

**CONTROL EN EL PROCESO DE FERMENTACION PARA LA PRODUCCION  
DE ALCOHOL EN INCAUCA S.A.S**

**PASANTE: OLGA MILENA PABON SERRANO**

**TUTOR: JOSE FELIX ORTIZ**

**JEFE DE PASANTIA: JOHANA MORENO CASTELLANOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS.  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA.  
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA.  
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER.**

**2020.**

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>I</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>III</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>IV</b>
<b>4. MARCO REFERENCIAL.</b>	<b>V</b>
4.1. Datos históricos.	V
4.2. Alcohol Etílico	VI
4.3. Producción de alcohol.	VII
4.4. Fermentación Alcohol	IX
4.1. Contaminación de la fermentación.	XII
<b>5. MARCO LEGAL</b>	<b>XIV</b>
<b>6. METODOLOGÍA</b>	<b>XVII</b>
6.1. Medición de Ácido Láctico	XVII
6.2. Recuento de Levadura y Viabilidad Celular.	XVII
6.3. Determinación de Contaminantes.	XVIII
6.4. Otras actividades.	XX
<b>7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES</b>	<b>XXIII</b>
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSION.</b>	<b>II</b>
8.1. Medición de Ácido Láctico	II
8.2. Recuento de Levadura y Viabilidad Celular.	III
8.3. Determinación de Contaminantes.	V
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>IX</b>
<b>10. RECOMENDACIONES O SUGERENCIAS.</b>	<b>X</b>
<b>11. GLOSARIO.</b>	<b>XI</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>XIII</b>

## **LISTA DE TABLAS.**

Tabla 1. propiedades fisicoquímicas y termodinámicas del alcohol etílico .....	VI
Tabla 2. normatividad alcohol carburante en Colombia, según la federación nacional de biocombustibles. ....	XV
Tabla 3. Siembra de cada una de las muestras realizadas en el laboratorio. ....	XIX
Tabla 4. cronograma de actividades realizadas semanalmente. ....	XXIII
tabla 5. concentración de ácido láctico expresados en partes por millón (ppm) realizados de lunes a viernes, en el proceso de obtención de etanol. ....	II
Tabla 6. recuento de levadura de cada uno de los fermentadores, propagador y cremas, expresado en levadura/ml y viabilidad celular. ....	IV
Tabla 7. recuentos de microorganismos contaminantes en la obtención de alcohol. ....	VI

## **LISTA DE GRÁFICOS, FIGURAS Y SIMILARES.**

Esquema 1. Proceso de fermentación alcohol desarrollado en Incauca S.A.S. ....	XI
Imagen 1. Proceso de la caña de azúcar para ser transformada en azúcar, alcohol y energía. ....	IX

## 1. INTRODUCCIÓN

El alcohol carburante es utilizado biocombustible, aumentando el O<sub>2</sub> de la gasolina, permitiendo mayor combustión y disminuyendo las emisiones contaminantes de hidrocarburos. La principal materia prima para la producción de alcohol es la caña de azúcar, ya sea en forma de jugo de caña o como melazas subproducto de la industria azucarera. Para la producción de dicho alcohol se realiza un proceso de fermentación convirtiendo los azúcares presentes en la materia prima, en etanol y gas carbónico, por medio de la acción de levaduras; se desarrolla por medio de un proceso continuo de cinco reactores que trabajan en serie, donde se llevan a cabo las reacciones químicas de transformación de azúcar en etanol y gas carbónico (INCAUCA S.A.S). El microorganismo más utilizado para la obtención de alcohol es la levadura ***Saccharomyces cerevisiae***, por su capacidad de hidrolizar la sacarosa de la caña de azúcar, hasta glucosa y fructosa en condiciones anaeróbicas, generando 2 moles adenosín trifosfato (ATP), por cada mol de hexosa consumida y 2 moles de etanol; también tiene la capacidad de convertir las hexosas en CO<sub>2</sub> aeróbicamente, por ende, dependiendo de las concentraciones de O<sub>2</sub> en el medio y de la fuente de carbono, se puede favorecer uno de los dos procesos. Las levaduras tienen la ventaja adicional de tolerar concentraciones relativamente altas de etanol (Cardona, C; Sánchez, O. 2005).

Al ser un proceso industrializado, se deben controlar diferentes variables como el pH, la temperatura, concentración de azúcares, viabilidad de células vivas, cantidad de etanol producido, acidez volátil, ácido láctico y contaminantes bacterianos entre otras. El proceso de producción de etanol es propenso a diferentes fuentes de contaminación, comenzando con la materia prima empleada de la cual provienen diferentes bacterias, esta debe mantenerse controlada, debido a que las bacterias crean un descenso en las fuentes de carbono disponible para que la levadura lo utilice es decir compiten con la levadura por el sustrato; una vez introducidas a la fermentación estas pueden sobrevivir con facilidad porque el proceso no es estéril y más cuando no se realiza una buena limpieza en las líneas de transferencia y los tanques de almacenamiento; algunos de estos microorganismos pueden formar biopelículas generando resistencia a los antibióticos. El rendimiento alcohólico se puede ver afectado por la presencia de estos microorganismos, disminuyendo la productividad en el proceso de fermentación alcohólica (Sossa, U; González, D; et al. 2009).

La producción de metabolitos y biomasa a nivel industrial por la levadura está ligada a condiciones estresantes de cultivo, principalmente la concentración de oxígeno disuelto, presión osmótica, temperatura, pH y compuestos tóxicos como el etanol, hacen que la levadura pierda su viabilidad, disminuyendo de igual forma la productividad en el proceso de fermentación alcohólica (Suárez, C; Garrido, N; Guevara, C. 2016). Por tal motivo el seguimiento que se realiza en el laboratorio de microbiología es esencial para monitorear los diferentes problemas que se presentan en la fermentación y así poder dar una solución adecuada, obteniendo una mayor eficiencia en el proceso. El objetivo de este trabajo es controlar el proceso de fermentación para la obtención de alcohol carburante, a partir de las metodologías realizadas en el laboratorio de microbiología destilería Incauca S.AS; sin embargo, los resultados evidenciados son casos hipotéticos, debido a que la empresa no permite la divulgación de dichos datos.

## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Controlar el proceso de fermentación para la obtención de alcohol carburante, en la destilería Incauca S.AS

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración de ácido láctico a lo largo del proceso de fermentación.
- Evaluar la viabilidad de las células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante las diferentes etapas de la fermentación.
- Verificar la presencia de microorganismos contaminantes en el proceso de fermentación.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El consumo de combustibles genera grandes cantidades de gases que son liberados a la atmosfera, siendo una de las principales fuentes de contaminación atmosférica, ya que contribuyen a aumentar el efecto invernadero; la contaminación del aire en el país se genera principalmente por la utilización de combustibles fósiles, el 41% de las emisiones en Colombia se generan en 8 ciudades: Bogotá, Medellín, Cali, Barranquilla, Sogamoso, Bucaramanga, Cartagena y Pereira. (Conpes 3344. 2005). El uso de estos combustibles fósiles representa un gran problema de sostenibilidad y deterioro del medio ambiente, por lo que es responsabilidad de todos, empresas y sociedad, disminuir su consumo y elegir el uso de productos generados con recursos renovables como lo es la producción de alcohol anhidro para usarse como alcohol carburante disminuyendo aproximadamente un 74% las emisiones de gases efecto invernadero producidos por la combustión de la gasolina lo que hace un ambiente más limpio.

En Colombia la producción de este alcohol anhidro, se basa principalmente en un proceso biotecnológico a partir de la caña de azúcar y el uso de una levadura que produzca eficientemente el alcohol en cantidades industriales. Por lo tanto, es de gran importancia realizar un control del proceso de producción ya que el proceso es susceptible a cambios o variables que pueden llegar a generar grandes pérdidas en la producción de alcohol y por ende pérdidas económicas para la empresa. El control del proceso de producción de alcohol que se lleva a cabo en el laboratorio de microbiología destilería Incauca S.AS es de gran importancia ya que permite identificar si existen o no problemas que puedan afectar la eficiencia de la fermentación, dichos problemas pueden llegar a causar pérdidas económicas para la empresa, por eso es importante realizar un control y así mismo sugerir acciones para dar solución a los problemas que se presenten. Los resultados evidenciados son casos hipotéticos, debido a que la empresa no permite la divulgación de dichos datos.

## **4. MARCO REFERENCIAL.**

El ingenio del Cauca puso en marcha el 28 de octubre de 2005 la primera planta de alcohol carburante más grande del País, capaz de producir 350.000 litros de alcohol diarios en operación continua. El etanol se utiliza como aditivo para la gasolina con el fin de mejorar el octanaje y disminuir la contaminación generada por los gases de combustión (INCAUCA S.A.S).

### **4.1. Datos históricos.**

La utilización de los biocombustibles líquidos es tan antigua como la de los mismos combustibles de origen fósil y los motores de combustión interna. La historia del uso del alcohol como combustible para motores se remonta al siglo XIX y su línea cronológica desde entonces hasta la actualidad, describe y se vincula con una serie de acontecimientos importantes en el campo de la ingeniería automotriz, la agroindustria, la ecología y la industria energética. (Higuera, O; Tristancho, J; Flórez, L. 2007).

El primer motor diseñado para usar aceites vegetales como combustible fue el motor diésel fabricado por Rudolf Diesel, hace más de cien años. En 1908, Henry Ford pensaba usar como combustible el etanol en su automóvil Model T. La Standard Oil Company de 1920 a 1924, comercializó en Estados Unidos una mezcla de 25% de etanol en la gasolina. Posteriormente, Ford con diversos expertos en la década de los treinta, ambicionaron recuperar la comercialización del etanol, construyendo una planta para su producción (HORTA NOGUEIRA, L.A 2003).

Las crisis energéticas que sacudieron el siglo XX, y la preocupación mundial por la conservación del medio ambiente, fueron el motor para incentivar la búsqueda de nuevas fuentes energéticas como el etanol. En el 1975, la crisis del petróleo tuvo una fuerte repercusión en Brasil. A partir de entonces, se incursionó en la producción de alcohol para abastecer su inmensa flota vehicular; la alternativa fue el bioetanol proveniente de la melaza de la caña de azúcar. Actualmente, en Brasil todos los vehículos que circulan, usan gasolina mezclada con un promedio de 25% de etanol originado en la biomasa (CUNHA F., A. 2003).

