

**EVALUACION DEL USO DE ANTIBIOTICOS COMO MECANISMO PARA EL  
CONTROL DE CONTAMINANTES BACTERIANOS  
EN LA FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN  
DE ALCOHOL ETÍLICO**

**NAYDA MILENA CALDERÓN PÉREZ**

**TRABAJO DE GRADO**  
**Presentado como requisito parcial para optar el título de**

**MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**  
**Bogotá D.C.**  
**Marzo de 2007**

#### **NOTA DE ADVERTENCIA**

“ La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946**

**EVALUACION DEL USO DE ANTIBIOTICOS COMO MECANISMO PARA EL  
CONTROL DE CONTAMINANTES BACTERIANOS  
EN LA FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN  
DE ALCOHOL ETÍLICO**

**NAYDA MILENA CALDERÓN PÉREZ**

**APROBADO**

---

**ANA LUCÍA GÓMEZ SCHOUBEN**  
Bióloga genética  
Directora

---

**JOAQUÍN QUINTERO GARCÍA**  
Ing. Producción Biotecnológica  
Codirector

---

**BALKYS QUEVEDO HIDALGO**  
Ing. Química  
Jurado

---

**IVONNE GUTIERREZ ROJAS**  
Bacterióloga  
Jurado

**EVALUACION DEL USO DE ANTIBIOTICOS COMO MECANISMO PARA EL  
CONTROL DE CONTAMINANTES BACTERIANOS  
EN LA FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN  
DE ALCOHOL ETÍLICO**

**NAYDA MILENA CALDERÓN PÉREZ**

**APROBADO**

---

**DRA. ANGELA UMAÑA MUÑOZ**  
Decana Académica

---

**DR. LUIS DAVID GÓMEZ**  
Director de Carrera

*El presente trabajo lo dedico a Dios por permitir que me levantara todos los días con el mejor ánimo y energía para realizar mis actividades, a mis padres y hermano que con su cariño y apoyo me han formado e inculcado los valores de disciplina y respeto, a mi tía Rosa María que siempre insiste en la fortaleza frente al trabajo, a mis amigos que aún en la distancia estuvieron conmigo durante este tiempo, a todos quienes en esta ciudad (Cali-Valle) me acogieron amablemente y me brindaron su soporte para que esta investigación se llevara a cabo con éxito.*

*Mi sincero y especial agradecimiento para SUCROMILES S.A. por permitirme utilizar sus recursos no sólo materiales sino además los más importantes y valiosos, sus recursos humanos, al ingeniero Rubiel Galarza, superintendente de la planta alcohólica quien permitió y acondicionó las instalaciones donde trabajé y llevé a cabo mi investigación, a mi Directora de proyecto Ana Lucía Gómez, Jefe de Desarrollos Microbiológicos, quien me apoyó incondicionalmente desde el momento en que presenté mi propuesta y aún dentro de sus múltiples ocupaciones dedicó tiempo a la dirección de mi trabajo, a mi Codirector de proyecto Joaquín Quintero García quien fue mi principal soporte en las aplicaciones a nivel de planta, a Jairo Orozco, Julián Ortiz, Ana María Gómez y William Ortiz, analistas del laboratorio de calidad alcohólica por brindarme su amistad y apoyo en la parte de análisis químico y en general a todo el capital humano de esta sólida empresa del sector biotecnológico para la cuál, la microbiología es una de las bases fundamentales de su desarrollo.*

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>PAG</b>
<b>1. Introducción</b>	22
<b>2. Marco Teórico</b>	24
2.1. <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	24
2.2. Bioquímica de la producción de alcohol por <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	25
2.3. Parámetros y condiciones en la Fermentación	30
2.3.1. pH	30
2.3.2. Temperatura	31
2.3.3. Concentración de azúcar	32
2.3.4. Tolerancia a altas concentraciones de alcohol	34
2.3.5. Requerimientos de oxígeno	35
2.4. Rendimiento de alcohol etílico	36
2.4.1. Factores que afectan el rendimiento de alcohol	37
2.4.1.1. Crecimiento celular	37
2.4.1.2. Generación de alcoholes superiores	38
2.4.1.3. Generación de ácidos orgánicos	39
2.5. Melazas como sustrato de fermentación	41
2.5.1. Producción de melaza de caña	41
2.5.2. Pretratamiento a las melazas de caña	42
2.5.3. Manejo de nutrientes en la fermentación con melaza	43
2.5.4. Ventajas del uso de melazas de caña como sustrato	44
2.6. Contaminación bacteriana en melaza	44
2.6.1. Fuentes de contaminación	45
2.6.2. Pérdidas de sacarosa	45
2.6.3. Bacterias lácticas como contaminantes	46
2.6.3.1. Metabolismo homofermentativo y heterofermentativo	47
2.6.3.2. Requerimientos nutricionales de bacterias lácticas y subproductos	49
2.7. Tratamientos de contaminación bacteriana	52

2.7.1. Antibióticos	53
2.7.1.1. Penicilina y virginamicina	54
2.7.1.2. Estreptograminas	55
2.7.3. Otras alternativas	57
<b>3. Formulación del problema, justificación y antecedentes</b>	60
3.1. Formulación del problema	60
3.2. Justificación	60
3.3. Antecedentes	61
<b>4. Objetivos</b>	63
4.1. Objetivo General	63
4.2. Objetivos Específicos	63
<b>5. Materiales y Métodos</b>	64
5.1. Ubicación y diseño de la investigación	64
5.1.1. Parámetros y variables en la etapa de reproducción	66
5.1.2. Parámetros y variables en la etapa de fermentación	66
5.2. Métodos	67
5.2.1. Pretratamiento del sustrato	67
5.2.2. Tratamiento con antibiótico	67
5.2.2.1. Hidratación de levadura activa seca	67
5.2.2.2. Preparación del sustrato para la reproducción	68
5.2.2.3. Determinación de los niveles de contaminación	69
5.2.2.4. Determinación del inóculo para la fermentación	70
5.2.2.5. Preparación del sustrato para la fermentación	70
5.2.2.6. Determinación de rendimiento (%), eficiencia (%) y productividad (g/L*h) del proceso	71
5.2.3. Tratamiento con descenso de pH	72
5.2.3.1. Diseño Experimental	73
5.3. Recolección de la información	74
5.4. Análisis de la información	75

