

**CONTROL ANTIMICROBIANO EN LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL
CARBURANTE EN INCAUCA S.A.S**

AUDITH YULIANA SALAZAR VEGA

**PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS**



UNIVERSIDA DE PAMPLONA

**CONTROL ANTIMICROBIANO EN LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL
CARBURANTE EN INCAUCA S.A.S**

AUDITH YULIANA SALAZAR VEGA

**Trabajo de monografía presentado como requisito para optar por el título de
MICROBIOLOGO**

Director: JOSÉ FELIX ORTIZ LEMUS

PhD

PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS



UNIVERSIDA DE PAMPLONA

El presente trabajo lo dedico principalmente al creador de la vida, a mi Dios, quien en su soberanía sabe muy bien los planes que tiene para mí, planes de bienestar y no de calamidad, a fin de darme un futuro y una esperanza (Jeremías 29:11), él mi mayor inspiración, permitiéndome alcanzar uno de mis sueños más anhelados.

A mis padres, por su entrega, amor y apoyo a lo largo de mi vida, quienes han sido escalón fundamental para poder lograr este propósito, son los mejores padres.

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios por guiarme y darme la paciencia en cada etapa y paso de mi vida, a mis amados padres Hosman Salazar y Judis Vega por brindarme su apoyo total para poder culminar una de mis metas y forjarme a nunca rendirme, por siempre recordarme lo perseverante que debo ser y siempre apoyarme en mis decisiones.

A mi tío Javier Vega, ingeniero en sistemas, por su apoyo tecnológico.

A mis hermanas Danna Salazar y Steffy Salazar por brindarme su amor y apoyo.

A mi director José Félix Ortiz Lemus por guiarme en este proceso, por su acogida y apoyo para que este trabajo fuera posible.

A la Universidad de Pamplona, por los conocimientos adquiridos durante mi proceso de aprendizaje.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÒN.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo general	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3. JUSTIFICACIÒN.....	12
4. MARCO TEORICO	14
4.1 Antecedentes	14
4.2 Bases teóricas y conceptuales	16
4.2.1 Miel de azúcar de caña	16
4.2.3 Fermentación alcohólica.....	16
4.2.2 Fuentes de contaminación presentes en fermentación.....	19
4.2.4 Bacterias acido lácticas como contaminantes.....	19
4.2.5 Antibióticos	21
5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	23
5.1 Medición de ácido láctico	23
5.2 Recuento de levadura y viabilidad celular	24
5.3 Determinación de contaminantes	25
5.4 Ensayo de antibióticos.....	26
5.4.1 Preparación de antibióticos.....	26
5.4.2 Preparación del inóculo y muestras.....	26
5.4.3 Medición del ácido láctico.....	27
5.4.4 Análisis de datos.....	27
6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	28
7. RESULTADOS Y DISCUSION	29

7.1 Medición de ácido láctico	29
7.2 Recuento de levadura y viabilidad celular	30
7.3 Determinación de contaminantes	32
7.4 Ensayo de antibióticos.....	36
8. CONCLUSIONES.....	41
9. RECOMENDACIONES O SUGERENCIAS	42
10. GLOSARIO	43
11. REFERENCIAS.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil microbiano de una fermentación típica de destilería.	17
Figura 2. Esquema proceso de fermentación de alcohol desarrollado en Incauca SAS.	18
Figura 3. Evolución y crecimiento de la población de LAB durante la fermentación.	20
Figura 4. Equipo Rqflex20.	23
Figura 5. Producción de ácido láctico en fermentación tratada con antimicrobiano.	36
Figura 6. Antibióticos utilizados en los ensayos.	50
Figura 7. Preparación de los medios de cultivo.	50
Figura 8. Equipo RQflex20 corriendo muestras diluidas antes preparadas.	51
Figura 9. Tiras reactivas luego de ser leídas en el equipo RQflex20.	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Siembras de cada una de las muestras.	25
Tabla 2. Concentraciones utilizadas por cada antibiótico.....	27
Tabla 3. Cronograma de actividades realizadas semanalmente.....	28
Tabla 4. Datos de ácido láctico de los cinco fermentadores.	29
Tabla 5. Datos del conteo de levaduras.	31
Tabla 6. Resultados microbiológicos de contaminantes microbianos presentes en fermentadores y aguas de proceso.	33
Tabla 7. Datos de análisis de varianza con α 0,05.	39

1. INTRODUCCIÒN

El alcohol carburante es utilizado como biocombustible, se considera necesario y benéfico para el medio ambiente, pues mejora la combustión en los motores de explosión interna y reduce las emisiones nocivas de gases contaminantes, ya que se produce a partir de biomasa mediante tecnologías limpias. 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 SAS, n.d.). La vía de obtención de alcohol a partir de la biomasa continuará por mucho tiempo por ser en nuestro medio la alternativa más viable, dada nuestra ubicación que permite aprovechar la energía solar durante todo el año. Hasta el momento se ha considerado que la materia prima más apropiada para Colombia es la caña de azúcar, ya que se dispone de una tecnología adecuada para obtener alcohol tanto para licores como para uso industrial.

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. Las sustancias antimicrobianas como los antibióticos han sido estudiados tras su descubrimiento a lo largo del tiempo por los infinitos usos que presentan, por ende, han tenido una aceptación en las industrias de destilería, ya que se ha demostrado que estas pueden controlar la contaminación por bacterias ácido lácticas en el proceso

fermentativo en la producción de etanol, lo que conlleva a un mayor rendimiento y evita las grandes pérdidas económicas que podría acarrear si se perjudica el proceso de fermentación.

Este trabajo tiene como objetivo aplicar metodologías implementadas para llevar el control de procesos fermentativos para la obtención de alcohol, analizando la viabilidad de la levadura, cantidad de contaminantes presentes y la efectividad de la actividad antimicrobiana de cuatro antibióticos (Monensina, Penicilina, Neomicina y Estreptomicina), para esto se aplicó una metodología experimental donde se utilizó el equipo RQflex20 con tiras reactivas, que mide la concentración de ácido láctico presente en la muestra, estudiando el comportamiento de estas sustancias antimicrobianas tras su aplicación. Con ello se pudo comparar cual tuvo mejor eficiencia y disminución de la contaminación presente en las muestras, tomando en cuenta los antibióticos que podrían dar mejores rendimientos en el proceso fermentativo, al final del estudio la monensina y penicilina mostraron óptimos resultados en la disminución de carga contaminante presente en las muestras del fermento a escala de laboratorio.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Analizar el efecto antimicrobiano de un grupo de antibióticos en el control de la contaminación microbiana en el proceso fermentativo a partir de un estudio a nivel de laboratorio.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración de ácido láctico en las muestras obtenidas a lo largo del proceso fermentativo.
- Evaluar la viabilidad de las células de levadura durante las diferentes etapas de fermentación.
- Determinar la concentración efectiva de los antibióticos como sustancias antimicrobianas en el control de la contaminación en el proceso fermentativo del alcohol a escala de laboratorio.

3. JUSTIFICACIÓN

La fermentación es un proceso catabólico que no requiere de oxígeno, cuando se quiere obtener metabolitos como el alcohol a partir de glucosa; este proceso se realiza bajo ciertas condiciones controladas (pH, temperatura) en un sistema de fermentación continuo de cinco reactores (fermentadores 1-5) 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 miel, el propagador de levadura, agua que ha pasado por esterilización U.V y nutrientes (ver. Figura2), el uso de la levadura es de principal importancia por su potencial fermentativo, este es un microorganismo unicelular que transforma azúcares en alcohol, CO₂ y energía, mediante una vía glucolítica en un medio anaeróbico; sin embargo, este proceso no está exento de contaminantes bacterianos provenientes de la materia prima (miel de caña) que ha sido adquirida, la cual puede introducir microorganismos productores de ácido láctico, generando un tipo de antagonismo causando el deterioro de la fermentación al generar transformaciones y posible inhibición de la levadura; también se sabe que los elevados niveles de bacterias ácido lácticas (BAL) reducen el rendimiento de etanol, creando un descenso constante de las fuentes de carbono disponible, para que la levadura realiza su actividad fermentativa y puede resultar en pérdidas de ingresos. El ácido láctico es una sustancia fuertemente inhibitoria del proceso de consumo de glucosa en la levadura, por lo tanto, afecta su reproducción y su desempeño en fermentación. Es por ello que el uso de antibióticos como tratamiento para el control de contaminación es el más implementado durante la etapa fermentativa.

