del ADN del fago a la célula huésped	54

INTRODUCCIÓN

El calentamiento global y el agotamiento de los recursos energéticos no renovables han recibido una atención generalizada en las últimas décadas. La comprensión de la necesidad de mitigar y adaptarse a los cambios actuales en el mundo ha llevado a desarrollar e implementar alternativas de combustible sostenibles o también llamados biocombustibles, dentro de los cuales encontramos el etanol anhidro desnaturalizado, siendo este producto benéfico para el medio ambiente debido a que disminuye la dependencia del petróleo y al ser oxigenante, mejora el octanaje de las gasolinas de manera considerable, ayudando a disminuir la contaminación de las ciudades y a reducir los gases causantes del calentamiento global.

El alcohol anhidrido también llamado alcohol etílico, con fórmula C_2H_5-OH , es un compuesto inflamable incoloro y con olor característico de los alcoholes, producido por la fermentación de levaduras. Su producción empezó el 3 de octubre de 2005, gracias a las leyes 693 de 2001 llamada ley del etanol carburante y la ley 939 de 2004 o ley del biodiesel, normativa que le dio vida a los biocombustibles en Colombia.

Según las estadísticas presentadas por Fede-Biocombustibles a nivel de Colombia, nos afirman que siete ingenios producen alcohol carburante, alrededor de los 100.000 a 500.000 L/ día, también nos muestra un crecimiento en la demanda en los últimos tres años de aproximadamente un 22 %, con estas estadísticas Colombia es el segundo productor de etanol en América del Sur, después de Brasil.

En el ingenio INCAUCA S.A.S este proceso se lleva a cabo mediante una fermentación continua de cinco reactores que trabajan en serie, donde se desarrollan reacciones químicas que transforman el azúcar en etanol y gas carbónico. Al tratarse de un proceso continuo con recirculación de vinaza los problemas de contaminación bacteriana son más agudos y las condiciones de estrés para la levadura son más altas debido a la acumulación de ácido láctico y ácido acético productos principalmente del metabolismo bacteriano.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Realizar un seguimiento microbiológico a los reactores principales de la planta de destilería del Ingenio del Cauca (INCAUCA S.A.S).

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar de manera eficiente la contaminación microbiana y la viabilidad de la levadura mediante el análisis del ácido láctico realizado al tren fermentativo (R 311- R 314)
- Evaluar la calidad microbiológica de los diferentes reactores en la planta de destilería mediante los métodos de placa profunda y superficie.
- Identificar fagos (calvas) mediante características macroscópicas de acuerdo a su actividad lítica a partir de jugo de caña de primera extracción específicos para bacterias ácido lácticas.

2. MARCO TEORICO

2.1 ANTECEDENTES

Ingenio del Cauca S.A.S., fue fundado el 29 de julio de 1963 y es el más grande ingenio de Colombia. Se encuentra ubicado en El Ortigal, departamento del Cauca, a 50 Km de Cali y 134 Km de Popayán, capital del departamento del Cauca.

Desde 1982 ocupa el primer lugar en molienda de caña de azúcar en Colombia. Posee una capacidad instalada de 17,000 toneladas de caña por día. Elaborando azúcar blanco, extrafino/refinado y morena. Adicional a esto, produce alcohol carburante, energía eléctrica y compost. En 2005 puso en funcionamiento una planta de alcohol carburante, con capacidad para producir 300,000 litros diarios. Su capacidad instalada fue ampliada en 2013, a 350,000 litros diarios. Esta iniciativa se dio gracias a que el Congreso Nacional de Colombia, decreta la Ley 693 de 2001 (septiembre 19) Por la cual se dictan normas sobre el uso de alcoholes carburantes, y a su vez se crean estímulos para su producción, comercialización y consumo, y se dictan otras disposiciones (Congreso de Colombia,2001).

Este producto al no ser un alimento, no presenta normatividad que establezca los rangos microbiológicos máximos permitidos en la fermentación, por lo tanto, en INCAUCA S.A.S, para controlar dicha contaminación se realizan estudios microbiológicos diarios los cuales se rigen por parámetros internos que se han establecido por estudios anteriores, ya que no hay normativa para estos casos (INCAUCA S.A. 2019)

3. ESTADO ACTUAL

3.1 BIOCOMBUSTIBLES

Hasta el inicio de la revolución industrial, la biomasa era la fuente más importante de energía para la humanidad. Sin embargo, a medida que se masificó el uso de combustibles fósiles, el aprovechamiento del potencial energético de la biomasa fue disminuyendo progresivamente. Debido a que cada vez son más evidentes los daños que causan al planeta las emisiones de los vehículos producto del consumo masivo de combustibles derivados del petróleo, como la gasolina y el diésel (Cardona Alzate, 2009), teniendo en cuenta esta problemática creciente surge una solución renovable que la constituye el uso de la energía solar en forma de biomasa (bioenergía), representada por los materiales lignocelulósicos y los cultivos ricos en energía que constituyen una solución para los combustibles de transporte “tradicionales”. Una de las principales características de los biocombustibles, que los diferencia enormemente de los combustibles derivados del petróleo, es que además de ser renovables se pueden convertir en una fuente “inagotable” de energía, esta característica permite que, en países con un nivel de desarrollo bajo y una gran biodiversidad, los biocombustibles se puedan observar como una fuente de progreso que contribuya a la seguridad energética del país (Valle & Valle, 2004)

Actualmente el biocombustible más importante es el etanol, producto renovable obtenido a partir de la caña de azúcar. El etanol carburante es utilizado para oxigenar la gasolina, permitiendo una mejor oxidación de los hidrocarburos y reduciendo las emisiones de monóxido de carbono, compuestos aromáticos y compuestos orgánicos volátiles a la atmósfera. El uso de alcohol etílico como combustible no genera una emisión neta de CO₂ sobre el ambiente debido a que el CO₂ producido en los motores durante la combustión y durante su proceso de obtención, es nuevamente fijado por la biomasa mediante el proceso de fotosíntesis (Cardona Alzate, 2009). Para obtener de dicho producto es necesario la extracción del jugo de caña, rico en azúcares, lo cual permite ser más asimilable por las levaduras durante la fermentación, del caldo resultante de la fermentación debe separarse la biomasa, para dar paso a la concentración del etanol mediante diferentes operaciones unitarias y su posterior deshidratación, forma en que es utilizado como aditivo oxigenante (Montoya, M. I., Quintero, J. A., Sánchez O, J., & Cardona, C. A. 2006).

3.1.1 ETANOL ANHIDRO DESNATURALIZADO

El etanol anhidro desnaturalizado o también conocido como alcohol carburante es un compuesto orgánico e incoloro, que presenta moléculas de carbono, hidrógeno y oxígeno, con un grupo hidroxilo unido a un radical alquilo como su principal característica química, es altamente inflamable y con alta viabilidad debido a la presión de vapor más baja que la gasolina, lo que resulta en una reducción de las emisiones por evaporación (Brexó & Sant'Ana, 2017). El uso de biocombustibles líquidos como combustibles de sustitución surgió en 1936 en Francia. En 1975 Brasil lanzó el programa denominado Proalcool, surgiendo como alternativa a la crisis energética, el cual es una mezcla llamada gasohol (10 % de etanol y 90 % gasolina); En Colombia su uso surgió en el año 2000 (Universidad de los Andes (Bogotá, 2009).

Según Fede-Biocombustibles actualmente siete ingenios producen alcohol carburante, cinco de estos se ubican en el valle del Cauca, uno en Risaralda, estos seis lo producen a base de caña de azúcar y uno en el departamento del Meta con yuca amarga, su producción se encuentra entre los 100.000 a 500.000 L/día como se muestra en la tabla 1. La demanda de este Biocombustible ha ido aumentando en los tres últimos años, en agosto del 2016 hubo una producción de 36.829.000 litros que comparado con agosto del 2019 con una producción de 44.253.093 litros denota un crecimiento del 22%, con estas estadísticas Colombia es el segundo productor de etanol en América del Sur, después de Brasil, estos datos son tomados de la Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia (Ca, Productoras, Carburante, & Funcionamiento, 2011)

Los biocombustibles se clasifican en tres generaciones:

Biocombustibles de primera generación: obtenidos a partir de productos agrícolas como cereales, tubérculos, y sacarosa. Su uso genera preocupación en cuanto al uso de tierras y consumo de agua elevado

Biocombustible de segunda generación: obtenidos a partir de material lignocelulósicos que no tiene función alimenticia para el hombre, se pueden plantar en terrenos deforestados y también los podemos encontrar en los residuos agroindustriales.

Biocombustibles de tercera generación: también obtenidos de especies no alimenticias, a través de técnicas de biología molecular. Dentro de este grupo destacan actualmente las microalgas como biofactorías para la producción de biocarburantes (Cobos Ramirez, 2019).

Tabla 1. Producción de alcohol carburante

Departamento	Capacidad instalada
	Etanol(L/día)
INCAUCA, Miranda (cauca)	350000
Ingenio Riopaila< Castilla, La Paila (valle del cauca)	400000
Ingenio Risaralda, la virginia (Risaralda)	100000
Bioenergy, Puerto López (Meta)	500000
Ingenio providencia, Palmira (Valle del cauca)	300000
Ingenio Mayagüez, candelaria (valle del cauca)	250000
Manuelita, Palmira(valle del cauca)	250000
TOTAL	2.150.000

Fuente: Fede-biocombustibles. 2011

[http://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-mostrar_info-titulo-Alcohol_Carburante_\(Etanol\).htm](http://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-mostrar_info-titulo-Alcohol_Carburante_(Etanol).htm)

El principal uso del alcohol carburante es la mezcla con gasolina cumpliendo la función de oxigenarla(Kumar, Singh, & Prasad, 2010), ya que mejora su octanaje de manera considerable, lo que ayuda a disminuir la contaminación de las ciudades y a reducir los gases causantes del calentamiento global. Además, por tener mayor octanaje que la gasolina, quema mucho mejor, lo que da mayor poder a los motores, por último a nivel social es un impulsador del desarrollo, dado que la transformación de la materia prima agrícola, agrega valor al producto y contribuye a elevar el nivel de vida de los habitantes rurales(Ravagnani, Reis, Filho, & Wolf-Maciél, 2010).

3.1.2 PROCESO DE OBTENCIÓN DEL ETANOL A PARTIR DE LA CAÑA DE AZUCAR.

La caña de azúcar es una hierba tropical con múltiples tallos, generalmente de 3 a 4 metros de altura y cinco centímetros de diámetro con brotes laterales en la base de la planta. El tallo de la caña constituye aproximadamente el 75%de la planta. Un tallo maduro generalmente consta de 11–16% de fibra, 12–16% de azúcares solubles, 2–3% sin azúcar y 63–73% de agua. El cultivo de la caña de azúcar es sensible al clima, tipo de suelo, riego, fertilizantes, insectos, enfermedades, la variedad de la caña de azúcar y el período de cosecha(Carvalho, Moretti, Colodette, & Bizzo, 2019).

Una vez la materia prima ingresa al ingenio pasa al área de molienda donde se extrae el jugo azucarado, retirando como subproducto el bagazo, este jugo se somete a un proceso de clarificación en el que se adiciona óxido de calcio y una pequeña porción de ácido sulfúrico, que posteriormente pasa a ser

esterilizado y enviado a la fermentación proceso que se basa principalmente en la transformación bioquímica de azúcares fermentables por levaduras, en esta etapa se van a producir una serie de gases los cuales son retirados y enviados a una torre de adsorción donde se recupera el 98% del etanol arrastrado (Montoya, M. I., Quintero, J. A., Sánchez O, J., & Cardona, C. A. 2006).

Una tonelada de caña de azúcar produce 160 kg de sacarosa, que después de la fermentación genera 80 litros de etanol y 300 kg de biomasa lignocelulósica después del hidrólisis, esta biomasa a su vez produce 60 kg de glucosa y 33 kg de xilosa, que en conjunto generan 47 litros de etanol después de la fermentación, lo que da un total de 127 litros de etanol por tonelada de caña de azúcar (Cardona Alzate, 2009).

Para concentrar el etanol se usa un proceso denominado destilación, el cual requiere de dos columnas la primera remueve el CO₂ disuelto (que es enviado a la torre de absorción) y la mayoría del agua obteniéndose un destilado con 50% en peso de etanol y unos fondos con un contenido de alcohol inferior al 0,1% en peso, esta columna también se alimenta con el etanol recuperado en la absorción de los gases de fermentación. La segunda columna concentra el etanol hasta una composición cercana a la azeotrópica (95% en peso); el agua restante es removida de la mezcla mediante adsorción en fase de vapor en dos lechos de tamices moleculares. El producto de la regeneración de los tamices es recirculado a la segunda columna de destilación (Ravagnani et al., 2010).

3.2 FERMENTACIÓN

Actualmente una serie de países han ido implementando programas para la producción y uso de etanol como combustible con el fin de reducir la dependencia del petróleo y las emisiones del efecto invernadero. Este producto se lleva a cabo mediante dos procesos diferentes, el químico y el microbiológico, el primero se basa en la hidratación del etileno y el segundo denominado fermentación alcohólica o etanólica realizada por la *Saccharomyces cerevisiae* siendo este el principal método de producción (Lopes et al., 2016), en estelos azúcares contenidos en los jugos y las mieles de los cultivos se transforman en alcohol con la ayuda de levaduras. Dicha fermentación se logra a partir de una gran variedad de carbohidratos (mono, di, polisacáridos), siendo los disacáridos utilizados más comúnmente para la producción de etanol, un claro ejemplo es la sacarosa que proviene de la caña de azúcar, la remolacha azucarera y el sorgo dulce. El etanol producido a partir de la caña de azúcar presenta tasas de reducción entre 40 y 62 por ciento en las emisiones del efecto invernadero en comparación con la gasolina (Brexó & Sant'Ana, 2017).

La reacción química se compone de hidrólisis enzimática de la sacarosa seguida de fermentación de azúcares simples, estas reacciones se llevan a cabo mediante dos enzimas presentes en la levadura, encontrando en primer lugar la invertasa

encargada de catalizar la hidrólisis de sacarosa para convertirla en glucosa y fructosa, la segunda enzima denominada zimasa, convierte la glucosa y la fructosa en etanol y CO₂ como se observa en la figura 1 (Kumar *et al.*, 2010).