<b>6. Resultados</b>	76
6.1. Caracterización del sustrato	76
6.2. Dilución de sustrato en etapa de reproducción	78
6.3. Dilución de sustrato en etapa de fermentación	79
6.4. Preparación y alistamiento de la levadura	80
6.5. Tratamiento con antibióticos en la etapa de reproducción	81
6.5.1. Reproducción con melaza	81
6.5.2. Reproducción con jugo de caña concentrado	83
6.5.3. Fermentación con melaza	84
6.5.4. Fermentación con jugo de caña concentrado	87
6.6. Tratamiento con descenso de pH	90
6.6.1. Etapa de reproducción	90
6.6.2. Etapa de fermentación	91
<b>7. Análisis de varianza</b>	94
7.1. ANOVA doble vía	94
7.1.1. ANOVA doble vía para melaza como sustrato de fermentación	95
7.1.2. ANOVA doble vía para jugo de caña concentrado como sustrato de fermentación	97
7.2. ANOVA una vía	99
7.2.1. ANOVA una vía para tratamiento con pH en melaza como sustrato de fermentación	100
7.2.2. ANOVA una vía para tratamiento con pH en jugo de caña concentrado como sustrato de fermentación	102
7.3. Medidas de Tendencia Central para datos de Productividad	102
<b>8. Discusión de Resultados</b>	103
<b>9. Conclusiones</b>	120
<b>10. Recomendaciones</b>	121
<b>11. Referencias Bibliográficas</b>	123
<b>12. Anexos</b>	128

## LISTA DE TABLAS

	PAG
<b>Tabla 1.</b> Rendimiento de alcohol a partir de concentraciones de azúcar para una cepa de <i>Saccharomyces</i> aislada de un sustrato específico	33
<b>Tabla 2.</b> Composición típica de una Miel tipo A	42
<b>Tabla 3.</b> Composición típica de una Miel tipo B	42
<b>Tabla 4.</b> Composición típica de una miel tipo C	42
<b>Tabla 5.</b> Tipos bacterianos según su metabolismo fermentativo.	49
<b>Tabla 6.</b> Tratamientos con antibiótico para la etapa de propagación con melaza y jugo de caña concentrado	69
<b>Tabla 7.</b> Tratamiento con descenso de pH para la etapa de propagación con melaza y jugo de caña concentrado	73
<b>Tabla 8.</b> Características físico-químicas y microbiológicas de melaza y jugo de caña concentrado	76
<b>Tabla 9.</b> Pruebas de identificación de los microorganismos aislados de los Sustratos de fermentación	77
<b>Tabla 10.</b> Características iniciales de Miel de Tercera dilución	78
<b>Tabla 11.</b> Características iniciales de Miel de Segunda dilución	79
<b>Tabla 12.</b> Crecimiento en medio sólido de la levadura hidratada y recuento en cámara de Neubauer	81
<b>Tabla 13.</b> Variables de respuesta etapa de reproducción con Melaza tratada con Penicilina (24 horas)	82
<b>Tabla 14.</b> Variables de respuesta etapa de reproducción con Melaza tratada con Virginamicina (24 horas)	82
<b>Tabla 15.</b> Variables de respuesta etapa de reproducción con Jugo de caña concentrado tratado con Penicilina (24 horas)	90
<b>Tabla 16.</b> Variables de respuesta etapa de reproducción con Jugo de caña concentrado tratado con Virginamicina (24 horas)	90
<b>Tabla 17.</b> Variables de respuesta etapa de fermentación de Melaza inóculo	

tratado con Penicilina (30 horas)	85
<b>Tabla 18.</b> Variables de respuesta etapa de fermentación de Melaza inóculo tratado con Virginamicina (30 horas)	85
<b>Tabla 19.</b> Variables de respuesta etapa de fermentación de Jugo de caña concentrado inóculo tratado con Penicilina (30 horas)	87
<b>Tabla 20.</b> Variables de respuesta etapa de fermentación de Jugo de caña concentrado inóculo tratado con Virginamicina (30 horas)	87
<b>Tabla 21.</b> Variables de respuesta etapa de reproducción con Melaza bajo ajuste de pH (24 horas)	90
<b>Tabla 22.</b> Variables de respuesta etapa de reproducción con Jugo de caña concentrado bajo tratamiento de ajuste de pH (24 horas)	90
<b>Tabla 23.</b> Variables de respuesta etapa de fermentación de Melaza inóculo tratado con ajuste de pH (30 horas)	91
<b>Tabla 24.</b> Variables de respuesta etapa de fermentación de Jugo de caña concentrado inóculo tratado con ajuste de pH (30 horas)	91
<b>Tabla 25.</b> Fórmulas generales para el análisis de varianza de dos vías.	94
<b>Tabla 26.</b> Datos de rendimiento (%) obtenidos con Melaza como sustrato de fermentación	95
<b>Tabla 27.</b> ANOVA doble vía (Melaza como sustrato de fermentación)	96
<b>Tabla 28.</b> Datos de rendimiento (%) obtenidos con Jugo de caña como sustrato de fermentación	97
<b>Tabla 29.</b> ANOVA doble vía (Jugo de caña como sustrato de fermentación)	98
<b>Tabla 30.</b> Fórmulas generales para análisis de varianza una vía.	99
<b>Tabla 31.</b> Datos de rendimiento (%) obtenidos con Melaza como sustrato de fermentación	100
<b>Tabla 32.</b> ANOVA una vía Melaza como sustrato de fermentación	100
<b>Tabla 33.</b> Datos de rendimiento (%) obtenidos con Jugo de caña como sustrato de fermentación	101
<b>Tabla 34.</b> ANOVA una vía (Jugo de caña como sustrato de fermentación)	102

<b>Tabla 35.</b> Medidas de tendencia central datos de productividad	102
<b>Tabla 36.</b> Características iniciales de Miel de Tercera dilución	141
<b>Tabla 37.</b> Características iniciales de Miel de Segunda dilución	142
<b>Tabla 38.</b> Variables de respuesta etapa de reproducción de Melaza tratado con Penicilina (24 horas)	142
<b>Tabla 39.</b> Variables de respuesta etapa de reproducción de Melaza tratado con Virginamicina (24 horas)	143
<b>Tabla 40.</b> Variables de respuesta etapa de reproducción de Jugo de caña concentrado tratado con Penicilina (24 horas)	144
<b>Tabla 41.</b> Variables de respuesta etapa de reproducción de Jugo de caña concentrado tratado con Virginamicina (24 horas)	144
<b>Tabla 42.</b> Variables de respuesta etapa de reproducción de Melaza con ajuste de pH (24 horas)	145
<b>Tabla 43.</b> Variables de respuesta etapa de reproducción de Jugo de caña concentrado con ajuste de pH (24 horas)	146
<b>Tabla 44.</b> Variables de respuesta etapa de fermentación de Melaza inocular tratado con Penicilina (30 horas)	147
<b>Tabla 45.</b> Variables de respuesta etapa de fermentación de Melaza inocular tratado con Virginamicina (30 horas)	147
<b>Tabla 46.</b> Variables de respuesta etapa de fermentación de Jugo de caña concentrado inocular tratado con Penicilina (30 horas)	148
<b>Tabla 47.</b> Variables de respuesta etapa de fermentación de Jugo de caña concentrado inocular tratado con Virginamicina (30 horas)	149
<b>Tabla 48.</b> Variables de respuesta etapa de fermentación de Melaza inocular tratado con ajuste de pH (30 horas)	149
<b>Tabla 49.</b> Variables de respuesta etapa de fermentación de Jugo de caña concentrado inocular tratado ajuste de pH (30 horas)	150