Colombia ante la iniciativa del Gobierno Nacional de impulsar una Ley que estimule la producción, comercialización y consumo de alcoholes carburantes y el déficit de petróleo en los próximos años, la producción de alcohol aparece como un nuevo negocio que no solo aportará sostenibilidad al sector azucarero y a su área de influencia, sino, además, nuevas posibilidades al sector agropecuario en general, ya que puede obtenerse también por fermentación de los azúcares presentes en el



sorgo, la yuca, la remolacha, el banano y el maíz, entre otros. Este fue uno de los motivos que tuvo en cuenta el Congreso de la República para expedir la Ley 693 de septiembre 19 de 2001, cuyo objeto es controlar la contaminación del aire mediante el uso de oxigenantes en las gasolinas que reduzcan la contaminación producida por los motores de combustión interna. Además, se impulsó por medio de una reforma tributaria, Ley 788 de 2002, la exoneración del pago del IVA, del impuesto global y de la sobretasa al porcentaje de alcohol carburante que se mezcle con la gasolina (Quiroga, B.2020).

## 4.2. Alcohol Etílico

También llamado etanol, alcohol etílico, metilo carbinol, etc. Se ha encontrado en la atmosfera, aguas de algunos manantiales y ambientes ricos en humus. Es un compuesto ternario, constituido por carbono 52%, oxígeno 34,8% e hidrógeno 13%; su fórmula general es  $C_2H_6O$  (ERNANDEZ, J.R. et al. 1990). En la tabla 1 se observan las diferentes propiedades fisicoquímicas y termodinámicas del alcohol.

El alcohol obtenido por fermentación obedece a la siguiente reacción; según Gay Lussac:



El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de  $CO_2$  por 1 g de glucosa. El calor de la reacción está establecido en 23.5 Kcal/mol de azúcar consumida, esto genera una modificación continua de la temperatura sobre el proceso de obtención de alcohol. Por lo tanto, representa un parámetro a ser controlado a lo largo del proceso; que se relaciona directamente con las características del producto final (Howell, K., Swiegers, J. et al. 2004).

TABLA 1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y TERMODINÁMICAS DEL ALCOHOL ETÍLICO

PROPIEDAD	
Formula	$C_2H_6O$ , $CH_3CH_2OH$
Peso Molecular	46.07 g/mol
Composición	C: 52.24%, H:13.13% y O: 34.73% (%mol)
Estado de agregación	Líquida
Color	Incoloro
Punto de ebullición	78.3°C
Punto de Fusión	-130°C
Índice de refracción (a 20°)	1.361
Densidad	0.7893 a 20°C

Presión de Vapor	59 mmHg a 20°C
Densidad de Vapor	1.59 g/ml
Temperatura de Ignición	363°C
Punto de Inflamación	12°C (al 100%), 17°C (al 96%), 20°C (al 80%), 21°C (al 70%), 22°C (al 60%), 24°C (al 50%), 26°C (al 40%), 29°C (al 30%), 36°C (al 20%) y 49°C (al 10%)
Límites de explosividad	3.3 – 19%
Punto de congelación	-114.1°C
Calor específico (J/g°C)	242 (a 20°C)
Temperatura de auto ignición	793°C
Conductividad térmica (W/mk)	0.17 (a 20°C)
Momento bipolar	1.699 debeys
Constancia dieléctrica	25.7 (a 20°C)
Solubilidad	Miscible con agua en todas proporciones, éter, metanol, cloroformo y acetona.
Temperatura Crítica	243.1°C
Presión crítica	63.116 atm
Volumen crítico	0.167 L/mol
Tensión superficial (dina/cm)	231 (a 25°C)
Viscosidad (cp.)	1.17 (a 20°C)
Calor de vaporización en el punto normal de ebullición (J/g)	839.31
Calor de combustión (J/g)	29677.69 (a 25°C)
Calor de fusión (J/g)	104.6
Acidez (pKa)	15.9

FUENTE: [www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/12etanol.pdf](http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/12etanol.pdf)

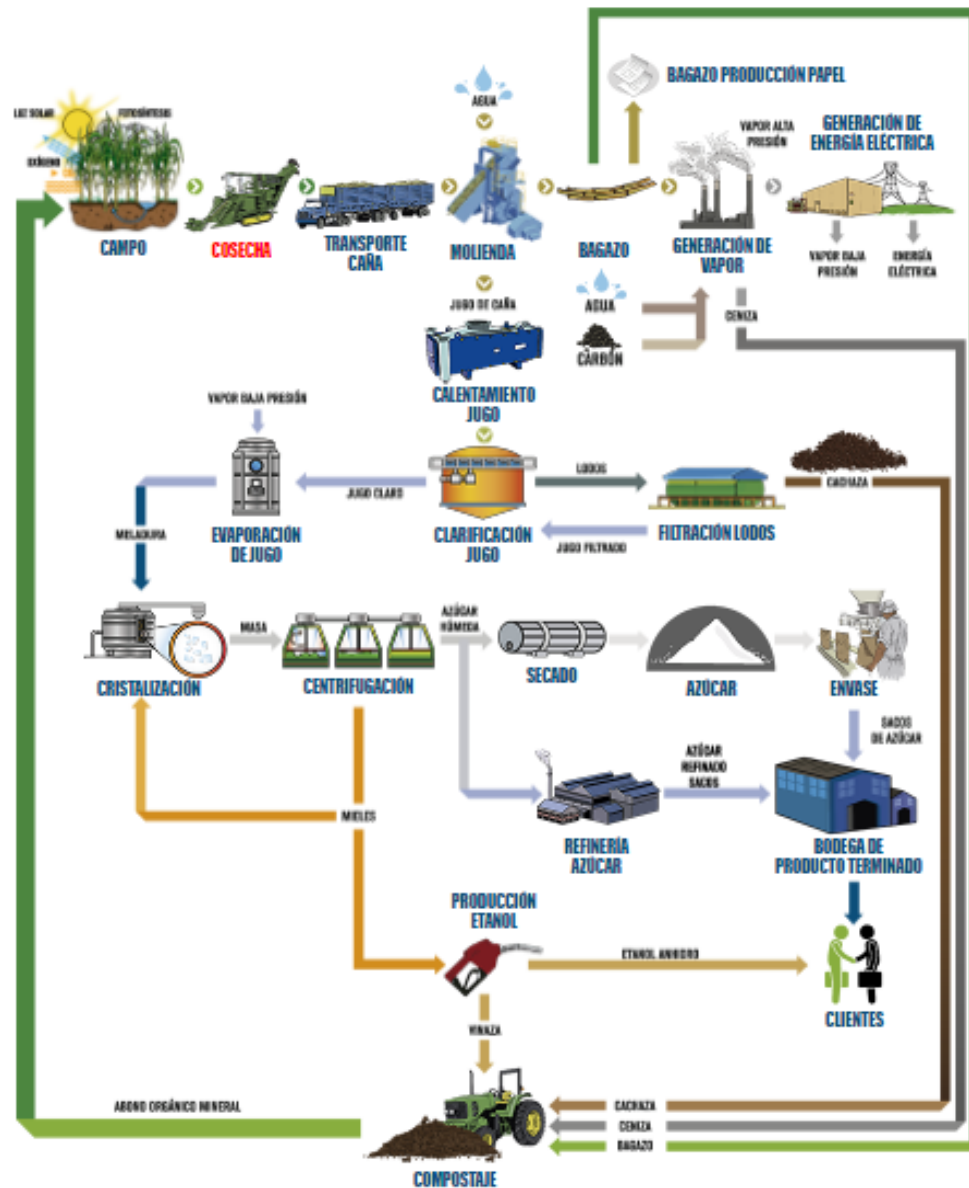
### 4.3. Producción de alcohol.

El etanol se produce a partir de azúcar o almidón, como la caña de azúcar, la remolacha azucarera, el sorgo azucarado, maíz, el trigo y la yuca. El alcohol o etanol es el producto de la fermentación alcohólica efectuada por microorganismos, que tienen la capacidad de fermentar la glucosa (Imagen 1). El etanol puede ser mezclado con gasolina o quemarse puro, mezclado con gasolina para el transporte, mejora el rendimiento; esta mezcla de combustible contiene 35% de oxígeno reduciendo las emisiones de dióxido de carbono y óxido de nitrógeno en la combustión. Si el etanol se usa directamente como combustible, podría proveer grandes beneficios ambientales debido a su baja presión y la reducción de

emisiones en la atmósfera y así realizar una combustión más limpia (FAO, 2008a). El uso de alcoholes, tanto puros como sus mezclas para combustible, no es una idea reciente. En 1906 Henry Ford produjo un automóvil que podía trabajar con alcohol o con gasolina y en el Brasil se conocen estudios desde 1920. Brasil es reconocido por ser el precursor en introducir el etanol como biocombustible. Actualmente, junto con Estados Unidos de América, sigue siendo uno de los mayores productores de etanol (Ocampo, A. 2004).

En Colombia el bioetanol producido en el país proviene del procesamiento de la caña de azúcar, proveniente de catorce ingenios azucareros de los cuales siete destilan bioetanol. Para el año 2006, la producción de alcohol carburante se estimó en 262,000,000 L/año, mientras que para el año 2010 fue de 292,000,000 L/año, evidenciando el incremento de 30 millones de litros en cuatro años, pero en el 2018 se evidencio un aumento del 16% frente el 2017 con la producción de 467,000,000 L/año. El Gobierno de Colombia ha expedido una serie de documentos relacionados con el alcohol carburante; la Ley 693 del 2001 dice que, a partir de septiembre del año 2005, las ciudades con más de 500.000 habitantes deben tener mezcladas sus gasolinas con un 10% de alcohol. El 14 de abril de 2003 MinMinas y Minambiente saco la resolución N° 447 determinó los requisitos de calidad del alcohol. La Resolución 180687 del 17 de junio de 2003, se establecieron los requisitos técnicos y de seguridad en relación con la producción, acopio, distribución y puntos de mezcla de los alcoholes carburantes. Finalmente, mediante la Resolución 180836 del 25 de julio de 2003, el Ministerio de Minas y Energía definió el precio del galón para el alcohol carburante en puerta de refinería que es equivalente aproximadamente a US\$1,20 por galón. Según datos de, la producción mundial de etanol 2004 fue de cerca de 41000mill de litros En promedio, el 73% del EtOH producido mundialmente corresponde a alcohol carburante, el 17% a alcohol para bebidas y el 10% es alcohol industrial. Los datos para el alcohol carburante tomados de diversas fuentes indican que Brasil y EEUU contabilizan el 73% de la producción mundial, aunque este porcentaje está cambiando constantemente debido a la dinámica del mercado mundial de este biocombustible (ARAÚJO, A. y TORRES, C. 1986).

IMAGEN 1. PROCESO DE LA CAÑA DE AZÚCAR PARA SER TRANSFORMADA EN AZÚCAR, ALCOHOL Y ENERGÍA.