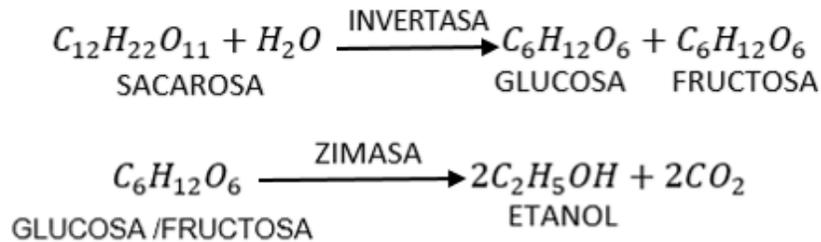


Figura 1. Reacciones Químicas para la obtención de etanol

El proceso de fermentación se puede llevar a cabo por dos procesos, el primero denominado fermentación continua representando el 17 % de las destilerías, el segundo es la alimentación por lotes representando alrededor del 83 por ciento, siendo este el más ventajoso ya que presenta mayores rendimientos de fermentación. Además, se observó una menor contaminación bacteriana en el vino y un menor consumo de productos químicos como el ácido sulfúrico y los antibióticos en comparación con los procesos continuos (Lopes *et al.*, 2016). En las fermentaciones en lotes alimentados, cada tanque se llena, gestiona y limpia por separado del otro, mientras que en procesos continuos todos los tanques fermentan simultáneamente en línea y no se pueden limpiar con la misma frecuencia. Después de la centrifugación, la crema de levadura recibe un tratamiento ácido y vuelve a los tanques de fermentación, como se evidencia en la figura 1 y 2 (López, M. *et al.*, 2016)

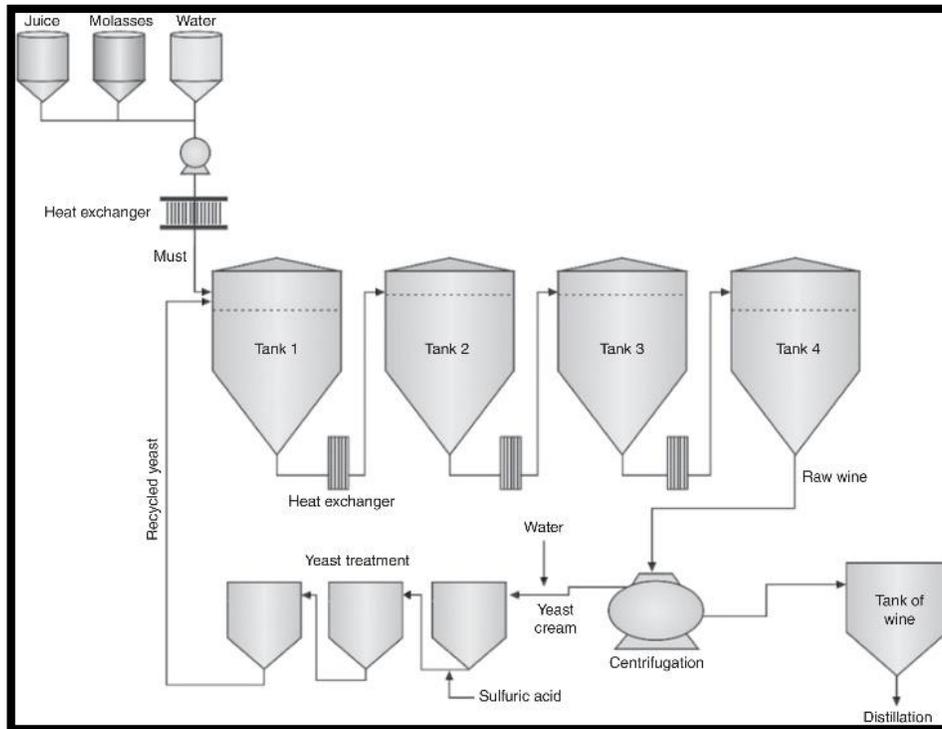


Figura 2. Esquema de Fermentación Continua en la producción de etanol (López, M. *et al*, 2016)

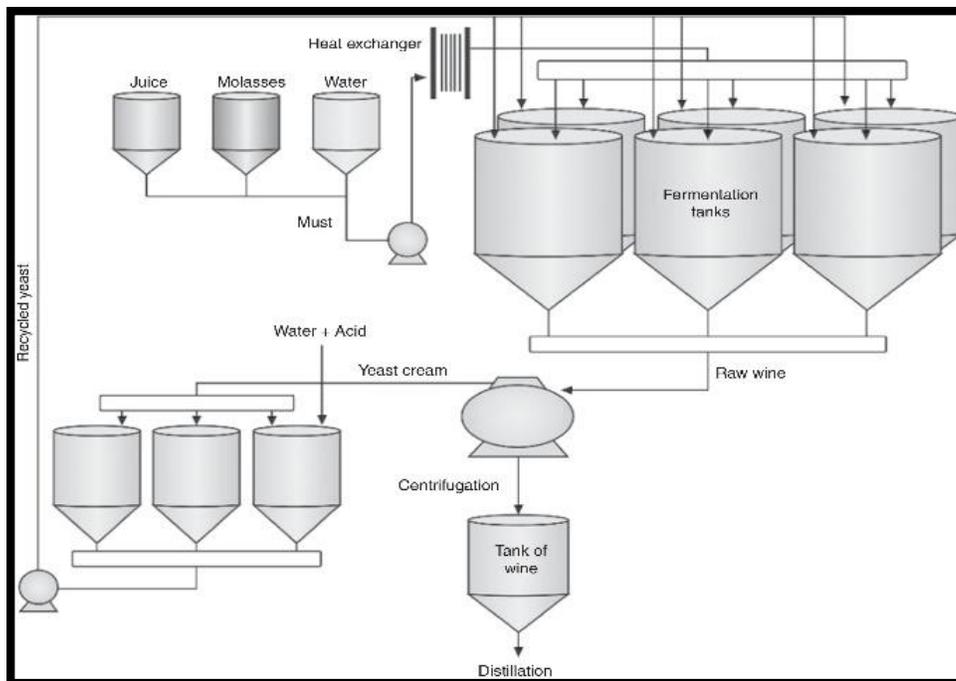


Figura 3. Esquema de fermentación en lotes alimentados en la producción de etanol (López, M. *et al*, 2016)

Para llevar a cabo el proceso de fermentación en la planta de destilería del ingenio INCAUCA S.A.S, se necesita una materia prima, que proviene de la planta de azúcar, que se denomina Miel B, esta llega a la planta de destilería y se almacena en unos tanques, seguidamente esta miel B pasa a un primer tanque denominada L 124 en donde se realiza un proceso de higienización (T 90°C), posteriormente pasa al segundo tanque L 347 en donde se realiza un proceso de desinfección (120°C, 15 psi, 7 minutos).

Para dar inicio al proceso de fermentación se prepara el reactor de propagación denominado R 305, el cual por tubería interna se va a alimentar con la Mezcla 347, agua, nutrientes (fosforo y nitrógeno), y la levadura proveniente del reactor de activación 304, para seguir con la fermentación continua contamos con 5 fermentadores en serie denominados 311-315-312-313-314 todos con una capacidad de 1000 m³, a los cuales les entra mezcla, una vez culminada el ciclo de fermentación, el vino producido se envía al reactor 331 con el fin de recuperar la levadura para que vuelva de nuevo al proceso de fermentación, una vez se realiza este proceso el vino producido es enviado al reactor R 335 y a partir de allí se envía al área de destilería. Ver figura 4

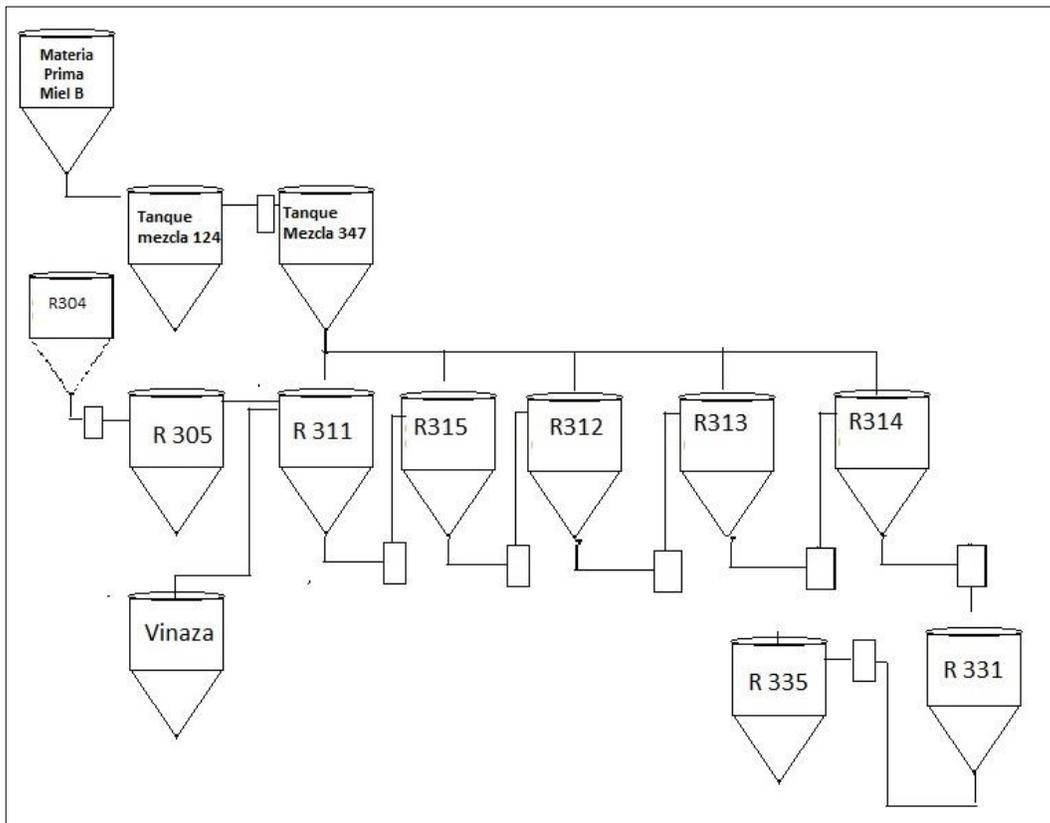


Figura 4.Flujograma Del Proceso De Fermentación

Fuente: Autor,
INCAUCA 2019

Por último y no menos importante en dicho proceso es necesario tener una serie de condiciones controladas para evitar niveles altos de contaminación, las plantas de procesamiento de bioetanol pueden no ser capaces de promover la esterilización de materias primas y coadyuvantes, lo que hace que el proceso sea susceptible a la contaminación bacteriana y de levadura salvaje, esta contaminación se considera un factor limitante para un mejor rendimiento del proceso, ya que cambia el metabolismo de los azúcares, a medida que la contaminación bacteriana aumenta a una concentración de 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml puede resultar en una reducción del 1 al 5 por ciento del rendimiento del proceso (Brexó & Sant'Ana, 2017).

3.2.1 METABOLISMO DE LA LEVADURA

La levadura es uno de los grupos microbianos unicelulares mejor estudiados en la naturaleza, han sido utilizadas, desde la antigüedad, en la elaboración de cervezas, pan y vino, pero los fundamentos científicos de su cultivo y uso en grandes cantidades fueron descubiertos por el microbiólogo francés Louis Pasteur en el siglo XIX. Son organismos eucariotas, unicelulares y generalmente sus células presentan diversidad respecto a su tamaño, forma y color, algunas de ellas son ovaladas, esféricas cilíndricas o elípticas como se observa en la figura 4, presentan un tamaño mayor que las bacterias, alcanzando un diámetro máximo de entre cuatro y cinco μm , se reproducen por fisión binaria o gemación. Son resistentes a antibióticos, sulfamidas y otros agentes antibacterianos de forma natural (Suárez-Machín, Caridad., Garrido-Carralero., Norge, Antonio., Guevara-Rodríguez. & Amarilys., 2016).

S. cerevisiae se convirtió en el organismo modelo para la investigación de células eucariotas, proporcionando innumerables datos y permitiendo una enorme expansión del conocimiento científico. Fue la primera especie microbiana eucariota de la que se secuenció todo el genoma. La evolución milenaria confirió a *S. cerevisiae* la capacidad de proliferar tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y acumular altas concentraciones de etanol, lo que lo convierte en una opción obvia como cultivo iniciador para fermentaciones de alimentos y bebidas. Sin embargo, las aplicaciones industriales más recientes, como la producción de bioetanol, enfrentan a *S. cerevisiae* con nuevos desafíos muy específicos que difieren de los encontrados en muchas fermentaciones de alimentos (Radecka *et al.*, 2015).

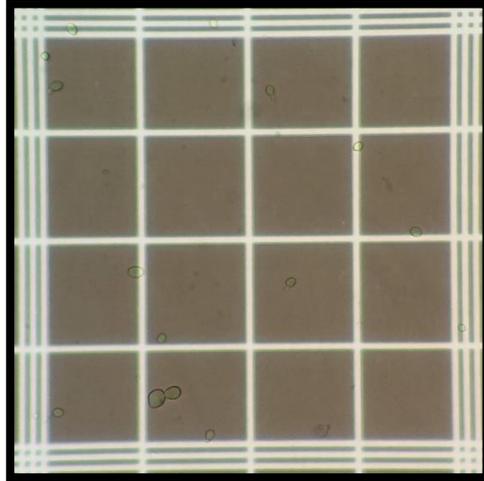


Figura 5. Visualización De conteo En Placa De Neubauer
Diversidad Morfológica De Las Levaduras.
Resolución 40X
Fuente: Autor,
INCAUCA 2019

Los constituyentes macromoleculares de las levaduras incluyen proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos, su pared celular comprende entre 15 y 25 por ciento de la masa seca de la célula y sus principales componentes son polisacáridos (80-90 %), esencialmente glucanos y mánanos, con una menor contribución de quitina. El contenido de proteínas en las levaduras varía del 40 al 50 por ciento de su peso seco y tienen una excelente calidad en función de su perfil de aminoácidos esenciales. La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero les resulta favorable un medio ligeramente ácido con un pH entre 4,5 a 6,5. Las levaduras más estudiadas en el mundo son cepas provenientes de las especies: *Saccharomyces cerevisiae* (levadura panadera comercial), *Kluyveromyces fragilis* y *Candida utilis*. Estas especies son consideradas como aptas para el consumo humano (Suárez-Machín, Caridad., Garrido-Carralero., Norge, Antonio., Guevara-Rodríguez. & Amarilys., 2016).

Las fuentes de carbono utilizadas por este microorganismo varían desde los carbohidratos hasta los aminoácidos. Entre los azúcares que puede utilizar está la glucosa, fructosa, manosa y galactosa o también llamados monosacáridos. Por norma general, las levaduras mantienen dos tipos de metabolismo, el primero es la glucólisis llevándose a cabo en concentraciones altas de azúcar y ausencia de oxígeno que llevan a la producción de etanol y el segundo es la respiración del etanol o metabolismo oxidativo mediante la vía ciclo de Krebs esto ocurre una vez los azúcares escasean (Kim & Gadd, 2019).

La fermentación del etanol o fermentación etílica, es un proceso biológico en plena ausencia de oxígeno (O_2), originado por la actividad de algunos microorganismos, entre ellos el *Saccharomyces cerevisiae*, que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares: como pueden ser por ejemplo la glucosa, la fructosa, la

sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$), dióxido de carbono (CO_2) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. En condiciones de anaerobiosis, las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* transforman la glucosa en ácido pirúvico, siguiendo la secuencia de 10 reacciones de la vía Embden-Meyerhof o vía glucolítica. Este proceso es común e la mayoría de los seres vivos; pero aquí radica lo específico de estas levaduras, que son capaces de proseguir la degradación de pirúvico hasta etanol (Medina, Lara, Aguilar, & De, 2011).