## LISTA DE FIGURAS

	PAG
<b>Figura 1.</b> Ruta Embden Meyerhof Parnas para la utilización de la glucosa.	26
<b>Figura 2.</b> Ciclo del ácido cítrico ó Ciclo de Krebs	28
<b>Figura 3.</b> Conversión de leucina en alcohol isoamílico como ejemplo de la producción de alcoholes superiores	38
<b>Figura 4.</b> Fermentación de glucosa por bacterias ácido lácticas.	48
<b>Figura 5.</b> Contaminantes bacterianos típicos en las destilerías.	50
<b>Figura 6.</b> Productos desarrollados por contaminantes bacterianos en la fermentación.	51
<b>Figura 7.</b> Esquema de estructuras bacterianas atacadas por diversos antimicrobianos	54
<b>Figura 8.</b> Esquema del proceso de fermentación por lotes	65
<b>Figura 9a.</b> Colonias en medio MRS a partir de jugo de caña concentrado sin calentamiento típicas del género <i>Leuconostoc</i>	78
<b>Figura 9b.</b> Colonias puntiformes en medio MRS aisladas en melaza y jugo de caña típicas de <i>Lactobacillus</i>	78
<b>Figura 10.</b> Crecimiento positivo en medio sólido YM de la cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	81
<b>Figura 11.</b> Población de BAL (ufc/ml) Vs Concentración de antibiótico (ppm) en etapa de reproducción con melaza (24 horas)	82
<b>Figura 12.</b> Población de BAL (ufc/ml) Vs Concentración de antibiótico (ppm) etapa de reproducción con jugo de caña concentrado (24 horas)	84
<b>Figura 13.</b> Rendimiento (%) Vs concentración de antibiótico (ppm) en etapa de fermentación con melaza (30 horas)	85
<b>Figura 14.</b> Eficiencia (%) Vs Concentración de antibiótico (ppm) en etapa de fermentación con melaza (30 horas)	85
<b>Figura 15.</b> Productividad (g/L*h) Vs Concentración de antibiótico (ppm) en etapa de fermentación con melaza (30 horas)	86

<b>Figura 16.</b> Rendimiento (%) Vs Concentración de antibiótico (ppm) en etapa de fermentación con Jugo de caña concentrado (30 horas)	88
<b>Figura 17.</b> Eficiencia (%) Vs Concentración de antibiótico (ppm) en etapa de fermentación con jugo de caña concentrado (30 horas)	88
<b>Figura 18.</b> Productividad (g/L*h) Vs Concentración de antibiótico (ppm) en etapa de fermentación con jugo de caña (30 horas)	89
<b>Figura 19.</b> Población de BAL (ufc/ml) Vs Tratamiento con pH en etapa de reproducción (24 horas)	91
<b>Figura 20.</b> Rendimiento (%) Vs Tratamiento con pH en etapa de fermentación con melaza y jugo de caña concentrado	92
<b>Figura 21.</b> Eficiencia (%) Vs Tratamiento con pH en etapa de fermentación con melaza y jugo de caña concentrado	92
<b>Figura 22.</b> Productividad (g/L*h) Vs pH del medio en etapa de fermentación con melaza y jugo de caña (30 horas)	93

## ANEXOS

	PAG
<b>Anexo 1.</b> Determinación de la morfología de la levadura	128
<b>Anexo 2.</b> Recuento en cámara de Neubauer y porcentaje de viabilidad	129
<b>Anexo 3.</b> Determinación de la concentración en medio sólido de bacterias ácido lácticas	130
<b>Anexo 4.</b> Aislamiento en medio sólido YM de levadura hidratada y recuento de levaduras salvajes	132
<b>Anexo 5.</b> Pruebas adicionales para determinación de contaminantes bacterianos	134
<b>Anexo 6.</b> Determinación de acidez volátil en mieles y en vinos	136
<b>Anexo 7.</b> Método de Fehling para determinación de azúcares totales reductores	138
<b>Anexo 8.</b> Determinación de porcentaje de alcohol en vinos	140
<b>Anexo 9.</b> Registros de parámetros de ensayo etapa de reproducción	141
<b>Anexo 10.</b> Registro de parámetros de ensayo etapa de fermentación	147
<b>Anexo 11.</b> Muestra de Cálculo para rendimiento, eficiencia y productividad	151

## RESÚMEN

Ante el auge en la producción de alcohol etílico en el país, se han buscado diversas alternativas para minimizar las pérdidas de azúcar fermentable y la contaminación por microorganismos durante el proceso de fermentación alcohólica a partir de las diferentes mieles de caña obtenidas por los ingenios azucareros, de manera que los compuestos antimicrobianos han ganado importancia.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de dos compuestos antimicrobianos (penicilina y virginamicina) en la fermentación alcohólica realizada por una cepa comercial de levadura activa seca de *Saccharomyces cerevisiae* en un sistema por lotes.

Además del tratamiento con antibióticos, se evaluó la variación en el pH de los sustratos del proceso con el fin de determinar si dicha variación, tiene efecto sobre el rendimiento y productividad de la fermentación y conocer si puede constituirse como una alternativa válida para ser utilizada en sustratos como melaza y jugo de caña evaluando su incidencia en la disminución de los contaminantes típicos (Bacterias ácido lácticas-BAL).

Los antibióticos se evaluaron en las siguientes concentraciones: 0.5, 1.0 y 2.0 ppm. El sustrato sin adición del antibiótico durante la etapa de propagación de la levadura fue utilizado como control.

La variación del pH en los sustratos fue de 3.0, 3.5 y 4.0 utilizando como control el pH normal manejado en planta: 4,6.

Para cada tratamiento se realizó la determinación de rendimiento a partir del alcohol generado, la eficiencia y la productividad del proceso.

Los resultados de rendimiento promedio se compararon mediante un análisis de varianza de doble vía (ANOVA) para el caso de los tratamientos con antibiótico y mediante análisis de

varianza de una vía (ANOVA) para el caso del tratamiento con pH para cada uno de los sustratos (melaza y jugo de caña). Los análisis se realizaron con un nivel de significancia de 0.05.