Fuente: <https://www.incauca.com/es/procesos/>

#### 4.4. Fermentación Alcohol

La producción de bioetanol es un proceso biológico llevado a cabo por levaduras fermentadoras, como, por ejemplo, *Saccharomyces* sp, que realiza la conversión de azúcares a etanol. Por ser un proceso industrializado, se hace necesario el control de variables al inicio y final de la producción, como lo son: el pH, la temperatura

(30°C- 35°C), concentración de azúcares, viabilidad de células vivas, cantidad de etanol producido, acidez volátil, ácido láctico y contaminantes bacterianos entre otras.

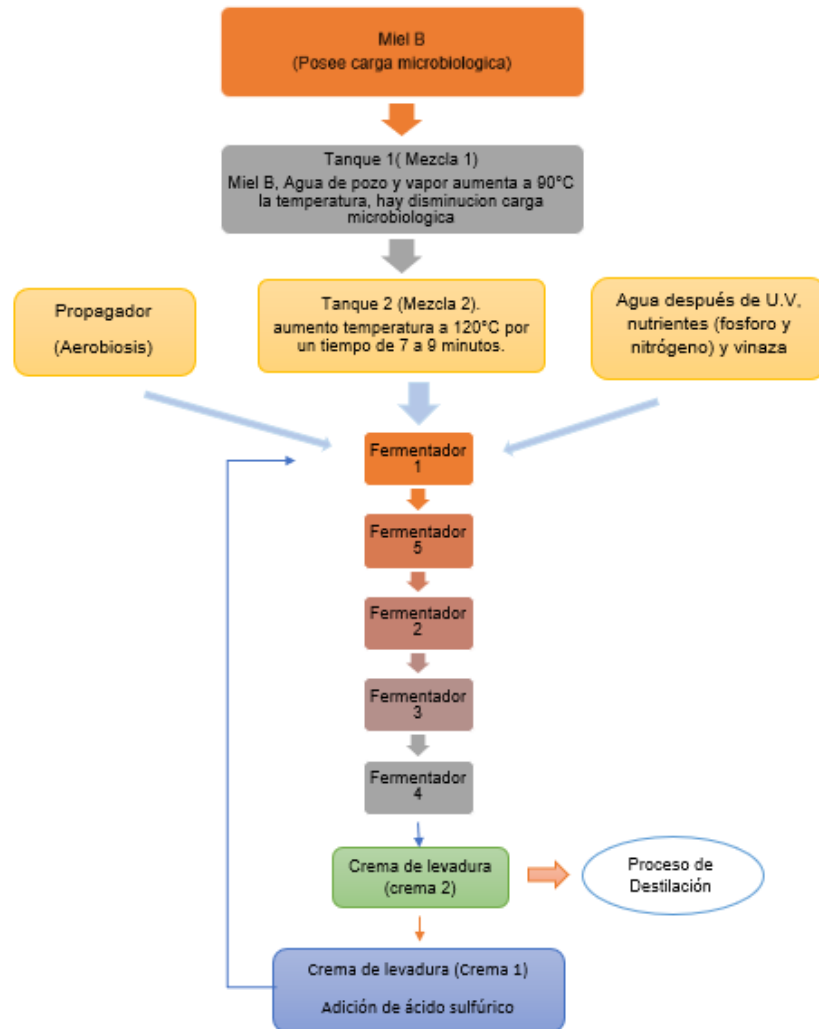
Es un proceso anaerobio en el que las levaduras y algunas bacterias, descarboxilan el piruvato obtenido de la ruta Embden – Meyerhof - Parnas (glicolisis) dando acetaldehído, y éste se reduce a etanol por la acción del NADH<sub>2</sub>. Siendo la reacción global (1), conocida como la ecuación de GayLussac:



El proceso típico de producción de alcohol por lotes a partir de melazas o jugo de caña (denominado proceso Melle-Boinot), comprende la esterilización de la materia prima seguida del ajuste del pH con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y de los °Brix a valores de 14-22. El mosto obtenido se somete a fermentación. El vino resultante se decanta y centrifuga para recuperar el EtOH, mientras la levadura se recircula a los fermentadores. Para la obtención de alcohol anhidro se utiliza mayoritariamente la destilación azeotrópica con benceno (Echegaray et al., 2000). Las principales materias primas que se utilizan en la destilería de Incauca son la miel B, la meladura y el jugo clarificado, provenientes de la fábrica de azúcar (Esquema 1), donde se realiza una dilución de miel y adición de otros componentes generando una mezcla que entrara a la fermentación. La fermentación se desarrolla por medio de un proceso continuo de cinco reactores (Fermentadores 1, 2, 3, 4 y 5) que trabajan en serie, donde se llevan a cabo las reacciones químicas de transformación de azúcar en etanol y gas carbónico; al fermentador 1 se le adiciona la mezcla, el propagador de levadura, agua que ha pasado por esterilización U.V y otros nutrientes utilizados por la levadura para la producción de alcohol. Al salir del último fermentador, se obtiene un producto conocido como mosto o vino fermentado que contiene una concentración de 9% (v/v) de alcohol y además se recupera en el tanque de sedimentación para ser usada nuevamente en el proceso. La levadura recuperada (Crema 2), se envía al tanque de acidulación donde se hace un choque con ácido sulfúrico para reducir la contaminación bacteriana presente y nuevamente se recircula a los fermentadores para continuar con el proceso de producción (Crema 1). El mosto o vino fermentado se envía al proceso de destilación para continuar la separación del etanol producido. En la destilación se purifica el mosto fermentado para obtener alcohol con una pureza del 96% (v/v); es un proceso de separación por diferencias en los puntos de ebullición de los componentes de una mezcla, que, al ser sometidos al calor, los compuestos más volátiles como el alcohol se evaporan y se concentran en fase de vapor. El mosto fermentado que proviene de la sección de fermentación contiene 9% de alcohol, se envía a la columna mostera donde se

obtienen dos productos: por la parte superior se obtienen gases con una concentración de alcohol entre el 40-50% v/v que se envían a la segunda columna llamada rectificadora. Por la parte inferior se obtiene una corriente líquida llamada vinaza. El 60% de la vinaza generada se envía a la sección de fermentación (entrara al primer fermentador) y el 40% restante hacia los evaporadores de vinaza donde se concentra para su posterior uso en compostaje. De la segunda columna de destilación se obtiene el alcohol rectificado por encima de una concentración de 96% v/v el cual se envía hacia la zona de deshidratación. De los platos intermedios de esta columna se extrae el aceite de Fusel y por el fondo se obtienen las flemazas, que se envían a la planta de tratamiento de aguas residuales (Incauca S.A.S).

ESQUEMA 1. PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHOL DESARROLLADO EN INCAUCA S.A.S.



#### 4.1. Contaminación de la fermentación.

La alta concentración de azúcares en el sustrato puro genera elevada presión osmótica, y el bajo contenido de agua son factores que no permiten la multiplicación de microorganismos, sin embargo, la carga microbiana se activa cuando el sustrato se diluye permitiendo su multiplicación, por ende se debe llevar un control, para que durante la etapa de reproducción de la levadura no se aumente de manera significativa la cual podría tener incidencia Negativa en la posterior fermentación (Calderón, N. 2007).

En el proceso de producción de etanol, la contaminación bacteriana sobre la materia prima debe mantenerse controlada, debido a que las bacterias crean un descenso constante de las fuentes de carbono disponible para que la levadura realice su proceso fermentativo. Entre los contaminantes más comunes encontramos Bacterias Acido Lácticas (BAL), estas son un grupo de microorganismos Gram positivos, no formadoras de esporas, cocos o bacilos, catalasa-negativos, con alta tolerancia al pH bajo. Se caracterizan por la producción de ácido láctico como producto principal y sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, diacilos, entre otros a partir de carbohidratos. Entre los géneros más conocidos encontramos *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, con *Lactobacillus* siendo los géneros más importantes. Por otro lado, también podemos encontrar las Bacterias Ácido-Acéticas (BAA) como contaminantes en la fermentación, estas son microorganismos Gram negativos, de forma elipsoidal o cilíndrica que pueden encontrarse aislados, en parejas o formando cadenas, son móviles por flagelación. Presentan actividad catalasa positiva, oxidasa negativa. Las BAA son conocidas por oxidar azúcares y alcoholes, obteniéndose como producto final una acumulación de ácidos orgánicos como por ejemplo ácido acético, predominando el género *Acetobacter* (Sossa Urrego, Diana Patricia, González, Lina María, & Vanegas, María Consuelo. 2009).

En la actualidad, los métodos más utilizados para el control de la contaminación bacteriana son: uso de compuestos orgánicos como la flor de lúpulo, que son bastante efectivos, pero que tienen un elevado costo, el aumento de los tiempos de calentamiento de las materias primas, el descenso del pH de la crema recirculada, mediante la adición de ácido sulfúrico, el cual no afecta la integridad de la levadura debido a la capacidad de resistir bajos niveles de pH.

Otro problema frecuente y de gran importancia en las destilerías es la floculación de las células de levadura, este proceso consiste en la agregación de las células de

levadura, lo cual disminuye la velocidad de producción de alcohol. Esto depende del estado de la levadura como genética, estado fisiológico y metabolismo, la composición del medio de fermentación y las condiciones de fermentación (Bayona, M; Ardua, M; Castellanos, C; Rojas, M. 2002).



## 5. MARCO LEGAL

La Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia la cual contribuye al crecimiento sostenible de la industria de los biocombustibles, mediante marco legal y normativo, dispuesto en la tabla 2 (FedeBiocombustibles. 2020).

La Ley 693 de 2001 marcó la entrada de Colombia en la era de los biocombustibles, tuvo como propósito la diversificación de la canasta energética colombiana a través de alternativas compatibles en el desarrollo ambiental, económico y social. Posteriormente, la Ley 939 de 2004, permitió ampliar el uso y comercialización de biocombustibles no solo de origen vegetal, sino de origen animal, en motores Diesel, ampliando parte del sector de transporte no contemplada en la Ley 693 de 2001, excluyendo al biodiesel del pago del impuesto a las ventas e impuesto global al ACPM y generando los incentivos para la financiación de proyectos de cultivos de rendimiento tardío. Esta normatividad es complementada con la Ley 788 de 2002 que establece la exención del IVA, impuesto global a la gasolina y de la sobretasa de que habla esta ley para los productores de alcohol carburante. También se dan exenciones arancelarias, para la importación de los equipos necesarios para el montaje de refinerías de alcohol, mejoramiento de los cultivos y de infraestructura. Según la Resolución 0447 de 2003 de MME-MMAVDT la cual regula la calidad de las gasolinas oxigenadas y establece las normas para el uso de aditivos en las gasolinas en Colombia, la cual no debe superar el 0,4%. La anterior condición permite producir un combustible con características bien definidas, apto para utilizarlo en automotores. La creación de nuevas oportunidades de trabajo y la generación de empleo son ventajas bastante reconocidas, asociadas a la promoción del uso de etanol como combustible que son frecuentemente utilizadas como argumentos para acciones de gobierno hacia este propósito. Efectivamente, por su carácter descentralizado, y por ocupar necesariamente extensas porciones de terreno para la producción de vectores bioenergéticos, la producción y procesamiento de biocombustibles como el etanol, demanda importante cantidad de mano de obra. En resumen, hay suficiente arsenal legal que permite aprovechar de manera sostenible nuestros recursos naturales, a la par que se generan incentivos para emprender iniciativas de inversión, en el campo de los energéticos.