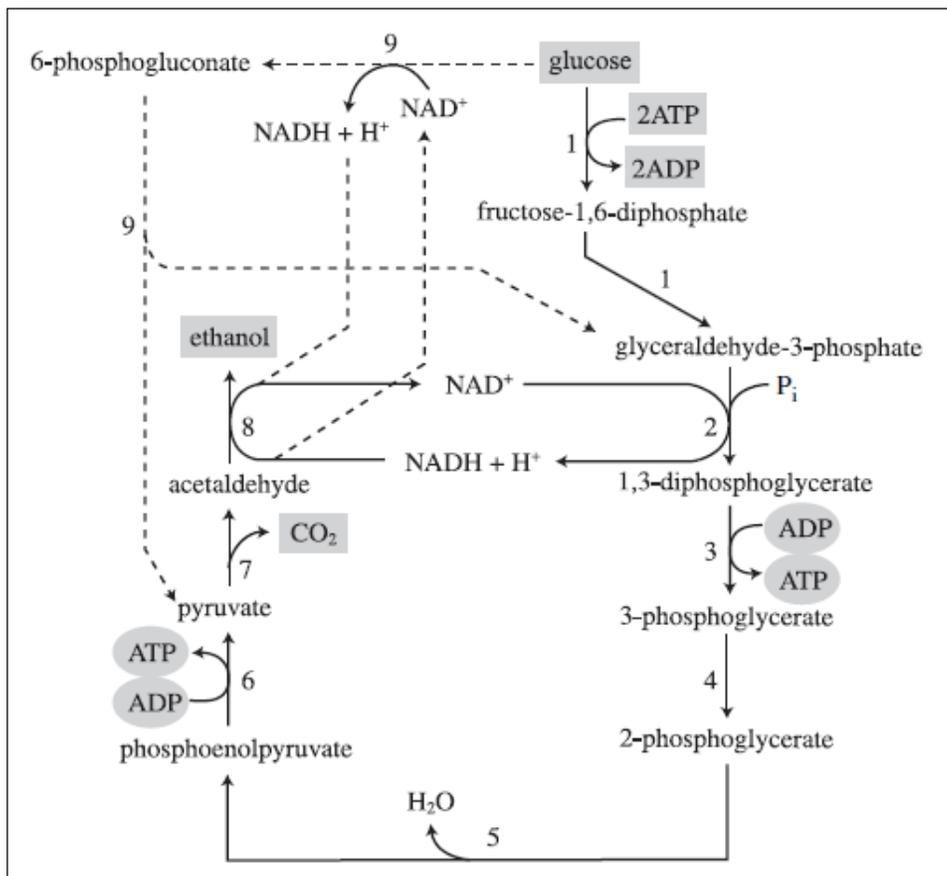


Figura 6. Fermentación del etanol por *Saccharomyces cerevisiae*
1-6 ruta de Embden Meyerhof Parnas
(Kim & Gadd, 2019)

En resumen, la diferencia de los procesos aeróbicos y anaeróbicos radica en el destino del ácido pirúvico en la vía metabólica y el resultado energético de esta ruta. En presencia de oxígeno, el ácido pirúvico está destinado al ciclo de Krebs y se convierte en biomasa, dióxido de carbono y agua, mientras que cada molécula de glucosa genera 38 moléculas de ATP. En condiciones anaeróbicas, las enzimas piruvato-descarboxilasa y alcohol-deshidrogenasa utilizan ácido pirúvico como

sustrato para la síntesis de etanol y agua, produciendo solo 2 moléculas de ATP (Brexó & Sant'Ana, 2017).

3.2.2. CONDICIONES A CONTROLAR EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN

3.2.2.1 CONTAMINACIÓN MICROBIANA

La contaminación microbiana es un problema generalizado en cualquier sistema de fermentación de etanol, las infecciones afectan la eficiencia de la fermentación y en el peor de los casos, provocan fermentaciones atascadas que conllevan el cierre de las plantas para su limpieza antes de comenzar de nuevo, estos retrasos pueden dar como resultado una pérdida de tiempo costosa, así como un aumento en el costo del producto final (Beckner, Ivey, & Phister, 2011). Varios factores, como las condiciones ambientales, la calidad y las prácticas aplicadas a la materia prima, y la reutilización de células de levadura innumerables veces durante la temporada pueden influir en el nivel de contaminación del mosto de la caña de azúcar por levaduras silvestres y bacterias, esto a su vez afecta el rendimiento y la preservación de los parámetros de fermentación de la levadura, lo que puede influir en los parámetros del proceso y el rendimiento (Carvalho *et al.*, 2019).

La caña de azúcar, así como la microbiota transitoria, tiene varios microorganismos endofíticos que son transportados por fragmentos de caña de azúcar no filtrados en el proceso o arrastrados junto con el jugo extraído en las operaciones de molienda. Los endófitos representativos en la caña de azúcar son *Burkholderia*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Bacillus* y *Gluconacetobacter*. La concentración de estos contaminantes puede aumentar en períodos prolongados entre las operaciones de corte y fresado, o debido a una limpieza deficiente del molino, filtros, bombas y tuberías.

Por otro lado, encontramos a las bacterias ácido lácticas (LAB) siendo los contaminantes bacterianos más comunes que se encuentran en las plantas de producción de etanol y las causantes de la disminución de la producción del mismo durante la fermentación. Este grupo bacteriano comprende varios géneros, incluidos *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Carnobacterium* y *Lactobacillus* siendo estos últimos los más predominante ya que soportan las condiciones de estrés como lo es el pH, oxígeno bajo y altas concentraciones de etano (Beckner *et al.*, 2011).

Las características fisicoquímicas de la materia prima y el proceso de fabricación (78–86% de agua, 10–20% de sacarosa 0.1–2% de azúcares reductores 0.3–0.5% de cenizas y 0.5–1.0% de compuestos nitrogenados / micronutrientes minerales, pH de 4.5–5.5, y temperatura de 26 a 35°C) favorecen el crecimiento de varias bacterias (Carvalho *et al.*, 2019). Se ha aceptado generalmente que los lactobacilos causan la inhibición de *Saccharomyces sp* y limita la producción de etanol a través

de dos métodos básicos; ya sea la producción de ácidos láctico y acético o mediante la competencia por nutrientes (Beckner *et al.*, 2011), dichos metabolitos generan la formación de espuma, disminuyendo la floculación de las células de levadura y por ende disminuye su viabilidad (Carlos, Olitta, & Nitsche, 2011) si dichas bacterias se encuentran en una concentración superior a 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml puede resultar en una reducción del 1% al 5% del rendimiento del proceso (Brexó & Sant'Ana, 2017),

Los LAB representan un gran grupo natural de bacterias no formadoras de esporas en forma de bastones y cocos (Carlos *et al.*, 2011), son generalmente no móviles, catalasa negativa y se destacan por producir ácido láctico como el principal producto del metabolismo fermentativo. Los LAB exhiben un perfil anaeróbico, capacidad para crecer rápidamente y pueden sobrevivir en plantas de producción de etanol, siendo tolerantes a altas temperaturas (30-45°C) y bajo pH (Beckner *et al.*, 2011). Debido a la falta de porfirinas, citocromos y ausencia de fosforilación oxidativa, las bacterias del ácido lácticas pueden obtener energía solo por fosforilación a nivel de sustrato. Estos microorganismos son bacterias aerotolerantes y se clasifican en homofermentativos cuando el único producto de fermentación es ácido láctico o heterofermentativos cuando se forman otros productos metabólicos (Brexó & Sant'Ana, 2017).

3.2.2.2 LEVADURA SALVAJE

Las levaduras que no se usan adecuadamente en la fermentación y que no están bajo control total se designan como levaduras salvajes (figura 6), su crecimiento durante la fermentación puede conducir a una serie de defectos dependiendo en la industria que se encuentren, si dichas levaduras están presentes en la industria cervecera van a producir la formación de sabores fenólicos, ácidos y sabores a éster (van der Aa Kühle & Jespersen, 1998). En la industria del etanol dichas levaduras van a producir sabores herbáceos, alcoholes y aldehídos superiores acompañados por la formación de un color verde, un claro ejemplo es *Dekkera bruxellensis* presente en la fermentación por lotes, responsable de la disminución del pH afectando negativamente la eficiencia de la producción de etanol por *S. cerevisiae.*, estas levaduras presentan menor productividad, floculación, formación de espuma, formación de pseudo hifas, biopelícula y crecimiento invasivo, no es deseable para las industrias de azúcar y bioetanol (Brexó & Sant'Ana, 2017).

Para contrarrestar esta contaminación se requiere un aumento en la inversión en materiales como agentes antiespumantes, vapor, dispersantes y sustancias antimicrobianas (Brexó & Sant'Ana, 2017). Aunque las levaduras silvestres se consideran contaminantes para la producción de bioetanol, cuando se seleccionan pueden presentar características interesantes, las levaduras silvestres también pueden servir para comprender la maquinaria genética que permite la supervivencia bajo el estrés ambiental y ecológico de la fermentación del mosto de la caña de

azúcar para la producción de bioetanol (Tosin, Andrietta, & da Graça Stupiello Andrietta, 2015).



Figura 7. Visualización en Cámara De Neubauer de Levadura Salvaje Muerta
Resolución 40X
Fuente: Autor,
INCAUCA 2019

3.3 BACTERIOFAGOS COMO HERRAMIENTAS ANTIMICROBIANAS

Los bacteriófagos (fagos) se han utilizado para distintas aplicaciones, desde su descubrimiento por Twort (1915) y d'Herelle (1917), la investigación sobre fagos ha permitido importantes avances tecnológicos y fundamentales que han sido esenciales para el surgimiento de la biología molecular moderna (Petty, Evans, Fineran, & Salmond, 2007). Los factores más importantes en la evaluación de los fagos como agentes de biocontrol efectivos son sus rangos de hospedadores y su capacidad para ejecutar infecciones duraderas (Saad et al., 2019), ya que estos pueden ser virulentos (líticos) o templados usando la bacteria huésped como fábrica para su propia replicación. Estos entes microscópicos son acelulares, compuestos de un núcleo con material genético (ADN mono catenario, ADN bicatenario o ARN) y requieren la capacidad de síntesis de ADN y producción de proteínas del huésped para replicar y producir partículas virales de la progenie de manera efectiva (Murphy, Mahony, Fitzgerald, & van Sinderen, 2017).

Debido a la resistencia de antibióticos ha surgido la necesidad de usar el potencial del fago para tratar los patógenos bacterianos, estos fagos codifican lisinas, enzimas que lisan la bacteria huésped antes de su liberación. Dichas enzimas son específicas del huésped y usan componentes de la pared celular que son esenciales para la viabilidad como receptores; por lo tanto, la resistencia bacteriana es casi nula (Fischetti, 2005a), estas lisinas están diseñadas para atacar uno de los cuatro enlaces principales en el peptidoglucano. Esta actividad puede ser una endo- β -N-

acetilglucosaminidasa o N-acetilmuramidasa (lisozimas), las cuales actúan sobre el resto de azúcar de la pared bacteriana (Fischetti, 2005b), el uso de múltiples lisinas de fagos con diferentes sitios de escisión podría aumentar la efectividad terapéutica y reducir aún más la posibilidad de que las bacterias desarrollen resistencia (Petty et al., 2007). Durante el desarrollo del fago en la bacteria infectada, la lisina se acumula en el citoplasma en previsión de la maduración del fago, en un momento genéticamente especificado, las moléculas de holina se insertan en la membrana citoplasmática y forman parches, lo que en última instancia da como resultado una alteración generalizada de la membrana, permitiendo que la lisina citoplasmática acceda al peptidoglucano, provocando la lisis celular y la liberación del fago de progenie (Fischetti, 2005b).

En los últimos treinta años, los fagos infectantes de LAB se han clasificado mediante métodos como la microscopía electrónica, serotipado, hibridación de ADN, perfil de proteínas estructurales y análisis genómico comparativo (Mahony, Bottacini, van Sinderen, & Fitzgerald, 2014). Los fagos son particularmente problemáticos en la industria láctea debido a que utilizan repetidamente los mismos cultivos o mezclas, dichos fagos persisten en los entornos de procesamiento hasta que un huésped (LAB) está disponible para infectarlo. Las LAB presentes en la industria láctea son susceptibles a la infección viral, lo que puede afectar la calidad, el sabor y la textura del producto final. Todos los fagos infectantes de LAB pertenecen al orden *Caudovirales* y la mayoría de ellos a la familia *Siphoviridae* que posee colas no contráctiles largas y cápsides isométricas (Mahony et al., 2013). Además, se han descrito fagos con colas no contráctiles cortas (*Podoviridae*) y aquellos que exhiben colas contráctiles largas (*Myoviridae*) para algunos géneros LAB. Sin lugar a dudas, los fagos que infectan LAB más intensamente investigados son los de las bacterias iniciadoras de lácteos *L. lactis* y *S. thermophilus*. Por otro lado, la escasa información genómica y datos taxonómicos con respecto a los fagos que infectan estas bacterias son limitados. Hay más de 100 especies distintas reconocidas dentro del género *Lactobacillus* y con tal heterogeneidad del huésped que parece sorprendente que los fagos que infectan especies de este género, sean igualmente complejas y difíciles de clasificar (Mahony & van Sinderen, 2014).

3.3.1 MECANISMO DE INFECCIÓN DE LOS FAGOS

Para ingresar al huésped, los fagos primero entran en contacto y se adsorben a la pared celular bacteriana. El proceso de adsorción ha sido bien estudiado en bacterias Gram-negativas, donde se descubrió que dos componentes están involucrados en la interacción fago-huésped. Uno de ellos es un receptor ubicado en la envoltura celular bacteriana (membrana o pared), mientras que el segundo componente, llamado proteína de unión al receptor (RBP), se presenta en la superficie del fago. RBP es responsable del reconocimiento y la unión de la partícula de fago al receptor bacteriano (Torabi et al., 2016).

En la primera etapa de la infección del fago, la proteína RBP reconoce y se une a un receptor de azúcar adecuado. Sin embargo, dicha unión es reversible y, por lo tanto, la interacción inicial fago-bacteria no asegura el comienzo de un evento de infección exitoso. En contraste con esto, en la segunda etapa, se produce una unión estable del fago a la célula bacteriana debido a una unión irreversible entre las proteínas ubicadas en las superficies bacterianas y del fago. Ambas etapas de adsorción se observan en bacterias Gram-positivas: los fagos que atacan a las células de *Lactococcus lactis* se unen a receptores específicos, principalmente azúcares, ubicados en la pared celular. Es ampliamente conocido que la ramnosa, la glucosa, la galactosa y la galactosamina son compuestos con los cuales la proteína de unión interactúa en la etapa inicial de adsorción.

Después de establecer una conexión estrecha, inyectan su material genético dentro del citoplasma del huésped, mientras que la cápside permanece fuera de la célula. Luego, de la infección se da inicio al ciclo de vida ya sea lítico o lisogénico. Los fagos que ingresan al modo lítico redirigen inmediatamente la maquinaria de replicación del huésped y las funciones metabólicas para replicar su propio material genético y sintetizar proteínas codificadas por fagos, en efecto, se producen cantidades abundantes de partículas de progenie. Los fagos que ejecutan solo el ciclo lítico se designan como virulentos y su infección implica la muerte celular, sin embargo, ciertos fagos denominados templados pueden llevar una existencia alterna entre un estado latente dentro de la célula bacteriana y el crecimiento lítico. Estos fagos pueden existir en la célula en forma latente por generaciones, replicando en sincronía con el cromosoma bacteriano. Una forma inactiva del fago se llama profagia y lleva un ciclo de vida lisogénico. La conversión del ciclo de vida lisogénico al lítico a menudo ocurre espontáneamente o puede ser inducida por varios mutágenos (UV, mitomicina)(Torabi et al., 2016).