De acuerdo al análisis estadístico de los datos resultantes de la presente investigación se puede decir que en fermentaciones con melaza, si existe diferencia significativa entre los efectos generados por la adición de las diferentes dosis de antibiótico, sin embargo, no existe diferencia significativa entre los efectos generados por la utilización de los antibióticos (penicilina y virginamicina) sobre el rendimiento de la fermentación, lo que indica que cualquiera de los dos podría usarse y su selección podría estar basada en una evaluación económica.

En el caso de la utilización de jugo de caña concentrado como sustrato de fermentación, el análisis de varianza demuestra que no existe diferencia significativa entre los efectos generados por el uso de diferentes dosis, pero si existe diferencia significativa entre los efectos generados por el uso de los dos compuestos antibióticos (penicilina y virginamicina) sobre el rendimiento de la fermentación. Los resultados indican que utilizando virginamicina a una concentración entre 1.0ppm y 2.0ppm puede beneficiarse el proceso de fermentación.

La alternativa de utilizar un descenso de pH para controlar las poblaciones de bacterias lácticas, especialmente del género *Lactobacillus*, no constituye un beneficio importante en el proceso pues afecta la población y viabilidad de la levadura que inciden en el rendimiento y productividad del proceso especialmente cuando se utiliza melaza como sustrato de fermentación.

## ABSTRACT

In view of the booming production of ethyl alcohol in the country, different alternatives have been sought to minimize the losses of fermentable sugar, and the contamination by microorganisms during the alcohol fermentation process, using the different cane syrups obtained by the sugar mills, so that the antimicrobial compounds have become important.

The object of this investigation was to evaluate the effect of two antimicrobial compounds (penicillin and virginamicine) on the alcohol fermentation carried out by a commercial dry active yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* in a batch system.

In addition to the treatment with antibiotics, the variation in the pH of the process substrates was evaluated, in order to determine if said variation affects the yield and productivity of the fermentation, and to determine if it can be considered as a valid alternative to be used in substrates such as molasses and cane juice, by evaluation of its influence on the decrease of the typical contaminants (Lactic Acid Bacteria-BAL).

The antibiotics were evaluated in the following concentrations: 0.5, 1.0 and 2.0 ppm. The substrate without the addition of the antibiotic during the yeast propagation stage was used as the control.

The variations of the pH in the substrates were 3.0, 3.5 and 4.0, with the pH normally used in the plant as the control (4.6).

For each treatment, the determination of yield, the efficiency and the productivity of the process was carried out, based on the alcohol generated.

The results of the average yield were compared by means of an analysis of the double way variance (ANOVA), in the case of the treatments with antibiotics; and by means of the

analysis of single way variance (ANOVA), in the case of the treatments with pH, for each one of the substrates (molasses and cane juice). The analyses were carried out with a significance level of 0.05.

According to the statistical analysis of data resulting from this investigation, it can be concluded that in fermentations with molasses, there is a significant difference among the effects generated by the addition of the different doses of the antibiotic. However, there is no significant difference between the effects generated by the use of the two antibiotics (penicillin and virginamicine) on the fermentation yield, which indicates that either one could be used, and that its selection would be based on economic criteria.

In the case of using concentrated cane juice as the fermentation substrate, the variance analysis demonstrates that there is no significant difference among the effects generated by the use of the different doses, but that there is a significant difference between the effects generated by the use of the two antibiotic compounds (penicillin and virginamicine) on the fermentation yield. The results indicate that the use of virginamicine at a concentration between 1.0ppm and 2.0ppm can benefit the fermentation process.

The alternative of using a decrease in the pH to control the lactic bacteria populations, especially of the genus *Lactobacillus*, does not bring an important benefit to the process, because it affects the population and the viability of the yeast, that influence the yield and productivity of the process, especially when molasses is used as the fermentation substrate.

## 1. INTRODUCCION

La producción de alcohol etílico es uno de los procesos biotecnológicos que ha tomado gran importancia en el país, no sólo por su valor económico como producto final y de acuerdo a la ley 693 de 2001 como alcohol carburante, sino como sustrato para la obtención de otros compuestos químicos. Este alcohol, por ser obtenido a partir de uno de los subproductos de la industria azucarera (principal industria en el Valle del Cauca), constituye la base de la industria sucroquímica y la integración de procesos químicos y biológicos complejos.

El proceso de obtención de este alcohol se puede realizar a partir de diversos sustratos azucarados, sin embargo, gracias a su ubicación geográfica, SUCROMILES S.A. utiliza como sustrato las mieles y melazas de caña suministradas por los ingenios azucareros del Valle, a partir de ellas puede llevarse a cabo la propagación del microorganismo fermentador (*Saccharomyces cerevisiae*) y por consiguiente lograrse la obtención final de un vino con un porcentaje de alcohol considerable, el cuál es separado tras procesos de destilación.

Durante el proceso de fermentación es necesario controlar todos los factores que pueden afectar el rendimiento final. Cada etapa, reproducción y fermentación, debe ser controlada. Las condiciones requeridas por el microorganismo fermentador (pH, temperatura, niveles de oxígeno, concentración de azúcar, etc) deben ser suplidas para que puedan obtenerse buenos resultados.

A pesar que este microorganismo no es tan exigente metabólicamente, existen factores que lo pueden afectar, tal es el caso de los contaminantes bacterianos, los cuales tienen un efecto negativo no sólo a nivel de competencia por sustrato sino por producción de metabolitos indeseables que pueden llegar a afectar la viabilidad de la levadura y por ende 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 de tipo bacteriano, sin embargo, la carga allí presente se activa cuando el sustrato se diluye y el contenido de agua permite su multiplicación, de manera que se deben tomar medidas preventivas y/o de control para que durante la etapa de reproducción de la levadura no se aumente de manera dramática la población bacteriana, la cual podría tener incidencia negativa en la posterior fermentación.

El objetivo de este trabajo de investigación es cuantificar el efecto de diferentes cargas bacterianas presentes en el inóculo, sobre el resultado de la fermentación en términos de porcentaje de alcohol en el vino al final del proceso y determinar si el uso de diversos antibióticos a diferentes concentraciones y durante la etapa de reproducción, sirve como mecanismo de control de dichos contaminantes.

También se pretende conocer la concentración a la cual debe usarse cada producto (penicilina y virginamicina) y establecer si estos compuestos afectan positivamente el rendimiento global del proceso.

Finalmente, se pretende valorar si una variación en el pH inicial del sustrato puede ser utilizada como alternativa para el control de estos contaminantes bacterianos (bacterias ácido lácticas-BAL)

## 2. MARCO TEÓRICO

A raíz del continuo agotamiento global de los recursos y/o reservas de petróleo y el consecuente aumento en su precio, la industria biotecnológica ha encontrado prácticas alternativas para que a partir de recursos renovables e incluso de subproductos de otras industrias, pueda producirse alcohol etílico no sólo para ser utilizado como combustible sino para ser utilizado en la industria sucroquímica para la elaboración de otros compuestos de interés comercial (Converti *et al*, 2003).