TABLA 2. NORMATIVIDAD ALCOHOL CARBURANTE EN COLOMBIA, SEGÚN LA FEDERACIÓN NACIONAL DE BIOCOMBUSTIBLES.

TIPO	NÚMERO	AÑO	CONTENIDO
Resolución	40185	2018 (Feb.27)	Por la cual se establece el porcentaje de mezcla de alcohol carburante en la gasolina motor corriente y extra a nivel nacional (E10).
Resolución	1962	2017 (Sep.25)	Por la cual se expide en el límite del indicador de cociente del inventario de emisiones de gases efecto invernadero del Etanol Anhidro Combustibles Desnaturalizado y se adoptan otras disposiciones.
Resolución	40626	2017 (jul.04)	Por la cual se establece la mezcla E8 de alcohol carburante con gasolina motor corriente en todo el país.
Resolución	40434	2017 (May.18)	Por la cual se suspende la mezcla de alcohol carburante con gasolina motor corriente en algunas zonas del país.
Resolución	0789	2016 (May.20)	Por la cual se modifica la Resolución 898 de 1995 en lo relacionado con los parámetros y requisitos de calidad del Etanol Anhidro Combustible y Etanol Anhidro Combustible Desnaturalizado utilizado como componente oxigenante de gasolinas y se dictan otras disposiciones.
Resolución	41072	2015 (oct.01)	Por la cual se establece el porcentaje de mezcla de alcohol carburante para la zona Suroccidental del país para uso en vehículos automotores.
Resolución	40565	2015 (May.15)	Por medio de la cual se establece la metodología para determinar el déficit de alcohol carburante en la oferta nacional.
Ley	1715	2014 (May.13)	Por medio de la cual se regula la integración de las energías renovables no convencionales al Sistema Energético Nacional.
Resolución	90454	2014 (abr. 29)	Por medio de la cual se modifica la Resolución 180687 de 2003, donde se permite la exportación de alcoholes carburantes en la medida que se garantice el abastecimiento interno y la importación siempre y cuando exista déficit en la oferta.
Resolución	90932	2013 (oct.31)	Por la cual se establece el porcentaje de mezcla de alcohol carburante con las gasolinas en algunas plantas de abastecimiento mayorista (E10).
Decreto	4892	2011 (dic.23)	Por el cual se dictan disposiciones aplicables al uso de alcoholes carburantes y biocombustibles para vehículos automotores.

Resolución	181555	2010 (ago.31)	Por la cual se modifica la Resolución 8 2438 del 23 de diciembre de 1998 y se establecen disposiciones relacionadas con la estructura de precios de la Gasolina Motor Corriente y Gasolina Motor Corriente Oxigenada.
Decreto	1135	2009 (Mar.31)	Por el cual se modifica el Decreto 2629 de 2007, en relación con el uso de alcoholes carburantes en el país y con las medidas aplicables a los vehículos automotores que utilicen gasolinas para su funcionamiento.
Conpes	3510	2008 (Mar.31)	Lineamientos de política para promover la producción sostenible de biocombustibles en Colombia.
Resolución	2200	2005 (dic.29)	Por la cual se modifica parcialmente la Resolución 1565 del 27 de diciembre de 2004.
Resolución	181069	2005 (ago.18)	Por la cual se modifica la Resolución 18 0687 del 17 de junio de 2003 y se establecen otras disposiciones.
Resolución	1565	2004 (dic.27)	Por la cual se modifica parcialmente la Resolución 898 del 23 de agosto de 1995, que regula los criterios ambientales de calidad de los combustibles líquidos y sólidos utilizados en hornos y calderas de uso comercial e industrial y en motores de combustión interna.
Resolución	180687	2003 (jun.17)	Por la cual se expide la regulación técnica prevista en la Ley 693 de 2001, en relación con la producción, acopio, distribución y puntos de mezcla de los alcoholes carburantes y su uso en los combustibles nacionales e importados.
Ley	788	2002 (dic.27)	Por la cual se expiden normas en materia tributaria y penal del orden nacional y territorial; y se dictan otras disposiciones.
Ley	693	2001 (Sep.19)	Por la cual se dictan normas sobre el uso de alcoholes carburantes, se crean estímulos para su producción, comercialización y consumo, y se dictan otras disposiciones.

## **6. METODOLOGÍA**

El control del proceso de fermentación se realizó a partir de análisis fisicoquímicos y microbiológicos, que fueron evaluados diariamente en la empresa; estos análisis permitieron implementar medidas correctivas para asegurar la producción de alcohol. Sin embargo, se realizó control para la parte Microbiológica por una semana y no fisicoquímicos, en diferentes puntos de muestreo identificados en el Esquema 1 como lo son: fermentadores, propagador, cremas, miel B y mezclas, dependiendo cada metodología mencionadas a continuación.

### **6.1. Medición de Ácido Láctico**

El ácido láctico se midió por reflectometría según el catálogo 116127 de Merck mediante la utilización del equipo RQflex20, al cual se le realizó su respectiva calibración y recalibración. Se preparó las muestras de los 5 fermentadores, se tomó 1ml de la muestra para adicionar al balón y se aforo con agua destilada a 100 ml. La preparación de la dilución para la miel B se realizó pesando 10g en un beaker, se diluyo muy bien para pasar al balón de 100ml y aforar, se mezcló muy bien para tomar a partir de esta dilución 10ml con pipeta, para aforar nuevamente en un balón de 100ml y a partir de esta se realizó la medición de ácido Láctico.

Se realizó la medición en el equipo tomando en cuenta introducir tira del test de ácido láctico en la muestra por dos segundos, limpiar el sobrante, introducir la tira en el equipo para su respectiva medición y se esperó el resultado.

La prueba de ácido láctico mide la suma de ácido D- y L-láctico en bebidas, por ejemplo, vino, cerveza y jugo de frutas / verduras después de la dilución. El ácido láctico es oxidado por el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) bajo el efecto catalítico del lactato deshidrogenasa a un piruvato. En presencia de diaforasa, el NADH formado en el proceso reduce una sal de tetrazolio a un formazán azul que se determina reflectométricamente en el RQflex20 el rango de medición del equipo utilizado es de 3.0 mg/l – 60.0mg/l (Merck. 2020).

### **6.2. Recuento de Levadura y Viabilidad Celular.**

Para el recuento de levadura se preparó las muestras realizando una agitación a los envases, a partir de estos se tomó 1ml de la muestra para adicionar al balón, se aforo con agua de proceso a 100 ml, se le adiciono azul de metileno para teñir la levadura muerta y papaína para separar la levadura. Esto se realizó con cada uno

de los fermentadores y el propagador. El procedimiento para las cremas de levadura, se realizó pesando 10g de muestra en un Beaker de 100ml, se le adiciono 90ml de agua de proceso, se mezcló muy bien para tomar 1ml de la muestra para adicionar al balón y se aforo con agua de proceso a 100 ml, se le adiciono azul de metileno para teñir la levadura muerta y papaína para separar la levadura.

A partir de las muestras aforadas se realizó agitación, se tomó una muestra con pipeta Pasteur y adiciono a la cámara de Neubauer. Se realizo conteo de levaduras vivas, gemantes, muertas, salvajes vivas y salvajes muertas (las levaduras salvajes son consideradas células que han pasado por un estrés durante el proceso de fermentación). La cámara de recuento, Neubauer, es un dispositivo de precisión hecho de vidrio óptico especial dividido en dos secciones, la sección para contar las células es la cuadrícula central, que contiene 25 cuadros limitados por una triple línea, esto se observa al microscopio con un aumento de 40x; se cuentan todas las células que están dentro de cada cuadrado y aquellas que están tocando los lados superior y derecho de dicho cuadrado (Games, R. 2019). Los datos obtenidos se reportan en la base de datos empleada por la empresa y se realiza porcentaje de viabilidad.

### **6.3. Determinación de Contaminantes.**

Para la determinación de contaminantes se realizó de acuerdo a lo descrito en la tabla 3 para las muestras, con cada dilución, medio, método e incubación correspondientes a cada contaminante; sin embargo, para las mezclas se les realizo un procedimiento distinto el cual se centrifuga a 3500rpm por 5 minutos en tubos Falcon de 50ml, el sobrenadante se descarta, se adiciona 9ml de agua peptona estéril para diluir el pellet y homogenizar por agitación en vortex; a partir de esta dilución se realiza lo descrito en la tabla 3. Los medios para las siembras se describen en el apartado 6.4.2.

Las siembras se incubaron en su respectiva temperatura por 48 horas. Después del tiempo de incubación se realizó conteo macroscópicamente de las colonias típicas en cada medio, se registró como unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml), multiplicando por su respectiva dilución dependiendo de la muestra; los datos se ingresaron a la base de datos de la empresa.

TABLA 3. SIEMBRA DE CADA UNA DE LAS MUESTRAS REALIZADAS EN EL LABORATORIO.