3.3.2 IMPACTO EN LA FERMENTACIÓN

Una de las funciones clave de los fagos es equilibrar la población bacteriana en cada entorno compartido, desafiando así a las bacterias a evolucionar rápidamente. Los fagos pueden alterar un proceso biotecnológico que se basa en el uso de bacterias para producir una molécula o hacer un producto, se han informado problemas debidos a la presencia de fagos en las industrias alimentaria, química, farmacéutica, de piensos y pesticidas, sin embargo, la industria láctea es probablemente aquella en la que los problemas de fagos son los más documentados(Madera, C., Morjandin, C., & Suarez, E., 2004)

Aunque la concentración de fagos suele ser baja en la leche, una población específica de fagos puede aumentar rápidamente si las células sensibles al fago están presentes en el cultivo iniciador, la consecuente lisis de una gran cantidad de células sensibles retrasará o incluso detendrá el proceso de fermentación de la leche, dando lugar a productos de baja calidad, en el peor de los casos, la leche inoculada

debe desecharse. Durante décadas, la industria láctea ha estado lidiando con este fenómeno natural y se ha basado en una serie de medidas de control, especialmente el diseño adaptado de fábrica, saneamiento mejorado, cambios de proceso, medio de cultivo específico, rotación de cepas y el uso de cepas resistentes a los fagos (Garneau & Moineau, 2011)..

Los fagos virulentos de LAB siguen siendo una preocupación industrial grave y los fabricantes están constantemente en guerra contra estos virus para mantenerlos bajo control. La industria láctea se ha basado en una serie de medidas para controlar este fenómeno natural, incluido el diseño adaptado de la fábrica, el saneamiento mejorado, los cambios en el proceso, la rotación de cepas y el uso de cepas resistentes a los fagos. A pesar de estos esfuerzos, los fagos están evolucionando y siguen surgiendo nuevas variantes. Por lo tanto, es esencial encontrar nuevas estrategias de control y antivirales para mantenerse al día con la evolución de los fagos. Este campo de investigación ahora se dedica a los enfoques integrados de biología de fagos para comprender mejor la diversidad de fagos y las interacciones del huésped con la esperanza de mejorar el proceso de selección de cepas de LAB y optimizar los mecanismos anti-fagos(Garneau & Moineau, 2011).

4. METODOLOGIA

4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en el ingenio INCAUCA ubicado Vía Caloto, El Ortigal, Cauca y se llevó a cabo en el segundo semestre del 2019. Las muestras analizadas en este estudio se tomaron en horas de la mañana en la planta de destilería del ingenio, todos los días durante el mes de octubre.

4.2 ANALISIS DE ACIDO LACTICO

Para determinar el ácido láctico se analizaron las muestras de los reactores iniciales y finales del tren fermentativo (R311- R314). En primer lugar, se cambia la celda del equipo RQflex plus 10, posteriormente es calibrado con el set de calibración, el cual cuenta con dos tirillas una de recalibración y otra de chequeo, una vez calibrado se toma un mililitro de las muestras (R311 y R314), se lleva a un balón aforado de 100ml por separado, una vez aforados la muestra se pasa a un vaso precipitado, allí se introducen las tirillas por dos segundos y se llevan al equipo, para que arroje el resultado. Para realizar la lectura de las mieles se pesan 10 gramos se diluyen con agua destilada y se llevan a un balón aforado de 100 ml, posteriormente se pasa a un vaso precipitado de 100ml de allí se toman 10 ml y se afora de nuevo en un balón de 100 ml, para llevar a cabo la lectura se procede como se menciona en la muestra de los reactores.

4.3. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LA LEVADURA

Para determinar la viabilidad de la levadura se realiza el conteo al reactor de propagación, al tren fermentativo (R 311-R 314), a las cremas (R 304- R 331) y al vino R335, las muestras se agitan y se toma un mililitro que se lleva a un balón aforado de 100ml el cual contiene papaína y 4 gotas de azul de metileno, una vez aforada la muestra con agua de la llave se agita de manera fuerte y con una pipeta pasteur se toma la muestra para llevarla a la cámara de Neubauer, donde se procede a realizar el recuento con un aumento de 40X.

4.4 EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL TREN FERMENTATIVO (R311-R312-R313-R314-R315-L124-L347)

Para llevar a cabo la evaluación microbiológica se tomaron muestras del tren fermentativo, el número de muestras tomadas depende del día, se distribuyen de la siguiente forma: lunes 11, martes 6, miércoles 9, jueves 6, y viernes 14 muestras, para un total de 46 muestras semanales. Para la toma de muestras en primer lugar se limpió la válvula de acceso con un escobillón y alcohol al 70%, seguido a esto se procede a purgar el reactor para luego tomar la muestra, una vez las muestras en el laboratorio se tomó 1 ml de las mismas y se diluyen en 9 ml de peptona, seguidamente se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-3} , para determinar la presencia de bacterias mesófilos y bacterias ácido lácticas se tomó 1 ml de las diluciones y se siembra en profundidad en los medios plate count (PC) y medio MRS respectivamente y se incuban a 37°C por 48 h, en anaerobiosis. Por otro lado, para determinar la presencia de *Acetobacter sp* se tomó 0,1 ml de las muestras y se siembra en superficie en medio laboratorio Wallerstein (WL) y se incubaron a 25°C por 48 h.

Para determinar la contaminación de las mezclas L124y L347 se tomó 45 ml en un tubo falcón y se centrifugan a 4000 rpm por 15 minutos, pasado este tiempo se descartó el sobrenadante y se adiciono 9 ml de peptona, se agito con vortex y luego se procede como se mencionó anteriormente, para estas muestras se realizó un análisis adicional como es la determinación de mohos y levadura sembrando en profundidad en medio Chloramphenicol Glucose Agar (YGC) y se incubo a 25 °C.

Tabla 2. Resumen de los análisis llevados a cabo en el laboratorio de microbiología en la destilería del ingenio INCAUCA

Análisis	Medio de cultivo	Temperatura y tiempo de incubación	Nombre del reactor	Metodología
<i>Recuento de aerobios mesofílos</i>	Medio plate count	37°C ± 2 °C– 48 horas	Tren fermentativo Mezclas L124 Y 347 Propagador 305 Reactor 304 Vinaza 311	Profundidad.
<i>Recuento de bacterias ácido lácticas</i>	Medio MRS	37°C ± 2 °C– 48 horas	Tren fermentativo Mezclas L124 Y 347 Propagador 305 Reactor 304 Vinaza 311	Profundidad.

<i>Recuento de mohos y levaduras</i>	Agar YGC (gar de cloranfenicol glucosa extracto de levadura)	25°C ± 2 °C – 5 días	Mezclas L124 Y 347	Profundidad.
<i>Recuento Acetobacter sp</i>	medio laboratorio Wallerstein (WL)	25°C ± 2 °C – 5 días	Tren fermentativo Mezclas L124 Y 347 Propagador 305 Reactor 304 Vinaza 311	Superficie

Fuente: Autor, INCAUCA 2019

4.5 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA UTILIZADA EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN, MEDIANTE EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Este ensayo se realizó una vez por semana, en este se tomaron 500 ml de agua en dos puntos diferentes denominados UV antes y UV después. Una vez en el laboratorio se filtraron las muestras utilizando filtros de 0,45 µm. Los medios utilizados en este ensayo se denominan como TTC (mesófilos), Wort (mohos y levaduras), MacConkey (enterobacterias) los cuales previamente se hidrataron con 3 ml de agua destilada estéril, también se utilizan placas de WL y MRS.

4.6 DETECCIÓN DE BACTERIÓFAGOS

Para determinar la presencia de fagos se llevó a cabo mediante dos métodos diferentes (su respectiva referencia y año se nombran en cada uno de los métodos), siendo estos los más adecuados ya que se adaptan completamente a el material presente en el laboratorio de microbiología del ingenio INCAUCA, a los métodos en mención se les realizaron una serie de modificaciones con el fin de obtener resultados más acertados, estas modificaciones se aplican a temperatura de incubación, bacteria de estudio, medio de cultivo y concentración Mcfarland.

4.6.1 DETECCIÓN DEL BACTERIÓFAGO POR EL MÉTODO DE DOBLE CAPA.

Para determinar la presencia de bacteriófagos a partir de jugo de caña de primera extracción se utilizó la metodología de (Zhang, Kong, & Qu, 2006) realizandole modificaciones como se menciona anteriormente. Se tomaron 300 ml de jugo de caña de primera extracción, en primer lugar la muestra se paso por un papel filtro con el fin de retirar la mayor cantidad de impurezas, una vez filtrada, se centrifugo a 1300 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se pasó por un filtro de 0,22 μm , a partir del filtrado se tomó 1ml en 9 ml de solución salina o Bufer SM y se procedió a realizar diluciones seriadas hasta 10^{-8} . Paralelo a esto en otros tubos se tenía el agar-agar al 0,85% y que han estado previamente en baño maría, a dichos tubos se le adiciona 1 ml de las diluciones mencionadas anteriormente (10^{-5} - 10^{-8}) y 1 ml de cultivo bacteriano joven (McFarland de 1) el cual se vierte en cajas de agar nutritivo y se incubo a 37°C por 48 horas en anaerobiosis.

4.6.2 DETECCIÓN DEL BACTERIÓFAGO POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN.

Para determinar la presencia de bacteriófagos a partir de jugo de caña de primera extracción, se utilizó la metodología de (Nouraldin, Baddour, Harfoush, & Essa, 2016) realizandole modificaciones como se menciona anteriormente. Se tomaron 300 ml de jugo de caña de primera extracción, a partir de esta muestra se tomó 10 ml y se llevaron a 90 ml de buffer SM, incubando a 30°C por 24 horas, pasado este tiempo se centrifugo 2 veces a 1300 rpm por 10 minutos, al sobrenadante se le realizó filtración por membrana con un filtro de 0,45 μm , del filtrado se tomaron 10 ml y se adicionaron a una fiola con 90 ml de buffer SM, este contenía 1 ml de la bacteria del cultivo joven. Para determinar la presencia de fagos líticos se utilizaron placas de Agar nutritivo con 5 pozos, dichas placas se inocularon con 1 ml de la bacteria de cultivo joven (McFarland de 1) y se extendieron con asa de hockey, seguidamente en cada pozo se adicionaron 100 μl del fago y se incubaron a 37°C por 24 horas en anaerobiosis, después de la incubación la formación de zonas claras (placas) sugiriere la presencia de fagos líticos específicos para cada cepa.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Mes	Octubre				Noviembre				Diciembre	
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
Introducción laboratorio de microbiología										
Análisis ácido láctico										
Viabilidad de la levadura										
Análisis microbiológico										
Revisión bibliográfica de bacteriófagos										
Aislamiento de bacteriófagos										
Inicio de desarrollo del trabajo escrito										
Revisión bibliográfica										
Envío del primer avance										
Envío del segundo avance										
Envío del tercer avance										
Sustentación del trabajo grado										

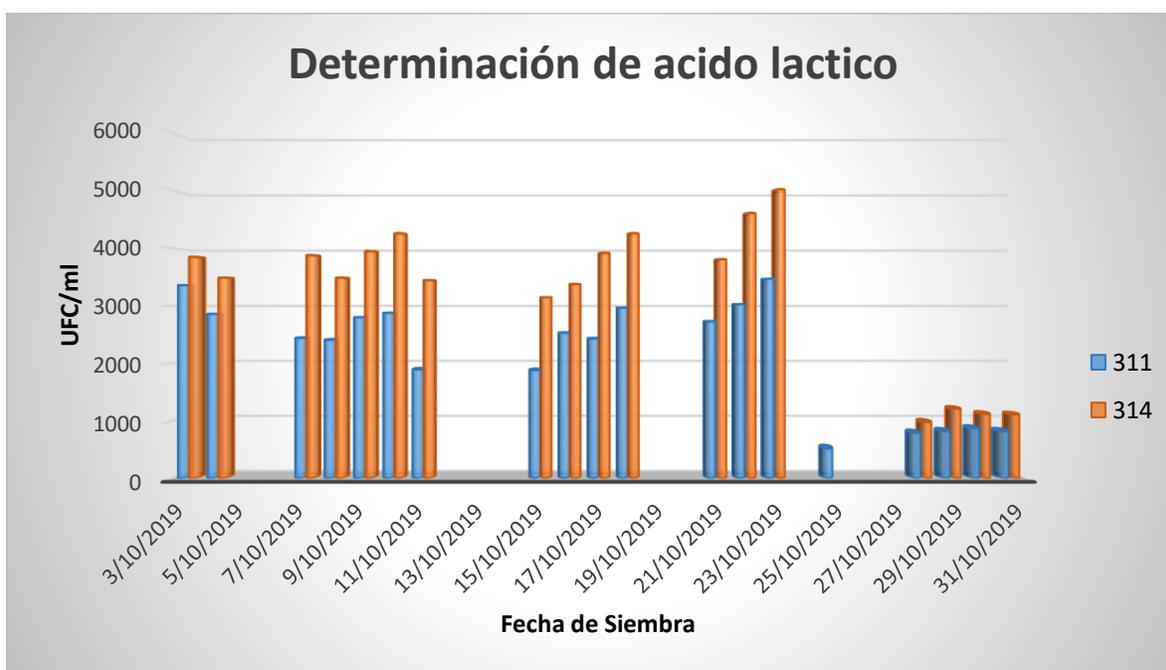
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de ácido láctico y contaminación microbiana son resultados verídicos obtenidos en el mes de octubre en la planta de destilería del ingenio INCACA.

6.1 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y VIABILIDAD DE LA LEVADURA

Para evaluar la contaminación microbiana, la planta de destilería del ingenio INCAUCA S.A, en el laboratorio de microbiología tiene implementado un método rápido de lectura de ácido láctico del tren fermentativo, ver grafica 1.

Grafica 1. Determinación de ácido láctico.



Fuente: Autor,
INCAUCA 2019

Las bacterias lácticas son importantes a nivel de la industria láctea debido a que fermentan azúcares produciendo cantidades considerables de ácido láctico usado en la elaboración de productos fermentados. Caso contrario pasa en la industria del etanol en donde dichas bacterias son perjudiciales para llevar a cabo la fermentación, ya que al encontrarse en cantidades elevadas (10^7 UFC / ml) va a inhibir la actividad metabólica de *S. cerevisiae*. Ver tabla 3. Dichas bacterias producen ácido acético a partir de los azúcares que se encuentran en la materia prima, como la glucosa y la fructosa. El ácido acético es el componente principal

de la acidez volátil el cual va a disminuir la calidad del etanol (Pielech-Przybylska *et al.*, 2019).