El uso de un equipo Rqflex20, que tiene un sistema reflectoquant, permitirá llevar un control de las bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación, mediante un análisis cuantitativo rápido haciendo uso de tiras reactivas especiales que muestran resultados precisos, directamente en el

sitio. A pesar de las mejoras introducidas en los procesos de fermentación en los últimos años, todavía no presentan un rendimiento satisfactorio con referencia al control de la contaminación. Hoy en día, las características del procesamiento de la caña de azúcar en los molinos de producción de alcohol dan lugar normalmente a la aparición de una microbiota bacteriana que excede generalmente 10^4 células/ml en el mosto en fermentación (Arch Chemicals, Inc, 2015). Además, el mismo mosto, que es un medio favorable para la proliferación bacteriana, tiene variedades de bacterias contaminantes tales como *Lactobacilli*, su presencia tiende a provocar la aglomeración de estos organismos en torno a las levaduras de fermentación, produciendo de este modo la floculación y alterando la actividad productiva de las levaduras de fermentación. Es por todo esto que el seguimiento que se realiza en el laboratorio de microbiología con este equipo junto a otras metodologías es de suma importancia y necesario para la empresa para monitorear los diferentes problemas que se presentan en la fermentación y buscar alternativas, que mitigue la presencia de contaminantes productores de ácido láctico, evitando las posibles pérdidas que este pueda generar.

4. MARCO TEORICO

4.1 Antecedentes

La contaminación bacteriana que predomina durante la fermentación industrial de levaduras, son las bacterias ácido lácticas (BAL). Estas generan una disminución de la producción de etanol y viabilidad celular de la levadura pues se crea una competencia por los factores de crecimiento en el medio de fermentación, como azúcares y nutrientes disponibles, así mismo existe una acumulación de subproductos como el ácido láctico y el ácido acético.

Uno de los sustratos que por su origen presenta problemas de contaminación por bacterias ácido lácticas son las melazas de caña, siendo considerado como el sustrato más utilizado a nivel global para la producción de alcohol. El método principal por el cual los BAL inhiben la producción de etanol por la levadura es mediante la producción de ácidos orgánicos como el ácido láctico y, en menor grado, ácido acético. La producción de ácido láctico desvía el sustrato fermentable de la producción de alcohol, ya que cada molécula de azúcar utilizada por BAL da como resultado la pérdida de dos moléculas de etanol. El método secundario de inhibición es la acumulación de ácido láctico y los efectos del pH bajo (<3,8) sobre la fisiología y el metabolismo de la levadura, que se agrava aún más si hay ácido acético presente. (Seo et al., 2020)

Las plantas a gran escala de producción de bioetanol suelen optar por el uso de agentes antimicrobianos (antibióticos) para minimizar y/o prevenir la contaminación por bacterias ácido lácticas, pues este suele ser un método eficaz para destruir de manera selectiva los contaminantes. Los antibióticos más comunes que se han empleado para el control de la contaminación bacteriana son la penicilina, virginamicina, estreptomycin y tetraciclina. (Haris et al., 2018)

En un estudio realizado por Day et al. probaron la penicilina, la aureomicina, la cloromicetina, la terramicina, la estreptomicina, la tirostricina, la bacitracina y la polimixina B contra *Lactobacillus* sp. Y la flora bacteriana mixta obtenida de fermentaciones a escala comercial. Observaron que todos los antibióticos administrados parecían inhibir los contaminantes comúnmente asociados con la fermentación del alcohol de grano, pero variaban en efectividad. Según la cantidad de antibiótico requerida, se encontró que la penicilina era la más efectiva. Inhibió los contaminantes a una dosis más baja en comparación con otros antibióticos. Al final de su estudio lograron concluir que la aureomicina, la bacitracina, la cloromicetina y la terramicina tenían menos efectividad y la tirostricina y la estreptomicina eran ineficaces, mientras que la polimixina B fue ineficaz a niveles de hasta 10 unidades / ml.

Para evaluar unos antibióticos y un antimicrobiano, en un trabajo realizado por Orozco et al., estudiaron el efecto de estos en el control de bacterias ácido lácticas en tres ingenios productores de alcohol en valle del cauca, Colombia; probaron los antibióticos virginamicina, estreptomicina, penicilina, monensina, cocteles de los mismos y un antimicrobiano (lúpulo) en diferentes concentraciones. Al concluir su estudio lograron exponer que la virginamicina en el ingenio A, EPVM (coctel estreptomicina-penicilina-virginamicina-monensina) en los ingenios B y C y el antimicrobiano lúpulo en los tres ingenios fueron eficientes en el control de bacterias ácido lácticas.

Bayrock et al., 2003, realizó un estudio para la disminución de la contaminación microbiana donde aplicaron penicilina G en dos tipos de régimen de adición, continua y de manera pulsada en fermentación continua, para verificar si existía alguna diferencia en control de la carga bacteriana al final del proceso, al final del estudio concluyeron que las levaduras viables aumentaron en las dos metodologías utilizadas y que no existían diferencias al momento de la

recuperación del alcohol, por lo tanto el antibiótico realizó su efecto en ambas condiciones como se esperaba, lo que demostró su efectividad.

4.2 Bases teóricas y conceptuales

4.2.1 Miel de azúcar de caña

La miel de caña es un subproducto de la producción de azúcar, es un líquido denso y viscoso de coloración marrón oscuro, rico en azúcares y que contiene un pequeño porcentaje de agua. Tiene diferentes nombres según la región, como miel agotada, miel pobre, miel final, miel residual o simplemente melaza. Su densidad es de 1.4 a 1.5 g / ml y su productividad es de 40 kg / ton de caña de azúcar. La producción de etanol es de 280 230 L / tonelada de melaza. Su composición depende de la variedad, edad, estado de salud, maduración, sistema de siembra, fertilización y tratamiento del cultivo de la caña de azúcar, así como de las condiciones climáticas, procesos de fabricación de azúcar, si la caña de azúcar fue cosechada cruda o quemada, clima y condiciones de almacenamiento, etc. (de Vasconcelos, 2015)

4.2.3 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso biotecnológico realizado por levaduras, algunos tipos de bacterias o algunos otros microorganismos para convertir los azúcares en alcohol etílico y dióxido de carbono. En este proceso de fermentación, la levadura se utiliza principalmente como biocultivo y solución acuosa de azúcares como monosacárido (materias primas) como medio de cultivo para la producción. En el proceso de fermentación alcohólica, la levadura lleva a cabo el proceso de fermentación aeróbica, pero también puede fermentar las materias primas en condiciones anaeróbicas. En ausencia de oxígeno, la fermentación alcohólica se produce en el citosol de la levadura. La fermentación alcohólica comienza con la descomposición de los

azúcares por las levaduras para formar moléculas de piruvato, lo que también se conoce como glucólisis. La glucólisis de una molécula de glucosa produce dos moléculas de ácido pirúvico. Las dos moléculas de ácido pirúvico se reducen a dos moléculas de etanol y CO₂. (Malakar et al., 2020)

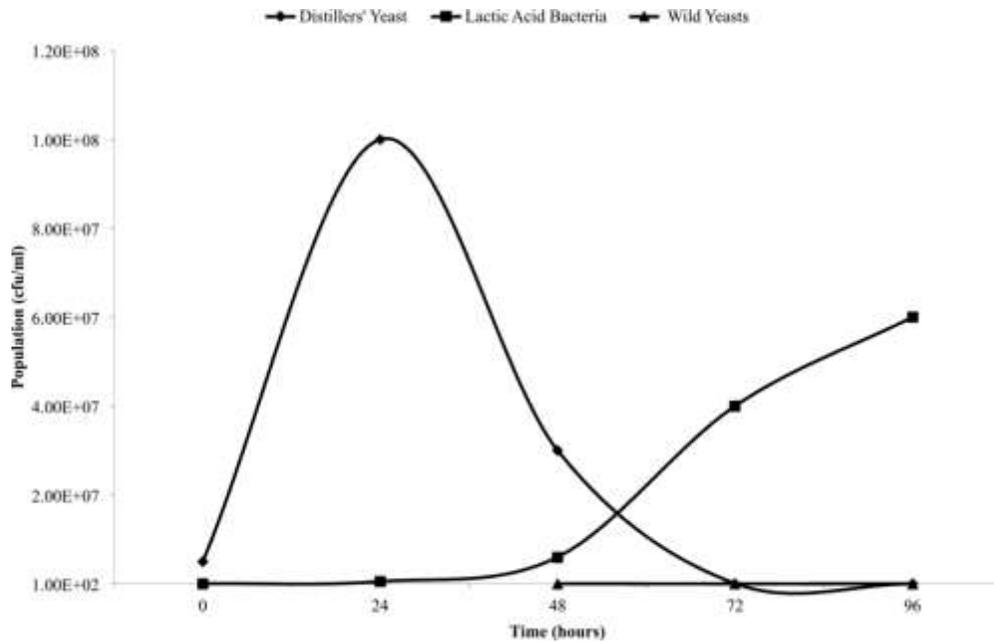


Figura 1. Perfil microbiano de una fermentación típica de destilería. Fuente: (Russell & Stewart, 2021)

En la Figura 1 se detalla el comportamiento de un perfil microbiano comúnmente observado en las fermentaciones donde el contaminante mayoritario (Bacterias ácido lácticas), presentan una población inicial baja ($10^3 - 10^5$ células / ml), que puede mantenerse bajo control mediante el crecimiento prolongado de levaduras y la acumulación de etanol, hasta que llega un punto donde la población de levaduras comienza a disminuir y cesa la producción de etanol. En este momento se permite que la población de las BAL se desarrolle (Russell & Stewart, 2021).