Muestra	Medio	Método	Dilución	Incubación
Crema de fermentación (Crema 1)	MRS*	Profundidad	10 <sup>0</sup>	35°C
	PC			30°C
	WL	Superficie		
Propagador	MRS*	Profundidad	10 <sup>1</sup>	35°C
	PC			30°C
	WL	Superficie		
Fermentador 1	MRS*	Profundidad	10 <sup>1</sup> y 10 <sup>2</sup>	35°C
Fermentador 2				
Fermentador 3	PC		10 <sup>1</sup>	
Fermentador 4	WL	Superficie	10 <sup>0</sup>	30°C
Fermentador 5				
Vinaza Caliente	MRS*	Profundidad	10 <sup>0</sup>	35°C
Vinaza Después	PC			
	WL			Superficie
Vinaza salida de la fermentación	MRS*	Profundidad	10 <sup>1</sup>	35°C
	PC			30°C
	WL	Superficie		
Vinaza entrada fermentador	MRS*	Profundidad	10 <sup>0</sup>	35°C
	PC			
	WL	Superficie		30°C
Mezclas	MRS*	Profundidad	10 <sup>1</sup>	35°C
	PC			
	MacConkey			
	YGC			
	WL	Superficie		30°C
Agua antes y después de U. V	TTC	Filtración por membrana	-	35°C
	MRS*			
	MacConkey			
	WORT			
	WL			30°C
Agua de enfriamiento	PC	Profundidad	10 <sup>0</sup>	35°C

\*El medio MRS se incuba en cámara de anaerobiosis

## 6.4. Otras actividades.

### 6.4.1 *Propagación cepa semilla de la fermentación.*

#### - Fase 1.

En un recipiente se pesaron la miel B que provienen del proceso de obtención de azúcar, DAP (fosfato di amónico), extracto de levadura y magnesio, y se adiciono al envase anterior, para diluir con agua de proceso hasta homogenizar; ajustar pH a 4.2; A partir de esta mezcla se adiciono a dos Erlenmeyer de 3000 mililitros la cantidad deseada, taparlos y se esterilizaron en autoclave a 120°C por 15 minutos a 103kPa. Después del proceso de esterilización se enfriaron las fases para irradiarlas con luz ultravioleta en Shaker por 15 minutos; al finalizar se les adiciono en cabina de siembra detrás de mechero la biomasa de levadura que se extrae del banco de trabajo del laboratorio; se adiciono antibiótico (Monicol) y se llevó a incubación a 30°C por 24 horas en Shaker a 100rpm.

#### - Fase 2

En un recipiente se pesaron la miel de caña, se adiciono fosfato di amónico (DAP), extracto de levadura y magnesio, se diluyo con agua de proceso hasta homogenizar y se ajusta pH a 4.2. Esta mezcla se distribuyó en cuatro Erlenmeyer de 5000 mililitros, se taparon y se esterilizaron en autoclave a 120°C por 15 minutos con 103kPa. Después del proceso de esterilización se enfriaron las fases para irradiarlas con luz ultravioleta en Shaker por 15 minutos. Terminado el proceso se inoculo en cada Erlenmeyer en cabina de siembra, a partir la fase 1. Se incubo a 30°C por 12 horas en Shaker a 100rpm; finalizado el proceso de incubación se guardaron en nevera hasta su uso en la propagación en planta.

### 6.4.2. *Toma de Muestras, Preparación de Medios y Soluciones.*

Las muestras se tomaron de forma aséptica en envases estériles de 250 ml para cada fermentador, mezcla y vinaza; para el agua empleada en el proceso de fermentación se tomaron 500ml de muestra. Se llevaron al laboratorio para realizar las respectivas siembras.

Los antibióticos y reactivos que se adicionaron a los medios, se prepararon de la siguiente manera:

Para Cicloheximida y Virginamicina se autoclavaron 50ml de agua destilada a 120°C por 15 minutos con 103kPa, luego se adicionaron en cabina de siembra detrás del mechero 1g del antibiótico, se diluyeron en 50ml de alcohol al 99% y

se guardaron en nevera hasta su utilización. Los antibióticos son importantes para inhibir el crecimiento de levaduras que no son de interés en la lectura de las siembras.

El reactivo Azul de anilina se preparó adicionando 1g en 100ml de agua destilada y se esterilizó a 120°C por 15 minutos con 103kPa. Se utilizó para la diferenciación de las colonias de bacterias ácido lácticas en el medio MRS.

El reactivo Azul de Metileno se preparó diluyendo 10ml del reactivo madre en 90 ml de agua de proceso. El azul de metileno es utilizado para la tinción de levadura muerta, es importante para la distinción de estas entre la levadura viva y no generar inconvenientes a la hora de obtener la viabilidad de la levadura.

Los medios se prepararon de acuerdo a la cantidad de muestras a analizar (20ml por cada caja de Petri), además se realizaron medios control para eliminar falsos positivos en las muestras. Los medios utilizados son: para microorganismos Mesófilos Plate Count. (PC) y medio Chapman TTC, Bacterias ácido lácticas agar Man Rogosa Sharpe (MRS), Bacterias Gram negativas agar diferencial WL (WL), bacterias termófilas agar Plate Count. (PC), Enterobacterias agar Mac Conkey, levaduras y mohos agar extracto de levadura, dextrosa y cloranfenicol (YGC) y medio Wort. Al medio MRS se adicionó 2 mL de antibiótico (Cicloheximida) y 2 mL de reactivo azul de anilina por cada 100ml, para el medio WL y Mac Conkey se le adicionó 2 ml de antibiótico (Cicloheximida) y 1 ml de virginamicina por cada 100 ml, para PC se le adicionó 2 ml antibiótico (Cicloheximida) y 2 ml de reactivo TTC por cada 100 ml, para los medios Wort y TTC se le adicionó 0,1 ml de antibiótico (Cicloheximida).

#### 6.4.3. Actividades extras.

Se realizó comprobación de la eficacia de las autoclaves mediante el uso de Sterikon, ampolla, que contiene caldo nutritivo, azúcar, un indicador de pH, así como esporas de ***Geobacillus stearothermophilus*** ATCC 7953 (de esporulación optimada) como organismo de ensayo patógeno, la cual midió por colores después de la esterilización en autoclave y la incubación (35°C por 48 horas): rojo-violeta indicó una esterilización satisfactoria mientras que amarillo-naranja advierte de un procedimiento inadecuado. Se realizó 1 vez al mes y se registró en un formato.

En el laboratorio se realizaron actividades de limpieza y desinfección de materiales, equipos e instalaciones de forma diario, semanal, quincenal y mensualmente, dependiendo del cronograma de actividades; se realizó control de seguimiento mediante formatos.



Se realizo control de temperaturas mediante un formato de seguimiento mensual, de incubadoras y neveras utilizadas diariamente.

Se dio apoyo al proceso de las entregas e inventario de alcohol al 70% para desinfección y glicerinado para atender la contingencia por Covid-19 en toda la empresa.

## 7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Las actividades se realizan semanalmente de la misma manera como se muestra en la tabla 2; se hace excepción cuando se realiza limpieza a los fermentadores o proceso de liquidación.

TABLA 4. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES REALIZADAS SEMANALMENTE .

ACTIVIDADES	LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES
1. MEDICIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO					
2. CONTEO DE LEVADURA					
3. PERFIL DE CONTAMINACIÓN					
4. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS					
5. SIEMBRA DE MEDIOS					
6. PROPAGACION CEPA SEMILLA DE LA FERMENTACIÓN					
7. LIMPIEZA LABORATORIO					

La recolección de muestras se realiza con acompañamiento de un operario, cada día se realizan diferentes tomas, \*Las vinazas se obtienen a partir del vino fermentado o mosto de la finalización de la fermentación, que luego se envía al proceso de destilación.

### LUNES

Crema de fermentación (crema 1)  
 propagador  
 fermentadores (1,2,3,4 Y 5)  
 vinaza caliente\*  
 vinaza después\*  
 vinaza salida de fermentación\*  
 vinaza entrada fermentador 1\*

### MARTES

Crema de fermentación (crema 1)  
 propagador  
 vinaza caliente  
 vinaza después  
 vinaza salida de fermentación  
 vinaza entrada fermentador 1

mezclas  
agua antes U.V  
agua después de U.V

### MIERCOLES

Crema de fermentación (crema 1)  
propagador

### JUEVES

Crema de fermentación (crema 1)  
propagador  
vinaza caliente  
vinaza después  
vinaza salida de fermentación  
vinaza entrada fermentador 1

### VIERNES

Crema de fermentación (crema 1)  
propagador  
fermentadores (1,2,3,4 Y 5)  
vinaza caliente  
vinaza después  
vinaza salida de fermentación  
vinaza entrada fermentador 1

vinaza caliente  
vinaza después  
vinaza salida de fermentación  
vinaza entrada fermentador 1  
agua de torre (enfriamiento equipos)

## 8. RESULTADOS Y DISCUSION.

Los resultados que a continuación se presentan fueron producto de un análisis hipotético, debido a que la empresa exigió confidencialidad para el trabajo realizado.

### 8.1. Medición de Ácido Láctico

La medición de ácido láctico realizada en el laboratorio es esencial para el control de la fermentación, para establecer si el proceso fue llevado a cabo correctamente o no; los datos obtenidos en la tabla 5 a partir de la medición de ácido láctico en la fermentación del etanol de la actividad de *S. cerevisiae*, no presentaron valores que excedieran los límites establecidos por la empresa en el control de la acidez, indicando que el proceso se está llevando con normalidad, obteniéndose etanol a partir de azúcar fermentable de la caña, como se evidencio en los 5 fermentadores; se observó un ligero aumento en la Crema 2 lo cual se considera normal, ya que esta proviene de la recirculación del mosto obtenida por sedimentación y en la Miel B se esperaban valores mayores puesto que el sustrato que está disponible la hace susceptible a contaminación (ver esquema 1 para los puntos de muestreo). La fermentación al ser rica en azúcares es más susceptible a la contaminación por bacterias ácido lácticas y otros microorganismos que utilicen los diferentes azúcares para su crecimiento generando el aumento de ácido láctico. Para evitar el aumento de ácido láctico se realiza adición de antibióticos, para disminuir la carga bacteriana contaminante; sin embargo, si la contaminación es alta se realiza limpieza y desinfección de los tanques de fermentación o en casos extremos la parada de la fermentación.

TABLA 5. CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO EXPRESADOS EN PARTES POR MILLÓN (PPM) REALIZADOS DE LUNES A VIERNES, EN EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE ETANOL.

	<b>F1</b>	<b>F5</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F 4</b>	<b>Crema 2</b>	<b>Miel B</b>
<b>Lunes</b>	400	520	550	590	600	700	2000
<b>Martes</b>	450	530	560	600	640	710	2010
<b>Miércoles</b>	490	540	585	630	680	750	2025
<b>Jueves</b>	570	600	620	660	700	815	2230
<b>Viernes</b>	630	645	650	690	710	820	2535

<b>Valores Control</b>	300 ppm – 4000 ppm	Debe ser siempre mayor al Fermentador 4	2000 ppm – 3000 ppm
------------------------	--------------------	---	---------------------

Se observó un leve aumento de ácido láctico en el transcurso de los días, este aumento no fue significativo indicando que se mantuvo en control la fermentación, en caso contrario un incremento de 4000 ppm se consideró que la fermentación se encontraba fuera de los límites establecidos, requiriendo medidas de ajuste entre estas, como lo mencionado anteriormente de la adición de antibióticos o limpieza y desinfección en el proceso de fermentación. Se ha informado que concentraciones de ácido láctico entre el 1 y el 4% inhiben el crecimiento de la levadura, este porcentaje varía según las diferentes Bacterias Acidolácticas que afectan la fermentación de la levadura tanto entre los grupos homofermentativos como heterofermentativos y dentro de ellos (Hynes, SH; et al. 1997).