A partir de este hecho y para lograr la producción industrial de alcohol etílico a partir de sustratos azucarados, ha de tenerse un sistema de fermentación correctamente diseñado y preparado para manejar volúmenes importantes de mosto y vino, los sistemas de fermentación usados en las destilerías pueden dividirse en fermentación por lotes y fermentación continua, en ambos casos, el control de las condiciones del proceso es importante pues la finalidad es obtener el máximo rendimiento producto/sustrato (Bellissimi & Ingledew, 2004).

### 2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los microorganismos eucarióticos más estudiados, ya que su uso a nivel industrial es muy variado, no solo a nivel de producción de etanol y CO<sub>2</sub>, sino de otros compuestos volátiles y no volátiles. Pertenece al reino Fungi y es de tipo unicelular, es una levadura facultativa, es decir, su componente enzimático y rutas metabólicas utilizadas le permiten habitar tanto en ambientes aerobios como anaerobios (Jacques *et al*, 1999).

Su reproducción puede ser de tipo sexual, asexual o incluso pueden presentar los dos tipos, sin embargo, la reproducción asexual por fisión binaria o gemación es el tipo más común y consiste en la división de la célula dando origen a una invaginación que evoluciona hasta

obtenerse dos células idénticas con el mismo material genético, proceso denominado mitosis (Jacques *et al*, 1999).

Las células de *Saccharomyces cerevisiae* son generalmente redondeadas u ovaladas y su tamaño oscila entre 2-8  $\mu\text{m}$  de diámetro por 3-15  $\mu\text{m}$  de longitud según la etapa de vida y las características del medio de cultivo en el que se encuentren (Jacques *et al*, 1999).

## **2.2. BIOQUÍMICA DE LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL POR *Saccharomyces cerevisiae***

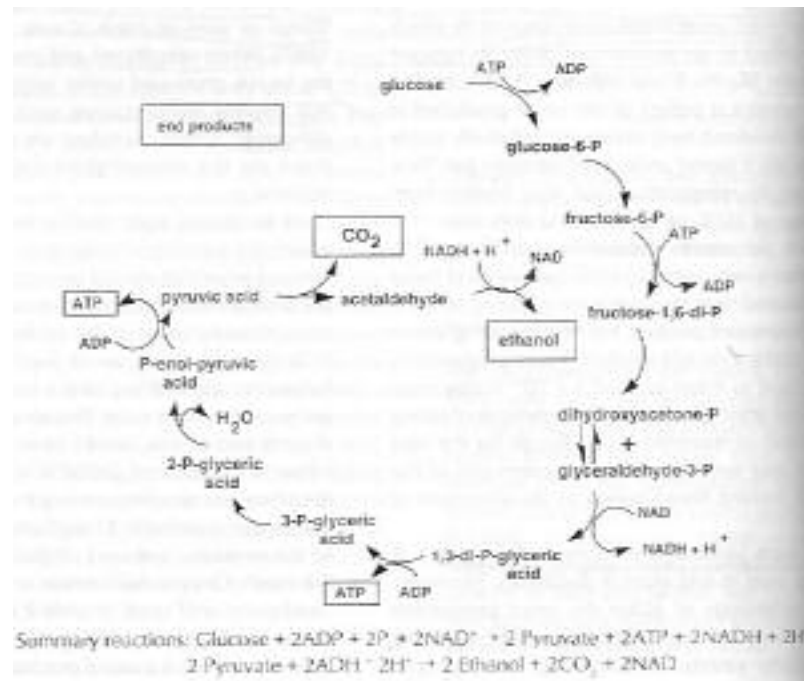
La levadura *Saccharomyces cerevisiae* en su etapa de reproducción, la cual lleva a cabo en presencia de oxígeno, utiliza la glucólisis y el ciclo de Krebs como metabolismo oxidativo para la generación de energía y biomasa, y en ausencia de oxígeno, siempre y cuando disponga de las condiciones adecuadas, realiza glucólisis en anaerobiosis y el piruvato generado tras este proceso se convierte en etanol por acción enzimática (Mathews *et al*, 2002).

La glucólisis, ruta por la cual se metabolizan las hexosas (ver figura 1), puede realizarse en condiciones anaerobias, sin la oxidación neta de los azúcares sustrato así como también en condiciones aerobias. La ruta se selecciona dependiendo de las condiciones y necesidades del microorganismo (Mathews *et al*, 2002).

Además de la glucólisis, dentro de las reacciones aerobias para la degradación de los azúcares se encuentra el ciclo del ácido cítrico ó ciclo de Krebs, el cual se constituye en la ruta oxidativa central de la respiración, pues a través de éste, se catabolizan todos los combustibles metabólicos (carbohidratos, lípidos y proteínas) en los organismos y tejidos aerobios (Mathews *et al*, 2002).

Aunque la glucólisis y la respiración conservan la energía liberada en forma de ATP, en la glucólisis se genera una energía total mucho menor, es decir que por cada mol de sustrato

catabolizado, la glucólisis produce menos energía total que la respiración completa (Mathews *et al*, 2002).