Las principales materias primas que se utilizan en la destilería de Incauca SAS, son la miel B, la meladura y el jugo clarificado, provenientes de la fábrica de azúcar. El proceso de fermentación

consiste en convertir los azúcares presentes en la materia prima que vienen de la fábrica, en etanol y gas carbónico, por medio de la acción de levaduras. La fermentación 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. 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. Además, contiene agua, sólidos y levadura, que se recupera en el tanque de sedimentación para ser usada nuevamente en el proceso. La levadura recuperada, 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. El mosto o vino fermentado se envía al proceso de destilación para continuar la separación del etanol producido(Incauca SAS, n.d.).

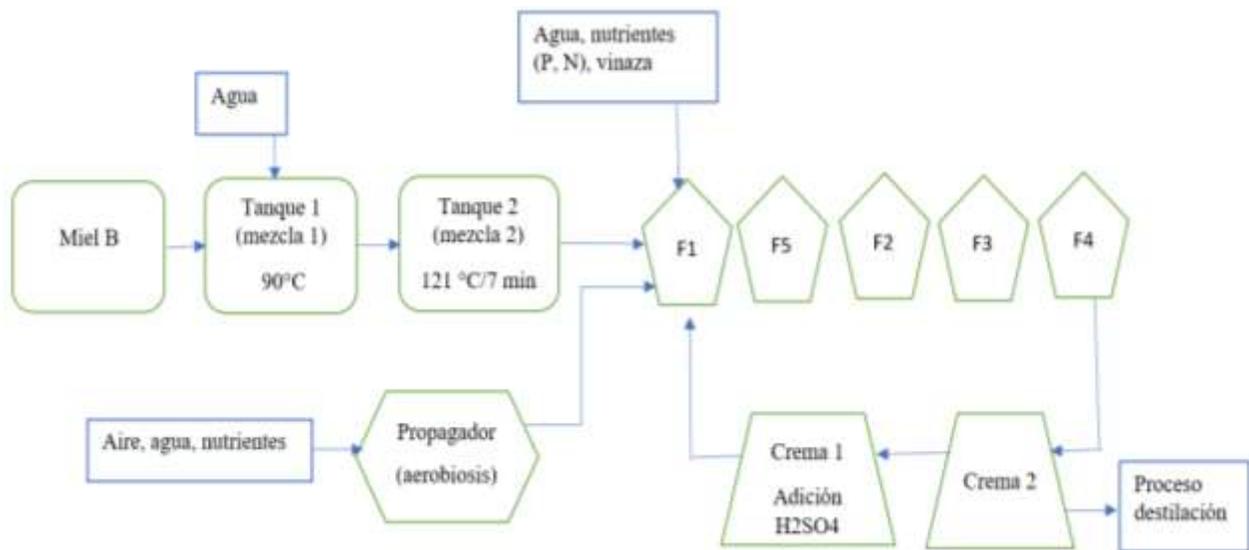


Figura 2. Esquema proceso de fermentación de alcohol desarrollado en Incauca SAS. Fuente: autor

4.2.2 Fuentes de contaminación presentes en fermentación

Las fuentes de contaminación se clasifican como directas o indirectas. Las fuentes directas potenciales pueden originarse a partir de materia prima añadida al fermentador y pueden incluir maíz pretratado, miel de caña, inóculos, enzimas, licor de maceración de maíz y aerosoles, lo que permite la proliferación según la duración de la fermentación. Las posibles fuentes indirectas de contaminación son las líneas de transferencia sucias o el agua utilizada para los sellos de la bomba y el agitador. Todos los recipientes y líneas de transferencia generalmente se esterilizan con vapor antes de su uso, sin embargo, la esterilización puede ser inadecuada. Debido a que la fermentación es un proceso anaeróbico, la mayoría de los contaminantes bacterianos son bacterias anaeróbicas o anaeróbicas facultativas. Estas bacterias tienen el potencial de sobrevivir en niveles de pH mucho más bajos ($\text{pH} < 5.0$) que la mayoría de las otras bacterias, crecer bien en condiciones de fermentación y competir con la levadura por azúcares fermentables y otros nutrientes necesarios, lo que resulta en reducciones en el rendimiento de etanol. (Muthaiyan et al., 2011). Otro contaminante presente son las levaduras silvestres, distintas de *S. cerevisiae*, que no se agregan intencionalmente en el fermentador, también pueden causar problemas para el proceso de fermentación.

4.2.4 Bacterias ácido lácticas como contaminantes

Las BAL se clasifican según los productos de su metabolismo de carbohidratos. Dentro de BAL homofermentadores obligados, se incluye *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y algunas especies de *Lactobacillus*, utilizan la glucólisis para producir ácido láctico como único producto final. BAL heterofermentadores obligados, como *Leuconostoc* y algunas especies de *Lactobacillus*, metabolizan los carbohidratos utilizando la vía 6 fosfogluconato / fosfocetolasa (6-PG / PK), produciendo ácido láctico, dióxido de carbono y etanol o ácido acético dependiendo

del contenido de oxígeno del mosto. También existen los heterofermentadores facultativos, compuestos principalmente de varias especies de *Lactobacillus*, pueden utilizar tanto la glucólisis como la vía 6-PG / PK dependiendo de las condiciones ambientales. Como los LAB compiten con la levadura por los carbohidratos durante las fermentaciones, la concentración y, en menor medida, el tipo de BAL presente durante la fermentación son importantes.

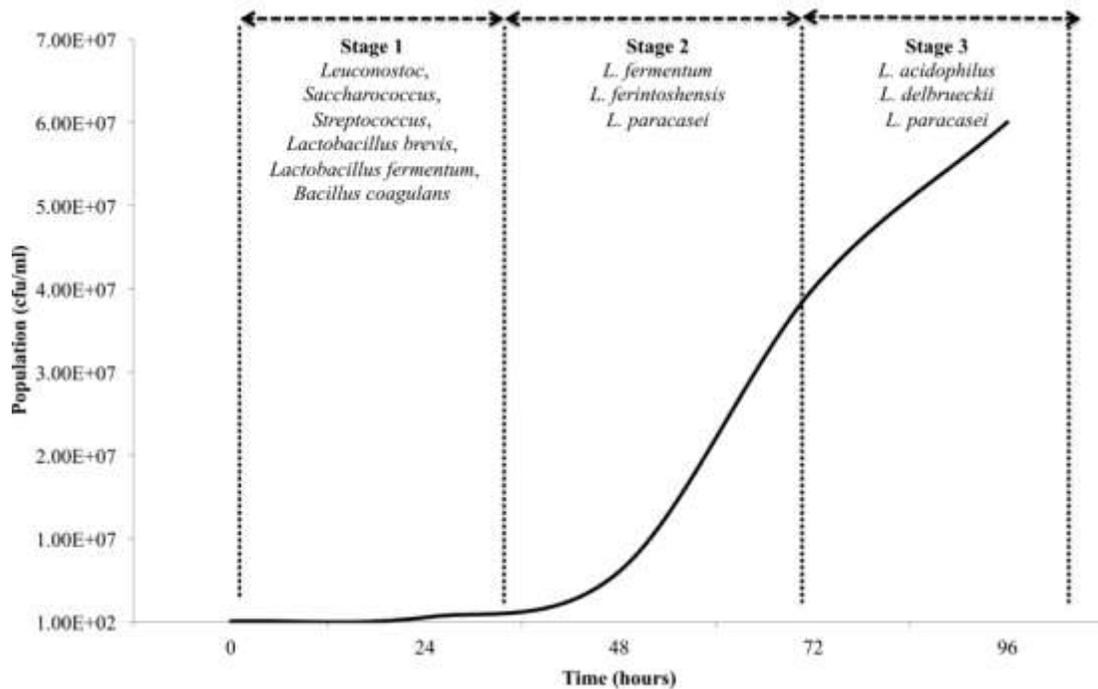


Figura 3. Evolución y crecimiento de la población de LAB durante la fermentación. Fuente: (Russell & Stewart, 2021)

Durante la etapa inicial de fermentación (0 a 30 a 40 h), el crecimiento bacteriano es inhibido por el rápido crecimiento de la levadura y la acumulación de etanol. Cuando entra a la segunda fase de fermentación (30-40 a 70 h), la población de levaduras entra en una fase estacionaria, comenzando a declinar su crecimiento, momento en el que la producción de etanol se completa entre el 80 y el 90%. A medida que muere la población de levaduras, proliferan lactobacilos, lo que provoca la acumulación de ácido láctico y acético, acelerando el declive de la levadura y, en última instancia, permite el dominio de los lactobacilos. Durante la etapa final (70 h en adelante),

las poblaciones bacterianas, compuestas principalmente de homofermentadores como *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* y *L. paracasei*, alcanzan su punto máximo y luego declinan. Debido a la falta de azúcares fermentables en esta etapa, se cree que estas bacterias sobreviven con los nutrientes liberados por las células de levadura que mueren y los oligosacáridos residuales. (Russell & Stewart, 2021)

4.2.5 Antibióticos

Además de los factores ya conocidos para el control como la calidad de las materias primas, higiene en la manipulación, pasterización del mosto, sanitización y buen mantenimiento, los antibióticos se utilizan como medida complementaria durante la fermentación de etanol. El término “antibiótico” fue acuñado por Selman Waksman en 1942 para describir cualquier sustancia producida por un microorganismo que es antagónico al crecimiento de otros microorganismos en alta dilución. En la industria productora de etanol combustible, el control de la contaminación bacteriana se ha logrado mediante el uso de antibióticos como la penicilina G, la estreptomicina, la tetraciclina, la virginiamicina, la monensina o composiciones de estos antibióticos. (Muthaiyan et al., 2011)

4.2.5.1 Penicilina

Dentro de los antibióticos más utilizados en destilerías para controlar contaminación por BAL, se encuentra la penicilina, metabolito producido por algunas bacterias *Penicillium*, especies como *P. notatum* y *P. crysogenum*, es de tipo de Beta-lactámico, su espectro de acción es contra las bacterias gran positivas y su mecanismo consiste en la inhibición de la síntesis de la pared celular, evitando la generación de nuevas células. (K.A. Jacques, 2003) La influencia favorable

de la penicilina como agente de control de la contaminación en las fermentaciones alcohólicas de melaza y caña de azúcar se ha reportado desde la década de 1950.