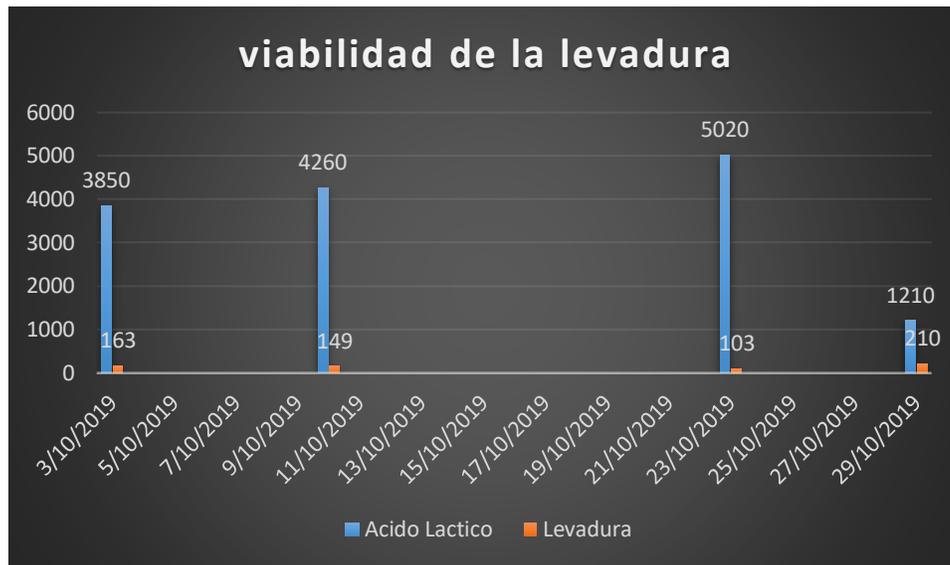
En la gráfica 1 podemos ver la diferencia clara de la contaminación del tren fermentativo (R 311- R 314) en donde se observa que las barras azules (R 311) presentan menor rango de contaminación, debido a que es el reactor inicial de la fermentación y aun no presenta altos grados de contaminación comparado con el reactor R 314 (reactor final), este presenta mayor contaminación ya que las bacterias a lo largo del proceso aumentan su población debido a que los fermentadores le aportan una serie de nutrientes necesarios para su metabolismo, Por lo tanto, se debe prestar especial atención a la temperatura durante la fermentación y al pH inicial del propagador 304. Una temperatura alta y un pH bajo (2,5) afectan el crecimiento de las bacterias ácido lácticas permitiendo que la levadura realice su metabolismo de manera normal. (Pielech-Przybylska *et al.*, 2019), por otro lado, el tren fermentativo cuenta con un cronograma de antibióticos, cada semana se adiciona uno diferente con el fin de evitar la resistencia antimicrobiana, es por esto que a final del mes de octubre al usar el antibiótico Monensina. se ve una reducción significativa de la contaminación.

Tabla 3. Comparativo de ácido láctico vs levaduras.

Fecha	Ácido láctico	Viabilidad
3-10-19	3850	163 levaduras vivas
10-10-19	4260	149 levaduras vivas
23-10-19	5020	103 levaduras vivas
29-10-19	1210	210 levaduras vivas

Fuente: Autor,
INCAUCA 2019

Grafica 2. Comparativo Ácido Láctico Vs Viabilidad De Las Levaduras



Fuente: Autor,
INCAUCA 2019

Al observar la tabla 3 y grafica 2, podemos evidenciar claramente la disminución del crecimiento de la levadura cuando hay gran cantidad de ácido láctico, mostrándonos una relación inversamente proporcional, al comparar estos resultados con los obtenidos en la gráfica 1 se observa que al inicio del mes una reducción en los montajes de la levadura, caso contrario sucede a fin de mes en donde el antibiótico Monensina. ayuda a controlar las bacterias ácido lácticas y favorece la viabilidad de las levaduras, al comparar estos resultados con los obtenidos en el trabajo de (Orozco, Martínez, & Cubillos-Hinojosa, 2018), el uso de Monensina no se presenta una diferencia significativa entre la viabilidad de la levadura, por otro ellos utilizaron otros antibióticos como penicilina, maduramicina, y lúpulo los cuales a la 24 horas presentaron un efecto positivo sobre la viabilidad de la levadura debido a que se logró promover el aumento de esta misma obteniendo mayores índices que los iniciales (Orozco et al., 2018).

6.2 EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS PRINCIPALES REACTORES

Para llevar a cabo la evaluación microbiológica de los diferentes reactores de la planta de destilería se realizó mediante el protocolo estandarizado del laboratorio de microbiología. A continuación, se muestran los resultados obteniendo en el mes de octubre para cada uno de los reactores, de igual manera se realiza un informe de un día específico y la gráfica comparativa de todo el mes.

6.2.1 PERFIL MICROBIOLÓGICO DEL PROPAGADOR 304

Tabla 4. Informe de propagador 304

Análisis	Método	Medio	T°/Ti-empo	Recuento	Informe
Aerobios Mesófilos	Recuento en placa profunda	Agar SPC (Standard plate count)	37°C/ 48 horas	10 ⁰ =No crecimiento	<1x10 ⁰ UFC/ ml
<i>bacterias ácido lácticas</i>	Recuento en placa profunda	Agar MRS	37°C/ 48 horas anaerobiosis	10 ⁻⁰ = No Crecimiento 10 ⁻¹ =No Crecimiento	<1x10 ⁰ UFC/ ml
Bacterias acéticas	Recuento en superficie	Agar WL	37°C/ 48 horas	10 ⁰ =No crecimiento	<1x10 ¹ UFC/ ml

Fuente: Autor,
INCAUCA 2019

El análisis microbiológico del propagador R 304 es uno de los más importantes ya que a partir de este se alimenta el reactor R 305 y se da inicio a la fermentación, es por esto que el análisis microbiológico en dicho reactor no debe presentar contaminación microbiana, dado que esta afectaría toda la fermentación generando un crecimiento bacteriano ascendente durante el proceso, que podría generar recuentos de hasta 10⁸ UFC/ ml en el reactor R 314, hecho que afectaría el producto final.

6.2.2 PERFIL MICROBIOLÓGICO DEL PROPAGADOR 305

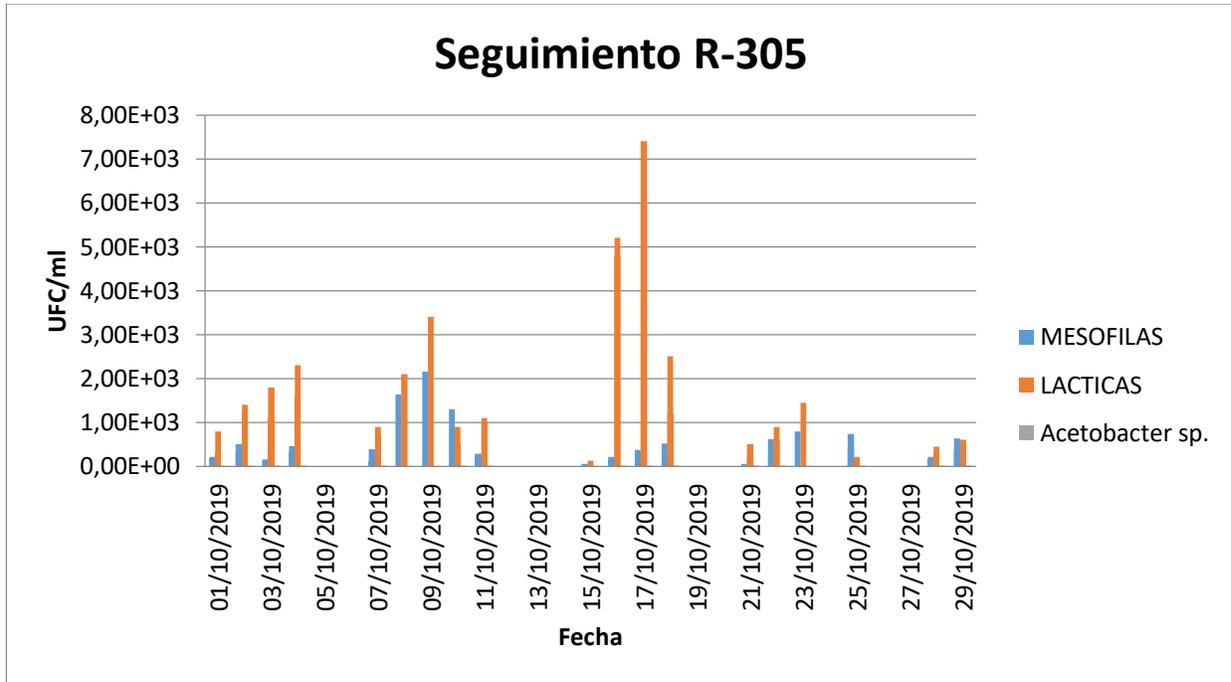
Tabla 5. Informe propagador 305

Análisis	Método	Medio	T°/Ti-empo	Recuento	Informe
Aerobios Mesófilos	Recuento en placa profunda	Agar SPC (Standard plate count)	37°C/ 48 horas	10 ¹ =8	8x10 ¹ UFC/ ml
				10 ¹ =130	13x10 ³ UFC/ ml
<i>bacterias ácido lácticas</i>	Recuento en placa profunda	Agar MRS	37°C/ 48 horas anaerobiosis	10 ⁻¹ = 120 10 ⁻² =14	1,4x10 ³ UFC/ ml
				10 ⁻¹ = 140 10 ⁻² =17	1,7x10 ³ UFC/ ml

Bacterias acéticas	Recuento en superficie	Agar WL	37°C/ 48 horas	10 ⁰ =No crecimiento	<1x10 ¹ UFC/ ml
--------------------	------------------------	---------	----------------	---------------------------------	----------------------------

Fuente: Autor,
INCAUCA 2019

Grafica 3. Comparativo mes R-305.



Fuente: Autor,
INCAUCA 2019

Al observar el perfil microbiológico del propagador R305 se observa crecimiento de aerobios mesofílos y de bacterias lácticas siendo estas las de mayor interés ya que dichas bacterias son el contaminante primario en las fermentaciones reduciendo la eficiencia del proceso, debido a que presentan necesidades nutricionales parecidas a las de la levadura, produciendo una competencia por el carbono disponible y factores de crecimiento, generando la floculación de la levadura y disminuyendo el consumo de carbohidratos, reduciendo así el etanol de 2-7% v/v y ocasionando pérdidas, incluso, del 1% de etanol (Sossa Urrego, González, & Vanegas, 2009), es por esta razón que este reactor se liquida cada 72 horas, por esta razón se evidencia picos bastante altos debido a que dicho fermentador ya ha pasado de sus 50 horas, por otro lado el antibiótico utilizado no es tan efectivo y por ende no ayuda a reducir la contaminación.

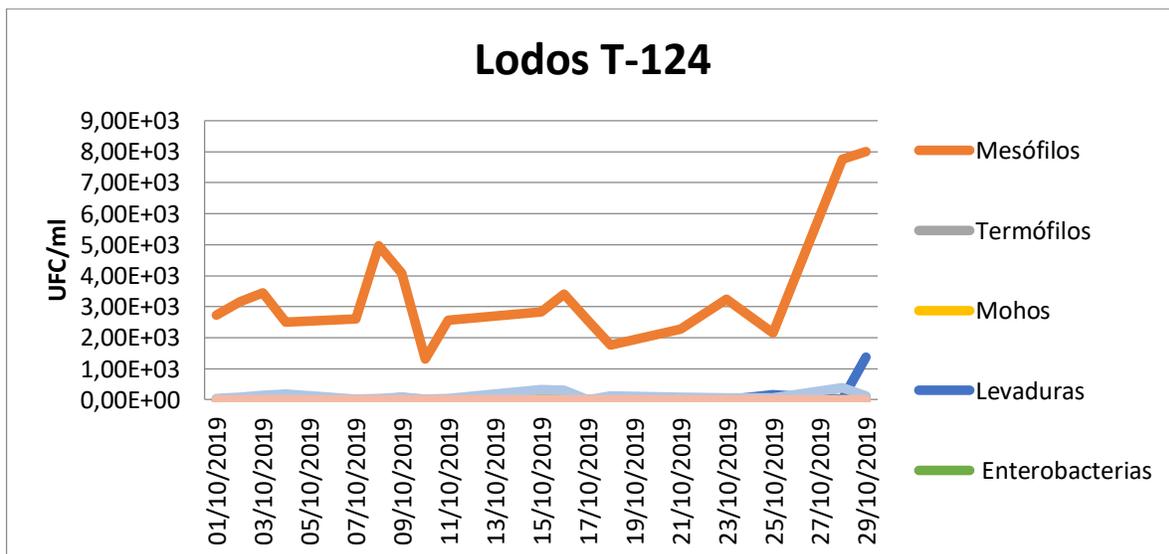
6.2.3 PERFIL MICROBIOLÓGICO DE LA MEZCLA 124

Tabla 6. Informe de la mezcla 124

Análisis	Método	Medio	T°/Ti-empo	Recuento	Informe
Aerobios Mesófilos	Recuento en placa profunda	Agar SPC (Standard plate count)	37°C/ 48 horas	$10^1 = 343$	$3,4 \times 10^3$ UFC/ ml
<i>bacterias ácido lácticas</i>	Recuento en placa profunda	Agar MRS	37°C/ 48 horas anaerobiosis	$10^1 = 15$	$1,5 \times 10^2$ UFC/ ml
Bacterias acéticas	Recuento en superficie	Agar WL	25°C/ 48 horas	$10^0 =$ No crecimiento	$<1 \times 10^1$ UFC/ ml
Mohos y levaduras	Recuento en placa profunda	Agar YGC	25°C/ 48 horas	$10^0 =$ No crecimiento	$<1 \times 10^1$ UFC/ ml
Bacterias termófilas	Recuento en placa profunda	Agar SPC (Standard plate count)	47°C/ 48 horas	$10^1 = 2$	$2,0 \times 10^1$ UFC/ ml
Enterobacterias	Recuento en placa profunda	Agar mac conkey	37°C/ 48 horas	$10^0 =$ No crecimiento	$<1 \times 10^1$ UFC/ ml

Fuente: Autor, INCAUCA 2019

Grafica 4. Comparativo mes de lodos T-124.