En especial la muestra analizada a partir de la materia prima en el punto de muestreo de miel B (esquema 1), tampoco evidencio un aumento significativo siendo un valor referencia, ya que esta miel será introducida a la fermentación, con una previa dilución y un acondicionamiento soportado en el manejo de la temperatura previendo disminuir la carga microbiológica y la concentración de azúcar reductor total. Las muestras que presentaron un aumento por encima de los límites establecidos al interior de la empresa indicara una posible contaminación por bacterias productoras de ácido láctico como las BAL que tienen la capacidad de desarrollar una fermentación láctica a partir de la glucosa que se introduce en la fermentación alcohólica, lo cual implica un descenso en la cantidad de etanol, en una proporción de dos moléculas de etanol por cada molécula de ácido láctico producido, inhibiendo el crecimiento de la levadura, disminuyendo la productividad y ocasionando pérdidas económicas (Bayrock, D.; Ingledew, W. 2004).

## **8.2. Recuento de Levadura y Viabilidad Celular.**

En la tabla 6 se observa el recuento de la levadura obtenido en la cámara de Neubauer, a partir de las muestras de mosto, evidenciándose el comportamiento de la levadura en la fermentación y su viabilidad, de esta forma, en el propagador de levadura se observó una viabilidad de 83.3% a un ciclo de 48 horas, siendo, aproximadamente un 7% menor a los límites establecidos por la empresa, lo cual indico que no hay un aumento ideal en el tiempo generacional de la levadura, trayendo como consecuencia la ralentización de la fermentación y retrasando el arranque del propagador, un aumento del ciclo de 90 horas es requerido para que la propagación de la levadura sea introducida en la fermentación.

TABLA 6. RECUENTO DE LEVADURA DE CADA UNO DE LOS FERMENTADORES, PROPAGADOR Y CREMAS, EXPRESADO EN LEVADURA/ML Y VIABILIDAD CELULAR.

	Propagador	F1*	F5*	F2*	F3*	F4*	Crema1	Crema2	
<b>Vivas</b>	100	130	126	120	110	100	100	1000	
<b>Gemantes</b>	10	40	31	35	30	20	40	100	
<b>Salvajes Vivas</b>	2	0	0	0	0	0	10	0	
<b>Muertas</b>	20	120	127	130	140	150	1000	500	
<b>Salvajes Muertas</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Viabilidad (%)</b>	83.3 con 48 horas	52	49,8	48	44	40	9,1	66.6	
<b>Valores Limite (%)</b>	90-100	30 - 90				Mayor a 9	Mayor a 50		

\*F1, F2, F3, F4 y F5 son los fermentadores.

Por otro lado, el recuento de la levadura en los fermentadores indico que la viabilidad disminuye a medida que pasan por el proceso de fermentación bajo un proceso continuo, esto se debe a que la levadura en su estado exponencial va agotando la fuente de carbono, en un proceso de reducción lo que genera dióxido de carbono y etanol. De acuerdo al modelo teórico expuesto en el *The alcohol textbook* (Jacques, Lyons, & Kelsall, 2003) el cual muestra una curva de crecimiento con el comportamiento de la levadura sometida aun acondicionamiento nutricional y físico-químico que favorece su crecimiento atravesando la fase latencia y exponencial; sin embargo, en la medida que la fermentación progresa y aumenta la cantidad de etanol en volumen las células pierden la permeabilidad de la membrana, disminuyendo su selectividad y afectando sus propiedades funcionales para el crecimiento al no poder retener cofactores y coenzimas importantes (Leao y Van Uden, 1984), induciéndose la muerte de la levadura en los fermentadores. Según Dacosta et al (2007) en mostos que contengan un 13% de alcohol la fermentación se verá afectada, explicando así un posible efecto del alcohol sobre el crecimiento de la levadura observando la disminución de la viabilidad y el aumento de células muertas. *S. cerevisiae* realiza una adaptación regulatoria para degradar la glucosa exclusivamente a etanol y CO<sub>2</sub>, cuando se cultiva aeróbicamente con altas concentraciones de glucosa. En la fermentación los niveles de glucosa disminuyen y las células se vuelven progresivamente derreprimidas, resultando en la inducción de la síntesis de las enzimas respiratorias o el etanol causa un efecto de inhibición en las células de levaduras, como la desnaturalización de proteínas y enzimas glucolíticas, inhibición en el transporte de nutrientes, incremento de la permeabilidad de la membrana, inducción de la lipólisis, alteración la composición de ácidos

grasos, aumento del contenido de esteroides, inhibición de la ATPasa lo cual hace que se disipe la fuerza protón motriz; sin embargo las levaduras pueden modificar la composición de su pared celular como mecanismo de defensa (Walker, 1998; Aguilar y François, 2003).

El recuento de levadura para las cremas de fermentación se observó que la crema 1 contiene mayoritariamente células muertas, al contrario de lo observado en la crema 2, esto se debe a que en el proceso final de la fermentación se obtuvo un mosto que es sedimentado proveniente de los fermentadores lo que es correspondiente a la crema 2, la cual es tratada con ácido sulfúrico para la eliminación de las bacterias contaminantes, a partir de esta se obtuvo la crema 1 (Esquema 1), que bajo este tratamiento induce la muerte celular. Por ende, la viabilidad es aproximadamente del 9.1% y 66.6% en crema 1 y 2, respectivamente.

### **8.3. Determinación de Contaminantes.**

En la tabla 7, el recuento de microorganismos contaminantes, de estos la microbiota mesófila es amplia obteniéndose valores mayores a 1600 UFC/mL, demostrando su capacidad de resistencia a los procesos de esterilización que se llevan a cabo en la empresa, entre estos, la esterilización por U.V para el tratamiento del agua que entra a la fermentación y la esterilización por temperatura y presión para las mezclas al momento de diluir la materia prima Miel B proveniente de la caña de azúcar; este tipo de microorganismos consumen el azúcar que sería alcohol, tornando lo utilizado por la levadura para la fermentación acidoláctica, produciendo exopolisacáridos permitiendo la adherencia microbiana a los fermentadores, su presencia no es perjudicial a menos que promueva el crecimiento (Serrano, L. 2006). Con el recuento de mesófilos se pudo verificar la efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección, determinar si las temperaturas aplicadas en el proceso fueron las indicadas ya que, al tener un recuento elevado de estas bacterias, nos indica que hubo contaminación por la deficiente manipulación durante el proceso de fermentación (Chamorro, N. et Al. 2019). El recuento de mesófilos obtenido en el propagador dependerá del tiempo que lleve su ciclo, entre más horas, mayor será el recuento de microorganismos, el recuento de la Crema 1 siempre será <1 UFC/mL ya que al adicionar ácido sulfúrico eliminara las bacterias procedentes de los tanques de fermentación; por ende, la principal entrada de microorganismos mesófilos posiblemente provino de la materia prima, propagador y agua después de U.V.

El recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en los fermentadores, dependió de los recuentos iniciales de las mezclas de nutrientes, propagador y el agua que entra a la fermentación (Agua después de U.V), el recuento obtenido de

las mezcla 1 evidencio la presencia de BAL, y aunque esta es sometida a un tratamiento de temperatura con vapor a 90°C; no se logró la disminución en el recuento de BAL, lo contrario se observó en la muestra analizada a partir de la mezcla 2 donde no se evidencio crecimiento de BAL, posiblemente al tratamiento de temperatura de 120°C por 8 minutos a que es sometida, eliminando la contaminación presente; sin embargo, la mezcla es una dilución de la materia prima, haciéndola más susceptible a la proliferación de BAL debido a su bajo contenido en ATR (Azúcar Total Recuperable) (Rovira & Rovira. 1994). Las muestras analizadas de vinaza presentaron recuentos altos de BAL lo cual es correspondiente puesto que se obtienen como un residuo de la fermentación en el tanque final que posteriormente es tratada con calor logrando una disminución en su concentración, En la fase II de propagación no debe haber recuento de BAL ya que esta se realiza de forma estéril en el laboratorio. Las BAL al competir con la levadura por los requerimientos nutricionales, la fuente de carbono disponible es fermentada hasta ácido láctico, haciendo que la levadura flocule, disminuyendo la producción de alcohol de tal forma que, por cada gramo de ácido láctico producido, se pierden 0,51g de etanol (Glazer, A; Nikaido, H. 1998).

TABLA 7. RECUEENTOS DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES EN LA OBTENCIÓN DE ALCOHOL.

Muestra	Mesófilos (UFC/mL)	Bacterias Acido Lácticas (UFC/mL)	Bacterias Ácido Acéticas (UFC/mL)	Termófilas (UFC/mL)	Levaduras (UFC/mL)	Mohos (UFC/mL)	Enterobacterias (UFC/mL)
<b>Propagador</b>	10 - 4000	<1 -4000	<1 - 100	-	-	-	-
<b>Fermentador 1</b>	100 - >16000	1000 - 16000	<1 - 10	-	-	-	-
<b>Fermentador 2</b>				-	-	-	-
<b>Fermentador 3</b>				-	-	-	-
<b>Fermentador 4</b>				-	-	-	-
<b>Fermentador 5</b>				-	-	-	-
<b>Crema 1</b>	<1	<1	<1	-	-	-	-
<b>H2O Antes de U. V</b>	10 - >1600	1 - >1600	0 - 100	-	0 - 500	0-10	0
<b>H2O Después de U. V</b>	0 - >1600	0 - >1600	0 - 100	-	0 - 200	0-10	0



<b>Mezcla 1</b>	100 -3000	<10 -1000	<10	<10 - 2000	<10 - 100	<10	<10
<b>Mezcla 2</b>	100 -3000	<10	<10	<10 - 2000	<10 - 100	<10	<10
<b>Vinaza Caliente</b>	<1 – 100	<1x10 <sup>0</sup> - 100x10 <sup>0</sup>	<1	-	-	-	-
<b>Vinaza Después</b>	1 - >1600	1 - >1600	<1	-	-	-	-
<b>Vinaza salida de la fermentación</b>	1 - >16000	1 - >16000	<1	-	-	-	-
<b>H2O Torre o Agua de enfriamiento</b>	100 - >1600	-	-	-	-	-	-
<b>Fase II</b>	<1 - 100	<1	<1	-	-	-	-

“- “: a la muestra no se le reportan dichas siembras. Cada una de las muestras fueron incubadas a 35°C para bacterias, 30°C mohos y levaduras por 48 horas, los medios empleados se evidencian en el apartado 5.4.2.