4.2.5.2 Estreptomicina

Este antibiótico es de tipo aminoglucósido producido por especies de *Streptomyces*, su mecanismo de acción consiste en la apertura de poros en la pared celular de bacterias Gram negativas, así mismo en la inhibición de la síntesis de proteínas de las mismas (K.A. Jacques, 2003) causando muerte celular en un periodo corto. Debido a su bajo espectro, en destilerías suelen utilizarlo en conjunto con otro antibiótico para generar un efecto sinérgico, siempre que los valores de pH del medio sean inferiores a 7.0 (Daniel Amsterdam, 2014)

4.2.5.3 Monensina

La monensina fue el primer ionóforo poli éter carboxílico, introducido en los Estados Unidos para el control de la coccidiosis en 1971. La monensina pertenece a la familia química del ácido poliéter monocarboxílico y se produce por fermentación de una cepa de *Streptomyces cinnamomensis*. La monensina se usa en la prevención de la coccidiosis en aves de corral. La monensina sódica es activa principalmente contra bacterias Gram positivas. (Anadón & Martínez-Larrañaga, 2014)

5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

5.1 Medición de ácido láctico

Para el análisis de ácido láctico, se utilizó un equipo de cuantificación reflectométría de detección rápida Rqflex20, al cual se realizó su respectiva calibración y recalibración, utilizando tiras de ensayo Reflectoquant Test Ácido Láctico MERCK (ver anexos), sumergiéndolas durante dos segundos, en una solución de cada muestra de los 5 fermentadores diluida 1/100, seguido se retiró el exceso de líquido y se insertó en el reflectómetro Reflectoquant Rqflex plus20 MERK, registrando el valor obtenido en mg/l.

La preparación de la dilución para la miel B se realizó pesando 10g en un beaker, se diluyo, se pasó a un balón de 100ml y se aforó, se agito para mezclar bien para tomar a partir de esta dilución 10ml con probeta, se aforó nuevamente en un balón de 100ml y a partir de esta se realizó la medición.



Figura 4. Equipo Rqflex20. Fuente: Avantor 2021

La prueba de ácido láctico mide la suma de ácido D- y L-láctico en bebidas, por ejemplo, vino, cerveza y jugo de frutas 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 por reflectometría en el equipo RQflex20 donde el rango de medición es de 3.0 mg/l – 60.0mg/l (Merck, 2020).

5.2 Recuento de levadura y viabilidad celular

Para el recuento de levadura se preparó las muestras realizando una agitación a los frascos, a partir de estos se tomó 1ml y se adicione a un balón aforado de 100 ml, se aforo con agua de proceso (agua que ha sido tratada en la empresa), se le adicione 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 adicione 90ml de agua de proceso, se mezcló bien y se tomó 1ml de la muestra para adicionar al balón y se aforo con agua de proceso a 100 ml y se adicione los reactivos descritos anteriormente.

A partir de las muestras aforadas se realizó agitación, se tomó una muestra con pipeta Pasteur y adicione a la cámara de Neubauer, la idea es de dejar que el líquido se introduzca entre la cámara y el cubre objetos por capilaridad. El líquido debe penetrar de manera uniforme en la hemicámara y sin desbordar. Se realizo conteo de levaduras vivas, gemantes, muertas, elongada vivas, elongadas muertas, salvajes vivas y salvajes muertas (las levaduras elongadas 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(Cervezero Itinerante, 2019). Los datos obtenidos se reportan en la base de datos empleada por la empresa.

5.3 Determinación de contaminantes

Para la determinación de contaminantes se realizó de acuerdo a lo descrito en la tabla 1 para las muestras, con cada dilución, medio, método e incubación correspondientes a cada contaminante; sin embargo, para los lodos se realizó un procedimiento diferente el cual se centrifuga a 3500rpm por 10 minutos en tubos Falcon de 50ml, el sobrenadante se descarta, se adiciona 9ml de agua peptona estéril y se homogeniza por agitación en vórtex, para diluir el pellet; a partir de esta dilución se realiza lo especificado en la tabla 1. Las siembras se incubaron en su respectiva temperatura por 48 horas. Después del tiempo de incubación se realizó conteo 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 fueron ingresados a la base de datos de la empresa.

Tabla 1. Siembras de cada una de las muestras.

Muestras	Medio	Método	Dilución	T° Incubación
Propagador	PC	Profundidad	10 ¹	35°C
	MRS			
	WL	Superficie	10 ⁰	30°C
Fermentadores	PC	Profundidad	10 ¹	35°C
	MRS		10 ¹ y 10 ²	
	WL	Superficie	10 ⁰	30°C
Vinaza entrando al fermentador	PC	Profundidad	10 ¹	35°C
	MRS		10 ¹ y 10 ²	
	WL	Superficie	10 ⁰	30°C
Lodos	PC	Profundidad		35°C
	MRS			
	MacConkey		10 ¹	

	YGC			30 °C
	WL	Superficie		
Aguas antes y después de UV	TTC	Filtración por membrana	-	35°C
	MRS			
	MacConkey			
	WORT			
	WL			30 °C

Fuente: Autor.

5.4 Ensayo de antibióticos

A continuación, se especifica el procedimiento para en el ensayo de antibióticos que fue ejecutado cuatro veces, por ende, en los resultados se verá reflejado cuatro datos control, por tanto, se pueden observar diferencias entre ensayos.

5.4.1 Preparación de antibióticos

Se preparó cuatro soluciones de antibióticos (Monensina, Penicilina, Neomicina, Estreptomicina). Estos fueron preparados como se expone a continuación con sus proporciones:

- Se tomó un gramo del antibiótico Monensina, posteriormente se agregó a un balón aforado de 100 ml y se aforó con 100 ml de etanol.
- Para la preparación de Penicilina, Neomicina y Estreptomicina, se usó la proporción 50:50, para ello se tomó un gramo de cada antibiótico, y se aforó con una mezcla de 50 ml de agua destilada estéril y 50 ml de etanol.

5.4.2 Preparación del inóculo y muestras.

Para la preparación del inóculo de bacterias ácido lácticas provenientes de la materia prima y el proceso hasta la entrada a los fermentadores, se tomó 100 ml de 5 fermentadores de la destilería, que llevan varios días en fermentación, realizando una mezcla, esta se adiciono a 1800 ml de

caldo MRS (Man Rogosa Sharpe) para su crecimiento, llevándolo a incubación en agitación constante en un Shaker durante 24 horas.

Posteriormente se preparó 13 frascos con 300 ml de caldo MRS, los cuales se le agregó 100 ml del cultivo antes preparado, se ajustó el pH a 4,2, pues las bacterias lácticas crecen con medios ligeramente ácidos y finalmente se adicionaron los antibióticos con tres concentraciones diferentes como se indica en la tabla 1 (cálculos: ver anexos) los frascos se llevaron a incubación en Shaker durante 18 horas.

Tabla 2. Concentraciones utilizadas por cada antibiótico.

Antibióticos	Concentración (ppm)
Monensina	3, 6, 8
Penicilina	3, 6, 8
Neomicina	3, 6, 8
Estreptomina	3, 6, 8

Fuente: Autor

5.4.3 Medición del ácido láctico

Para este análisis se realizó el procedimiento descrito en el apartado 5.1 para determinar la concentración del ácido láctico presente en las 13 muestras tratadas con los antibióticos y verificar si hubo disminución de este.

5.4.4 Análisis de datos.

Los datos fueron organizados en hojas de cálculos Microsoft Excel 2019, donde se hallaron las medias a cada grupo, se realizó gráficos estadísticos para su respectivo análisis y se aplicó la prueba de análisis de varianza a las medias para verificar si los datos eran estadísticamente significativos o no, a un nivel de significancia α 0,05.

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

A continuación, se evidencia el cronograma representado en diagrama de Gantt para cada una de las actividades realizadas semanalmente, así mismo una actividad extra de un ensayo de antibióticos realizado durante 4 semanas.