Fuente: *The alcohol textbook 3<sup>rd</sup> edition page 61.*

**Figura 1.** Ruta Embden Meyerof Parnas para la utilización de la glucosa.

**La reacción global de glucólisis es la siguiente:**



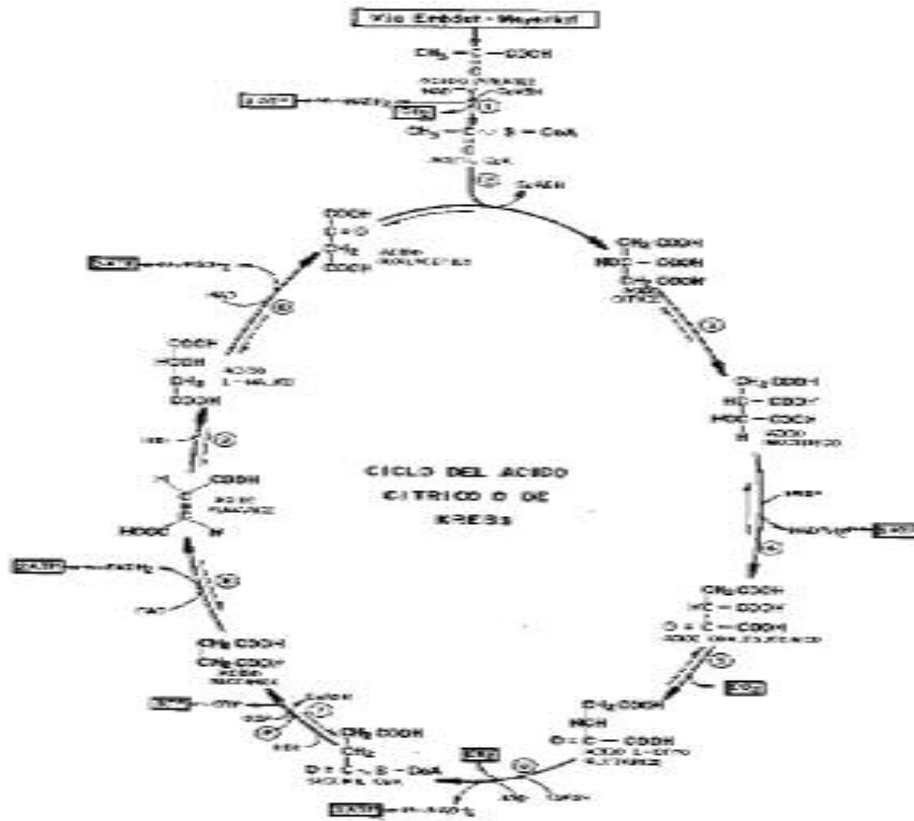
Esta importante vía metabólica para la degradación de hexosas es realizada por la levadura tanto en la etapa de reproducción como en la etapa de fermentación para la producción de etanol a partir de sustratos azucarados

En condiciones de aireación (presencia de oxígeno en el medio), después de la generación del piruvato a través de glucólisis al interior de la mitocondria de la levadura, el microorganismo inicia su proceso de respiración, la cual se realiza en tres etapas:

- 1) El piruvato, por acción del complejo piruvato deshidrogenada, es oxidado a Acetil-coA.
- 2) en el ciclo del ácido cítrico, la oxidación del carbono produce CO<sub>2</sub>, transportadores electrónicos reducidos una pequeña cantidad de ATP y
- 3) los transportadores electrónicos reducidos se reoxidan, aportando energía para la síntesis de mas ATP (Mathews *et al*, 2002).

El ciclo del ácido cítrico (ver figura 2), inicia en el momento en el que el piruvato producido durante la glucólisis, sufre una descarboxilación y deshidrogenación mediante el complejo piruvato deshidrogenada y es convertido en acetil-coA. Una vez este acetil-coA entra al ciclo, es condensado con oxaloacetato por la acción de la citrato sintasa y se produce citrato, el cual posteriormente sufre una deshidratación a isocitrato gracias a la acción reversible de la enzima aconitasa. Este isocitrato a su vez es oxidado por la isocitrato deshidrogenada y es producido  $\alpha$ -cetoglutarato junto con CO<sub>2</sub>, el primero es deshidrogenado y descarboxilado a CO<sub>2</sub> y succinil co-A, el cual reacciona con ADP y forma ATP y succinato, que luego es oxidado a fumarato por la succinato deshidrogenasa, con la intervención de FAD como cofactor. El fumarato es reversiblemente hidratado a L-malato tras la acción de la fumarasa. Este nuevo intermediario es oxidado por la malato deshidrogenasa y con producción de NADH, regenerando oxaloacetato, el cual inicia un nuevo ciclo (Nelson & Cox 2001).

El resultado final es producir alrededor de 38 ATP's por cada molécula de glucosa pues tras la glucólisis sólo se producen dos (2) ATP's a partir de una molécula de glucosa. Estas dos vías metabólicas (glucólisis y ciclo de Krebs ó ciclo de los ácidos tricarboxílicos) ocurren al interior de la célula más específicamente en las mitocondrias y constituyen lo que se denomina la respiración celular de las levaduras durante los procesos fermentativos siempre y cuando las condiciones de aireación sean adecuadas y puedan darse las reacciones de oxidación (Nelson & Cox 2001).

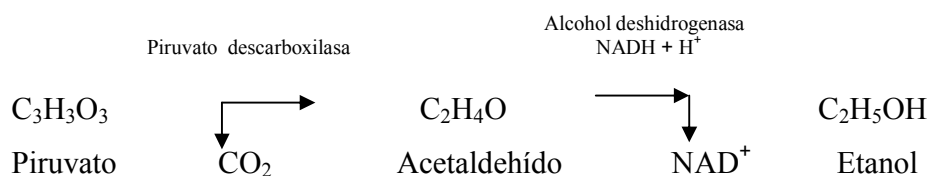


Fuente: Bioquímica Harper 2004  
**Figura 2.** Ciclo del ácido cítrico ó Ciclo de Krebs

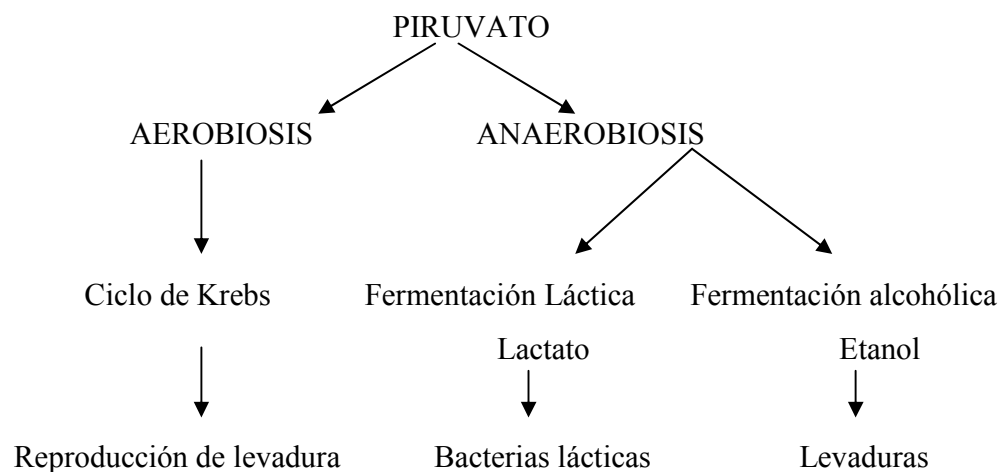
Esta es la vía completa que sigue la degradación de azúcares bajo condiciones aerobias, es decir condiciones de oxidación de los compuestos, para generar la energía necesaria por los organismos para producir intermediarios orgánicos y la generación de estructuras celulares y por ende para su reproducción en un medio específico (Mathews *et al*, 2002).

Por otro lado, en condiciones anaerobias, es decir condiciones de fermentación, el metabolismo del piruvato sigue otra vía que se denomina vía fermentativa, el piruvato tiene numerosos destinos alternativos en los microorganismos anaerobios y microaerófilicos, en el caso de las bacterias lácticas, reducen el piruvato a lactato en un solo paso, mientras las levaduras convierten el piruvato en etanol en una ruta de dos pasos.