El recuento de las Bacterias Ácido Acéticas (BAA) se evidencio altos recuentos en el propagador y agua después de ser sometida al tratamiento con U.V, siendo significativo ya que no debería haber crecimiento de estos contaminantes, lo que permitió se observaran su presencia en los fermentadores generando pérdidas de alcohol, puesto que este tipo de bacterias, por ejemplo los géneros de *Acetobacter* que producen ácido acético a partir de la oxidación del etanol, siendo un grave problema para la producción de alcohol afectando notablemente las características organolépticas del etanol, produciendo acroleína y el diacetil, una cetona que puede producirse durante la fermentación cuando el piruvato es convertido a ácido láctico (LARS, A. 2004); por lo tanto, la presencia de estos contaminantes genera grandes pérdidas de alcohol.

El recuento de levadura y mohos que se presentaron en las mezclas y agua después de ser sometida al tratamiento con de U.V; sin embargo, el conteo no es significativo, pero indican que estos contaminantes pueden entrar a la fermentación, lo cual pueden influir en las características finales del alcohol, algunas especies de hongos, pueden metabolizar los azúcares y ácidos orgánicos, resultando subproductos como el ácido acético, acetato de etilo y acetaldehído que a elevadas concentraciones causan efectos en las características del alcohol. Algunas especies al realizar su metabolismo hacen que disminuya el nitrógeno asimilable, vitaminas y otros micronutrientes esenciales para la levadura al producir alcohol (Franco, W., Valencia, P; et al. 2019)

La presencia de bacterias termófilas en las mezclas fue alta, estas pudiendo generar problemas en la fermentación ya que estas hidrolizan el azúcar para formar dextranos aumentando la viscosidad, causando que se incrusten los equipos y tuberías, ocasionando problemas de transferencia de calor de los equipos e incrementando los costos de operación por la limpieza; también hacen que los cristales de azúcar se elonguen, aumentando los niveles de azúcares reductores ocasionándole estrés a la levadura por el aumento de solutos. Las Bacterias termófilas pueden soportar las altas temperaturas que son sometidas las mezclas ya que poseen una proporción alta de lípidos saturados de cadena larga, lo que hace que tenga la fluidez adecuada a altas temperaturas, poseen mecanismos es muy genérico, que les permiten resistir condiciones extremas de temperatura como las estructuras de protección (esporas) muy resistentes a los tratamientos térmicos del proceso, por ende, se evidencia recuento de estas bacterias en las mezclas las cuales pasan por un proceso térmico similar a la de la esterilización (Rodríguez, H. 2018).

Por último, no se detectó recuento de enterobacterias en agua antes y después de ser sometida al tratamiento con U.V, lo que indico que el agua utilizada para la fermentación estaba libre de estos contaminantes y no generaran problemas de salubridad en el producto final, su presencia podría radicar en serios problemas relacionados con la capacidad de fermentar la lactosa por vía glucolítica produciendo ácido, dióxido de carbono e hidrogeno, disminuyendo el pH de la fermentación, generando la levadura no realice correctamente su metabolismo para la producción de alcohol, o incluso, algunas especies pueden colonizar superficies de tuberías de agua formando biopelículas que les permiten sobrevivir por tiempos prolongados generando problemas en el proceso (Ríos, T; Agudelo, C; et al. 2017)

Las diferentes metodologías para el control de la fermentación, indicaron que la evaluación de ácido láctico es importante para establecer la desviación del proceso de fermentación al igual que el recuento de microorganismos en los diferentes medios, siendo las BAL el contaminante más importante de la fermentación; esto hace que disminuya la viabilidad de la levadura ya que no producirá alcohol, generando perdidas en la producción de alcohol. A partir de los resultados obtenidos se toman diferentes decisiones como el incremento de fuente de carbono en el propagador para generar más biomasa, el incremento de la recirculación de la crema de levadura para equilibrar el sistema, la disminución del grado alcohólico también ayuda a la viabilidad celular, el programar liquidaciones correctivas, el arranque del propagador para introducir la levadura del laboratorio al sistema de fermentación y la dosificación de antibióticos en tiempos determinados, asignados por la empresa.

## 9. CONCLUSIONES

La medición de ácido láctico como control para el proceso de fermentación permitió identificar la existencia de problemas asociados a la presencia de microorganismos contaminantes principalmente por bacterias ácido lácticas, que inhibieron la actividad fermentativa de la levadura, generando pérdidas en la producción de alcohol.

La viabilidad celular evidenció el comportamiento de la levadura en la fermentación y permitió observar cómo avanza este proceso, indicando que podría haber una ralentización del proceso; debido a que la levadura de propagación presentaba una viabilidad menor al 90% para obtener la producción de alcohol deseada. La viabilidad celular de la levadura es inversamente proporcional con la medición de ácido láctico, es decir, si el ácido láctico aumenta en la fermentación, la viabilidad de la levadura disminuye, lo cual hace que se deje de producir alcohol, generando así pérdidas económicas para la empresa.

El recuento de microorganismos contaminantes indicó que el proceso de obtención de alcohol posee contaminación, siendo la mezcla y el agua utilizados para el arranque de la fermentación, los principales puntos de entrada de contaminación por microorganismos mesófilos, bacterias lácticas y bacterias ácido acéticas; lo cual altera la obtención del producto final y genera pérdidas económicas para la empresa.

## **10. RECOMENDACIONES O SUGERENCIAS.**

Se recomienda el uso de productos que puedan eliminar o reducir los contaminantes microbianos efectivamente, como el producto de origen natural de lúpulo llamado BetaTec, un bacteriostático que al ser un producto de origen natural los contaminantes no desarrollan resistencia. Según el artículo publicado en la revista Ethanol Producer Magazine, el lúpulo contiene ácidos orgánicos naturales débiles, cuando estos se dosifican al propagador, las bacterias absorben el extracto de lúpulo a través de la pared celular y, al ser un ácido orgánico débil, reducirá el pH dentro de la célula bacteriana, evitando que las bacterias absorban glucosa. También genera un impacto positivo en la fermentación, donde observaron aumento en el conteo de levadura, aumentando un poco el rendimiento en la producción de alcohol (Thompson, M. 2020).

Otra recomendación de acuerdo a las metodologías realizadas es el evitar errores en la medición tanto de ácido láctico, como en el conteo de levadura y recuento de contaminantes, ya que esto significarían pérdidas económicas para la empresa al tomar medidas de acuerdo a los resultados de estas metodologías.

## 11. GLOSARIO.

**Alcohol carburante:** El Alcohol Carburante es un Compuesto inflamable que no tiene color y tiene olor característico de los alcoholes. Se puede producir a partir de maíz, papa, remolacha, yuca, sorgo o de la caña de azúcar, todos ellos tienen la propiedad de contener carbohidratos que al fermentarse se transforman en alcohol (Procaña).

**Biocombustible:** Son combustibles producidos a partir de productos vegetales, como caña de azúcar, sorgo dulce, remolacha azucarera, maíz, madera y celulosa, para producir etanol y, de los aceites vegetales de palma, girasol, soya y colza, entre muchos otros, y de grasas y sebo de origen animal, para producir biodiesel. Los biocombustibles son biodegradables, razón por la cual son amigables con la naturaleza (Quiroga, B. 2020).

**Combustión:** se entiende el proceso mediante el cual se produce la quema de cualquier sustancia, ya sea gaseosa, líquido o sólida. En este proceso, el combustible se oxida y desprende calor, y, con frecuencia, luz. El oxidante no es oxígeno necesariamente, ya que puede ser parte de un compuesto químico, como ácido nítrico,  $\text{HNO}_3$ , o perclorato de amonio,  $\text{NH}_4\text{ClO}_4$ , y puede quemarse nuevamente durante una serie de pasos químicos complejos. Este oxidante puede también ser un material que no contenga oxígeno, como el flúor. Éste se combina con el hidrógeno combustible, que libera luz y calor (Ambientum).

**Melaza:** La melaza de caña es el líquido residual que queda tras la cristalización del azúcar de caña. Tiene una textura espesa y viscosa, y su color puede ir desde una tonalidad ámbar hasta marrón muy oscuro, prácticamente negro (Mercado flotante).

**Anaeróbico:** es un proceso que se desarrolla sin oxígeno. Condición que presentan algunos microorganismos para su crecimiento. Las bacterias anaerobias son microorganismos que son capaces de sobrevivir y multiplicarse en ambientes que no tienen oxígeno (Medineplus)

**Fermentación:** La fermentación alcohólica es un complejo proceso biológico originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono como, por ejemplo, la glucosa (Bodega Garzón. 2020).

**Biomasa:** La biomasa es un tipo de energía renovable procedente del aprovechamiento de la materia orgánica e inorgánica formada en algún proceso biológico o mecánico, generalmente, de las sustancias que constituyen los seres vivos, o sus restos y residuos (Quiroga, B. 2020).

**Metabolitos:** son compuestos químicos sintetizados a partir de excedentes del metabolismo primario. Los productos provenientes del metabolismo primario

(aminoácidos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos) participan directamente en el crecimiento y supervivencia de las plantas, pero los metabolitos secundarios (como fenoles, terpenos, alcaloides) actúan como mediadores (alelos químicos), interviniendo en las funciones de la planta o de los organismos con los que interacciona; en otras palabras, participan en las respuestas a innumerables variables (Conacyt)

**Cultivo microbiano:** es una herramienta de investigación bien establecida en biología molecular para el cultivo de bacterias y levaduras (Thermo Fisher).

**Mosto:** es el líquido que se obtiene previo a la fermentación de una cerveza. Contiene azúcares de las distintas maltas, el lúpulo y otros añadidos durante la cocción. Se denomina mosto debido a su sabor dulce y a su falta de alcohol (Cultura Cervecera. 2017).

**Alcohol anhidro:** Es etanol obtenido a partir de deshidratación limpia (tamices moleculares) de alcohol rectificado, con pureza mínima de 99,6% v/v (Incauca.S.A.S).

**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, consumo de agua elevado y seguridad alimentaria Ya que el economista Don Mitchell, estimo un alza del 70% en los precios de Los alimentos empleados para producir biocombustibles.

**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:** producidos por materia prima de Modificada procedentes de nalgas, hidrogeno obtenido de la biomasa (Cobos, Y.2019).

**Bioetanol:** Es un combustible biodegradable que se puede utilizar mezclado con El diésel petrolero o puro, descubierto por el profesor Expedito Parente de la Universidad Federal de Ceará, Brasil, en 1977, resultante de la reacción de un Ácido graso vegetal o animal, con un alcohol –etanol o metanol– en presencia De un catalizador, generalmente, hidróxido de potasio o de sodio (Quiroga, B. 2020).