Tabla 3. Cronograma de actividades realizadas semanalmente.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES					
Actividad	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
Medición ácido láctico					
Conteo de levaduras					
Perfil de contaminación					
Siembras de medios					
Propagación de cepa para la fermentación					
Limpieza de laboratorio					
Ensayo de antibióticos					

Fuente: autor

7. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados presentados a continuación son datos hipotéticos, debido a que la empresa exige confidencialidad en el trabajo realizado.

7.1 Medición de ácido láctico

En la tabla 4 se registraron los datos obtenidos de 5 fermentadores, donde los valores no excedieron al valor control que ha sido establecido por la empresa, lo que indica que el proceso se desarrolló con normalidad, con la miel B que es un sustrato con altas cantidades de glucosa y muy susceptible a contaminación ocurrió lo mismo, dada por los equipos o la materia prima de donde es extraída.

Tabla 4. Datos de ácido láctico de los cinco fermentadores.

	F1	F5	F2	F3	F4	Miel B
Lunes	810	1840	2130	2650	2800	1950
Martes	1010	1900	2200	2800	3090	2100
Miércoles	1920	1960	2280	2880	3120	2090
Jueves	2230	2300	2300	2890	3150	2200
Viernes	2630	2800	2950	3100	3300	2470
Valor control	300 ppm-4000 ppm					2000-3000 ppm

* F1, F2, F3, F4 y F5 son los fermentadores. Los valores control son establecidos por la empresa. Fuente: autor.

Se observó un aumento de ácido láctico en cada fermentador en el transcurso de los días, este aumento no fue significativo indicando que la fermentación se mantuvo dentro de los valores normales de 300-4000 ppm, en caso contrario, fuera necesario aplicar medidas de ajuste que implicarían la adición de antibióticos, limpieza y desinfección en el proceso de fermentación o en última instancia, la suspensión de la fermentación y/o liquidación del fermentador, puesto que en estos casos, se ha informado que concentraciones de ácido láctico entre el 1 y el 4% inhiben el

crecimiento de la levadura, afectando directamente la producción de alcohol, esta acidez es desarrollada por diferentes Bacterias Ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas (Hynes et al., 1997).

La muestra analizada de miel B no evidenció un aumento significativo y estuvo dentro del rango establecido, pues este dato es de importancia, siendo un valor referencia, ya que esta miel será introducida a la fermentación, con una previa dilución y un tratamiento con temperatura, para disminuir la carga microbiológica y la concentración de azúcar reductor total. En caso de que las muestras presenten un valor por encima del valor de referencia determinado en la empresa, indicaría una posible contaminación por bacterias productoras de ácido láctico, que tienen la capacidad de desarrollar una fermentación láctica a partir de la glucosa que se ingresa en la fermentación alcohólica, lo cual, implicaría 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 (Malakar et al., 2020).

7.2 Recuento de levadura y viabilidad celular

La evaluación de viabilidad se realizó bajo conteo directo en cámara de recuento de Neubauer empleando azul de metileno que permite la tinción de las células de levaduras muertas, diferenciándolas de las vivas. Una célula viva es capaz de metabolizar el azul de metileno, volviéndolo incoloro (Cerveceros Itinerantes, 2019). En la tabla 5, se muestra el conteo de levaduras obtenido en la cámara de Neubauer, a partir de las muestras de mosto, evidenciándose la viabilidad de la levadura en la fermentación, de esta forma, en el propagador de levadura, se observó una viabilidad de 97,6 % en un ciclo de 24 horas, estando entre los límites establecidos

por la empresa, lo cual demostró que existe un aumento proporcional al tiempo generacional de la levadura, trayendo como resultado un buen arranque del propagador (tanque donde se propaga la levadura que será ingresada a fermentación), lo que facilitó la propagación de la levadura, con el fin de masificar el cultivo de tal forma que sirva como inóculo a la fermentación (Julia Sierra et al., n.d.).

Tabla 5. Datos del conteo de levaduras.

Células	propagador	F1	F5	F2	F3	F4	Crema 1	Crema 2
Vivas	210	195	186	175	168	157	580	1020
Gemantes	50	45	43	41	35	30	270	70
Muertas	5	130	144	150	120	150	1670	420
Elongada Viva	0	3	1	2	0	0	0	0
Elongada Muerta	0	2	1	1	0	0	0	0
Salvaje viva	0	0	0	0	0	0	0	0
Salvaje muerta	0	0	0	0	0	0	0	0
Viabilidad (%)	97,6	60	56,3	53,8	58,3	51	25	70,8
Valores límites	90-100	30-90					>9	> 50

*Los valores límites son establecidos por la empresa. Fuente: autor.

El recuento de la levadura en las cremas de fermentación evidenció que en la crema 1 la cantidad de células muertas es alta, al contrario de lo observado en la crema 2, esto se debe a que en el proceso final de la fermentación es sometido a un proceso de sedimentación y tratamiento con ácido sulfúrico, acidificando el medio, lo que facilitó la eliminación de las bacterias contaminantes, pero de igual forma indujo la muerte de la levadura sustrato (Iván Leal Granadillo et al., 2014), observándose una viabilidad de aproximadamente el 25% y 70,8 % en crema 1 y 2, respectivamente.

Este procedimiento nos ayuda a tener un estimado de la cantidad de levaduras disponibles durante la fermentación, lo que nos permitió visualizar si hay una población baja, en tal caso se requirió aumentar la propagación celular, aplicando acciones correctivas, e igualmente, demostró como la viabilidad disminuye a lo largo del proceso continuo desde F1 a F4, esto se debe a que la levadura va agotando su fuente de carbono, en el proceso de reducción que genera alcohol y CO₂ (Malakar et al., 2020).

7.3 Determinación de contaminantes

La información presentada a continuación son el resultado de una toma de muestra, ya que no se permitió la presentación de los resultados de toda la práctica, por motivo de confidencialidad empresarial.

El recuento dado de los microorganismos contaminantes en la (tabla 6), se observan valores altos en la microbiota mesofílica siendo estos >1600 UFC/ml, demostrándose 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, 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 utilizado por la levadura en la fermentación ácido láctica, produciendo exopolisacaridos que permiten la adherencia microbiana a los fermentadores, su presencia no es perjudicial a menos que promueva el crecimiento(Serrano Galvis, 2006), estos microorganismos son indicadores de la calidad sanitaria, que muestra las condiciones higiénicas de la materia prima, como también las aguas que son utilizadas, por ello estas pruebas se realizan para identificar factores de riesgo y restringir microbiota que puedan llegar a estropear la fermentación.

El recuento de mesófilos obtenido en el propagador dependió del tiempo de permanencia en el fermentador, de esta forma, a mayor tiempo, mayor será el recuento de microorganismos, el recuento de la Crema 1 siempre será <1 UFC/ml, ya que, al ser tratado con ácido sulfúrico, eliminara las bacterias procedentes de los tanques de fermentaciones, lo que nos da una idea, que la principal entrada de microorganismos mesófilos posiblemente provino de la materia prima, el propagador y agua después de UV.

Tabla 6. Resultados microbiológicos de contaminantes microbianos presentes en fermentadores y aguas de proceso.

Muestra	Mesófilos (UFC/ml)	Bacterias Ácido lácticas (UFC/ml)	Bacterias Acido acéticas (UFC/ml)	Termófilas (UFC/ml)	Entero Bacterias (UFC/ml)	Mohos (UFC/ml)	Levaduras (UFC/ml)
Propagador	3000	4000	100	-	-	-	-
Fermentador 1	>1600	>1600	10	-	-	-	-
Fermentador 5	>1600	>1600	10	-	-	-	-
Vinaza entrando	>1600	>1600	<1	-	-	-	-
Crema 1	<1	<1	<1	-	-	-	-
Lodos 1	3000	<10	<10	2000	<10	<10	<10
Lodos 2	300	<10	<10	1000	<10	<10	<10
Aguas Antes UV	1600	100	0	-	0	10	400
Aguas después UV	400	0	0	-	0	0	0

*Los datos aquí registrados, no tienen valores de referencia, porque no fueron suministrados por la empresa. Fuente: Autor.

Se puede observar que los recuentos de las bacterias ácido lácticas fueron altos en el propagador y los fermentadores, lo que genera un problema a la empresa pues estas reducen la eficiencia del proceso, porque tienen 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, lo cual puede reducir la productividad del etanol entre el 2 al 7% v/ v (SOSSA, 2009). El recuento obtenido en lodos 1 no evidenció la

presencia de BAL, debido a que la mezcla de donde se extrajo la muestra de lodo es sometida a un tratamiento de temperatura con vapor a 90°C; al igual en la muestra analizada a partir de lodos 2 donde no se evidencio crecimiento de BAL, posiblemente al tratamiento de temperatura de 121°C por 7 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 Carballido & A. Rovira Viyella, n.d.). Las muestras analizadas de vinaza presentaron recuentos altos de BAL pues esta se obtiene en el tanque final como residuo de la fermentación que posteriormente es tratada con calor logrando una disminución en su concentración.

El recuento de las Bacterias Ácido Acéticas (BAA) evidenció altos valores en el propagador, siendo significativo, ya que no debería existir crecimiento de estos contaminantes, puesto que este tipo de bacterias, producen ácido acético a partir de la oxidación del etanol y afectan notablemente las características organolépticas del etanol (Axelsson, 2004).