Fuente: Autor, INCAUCA 2019

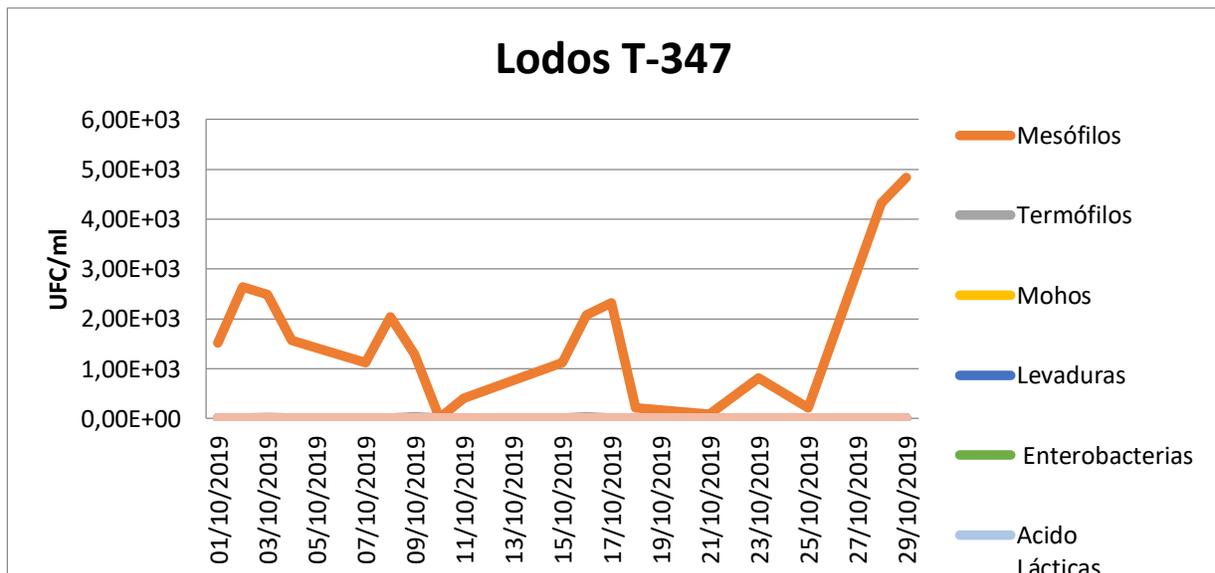
6.2.4. PERFIL MICROBIOLÓGICO DE LA MEZCLA 347

Tabla 7. Informe de la mezcla 347

Análisis	Método	Medio	T°/Ti-empo	Recuento	Informe
Aerobios Mesófilos	Recuento en placa profunda	Agar SPC (Standard plate count)	37°C/ 48 horas	$10^1 = 2480$	$2,4 \times 10^3$ UFC/ ml
<i>bacterias ácido lácticas</i>	Recuento en placa profunda	Agar MRS	37°C/ 48 horas anaerobiosis	$10^1 =$ No crecimiento	$<1 \times 10^1$ UFC/ ml
Bacterias acéticas	Recuento en superficie	Agar WL	25°C/ 48 horas	$10^1 =$ No crecimiento	$<1 \times 10^1$ UFC/ ml
Mohos y levaduras	Recuento en placa profunda	Agar YGC	25°C/ 48 horas	$10^1 =$ No crecimiento	$<1 \times 10^1$ UFC/ ml
Bacterias termófilas	Recuento en placa profunda	Agar SPC (Standard plate count)	47°C/ 48 horas	$10^1 = 2$	$2,0 \times 10^1$ UFC/ ml
Enterobacterias	Recuento en placa profunda	Agar mac conkey	37°C/ 48 horas	$10^0 =$ No crecimiento	$<1 \times 10^1$ UFC/ ml

Fuente: Autor, INCAUCA 2019

Grafica 5. Comparativo mes de lodos T-347



Fuente: Autor, INCAUCA 2019

Al realizar el análisis microbiológico de la materia prima que pasa por los tanques L124 - L347, a través de un tratamiento térmico diferente en cada uno de ellos, en el primer tanque se realiza un proceso de higienización (T 90°C) y en el segundo un proceso de desinfección (120°C, 15 psi, 7 minutos), en el tanque L124 se evidencia un crecimiento representativo de bacterias ácido lácticas esto se debe a que dicha materia prima se obtiene de la extracción del jugo de caña la cual, contiene muchas impurezas del suelo, de donde pueden aislarse dichas bacterias, además la miel al ser rica en carbono es susceptible a la contaminación, Estos resultados demuestran que gran proporción de la materia prima empleada para el llenado de los tanques de fermentación es una fuente importante de contaminación para el proceso, indicando que se están adicionando, constantemente, contaminantes al proceso.

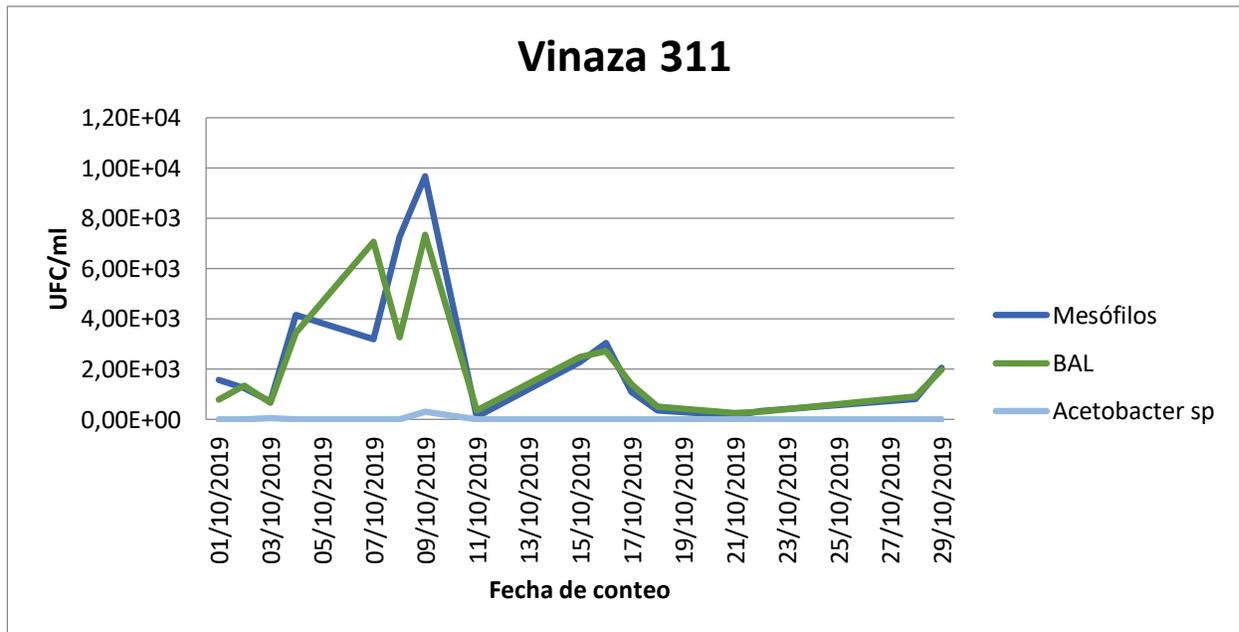
6.2.5 PERFIL MICROBIOLÓGICO DE LA VINAZA DEL 311

Tabla 8. Informe de vinaza del 311

Análisis	Método	Medio	T°/Ti-empo	Recuento	Informe
Aerobios Mesófilos	Recuento en placa profunda	Agar SPC (Standard plate count)	37°C/ 48 horas	10 ¹ = 158	1,5 x10 ³ UFC/ ml
<i>bacterias ácido lácticas</i>	Recuento en placa profunda	Agar MRS	37°C/ 48 horas anaerobiosis	10 ¹ =79	7,9x10 ² UFC/ ml
Bacterias acéticas	Recuento en superficie	Agar WL	25°C/ 48 horas	10 ¹ =No crecimiento	<1x10 ¹ UFC/ ml

Fuente: Autor, INCAUCA 2019

Grafica 6. Comparativo mes vinaza 311.



Fuente: Autor,
INCAUCA 2019

El proceso de fermentación alcohólica realizado en el ingenio del cauca se basa principalmente en la recirculación de vinazas las cuales presentan una serie de ventajas como es menor costos de energía durante el tratamiento (evaporación), así como en una reducción del impacto ambiental de esta corriente en caso de que se descargue a un cuerpo receptor sin ningún tratamiento. Por otro lado, el potencial de contaminación de las vinazas es considerable ya que puede superar valores de demanda química de oxígeno (DQO) de 100 g/L, es por esta razón que se obtienen recuentos altos de bacterias ácido lácticas y aerobios mesófilos.

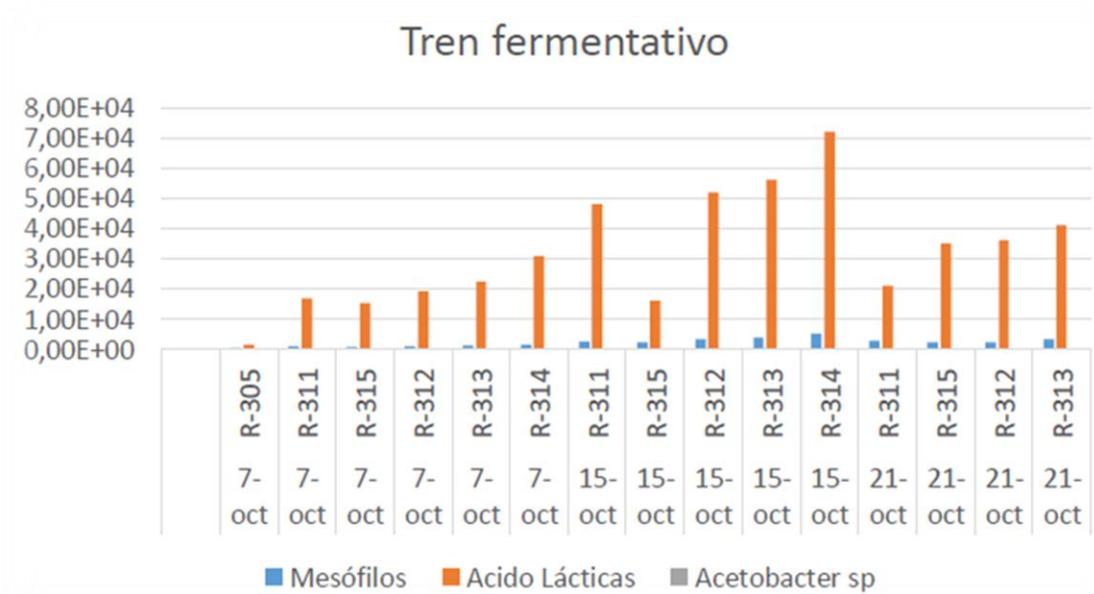
6.2.6 PERFIL MICROBIOLÓGICO DEL TREN FERMENTATIVO.

Tabla 9. informe microbiológico del tren fermentativo

FECHA DE LECTURA	Fermentador ó Propagador	Mesofílos	Acido Lácticas	<i>Acetobacter sp.</i>
		UFC/ ml		
7-oct	R-305	3,50E+02	1,60E+03	9,00E+00
7-oct	R-311	8,80E+02	1,68E+04	9,00E+00
7-oct	R-315	6,40E+02	1,52E+04	9,00E+00
7-oct	R-312	1,08E+03	1,92E+04	9,00E+00
7-oct	R-313	1,20E+03	2,24E+04	9,00E+00
7-oct	R-314	1,52E+03	3,08E+04	9,00E+00
15-oct	R-311	2,50E+03	4,80E+04	9,00E+00
15-oct	R-315	2,30E+03	1,60E+04	9,00E+00
15-oct	R-312	3,40E+03	5,20E+04	9,00E+00
15-oct	R-313	3,90E+03	5,60E+04	9,00E+00
15-oct	R-314	5,20E+03	7,20E+04	9,00E+00
21-oct	R-311	2,70E+03	2,10E+04	9,00E+00
21-oct	R-315	2,40E+03	3,50E+04	9,00E+00
21-oct	R-312	2,40E+03	3,60E+04	9,00E+00
21-oct	R-313	3,40E+03	4,10E+04	9,00E+00

Fuente: Autor
INCAUCA 2019

Grafica 7. Resultados del tren fermentativo del mes de octubre



Fuente: Autor,
INCAUCA 2019

La evaluación microbiológica se realiza una vez por semana para determinar la curva de crecimiento de las bacterias, en la gráfica 8 podemos observar que a medida que va pasando la fermentación las bacterias ácido lácticas van aumentando alcanzando una concentración máxima de 7×10^4 UFC/ ml lo cual se considera un recuento adecuado para la fermentación.

7. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA

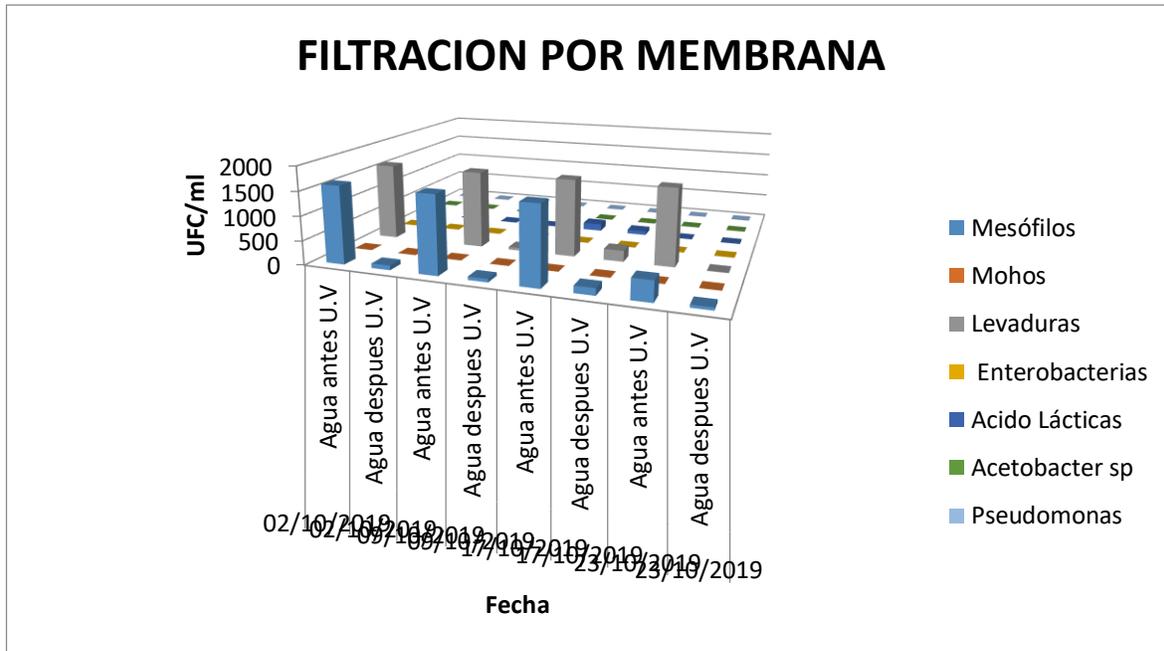
Para determinar la calidad microbiológica del agua fue necesario utilizar 5 medios de cultivo. Los medios TTC, WORT y MACKONKEY son medios deshidratados a las cuales previamente se les adiciona 3 ml de agua destilada estéril y 0,1 de cicloheximida, y virginamicina. A continuación, se muestran los resultados de los dos puntos de toma de muestra

Tabla 10. Informe de determinación microbiológica del agua

MUESTRA	Análisis	Método	Medio	T°/Tiempo	Recuento	Informe
AGUA ANTES DE UV	Aerobios Mesofílos	filtración por membrana	Medio TTC deshidratado	37°C/ 48 horas	1600	2,4 x10 ³ UFC/ml
<i>bacterias ácido lácticas</i>	bacterias ácido lácticas	filtración por membrana	Agar MRS	37°C/ 48 horas anaerobiosis	0	<1x10 ¹ UFC/ml
Bacterias acéticas	Bacterias acéticas	filtración Por membrana	Agar WL	25°C/ 48 horas	0	<1x10 ¹ UFC/ml
Mohos y levaduras	Mohos y levaduras	filtración por membrana	Medio wort deshidratado	25°C/ 48 horas	Levaduras 1600	<1x10 ¹ UFC/ml
Enterobacterias	Enterobacterias	filtración por membrana	Medio Mac conkey deshidratados	37°C/ 48 horas	0	<1x10 ¹ UFC/ml

Fuente: Autor, INCAUCA 2019

Grafica 8. Comparativo de filtración por membrana.