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Ambientum. Visitado: 21 De septiembre De 2020. [https://www.ambientum.com/Enciclopedia\\_Medioambiental/Energia/La\\_Combustion.Asp](https://www.ambientum.com/Enciclopedia_Medioambiental/Energia/La_Combustion.Asp)

Annemuller, G; Manger, H. Limitaciones y consecuencias de la reproducción de levadura en mosto cervecero. Traducción Ray Young. Brauwelt en español 2:351-354. 2000.

Araújo, A. Y Torres, C. Investigaciones Realizadas En Colombia Sobre La Producción De Alcohol Carburante; Comité Nacional De Sucroindustria, Producción De Alcohol Carburante En Colombia, 1986.

Bayona, M; Ardua, M; Castellanos, C; Rojas, M. Determinación De Bacterias Contaminantes En El Proceso De Producción De Alcohol Etilico Y Su Relación Con La Floculación De Saccharomyces Cerevisiae. Revista Colombiana De Biotecnología Vol. Iv N° 2 dic. 2002 64-71.

Bayrock, D.; Ingledew, W. 2004. Inhibition of Yeast by Lactic Acid Bacteria in Continuous Culture: Nutrient Depletion And/Or Acid Toxicity? J. Industrial Microbiol. & Biotechn. 31:362-368.

Bison L., (2001). Factors Influencing Wine Quality. University of California at Davis, University Extension.

Bodega Garzón. Visitado El 21 De septiembre 2020. <https://bodegagarzon.com/es/blog/fermentacion-alcoholica/>

Calderón, N. Evaluación Del Uso De Antibióticos Como Mecanismo Para El Control De Contaminantes Bacterianos En La Fermentación Para La Producción De Alcohol Etilico. 2007

Cardona, C; Sánchez, O. 2005). Producción Biotecnológica De Alcohol Carburante I: Obtención A Partir De Diferentes Materias Primas. Interciencia. Vol. 30 N.º 11. Nov 2005. <https://www.redalyc.org/Pdf/339/33911004.Pdf>.

CHAMORRO, Natal. FLORES, Bryan. MUÑOZ, Pilar. QUISPE, Leslie. Análisis microbiano de aerobios mesófilos. Mayo de 2019.

Cobos, Y. Estudio Comparativo Para La Producción De Bioetanol A Través De La Fermentación En Batch Usando Saccharomyces Cerevisiae Entre (Mangifera Indica) Y (Vitis Vinifera). Fundación Universitaria Los Libertadores Facultad Ingeniería Y Ciencias Básicas Ingeniería Industrial. Bogotá D.C 2019.

Conacyt. Ciencia Y Desarrollo. Visitado El 21 De septiembre 2020. <https://www.cyd.conacyt.gob.mx/?P=Articulo&Id=227>

Conpes 3344. Lineamientos Para La Formulación De La Política De Prevención Y Control De La Contaminación Del Aire. Bogotá, D.C., 14 De marzo De 2005.

Correa Cortés, Yania; et al. "Estudio De La Miel B Como Fuente De Carbohidratos Para La Fermentación Alcohólica." Centro Azúcar, Vol. 29, No. 2, 2002, P. 9+. Accessed 9 oct. 2020.

Cultura Cervecera. Noviembre 2017. Visitado El 21 De septiembre 2020. <https://cervecerosdemexico.com/2017/11/13/mosto-cerveza-proceso/>.

Cunha F., A Logística Actual De Transporte Das Distribuidoras E A Infraestructura Para A Exportación De Alcohol, Petrobras Distribuidora (Presentación En Power Point), agosto De 2003.

Dacosta, O; Vázquez, H. (2007). Fermentación Alcohólica: Una Opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ing. Investig Tecnol., 249- 259.

Echegaray Et Al., 2000. Cultivo Por Lotes De Saccharomyces Cerevisiae En Melaza De Caña De Azúcar: Actividad Invertasa De Células Intactas En La Fermentación De Etanol. Julio De 2000 [Biomasa Y Bioenergía](#) 19 (1): 39-5.

FAO. The State of Food and Agriculture, Sales and Marketing Group Communication Division Food and Agriculture Organization of The United Nations 2008a.

FedeCombustibles. 2020. Normatividad de la Agroindustria de los Biocombustibles. <https://www.fedebiocombustibles.com/main-pagina-id-2-titulo-normatividad.htm>

Franco, W., Valencia, P., Ramírez, C., & Urtubia, A. (2019). Detección de levaduras y bacterias ácido lácticas nativas de diferentes cultivares chilenos: Potenciales especies para la producción de vinos reducidos en alcohol. BIO Web of Conferences, 12, 02022.



Games, R. 2019. HEMOGRAMA. Cómo hacer e interpretar. Segunda edición. Capítulo 7, pág. 317-318.

Gerard, Lm. (2015). Caracterización De Bacterias Del Ácido Acético Destinadas A La Producción De Vinagres De Frutas [Tesis Doctoral No Publicada]. Universitat Politècnica De València. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/59401>.

GLAZER, A.; NIKAIIDO H., 1998. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. Ed. W.H. Freeman & Co. (USA). p.362-368.

Gonzales, M; Pinto, R; Camacho, R. Fermentación Del Mosto De Caña De Azúcar En Barriles De Madera Para La Producción De Aguardiente En El Cip Santo Tomas – Abancay. 2019

Higuera, O; Tristancho, J; Flórez, L. Biocombustibles Y Su Aplicación En Colombia. Scientia Et Technica Año Xiii, No 34, mayo De 2007. Universidad Tecnológica De Pereira. Issn 0122-1701.

Hynes, SH, Kjarsgaard, DM, Thomas, KC e Ingledew, WM (1997). Uso de virginamicina para controlar el crecimiento de bacterias lácticas durante la fermentación del alcohol. Revista de microbiología y biotecnología industrial, 18 (4), 284-291. doi: 10.1038 /

Horta Nogueira, L.A. Perspectivas De Un Programa De Biocombustibles En América Central, Informe Preparado Para La Unidad De Energía, Cepal (Subsede México), 2003.

Howell, K., Swiegers, J., Elsey, G., Siebert, T., et al. (2004). "Variation in 4-mercapto-4methylpentan-2-one release by *Sccharomyces cerevisiae* commercial wine strains." FEMS Microbiology Letters 240(2): 125-129.

Incauca S.A.S. Procesos. Alcohol Carburante. <https://www.incauca.com/es/procesos/>.

Jacques, K., Lyons, T., & Kelsall, D. (2003). The alcohol textbook. Nottingham University Press.

Lars, A. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Salminen, S.; Wright, A.; Ouwehand, A. Eds. Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Ed. Board (New York U.S.A.). P.4-8.

Leao, C. Y., Van Uden, N. 1984. Effects of ethanol and other 306 alkanols on the kinetics and the activation on the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng 26: 403-411.

Medineplus. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002230.htm#:~:Text=La%20palabra%20anaerobio%20significa%20%22sin,Ambientes%20que%20no%20tienen%20ox%C3%Adgeno.&Text=Este%20tipo%20de%20bacterias%20causan%20infecciones%20como%20el%20t%C3%A9tanos%20y%20la%20gangrena>.

Mercado Flotante. Visitado: 21 De septiembre 2020.  
<https://www.mercadoflotante.com/blog/foodiepedia/melaza-de-cana#:~:Text=La%20melaza%20de%20ca%C3%B1a%20es,Marr%C3%B3n%20muy%20oscuro%2c%20pr%C3%A1cticamente%20negro>.

Merck. Test Ácido Láctico. 2020.  
[https://www.merckmillipore.com/Co/Es/Product/Lactic-Acid-Test,Mda\\_Chem-116127](https://www.merckmillipore.com/Co/Es/Product/Lactic-Acid-Test,Mda_Chem-116127).

Ocampo, A. Alcohol Carburante: Actualidad Tecnológica. Revista Eia, Issn 1794-1237 Número 1 P. 39-46. febrero 2004.

Procaña. Visitado: 21 De septiembre 2020.  
<https://www.procana.org/new/quienes-somos/historia-de-alcohol-carburante.html#:~:Text=El%20alcohol%20carburante%20es%20un,Fermentarse%20se%20transforman%20en%20alcohol>.

Quiroga, B. La Estructura Productiva De La Agroindustria Azucarera En El Departamento Del Valle Del Cauca A Partir De La Producción De Bioetanol 2005-2017. Fundación Universidad De América Facultad De Economía Bogotá D.C. 2020.

Ríos, T; Agudelo, C; Gutiérrez, B. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. Rev. Fac. Nac. Salud pública, 35(2): 236-247. 2017

Rodríguez, H. 2018. Análisis HACCP del proceso de elaboración de azúcar y estandarización de la ecología microbiana presente en campo y fábrica en el ingenio quesería del grupo BSM. Col, a 1 de junio.

ROVIRA, J.; ROVIRA, A.1994. Factores de inhibición del crecimiento de bacterias ácido lácticas. Alimentaria: Revista de Tecnología e Higiene de los alimentos. 254:31-36

Skinner, K.; Leathers, T. 2004. Bacterial Contaminants of Fuel Ethanol Production. J. Industrial Microbiol. Biotechnol. 31:401-408.

Slaughter, J. Biochemistry and physiology of yeast growth. En: PRIEST, FG Y CAMPBELL, I. (eds) Brewing microbiology. 3ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers. Nueva York. Pp 19-66. 2003.

Suárez, C; Garrido, N; Guevara, C. Levadura Saccharomyces Cerevisiae Y La Producción De Alcohol. Revisión Bibliográfica. Icidca Sobre Los Derivados De La Caña De Azúcar 50 (1) Enero - abril, 2016.

Serrano, L. Determinación de las poblaciones microbiológicas en el proceso de extracción de jugo de caña de azúcar en el ingenio Manuelita S.A. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, D.C. febrero de 2006

Sossa Urrego, D., González, L., & Vanegas, M. (2009). Aislamiento E Identificación De Lactobacillus Contaminantes En Una Planta Colombiana De Fermentación Alcohólica. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 12(2), 163-172. <https://doi.org/10.31910/Rudca.V12.N2.2009.702>.

Thermo Fisher. Visitado El 21 De septiembre 2020. <https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/cell-culture/microbiological-culture.html#:~:text=Un%20cultivo%20microbiol%C3%B3gico%2c%20o%20cultivo,Bacterias%20y%20organismos%20de%20levadura.&text=Medios%20microbiol%C3%B3gicos>

Thompson, Matt. A Natural Fit. Ethanol Produce Magazine Edition March 2020. Pag 18- 25. 20 De febrero De 2020.

Walker Simmons, M.K. (2003), "New USDA-ARS Research in Biotechnology Risk Management", in Agricultural Biotechnology: Science and Society at a Crossroad. Natl. Agric. Biotechnol. Council, A. Eaglesham y otros (ed.), New York, pp. 94-98.