La presencia de bacterias termófilas en las muestras de lodos procedentes de mezclas introducidas a los fermentadores, fue alto, a pesar que pasan por un proceso similar a la esterilización, estos microorganismos puede llegar a generar problemas en la fermentación al que hidrolizar la sacarosa, formando dextranos que aumentan la viscosidad y generando biofilms que generan incrustaciones en los equipos y tuberías, ocasionando problemas de transferencia de calor 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(Hugo Martín Rodríguez Magaña, 2018). Las Bacterias termófilas pueden soportar las altas temperaturas poseen mecanismos que les permiten resistir condiciones extremas de temperatura como las estructuras de protección muy resistentes a los

tratamientos térmicos del proceso, su membrana es rica en ácidos grasos saturados, que forman entre sí enlaces hidrófobos muy estables al calor (Claudia Suárez Núñez et al., 2004).

El recuento de mohos y levaduras en agua antes de UV no fue significativo, ya que en la muestra de agua después del tratamiento de UV no evidencio crecimiento, indicando que proceso de esterilización se está llevando con normalidad. La muestra de lodos procedentes de las mezclas no presentó crecimiento, estos resultados son positivos ya que su presencia puede 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 et al., 2019).

Por último, no hubo presencia de bacterias entéricas en el agua antes y después de ser sometida al tratamiento con UV, lo que indicó que el agua utilizada para la fermentación estaba libre de estos contaminantes y no generaran problemas en el producto final, su presencia podría radicar en serios problemas relacionados con la capacidad de fermentar la glucosa por vía glucolítica generando ácidos como producto final (María C. Apella & Paula Z. Araujo, n.d.), disminuyendo el pH de la fermentación, causando que la levadura no realice correctamente su metabolismo para la producción de alcohol; algunas especies pueden llegar a colonizar superficies de tuberías de agua formando biopelículas que les permiten sobrevivir por tiempos prolongados generando problemas en el proceso(Ríos-Tobón et al., 2017). La muestra analizada de lodos no evidenció presencia de estos microorganismos, ya que al ser sometida a un tratamiento con temperatura (Figura 2), elimina la posibilidad de supervivencia (Horacio A. Lopardo et al., n.d.).

7. 4 Ensayo de antibióticos

Los resultados de la efectividad antimicrobiana de los antibióticos ensayados partieron de determinar el porcentaje de acidez medido como ácido láctico, puesto que este es el producto de la actividad del principal grupo contaminante en el proceso de fermentación de etanol para parte de la levadura, proceso que se realizó a través de la técnica rápida Rqflex20. Se analizaron en el laboratorio 13 muestras dosificadas con antibióticos bajo las concentraciones 3, 6 y 8 ppm. Para la determinación se empleó el sustrato industrial de fermentación al cual se le añadió el antibiótico y se realizó análisis de la concentración de ácido láctico presente luego de 18 horas de incubación en agitación constante, esto permitió comparar y evidenciar que antibiótico resulta efectivo siendo contrastado con el dato de la muestra control.

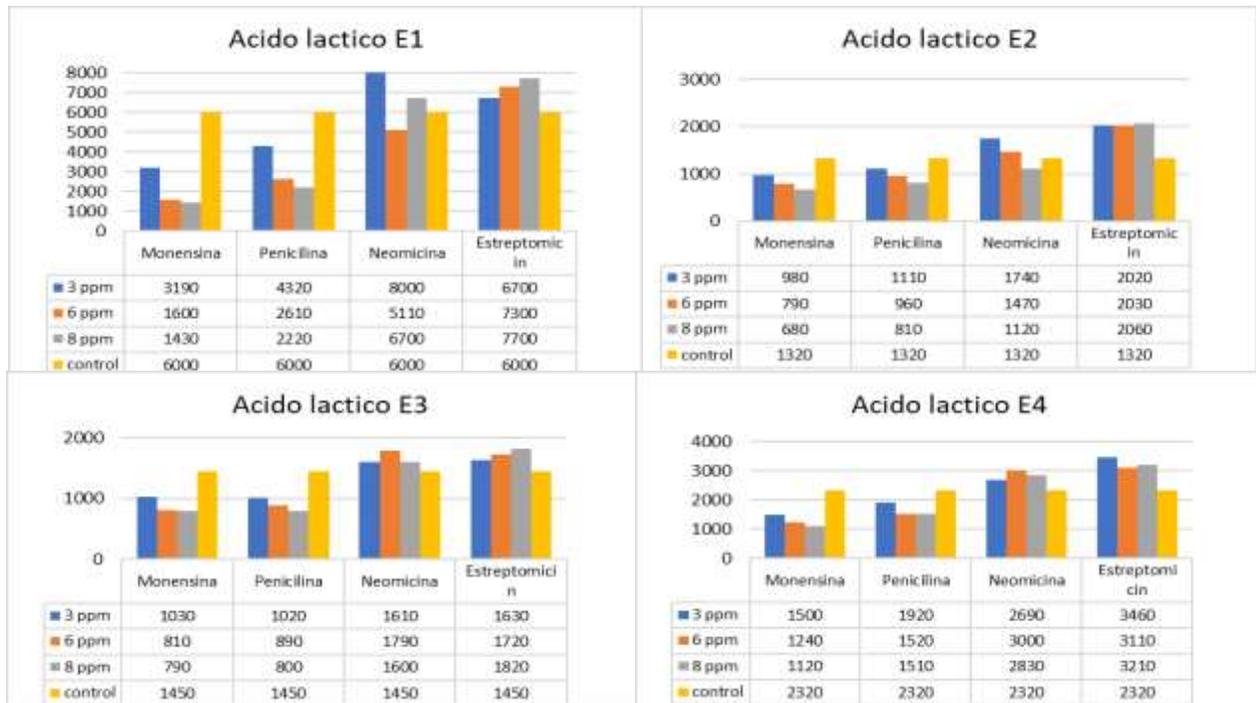


Figura 5. Concentración de ácido láctico en fermentación tratada con sustancias antimicrobianas -E1 (Replica 1), E2 (Replica 2), E3 (Replica 3), E4 (Replica 4). Fuente: autor.

En la figura 5, E1, E2, E3 y E4, se evidencia como disminuye la concentración de ácido láctico a medida que se aumenta la concentración del antibiótico, en el caso de la monensina (E1) una

concentración de 3 ppm mostró 3190 mg/l y para 8 ppm 1430 mg/l de ácido láctico en comparación con los 6000 mg/l de ácido láctico de la muestra control, observándose una diferencia de 4570 mg/l, lo mismo se observa para E2, E3 y E4, donde se aprecia la disminución de ácido láctico, lo cual es correspondiente con estudios relacionados donde se evidenció que muestras tratadas con monensina a partir de una concentración de 3 ppm, pueden lograr la obtención de menores niveles de concentración de Ácido láctico (Orozco et al., 2018). Es importante aclarar que el antibiótico monensina es un tipo de ionóforo que obstruyen el transporte de cationes en la membrana de las bacterias gram-positivas, interfiriendo en la absorción de nutrientes para la célula y promoviendo un mayor gasto energético para el mantenimiento del balance osmótico. Para el caso de las bacterias gram-negativas sufren un aumento en la demanda de energía para el mantenimiento, pero ellas pueden adaptarse (continuando creciendo y/o sobreviviendo) debido a la capacidad de transporte de electrones acoplada a la expulsión de protones y/o síntesis de ATP (Fuentes Alarcón, 2006).

En el tratamiento con penicilina se observa que el mayor efecto se encuentra en la concentración 8 ppm seguido de la 6 y 3 ppm respectivamente, para cada una de las réplicas (E1, E2, E3.E4), esto demuestra lo explicado en otros estudios donde su acción contra bacterias gram positivas y su mecanismo impide la producción de nuevas células, por lo tanto, ha sido altamente implementado en destilerías(K.A. Jacques, 2003). Ya que la penicilina contiene un anillo lactámico β para su actividad biológica, estas al unirse a los receptores, la síntesis de peptidoglucano se inhibe debido al bloqueo de la transpeptidación. La acción bactericida final es la eliminación de un inhibidor de las enzimas autolíticas de la pared celular que activa las enzimas y acaba en la lisis celular (B. Joseph Guglielmo, 2017).