Fuente: Autor,
INCAUCA 2019

La evaluación microbiana del agua del proceso es fundamental ya que, si el esterilizador UV no funciona correctamente, este fluido le agregara una carga microbiana afectando la fermentación obteniendo recuentos muy altos, dicho análisis se realiza una vez por semana con el fin de evaluar el esterilizador, al observar la gráfica 8 podemos ver recuentos elevados antes de que se realice la esterilización, una vez se realiza este proceso la carga microbiana disminuye considerablemente. A pesar de que en este apartado se analizan muestras de agua, la planta de destileria no se basa en una norma para determinar el límite máximo de las bacterias.

8. AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS

La economía del proceso de fermentación de biocombustibles impide el nivel de esterilidad requerido para prevenir la contaminación bacteriana sin el uso antibióticos, por lo tanto, se ha especulado sobre el potencial del fago para controlar LAB durante las fermentaciones. Es por esto que en este estudio se quiso aislar fagos a partir del jugo de caña de primera extracción mediante dos protocolos (doble capa y difusión en placa) obteniendo los resultados mostrados a continuación.

En primer lugar, se hace necesario tener la bacteria de estudio de forma axénica y en un cultivo joven, es por esto que a partir de las muestras de los fermentadores, se seleccionan las cajas con mejor crecimiento de bacterias ácido lácticas figura 8, a partir de este cultivo mixto se tomaron 2 colonias diferentes macroscópicamente, a las cuales se les realizó una descripción macroscópica como se observa en la tabla 2, y se repicaron en este mismo medio con el fin de obtener cultivos axénicos. Una vez las bacterias ácido lácticas se tienen puras se procede a realizar los ensayos como se muestra en la tabla

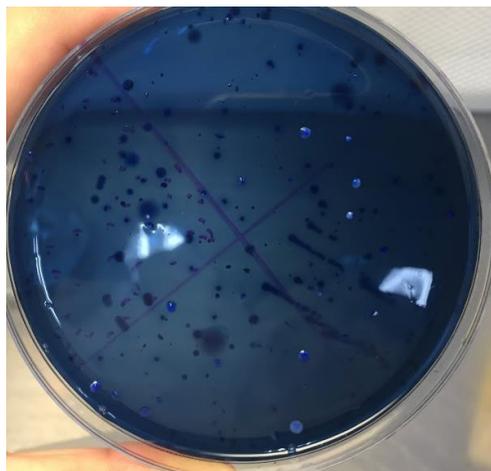
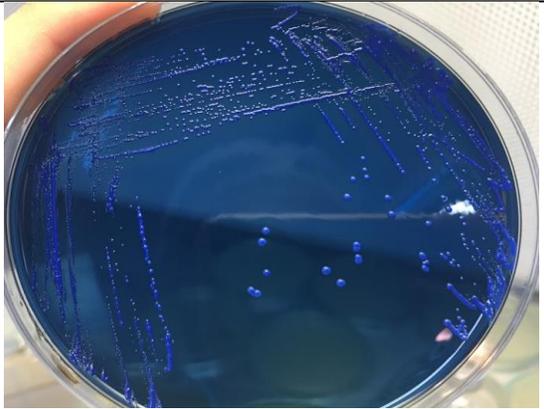
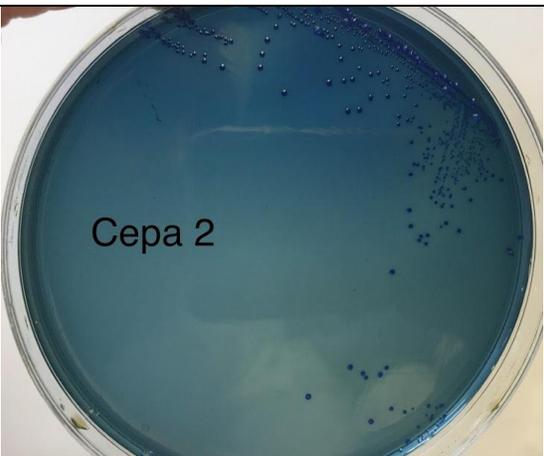


Figura 8. Muestra del último reactor dilución 10^{-2}
cultivo mixto
Fuente: Autor
INCAUCA 2019

Tabla 11. Descripción macroscópica de las colonias

DESCRIPCION MACROSCOPICA	IMAGEN
<p>AISLAMIENTO 1</p> <p>Colonia grande, redonda con borde uniforme presenta un color azul claro alrededor y un azul oscuro en el centro</p>	
<p>AISLAMIENTO 2</p> <p>Colonia mediana, redonda con borde regular, presenta un color azul oscuro</p>	

Fuente: Autor,
INCAUCA 2019

Tabla 12. Resultados del método de doble capa

Ensayo	Fecha de siembra	Fecha de lectura	Medio de cultivo	Temperatura de incubación	Recuento Presencia / ausencia de calvas
Ensayo # 1 aislamiento 1	29-oct-19	31-oct-19	Agar nutritivo	37°C en anaerobiosis	Ausencia de calvas
Ensayo # 1 aislamiento 2	29 -oct-19	31-oct-19	Agar nutritivo	37°C en anaerobiosis	Ausencia de calvas
Ensayo # 2 aislamiento 1	6-nov-19	8-nov-19	Agar nutritivo	37°C	Ausencia de calvas
Ensayo # 2 aislamiento 2	6-nov-19	8-nov-19	Agar nutritivo	37°C	Ausencia de calvas

Fuente: Autor, INCAUCA 2019

Tabla 13. Resultados del método de difusión en pozo

Ensayo	Fecha de siembra	Fecha de lectura	Medio de cultivo	Temperatura de incubación	Presencia / ausencia de calvas
Ensayo # 3 aislamiento 1	13-nov-19	15-nov-19	Agar nutritivo	37°C en anaerobiosis	Ausencia de calvas
Ensayo # 3 aislamiento 2	19-nov-19	21 nov-19	Agar nutritivo	37°C en anaerobiosis	Ausencia de calvas
Ensayo # 4 aislamiento 1	22-nov-19	25 nov-19	Agar nutritivo	37°C	Ausencia de calvas
Ensayo # 4 aislamiento 2	22-nov-19	25-nov-19	Agar nutritivo	37°C	Ausencia de calvas

Fuente: Autor,
INCAUCA 2019

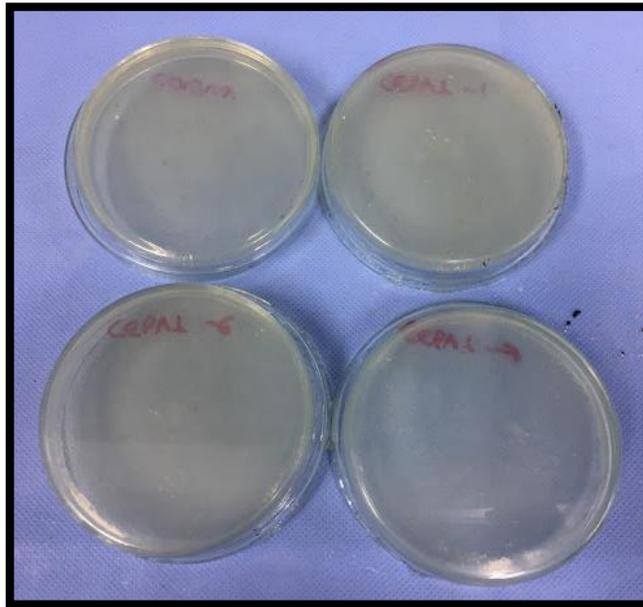


Figura 9. Método de doble capa, ensayo 1, aislamiento 1

Fuente: Autor
INCAUCA 2019

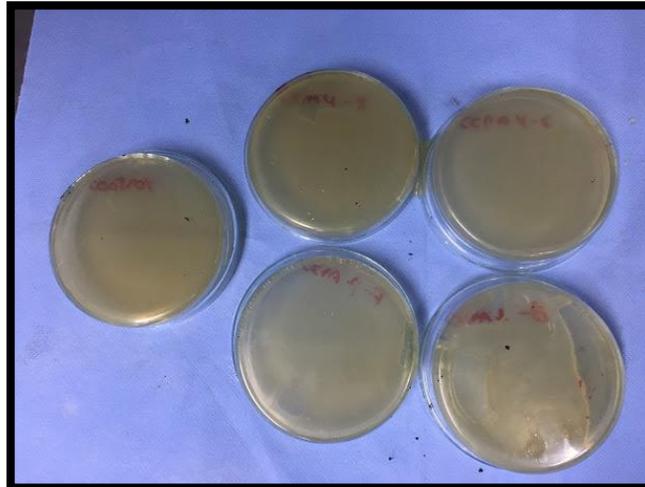


Figura 10. Método de doble capa, ensayo 1, aislamiento 2

Fuente: Autor
INCAUCA 2019

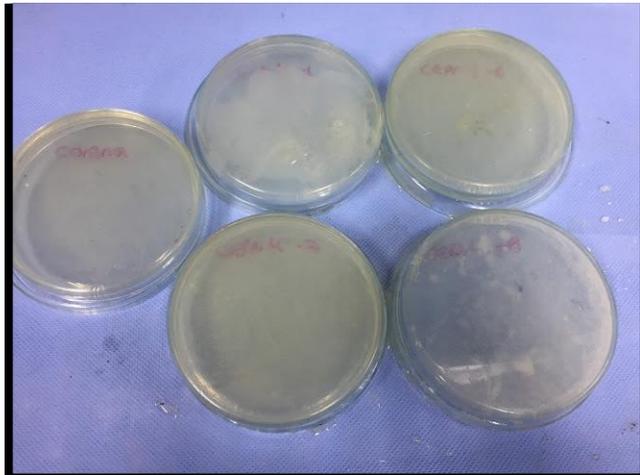


Figura 11. Método de doble capa, ensayo 2, aislamiento 1
Fuente: Autor
INCAUCA 2019

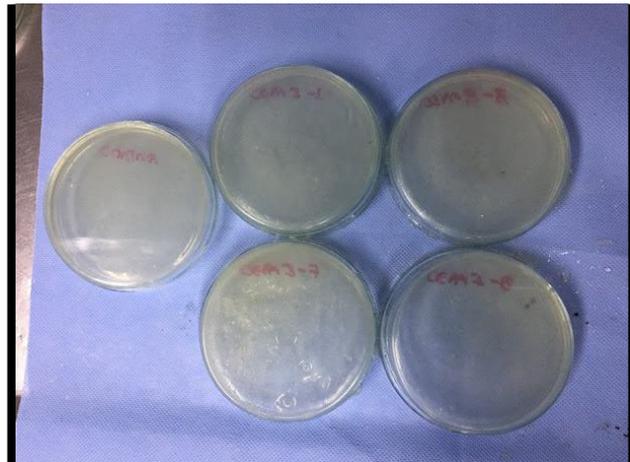


Figura 12. Método de doble capa, ensayo 2, aislamiento 2
Fuente: Autor
INCAUCA 2019

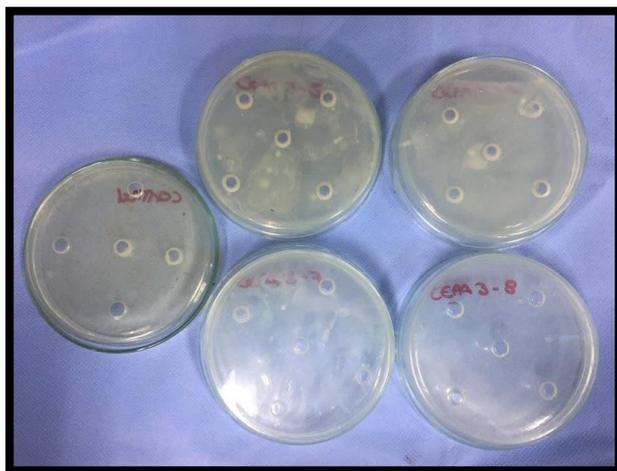


Figura 13. Método de difusión, ensayo 3, aislamiento 1
Fuente: Autor
INCAUCA 2019

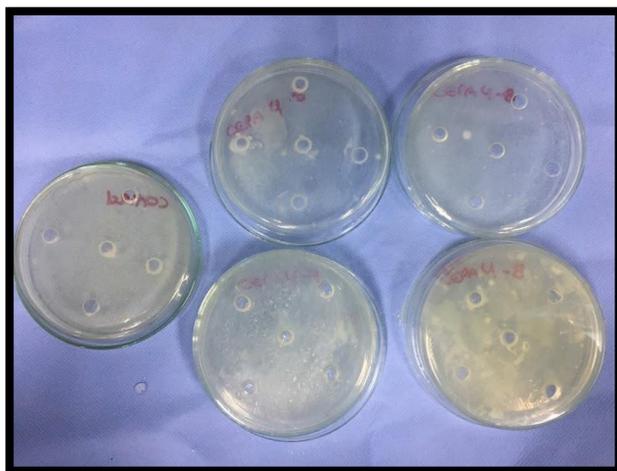


Figura 14. Método de difusión, ensayo 3, aislamiento 2
Fuente: Autor
INCAUCA 2019

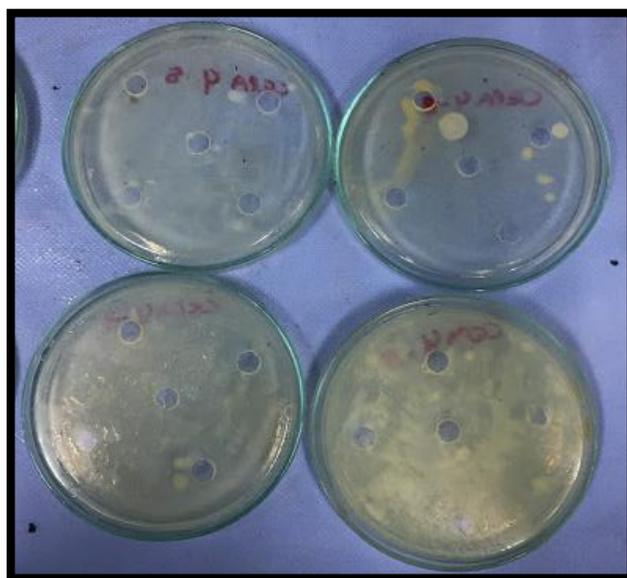


Figura 15. Método de difusión, ensayo 4, aislamiento 1

Fuente: Autor
INCAUCA 2019

Los fagos LAB se encuentran entre los fagos más ampliamente investigados, debido a su impacto perjudicial en los procesos de fermentación de alimentos, los fagos que infectan cepas lecheras de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* han sido objeto de un análisis considerable, con 66 y 11 secuencias completas del genoma disponibles, respectivamente (International Commission on Harmonization, 2002). Sin embargo, no se han descrito fagos capaces de controlar ampliamente las poblaciones de LAB presentes específicamente en instalaciones de fermentación de etanol. (Liu et al., 2015).

Los métodos implementados en la presente investigación son utilizados en la industria láctea. La prevalencia de fagos en esta industria es muy alta debido a que se encuentran de manera constante en la leche cruda provocando la infección de cultivos iniciadores (LAB), afectando la calidad del producto y retrasando la fermentación, caso contrario sucede en la industria del etanol en donde dichos fagos se consideran una solución con el fin de disminuir la contaminación microbiana que retrasa dicho proceso.