Esta fermentación alcohólica comienza con la descarboxilación no oxidativa del piruvato a acetaldehído, catalizada por la piruvato descarboxilasa, esta reacción va seguida de la reducción del acetaldehído a etanol que depende de NADH, catalizada por la enzima alcohol deshidrogenada, reacción expresada de la siguiente manera:



Es así como el metabolismo del piruvato producido por glucólisis a partir de las hexosas, dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y de los microorganismos presentes en el medio, puede tomar dos vías principales:



### 2.3. PARÁMETROS Y CONDICIONES EN LA FERMENTACIÓN

La producción de alcohol es un proceso multidisciplinario basado en la química, bioquímica y microbiología de diversos materiales, el metabolismo del microorganismo más estudiado y usado en este campo: *Saccharomyces cerevisiae*, la técnica de destilación adecuada para separar el etanol de otros compuestos, y en general un sinnúmero de reacciones que originan el proceso y que permiten la obtención de este valioso producto (Jacques *et al*, 1999).

Los mejoramientos a nivel de fermentación han sido motivo de múltiples trabajos de investigación y se han hecho pruebas con cepas mutantes, desarrollo de cepas sobre sustratos más económicos, uso de recursos renovables, diseño de reactores más eficientes, utilización de mejores nutrientes en el medio de cultivo para mejorar el crecimiento y desarrollo celular, entre otros, todo con el fin de llegar a la optimización de los parámetros de un proceso que conduzca al máximo aprovechamiento de las materias primas y al máximo rendimiento y productividad (Pramanik, 2003).

Los principales parámetros a controlar en una fermentación alcohólica son en esencia pH, Temperatura, Concentración de azúcar, Tolerancia a concentraciones de alcohol producido y constituyentes del medio de cultivo, así como durante la propagación es esencial la inyección de aire que permita el crecimiento del microorganismo fermentador (Pramanik, 2003).

### **2.3.1. pH**

El efecto de pH en una fermentación es realmente importante no sólo en relación con el desarrollo de la levadura sino con la tasa de fermentación y con la formación de subproductos.

En estudios realizados con cepas aisladas de ponches azucarados, se encontró que la máxima producción de alcohol se obtiene a pH 4.25 y la menor a pH 3.7, probablemente porque este último es demasiado bajo para lograr una activación eficiente de las enzimas necesarias para la fermentación y el intercambio iónico al interior de la célula sufre un

descontrol tal, que ésta, concentra su energía, en regular su sistema y no en fermentar el azúcar presente en el sustrato (Pramanik 2003).

Así mismo la inversión de la sacarosa, a sus componentes monoméricos, presente en el sustrato, aumenta a medida que el pH disminuye incidiendo en el tiempo de fermentación. A mayor inversión mayor disponibilidad para la levadura y mayor tasa de fermentación al no estar éstos azúcares expuestos a la contaminación ya sea química o microbiológica, además, pHs cercanos al neutro facilitan el desarrollo de flora microbiana contaminante del proceso y por ende la formación de subproductos indeseables.

De esta manera se demuestra la importancia del pH y su optimización no sólo para que la inversión del azúcar sea eficiente sino también para un buen desarrollo de la cepa del microorganismo fermentador y control de la formación de productos no esperados (Jacques *et al*, 1999).

### **2.3.2. Temperatura**

La temperatura constituye un factor primordial tanto en la producción de biomasa como de etanol. Usualmente, la fermentación alcohólica incrementa cuando la temperatura se encuentra en un rango de 30-35°C con una óptima de 32°C, dependiendo de la cepa de levadura utilizada.

El metabolismo aumenta su actividad paralelamente a la temperatura hasta llegar a ser inhibitoria para la levadura (> a 37°C) y este incremento amplifica la probabilidad de desarrollo de microorganismos contaminantes que perjudican la fermentación.

Estudios realizados con distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* han demostrado que cuando ocurre un sobrecalentamiento durante la fermentación para la producción de alcohol, la eficiencia es menor debido a la baja de la actividad enzimática y al estrés que sufre el microorganismo por afección de sus estructuras celulares.

En fermentaciones con melazas, la temperatura óptima, a la cual se obtiene el mayor rendimiento de alcohol a partir del sustrato ha sido 32°C.

Esta temperatura es a la cual el microorganismo desarrolla un mejor metabolismo fermentativo, sin embargo el incremento en la temperatura es un fenómeno normal pues las reacciones de fermentación son exotérmicas (Pramanik, 2003), los mecanismos de control para este parámetro a nivel de planta son la utilización de un serpentín interno en el fermentador, chaqueta de enfriamiento externo, intercambiador de placas, etc, éste último es el más usado en las destilerías por su alto grado flexibilidad, fácil limpieza, permite agitación en el fermentador y alto coeficiente de transferencia de calor, entre otros (Jacques *et al*, 1999).

### 2.3.3. Concentración de azúcar

La concentración de sustrato fermentable al exterior de la célula, constituyen un punto crítico en la actividad del microorganismo y por ende en el rendimiento en sustrato a partir de él. En el caso de producción de alcohol a partir de sustratos azucarados que tienen concentraciones de sacarosa y/o glucosa significativamente altas, han de estandarizarse dichas concentraciones para lograr una optimización del proceso y asegurar la eficiente utilización del sustrato.

Los resultados obtenidos por Pramanik en el año 2003 en una fermentación por lotes usando una cepa de *Saccharomyces* aislada de un sustrato azucarado muestran que la concentración de etanol incrementa cuando se eleva la concentración de sustrato pero dicho aumento repercute en el tiempo que toma la fermentación afectando la productividad.

**Tabla 1.** Rendimiento de alcohol (%) a partir de concentraciones de azúcar para una cepa de *Saccharomyces* aislada de un sustrato específico.

Concentración de azúcar	Rendimiento de alcohol	Tiempo de fermentación
-------------------------	------------------------	------------------------

(g/L)	(%)	(horas)
250	43	121
200	47	105

Tomado de Pramanik, 2003.

En ambos casos, el porcentaje de conversión del sustrato fue del 100%, demostrando así que la concentración de sustrato, la producción de alcohol y el tiempo de fermentación son directamente proporcionales y dependen de los requerimientos y capacidad de la industria. A nivel industrial, esto también depende de la conservación de la viabilidad de la levadura, de la respuesta de la cepa a dichos cambios y de los niveles de contaminación presentes en los tanques, pues al aumentar el tiempo, puede posiblemente aumentar igualmente el número de bacterias indeseables y sus subproductos, disminuyéndose así el rendimiento de alcohol y la actividad del microorganismo fermentador (Oliveira *et al*, 1999).