Para el caso de estreptomicina se evidencio que en E1, E2, E3 y E4, los datos de ácido láctico se salieron del valor de la muestra control, siendo estos más altos, como se observa en el E3, en una concentración de 3 ppm dio 1630 mg/l, siendo el dato control de 1450 mg/l, así mismo para las otras concentraciones 6 y 8 ppm, que en vez de disminuir la carga del contaminante, se mostró un aumento de este, por tanto, se infiere que su efectividad fue casi nula en la muestra con el fermento, por tanto, no sería de utilidad su aplicación. En estudios anteriores se ha demostrado la efectividad de la estreptomicina en el control de la contaminación en destilerías, sin embargo, estos resultados nos muestran que su actividad fue baja, esto se debe a que su espectro es bajo frente a bacterias Gram positivas y su actividad bactericida es dependiente de la concentración suministrada (Agroquimicos de mexico, n.d.). Es por ello que, debido a su corto espectro, ha sido utilizado en destilerías en conjunto con otro antibiótico para generar un efecto sinérgico, siempre y cuando el pH del medio se mantenga a inferiores de 7.0, la combinación más utilizada ha sido la de penicilina/estreptomicina (Daniel Amsterdam, 2014). Para el caso de neomicina, esta sustancia es bactericida, actúa contra la gran mayoría de bacterias gram negativas y no tiene actividad contra anaerobios(Eliana Sáenz Anduaga, 2005), esto puede ser una complicación al momento de ser utilizada en fermentación pues no arrojaría buenos resultados en la disminución de bacterias ácido lácticas y en este ensayo se observa que los resultados fueron incongruentes, pues al igual que estreptomicina, su actividad fue casi nula y no disminuyo la concentración del ácido láctico generado por bacterias ácido lácticas consideradas una microbiota contaminante en fermentación y obtención de etanol. Es de resaltar el uso de la neomicina y estreptomicina, que son aminoglucósidos, de tipo bactericida. Estos agentes inhiben la síntesis de proteínas en las bacterias al impedir la función de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Las bacterias anaerobias son resistentes a los aminoglucósidos porque el transporte a través de la membrana

celular es un proceso que requiere energía dependiente de oxígeno. Su principal utilidad actual consiste en emplearlos para tratar microorganismos gramnegativos resistentes sólo sensibles a los aminoglucósidos, o en dosis bajas en combinación con fármacos lactámicos β (B. Joseph Guglielmo, 2017).

Las diferencias de la concentración de ácido láctico en los resultados obtenidos entre ensayos realizados pueden deberse a la cantidad de bacterias productoras de ácido láctico presentes durante la etapa fermentativa al momento de realizar cada montaje.

Tabla 7. Datos de análisis de varianza con α 0,05.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	31604063,19	3	10534687,73	5,30	0,015	3,49
Dentro de los grupos	23873425	12	1989452,083			
Total	55477488,19	15				

*F: calculado, Valor crítico F: Teórico. Fuente: autor.

Ho: Todas las medias de los grupos son iguales.

Ha: Por lo menos dos medias no son iguales.

Nivel de significancia: α 0.05

En la tabla 7 observamos los resultados del análisis de varianza realizado a las medias obtenidas en los cuatro ensayos para cada antibiótico. La teoría nos indica que $F_c > F_t$ rechazamos la hipótesis nula (Ho), por tanto, aceptamos la alternativa (Ha), Atendiendo a esto, se observa que el valor F calculado es de 5,30, siendo mayor que el dato teórico de 3,49, evidenciando que existen diferencias entre las medias de los cuatro antibióticos analizados, lo que nos confirma los resultados arrojados del ácido láctico, que indican que estos no guardan un comportamiento similar entre ellos. Otra manera de determinar si las medias de los datos son iguales o no, es

mirando si la probabilidad es menor a α 0,05 rechazando la hipótesis nula (H_0), siendo el valor P de 0,015, mucho menor al nivel de significancia (0,05), entonces se rechaza la hipótesis de que todas las medias son iguales. (Padilla, n.d.).

8. CONCLUSIONES

La medición de ácido láctico como medida control en la fermentación que permite identificar la existencia de microorganismos contaminantes asociados al proceso, principalmente bacterias ácido lácticas, que compiten por la fuente de carbono y a su vez inhiben la actividad de la levadura, generando pérdidas en la producción de etanol.

La viabilidad celular establecida bajo recuento directo al microscopio permitió determinar la actividad fermentativa de la levadura, evaluando su capacidad de propagación en sustrato azucarado, de tal forma que la misma es inversamente proporcional a la concentración del ácido láctico, afectándose el rendimiento de la levadura en la producción de etanol.

Dentro del estudio de la actividad antimicrobiana, la monensina y la penicilina muestran los mejores resultados en la reducción de la concentración del ácido láctico a partir de fermentaciones realizadas en laboratorio, lo cual permite inferir que podrían ser usados individual o colectivamente en el control de la microbiota contaminante, principalmente bacterias ácido lácticas, lo que permite generar un efecto positivo en el rendimiento fermentativo de la levadura.

9. RECOMENDACIONES O SUGERENCIAS

El uso de antibióticos ha sido altamente cuestionado, ya que su uso excesivo ha generado bacterias multirresistentes, un estudio realizado por Murphree et al., 2014 reportaron resistencia en 32 aislados de bacterias ácido lácticas a los antibióticos, de ocho instalaciones de bioetanol en los estados unidos, por ello se busca la implementación de métodos alternativos de control de la contaminación. El ácido de lúpulo puede ser utilizado como antibacteriano, al ser de origen natural los contaminantes no desarrollan resistencia y puede llegar a sustituir los antibióticos comerciales. Según el artículo publicado en la revista Ethanol Producer Magazine, el lúpulo contiene ácidos orgánicos naturales débiles, al momento dosificarlo en el propagador, las bacterias absorben el extracto de lúpulo a través de la pared celular y, al ser un ácido orgánico débil, reduce el pH dentro de la célula bacteriana, por tanto, previene que las bacterias absorban glucosa, evitando la competencia con las levaduras. El uso de esta sustancia genera un impacto positivo en la fermentación, por tanto, observaron aumento en el conteo de levadura, aumentando el rendimiento en la producción de alcohol.(Matt Thompson, 2020).

Antes de recurrir al uso de los antibióticos, se debería revisar su composición química, debido a que estos pueden dejar trazas en el alcohol producido y causar efectos ambientales tras la reacción de combustión. También es necesario realizar identificaciones de los microorganismos que se encuentran presentes en los fermentadores, puesto que la eficacia de los antibióticos se limita normalmente a un cierto grupo de bacterias, lo que podría conllevar a la resistencia de otras. Ya que posiblemente estos son los que están generando problemáticas durante la fermentación. Por último, sería necesario implementar la identificación de ácido acético en las muestras a la par que se determina el ácido láctico.

10. GLOSARIO

- 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.
- 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.
- 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.
- Fermentación: La fermentación alcohólica es un complejo proceso biológico originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono como fuente de energía, por ejemplo, la glucosa.
- 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.

11. REFERENCIAS

Agroquimicos de mexico. (n.d.). *Estreptomicina*. Terralia Informacion Agricola. Retrieved December 3, 2021, from https://www.terralia.com/agroquimicos_de_mexico/view_composition?composition_id=12910

Anadón, A., & Martínez-Larrañaga, M. (2014). Veterinary Drugs Residues: Coccidiostats. In *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00246-8>

ARCH CHEMICALS, INC (2015). Control de la contaminación microbiana en procesos de fermentación alcohólica. OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS. Consultado: 18 dic 2021.

Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria. In *Lactic Acid Bacteria*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1>

B. Joseph Guglielmo. (2017). Quimioterapéuticos antiinfecciosos y antibióticos. In *Diagnóstico clínico y tratamiento* (Michael W. Rabow).

Bayrock, D. P., Thomas, K. C., & Ingledew, W. M. (2003). Control of Lactobacillus contaminants in continuous fuel ethanol fermentations by constant or pulsed addition of penicillin G. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(5–6). <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1324-5>

Cerveceros Itinerantes. (2019, August 17). *Cómo realizar un recuento de levaduras*. <https://CervecerosItinerantes.Com/Como-Realizar-Un-Recuento-de-Levaduras>.

Claudia Suárez Núñez, Florina Ramírez Vives, Óscar Monroy Hermosillo, Didier Alazard, & Luis Fernández Linares. (2004). *La vida a altas temperaturas: adaptación de los*

microorganismos y aplicación industrial de sus enzimas.

https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/55_1/lavida_altas_temperaturas.pdf

Daniel Amsterdam. (2014). Susceptibility Testing of Antimicrobials in Liquid Media. *Antibiotics in Laboratory Medicine, 6 Ed.*

Day, W. H., Serjak, W. C., Stratton, J. R., & Stone, Leonard. (1954). Contamination Inhibition, Antibiotics as Contamination-Control Agents in Grain Alcohol Fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2(5)*. <https://doi.org/10.1021/jf60025a007>

De Vasconcelos, J. N. (2015). Ethanol Fermentation. In *Sugarcane*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802239-9.00015-3>

Eliana Sáenz Anduaga, L. S. Saldaña. (2005). Antibioticos topicos. *Dermatologia peruana, 15*.

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*. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191202022>

Fuentes Alarcón, P. A. (2006). *Utilización de monensina sódica, en combinación con melaza, urea y azufre para estimular ganancia de peso en novillos en etapa de pre ceba.*

Haris, S., Fang, C., Bastidas-Oyanedel, J.-R., Prather, K. J., Schmidt, J. E., & Thomsen, M. H. (2018). Natural antibacterial agents from arid-region pretreated lignocellulosic biomasses and extracts for the control of lactic acid bacteria in yeast fermentation. *AMB Express, 8(1)*. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0654-8>

HORACIO A. LOPARDO, SILVIA C. PREDARI, & CARLOS VAY. (n.d.). Bacterias de Importancia Clínica. In *Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología* (Vol. 1).