Al comparar la composición nutricional de las dos matrices utilizadas para el aislamiento de los fagos, podemos observar que la leche presenta mejores requerimientos para la propagación de los mismos un elemento clave es la presencia del calcio (“Composición nutricional de la leche de ganado vacuno,” 2005), dicho elemento es un requerimiento básico para la propagación de los

bacteriófagos los cationes de Ca, facilitan el cambio conformacional a la "forma activada" de la placa base con la extensión concomitante de las fibras de la cola para unirse a la superficie del huésped bacteriano (Harada et al., 2018). Teniendo claro eso llegamos a una hipótesis debido que el jugo de caña carece de calcio impidiendo su propagación. Según un estudio realizados por (Yoon, Barrangou-Pouey, Breidt, Klaenhammer, & Fleming, 2002) lograron aislar bacteriófagos a partir de fermentaciones de chucrut, adicionándole calcio al lisado de fagos lo que les permitió ver de manera más eficaz las calvas.

Otro factor que pudo inhibir el crecimiento de bacteriófagos fue el paso de centrifugación siendo este un proceso exotérmico que produce calor debido a la fricción con el aire en el interior de la cámara, este calor dependerá de múltiples factores como el tipo de rotor, la velocidad o la temperatura ambiente. Para lograr el aislamiento de los bacteriófagos se requiere que este paso presente una temperatura de 4°C para evitar que la inactivación de los mismo, factor que en el laboratorio en donde se realizó los ensayos no se pudo controlar (Garneau & Moineau, 2011).

Comparando lo obtenido en este trabajo con el de (Liu et al., 2015) los cuales, aislaron fagos a partir de chucrut comercial y aguas residuales municipales, utilizando huésped de *L. fermentum* y *L. mucosae* aisladas de diferentes plantas de fermentación de etanol de maíz, dichos fagos mostraron mejor actividad lítica frente a *L. fermentum*, mediante microscopía electrónica de transmisión determinaron su morfología uno de ellos presenta colas largas, no flexibles, (~ 179 nm) con un ancho promedio de ~ 10 nm, y cápsides isométricas con un diámetro promedio de ~ 62 nm, el otro virion exhibió cuerpos contráctiles gruesos (20 nm), no flexibles, de ~202 nm y cabezas isométricas con un diámetro promedio de ~ 89 nm, estos dos entes se clasificaron como *siphophage* y *myophage*, respectivamente. Por último y después de realizar un ensayo a escala de laboratorio llegaron a la conclusión de que las muestras tratadas con fagos mostraron una recuperación completa de la producción de etanol sin disminución de la viabilidad de la levadura (Liu et al., 2015)

Otra posible hipótesis que puede sustentar el resultado obtenido es resistencia generada por las LAB mediante una serie de sistemas de defensa para superar las infecciones de los bacteriófagos, lo que les permite sobrevivir en un ambiente lleno de sus depredadores. Estos sistemas anti-fagos se han organizado en cinco grupos dependiendo de la forma en que operan: (i) inhibición de la adsorción de fagos, (ii) bloqueo de la inyección de ADN de fagos, (iii) sistemas de modificación de restricción, (iv) infección abortiva de fagos sistemas, y finalmente, los más recientemente descritos, (v) sistemas CRISPR / cas .cada uno de ellos dirigido a un paso diferente en el ciclo de multiplicación de fagos (Garneau & Moineau, 2011).

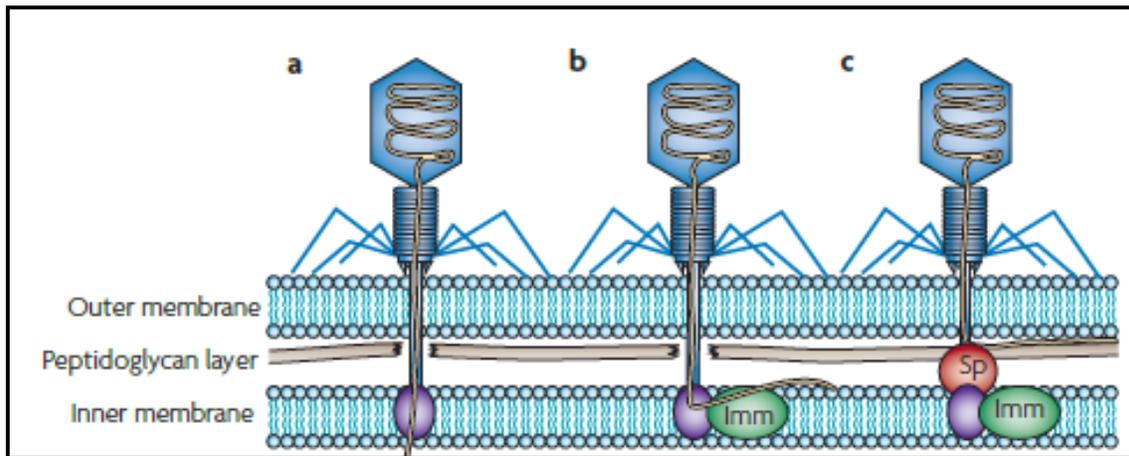


Figura 16. Sistema de bloqueo del ADN del fago a la célula huésped
Fuente: (Labrie, Samson, & Moineau, 2010).

De estos sistemas de resistencia el más utilizado por bacterias Gram positivas especialmente de especies de *Lactococcus lactis* es el bloqueo de la entrada de ADN del fago, este método de resistencia se logra mediante un sistemas de exclusión de superinfección (Sie) que se basa en proteínas que bloquean la entrada de DNA del fago a las células huésped, lo que confiere inmunidad contra fagos específicos, estas enzimas se pueden encontrar ancladas a la membrana o asociadas con componentes de la membrana, para evaluar dicha resistencia labrie, Samson & Moineau, 2010 evaluaron este sistema en el colifago T4 el cual presenta dos sistemas Sie codificados por IMM y SP como se observa en la figura 18 los cuales actúan por separado. IMM previene la transferencia del DNA del fago al citoplasma bacteriano al cambiar la conformación del sitio de inyección, por otro lado, presenta dos dominios transmembrana no convencionales y se predice que se localiza en la membrana, pero dicha proteína al encontrarse sola no confiere inmunidad completa del fago por ende debe asociarse con otra proteína de membrana para ejercer su función y lograr la exclusión completa. La proteína de membrana Sp inhibe la actividad de la lisozima T4, evitando así presumiblemente la degradación del peptidoglucano y la posterior entrada de ADN del fago. La lisozima T4 se encuentra en el extremo de la cola y crea agujeros en la pared celular del huésped, lo que facilita la inyección de DNA del fago en la célula (Labrie et al., 2010).

9. CONCLUSIONES

- Se realiza de manera eficiente el análisis de contaminación microbiana mediante la lectura del ácido láctico realizado al tren fermentativo y se determina que la viabilidad de las levaduras es inversamente proporcional a la presencia de bacterias ácido lácticas.
- Se determina que los métodos de análisis de placa profunda y superficie son altamente confiables para determinar la calidad microbiológica en cada uno de los reactores de la planta de destilería.
- Se concluye bajo las condiciones en que se realizó la investigación en la empresa INCAUCA tomando muestras de jugo de caña de primera extracción y mediante los métodos de difusión en placa y doble capa no se logra aislar bacteriófagos, ya que esta matriz es carente de calcio, elemento que según la bibliografía consultada es de vital importancia para su propagación.

10. RECOMENDACIONES

- Es recomendable que para posteriores trabajos de aislamiento de bacteriófagos específicos para bacterias ácido lácticas la fuente de aislamiento sea agua residual ya que en la bibliografía se encuentran trabajos que evidencian su presencia y a su vez su eficiencia contra dichas bacterias.
- Según la bibliografía consultada también se recomienda inducir el ciclo lítico de dichos bacteriófagos median luz U.V, ya que muchos de ellos pueden estar presente en las bacterias ácido lácticas de forma lisogénica.

11. BIBLIOGRAFIA

- Beckner, M., Ivey, M. L., & Phister, T. G. (2011). Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology*, 53(4), 387–394. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03124.x>
- Brexó, R. P., & Sant'Ana, A. S. (2017). Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73, 423–434. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2017.01.151>
- C., M., C., M., & J.E., S. (2004). Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7365–7371. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7365>
- Ca, E. D. E., Productoras, P., Carburante, D. E. A., & Funcionamiento, E. N. (2011). Etanol de caña anhidro.
- Cardona Alzate, C. (2009). Perspectives of Biofuels Production in Colombia: Latinamerican and World Contexts. *Revista de Ingeniería*, (29), 109–120.
- Carlos, L., Olitta, T., & Nitsche, S. (2011). Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*, (April). <https://doi.org/10.5772/17047>
- Carvalho, D. J., Moretti, R. R., Colodette, J. L., & Bizzo, W. A. (2019). Assessment of the self-sustained energy generation of an integrated first and second generation ethanol production from sugarcane through the characterization of the hydrolysis process residues. *Energy Conversion and Management*, 112267. <https://doi.org/10.1016/J.ENCONMAN.2019.112267>
- Cobos Ramirez, Y. L., & ylcobosr@libertadores.edu.co. (2019). Estudio comparativo para la producción de bioetanol a través de la fermentación en batch usando *saccharomyces cerevisiae* entre (*mangifera indica*) y (*vitis vinifera*). Retrieved from <https://repository.libertadores.edu.co/handle/11371/1786#.XcCRHaDYZgU.mendeley>
- Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. (2005). *Revista Lasallista de Investigación*, 2(1), 38–42.
- Dibico. (2015). *Bacteriología General* Catálogo 1267, 1267.
- Fischetti, V. A. (2005a). Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends in Microbiology*, 13(10), 491–496. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2005.08.007>

- Fischetti, V. A. (2005b). Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends in Microbiology*, 13(10), 491–496. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2005.08.007>
- Garneau, J. E., & Moineau, S. (2011). Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories*, 10(SUPPL. 1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S20>
- Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., ... Balcão, V. M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*, 212–213, 38–58. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2018.04.007>
- International Commission on Harmonization. (2002). International Conference on Harmonization (ICH, 1997) E8 Guideline: General Considerations for Clinical Trials, 68(2), 973–976. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.973>
- Kim, B. H., & Gadd, G. M. (2019). Anaerobic fermentation. *Prokaryotic Metabolism and Physiology*, 230–267. <https://doi.org/10.1017/9781316761625.008>
- Kumar, S., Singh, N., & Prasad, R. (2010). Anhydrous ethanol: A renewable source of energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 1830–1844. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2010.03.015>
- Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Liu, M., Bischoff, K. M., Gill, J. J., Mire-Criscione, M. D., Berry, J. D., Young, R., & Summer, E. J. (2015). Bacteriophage application restores ethanol fermentation characteristics disrupted by *Lactobacillus fermentum*. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0325-9>
- Lopes, M. L., Paulillo, S. C. de L., Godoy, A., Cherubin, R. A., Lorenzi, M. S., Giometti, F. H. C., ... Amorim, H. V. de. (2016). Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 64–76. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2016.10.003>
- Mahony, J., Bottacini, F., van Sinderen, D., & Fitzgerald, G. F. (2014). Progress in lactic acid bacterial phage research. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S1. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S1>
- Mahony, J., Martel, B., Tremblay, D. M., Neve, H., Heller, K. J., Moineau, S., & Sinderen, D. van. (2013). Identification of a New P335 Subgroup through Molecular Analysis of Lactococcal Phages Q33 and BM13. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(14), 4401–4409. <https://doi.org/10.1128/AEM.00832-13>
- Mahony, J., & van Sinderen, D. (2014). Current taxonomy of phages infecting lactic acid bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5(JAN), 1–7.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00007>

- Medina, M., Lara, L., Aguilar, C., & De, H. (2011). Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante. *Acta Química Mexicana*, 3(6), 35–41. Retrieved from <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM6/Art4.pdf>
- Murphy, J., Mahony, J., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2017). Bacteriophages Infecting Lactic Acid Bacteria. *Cheese*, 249–272. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00010-7>
- Nouraldin, A. A. M., Baddour, M. M., Harfoush, R. A. H., & Essa, S. A. M. (2016). Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Alexandria Journal of Medicine*, 52(2), 99–105. <https://doi.org/10.1016/J.AJME.2015.05.002>
- Petty, N. K., Evans, T. J., Fineran, P. C., & Salmond, G. P. C. (2007). Biotechnological exploitation of bacteriophage research. *Trends in Biotechnology*, 25(1), 7–15. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2006.11.003>
- Pielech-Przybylska, K., Balcerek, M., Dziekonska-Kubczak, U., Pacholczyk-Sienicka, B., Ciepielowski, G., Albrecht, Ł., & Patelski, P. (2019). The Role of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast and Lactic Acid Bacteria in the Formation of 2-Propanol from Acetone during Fermentation of Rye Mashers Obtained Using Thermal-Pressure Method of Starch Liberation. *Molecules*, 24(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules24030610>
- Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R. Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2015). Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*, 15(6), fov053. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov053>
- Ravagnani, M. A. S. S., Reis, M. H. M., Filho, R. M., & Wolf-Maciel, M. R. (2010). Anhydrous ethanol production by extractive distillation: A solvent case study. *Process Safety and Environmental Protection*, 88(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2009.11.005>
- Saad, A. M., Soliman, A. M., Kawasaki, T., Fujie, M., Nariya, H., Shimamoto, T., & Yamada, T. (2019). Systemic method to isolate large bacteriophages for use in biocontrol of a wide-range of pathogenic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2018.07.001>
- Sossa Urrego, D. P., González, L. M., & Vanegas, M. C. (2009). ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CONTAMINANT *Lactobacillus* IN A COLOMBIAN ALCOHOL FERMENTATION PLANT. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 12(2), 163–172. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-

- Suárez-Machín, Caridad., Garrido-Carralero., Norge, Antonio., Guevara-Rodríguez., & C., & Amarilys. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *Instituto Cubano de Investigaciones Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar (ICIDCA)*, 50(1), 20–28. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>
- Torabi, M., Drahansky, M., Paridah, M. ., Moradbak, A., Mohamed, A. ., Owolabi, F. abdulwahab taiwo, ... Abdul Khalid, S. H. . (2016). We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. *Intech, i(tourism)*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Tosin, C., Andrietta, S. R., & da Graça Stupiello Andrietta, M. (2015). Population dynamics of yeasts inhabiting bioethanol production with cell recycling. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(3), 343–348. <https://doi.org/10.1002/jib.237>
- Universidad de los Andes (Bogotá, C. F. de I. (2009). *Revista de ingeniería.Revista de Ingeniería*. Universidad de los Andes, Facultad de Ingeniería. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-49932009000100014&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Valle, U., & Valle, U. (2004). Selección de tecnologías apropiadas para la producción de etanol carburante. *Ingeniería de Recursos Naturales y Del Ambiente*, 1(2), 48–55.
- van der Aa Kühle, A., & Jespersen, L. (1998). Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *International Journal of Food Microbiology*, 43(3), 205–213. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00113-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00113-5)
- Wilson, N. (2014). Contamination: bacteria and wild yeasts in a whisky fermentation. *Whisky*, 147–154. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-401735-1.00008-8>
- Yoon, S. S., Barrangou-Pouey, R., Breidt, F., Klaenhammer, T. R., & Fleming, H. P. (2002). Isolation and characterization of bacteriophages from fermenting sauerkraut. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 973–976. <https://doi.org/10.1128/aem.68.2.973-976.2002>