Hugo Martín Rodríguez Magaña. (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. *Instituto Tecnológico de Colima*.

Hynes, S. H., Kjarsgaard, D. M., Thomas, K. C., & Ingledew, W. M. (1997). Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18(4). <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900381>

Incauca SAS. (n.d.). *procesos, alcohol carburante*. Retrieved December 2, 2021, from <https://www.incauca.com/es/procesos/>

Iván Leal Granadillo, Giuseppe Tarantino Rodríguez, Rómulo Hernández Motzezak, & Héctor Morán Guillén. (2014). Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de Agave cocui. *Multiciencias*, 14.

Julia sierra, Luis A. caicedo, & Hernan Hoyos V. (n.d.). Desarrollo y verificación de un modelo matemático para el crecimiento de levadura cervecera. *Revista de Facultad de Ingenierías*. Retrieved December 4, 2021.

K.A. Jacques, PhDT. P. L. PhDD. R. K. (2003). *The alcohol textbook: Vol. 4ta edicion*. Nottingham University Press.

Malakar, S., Paul, S. K., & Jolvis Pou, K. R. (2020). Biotechnological Interventions in Beverage Production. In *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816678-9.00001-1>

María C. Apella, & Paula Z. Araujo. (n.d.). Microbiología de agua. Conceptos básicos. *Solar Face Water*. Retrieved December 2, 2021, from https://www.psa.es/es/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf

Matt Thompson. (2020). A Natural Fit. *Ethanol Produce Magazine*, 18–21. https://issuu.com/bbiinternational/docs/mar-20epm_issuu?fr=sMDU1YzkwMTk2

Murphree, C. A., Heist, E. P., & Moe, L. A. (2014). Antibiotic Resistance Among Cultured Bacterial Isolates from Bioethanol Fermentation Facilities Across the United States. *Current Microbiology*, 69(3). <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0583-y>

Muthaiyan, A., Limayem, A., & Ricke, S. C. (2011). Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(3). <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.06.005>

Orozco, J. C., Martínez, C. A., & Cubillos-Hinojosa, J. G. (2018). Efecto de antibióticos y un antimicrobiano sobre el control de bacterias ácido lácticas en la fermentación alcohólica. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2). <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.68948>

Padilla, J. J. (n.d.). *ANOVA: Interpretación de los resultados*.

Ríos-Tobón, S., Agudelo-Cadavid, R. M., & Gutiérrez-Builes, L. A. (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 35(2). <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08>

Rovira Carballido, J., & A. Rovira Viyella. (n.d.). Factores de inhibición del crecimiento de bacterias ácido lácticas. *Revista de Tecnología e Higiene de Los Alimentos*.

Russell, I., & Stewart, G. G. (2022). Distilling yeast and fermentation. In *Whisky and Other Spirits*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822076-4.00030-9>

Seo, S.-O., Park, S.-K., Jung, S.-C., Ryu, C.-M., & Kim, J.-S. (2020). Anti-Contamination Strategies for Yeast Fermentations. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020274>

Serrano Galvis, L. (2006). *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*.

SOSSA, D. P. G. L. M. V. M. C. (2009). AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE Lactobacillus CONTAMINANTES EN UNA PLANTA COLOMBIANA DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA. . *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 12.

12. ANEXOS

1. cálculos preparaciones

Antibióticos

$$\text{Monensina} = \frac{1 \text{ gramo}}{100 \text{ ml etanol}}$$

$$\text{Neomicina} = \frac{1 \text{ gramo}}{50 \text{ ml ADE} + 50 \text{ ml etanol}}$$

$$\text{Penicilina} = \frac{1 \text{ gramo}}{50 \text{ ml ADE} + 50 \text{ ml etanol}}$$

$$\text{Estreptomycin} = \frac{1 \text{ gramo}}{50 \text{ ml ADE} + 50 \text{ ml etanol}}$$

*ADE: agua destilada estéril.

Cálculos para hallar la cantidad de antibiótico a utilizar.

$$V1 = \frac{V2 \times C2}{C1}$$

$$V1 = \frac{400 \text{ ml} \times 3 \text{ ppm}}{10000 \text{ ppm}} = 0.12 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{400 \text{ ml} \times 6 \text{ ppm}}{10000 \text{ ppm}} = 0.24 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{400 \text{ ml} \times 8 \text{ ppm}}{10000 \text{ ppm}} = 0.32 \text{ ml}$$

2. Imágenes tomadas durante el proceso.



Figura 6. Antibióticos utilizados en los ensayos.

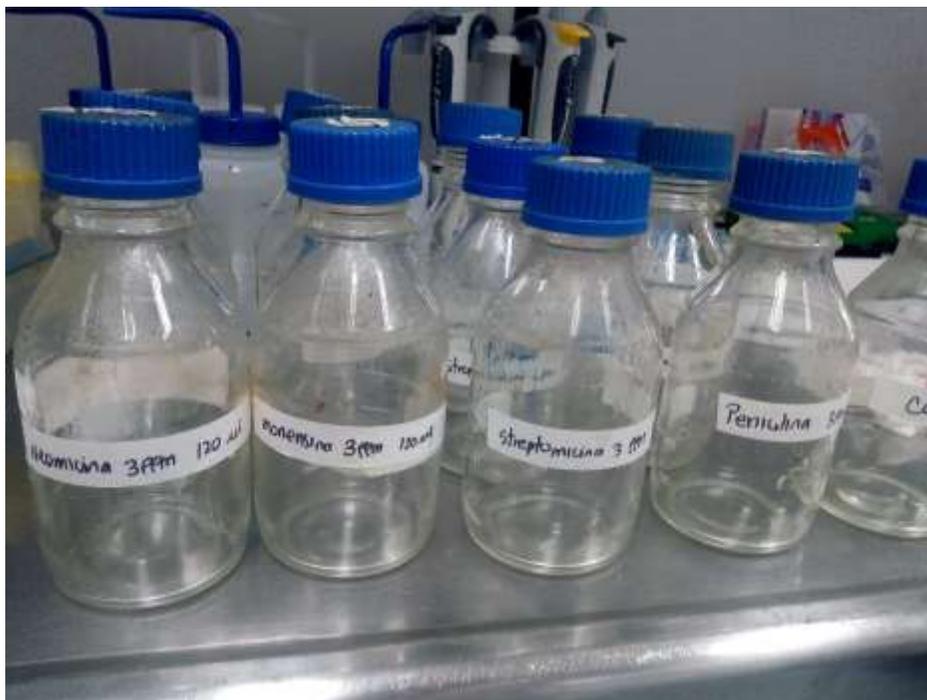


Figura 7. Preparación de los medios de cultivo.



Figura 8. Equipo RQflex20 corriendo muestras diluidas antes preparadas.

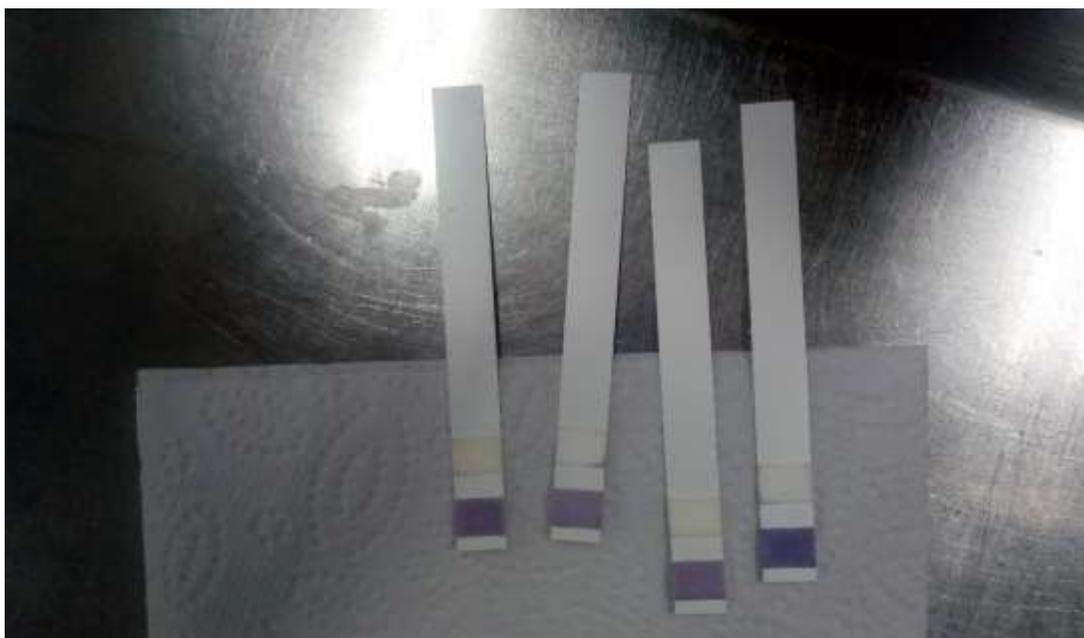


Figura 9. Tiras reactivas luego de ser leídas en el equipo RQflex20.