El efecto inhibitorio por altas concentraciones de azúcar en el medio para fermentación alcohólica puede manifestarse en la plasmólisis celular y/o en el cese de la actividad celular, es decir que las levaduras suspenden su metabolismo y como mecanismo de resistencia dejan de intercambiar materia y energía con el medio, lo cual se traduce en la interrupción de la fermentación y ha de diluirse dicho sustrato para lograr el acoplamiento y re-adaptación microbiana para reiniciar el proceso (Pramanik, 2003).

#### **2.3.4. Tolerancia a altas concentraciones de alcohol**

El alcohol producido a partir del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* puede en algún momento ser inhibitorio e incluso tóxico para sí misma pues afecta la traslocación de iones como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , afecta la función y estabilidad de enzimas citoplasmáticas e incluso la función de los transportadores afectando el reconocimiento del sustrato, sin embargo la resistencia de algunas cepas a altas concentraciones depende de la composición lipídica de su membrana:

**Fosfolípidos:** otorgan flexibilidad a la membrana, los principales son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol y se componen de ácidos grasos saturados e insaturados de 16 y 18 carbonos.

**Esteroles:** Aumentan la rigidez de la membrana y disminuyen su permeabilidad; el principal esteroles de membrana es el ergosterol y las levaduras al ser mas ricas en esteroleles, mantienen por más tiempo su actividad fermentativa (Tomasso 2004).

En cultivo anaeróbico, existe una correlacion positiva entre el contenido de esteroleles y el etanol producido y en cultivo aeróbico existe una correlación negativa entre el contenido de esteroleles y el alcohol producido (Tomasso 2004).

La tolerancia al etanol es dependiente de la habilidad de la célula para exportar el etanol del interior al medio externo, un proceso que depende de la composición de la membrana y de su fluidez, es decir de su contenido lipídico, no obstante otros factores como temperatura afectan dicha resistencia, por ejemplo, a medida que se incrementa la temperatura, aumenta la toxicidad del etanol frente a la célula y aquellas levaduras que son más tolerantes al etanol también lo son a la temperatura (Tomasso 2004).

Las tecnologías actuales permiten manipular el DNA de las levaduras a través de técnicas especializadas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la electroforesis en campo pulsado (ECP), el estudio del DNA mitocondrial y el análisis del polimorfismo del fragmento de restricción (RLPF) y mediante las cuales se logra un mejoramiento de las cepas en diversas características que incluyen la resistencia al etanol en el medio y que le permiten tolerar a la levadura incluso un 11% de alcohol (Bartra 2002).

Actualmente, en las destilerías para producción de alcohol a partir de melazas ya se usan cepas seleccionadas, mejoradas y/o adaptadas de diferentes tipos: crema, comprimida, activa seca o cepas purificadas del mismo proceso, las cuales no sólo soportan altas concentraciones de alcohol, sino que requieren de la presencia del mismo para desarrollarse

adecuadamente y fermentar de forma eficiente. Estudios han revelado que la presencia de este metabolito en el medio en concentraciones alrededor al 1% v/v induce al microorganismo a convertir rápidamente el ácido pirúvico a etanol y lograr un balance de oxidación y reducción al interior de la célula (Jacques *et al*, 1999).

En cuanto al efecto inhibitorio del etanol, la mayoría de cepas utilizadas para dicho proceso soportan en promedio 9,5% v/v de alcohol en el vino, sin embargo, esta concentración a nivel de planta sólo se obtiene cuando el sustrato es puro, se suministran concentraciones de azúcar controladas, no existe contaminación bacteriana y el proceso está estandarizado, de manera que con sustratos de baja pureza difícilmente se alcanzan estas concentraciones de alcohol, adicional a esto las cepas comercialmente utilizadas son tolerantes, no tienden a sufrir estrés o inhibición por metabolito, en este caso por etanol (Bellisimi & Ingledew, 2005).

### **2.3.5. Requerimientos de oxígeno**

El oxígeno como elemento, es requerido por la levadura para la síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados, componentes esenciales de sus membranas celulares, que le permiten en algunos casos soportar factores de estrés como temperatura, concentraciones de alcohol, sales, ácidos, azúcares, etc.

*Saccharomyces cerevisiae* logra propagarse más eficientemente en condiciones aeróbicas pues la tasa de crecimiento aumenta considerablemente siempre y cuando los nutrientes y el sustrato azucarado sea moderado pero suficiente (aproximadamente 6-8% m/v azúcar), es decir, que cuando el oxígeno se reduce y los niveles de glucosa aumentan se produce etanol, de manera que las condiciones para propagación han de ser controladas y dirigidas estrictamente al aumento de biomasa necesaria para la posterior fermentación de concentraciones superiores de azúcar (Oliveira *et al*, 1999).

## **2.4. RENDIMIENTO DE ALCOHOL ETILICO**

Diferentes variables son utilizadas para medir el resultado de una fermentación:

A) Rendimiento (real), entendido como la cantidad de producto generado a partir de un sustrato determinado.

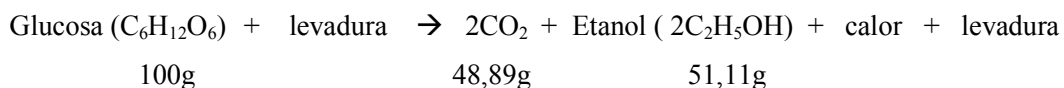
La fórmula para hallar el rendimiento de un proceso consiste en:

$$\frac{\text{Moles o Gramos del producto}}{\text{Moles o Gramos del sustrato}} * 100$$

B) Eficiencia, relaciona el rendimiento real con el rendimiento teórico y se expresa:

$$\frac{\text{Rendimiento real}}{\text{Rendimiento teórico}} * 100$$

Donde el rendimiento teórico es el obtenido estequiométricamente según la ecuación:



Sin embargo, según Pasteur, sólo puede lograrse un máximo de 95% del rendimiento teórico, es decir que a partir del azúcar reductor que ingresa al proceso sólo el 95% máximo, ha de ser convertido a alcohol por parte de la levadura. El 5% restante es empleado para crecimiento celular, producción de otros metabolitos como ácidos orgánicos, consumo por parte de la contaminación bacteriana, conversión en productos infermentables, entre otros (Jacques *et al*, 1999).

C) Productividad, indica la relación entre la masa de producto generado en cierto volumen de fermentación en un tiempo determinado:

$$\text{Productividad} = \frac{\text{g de producto}}{\text{Volumen(L)} * \text{Tiempo de fermentación (h)}}$$

#### **2.4.1. FACTORES QUE AFECTAN EL RENDIMIENTO DE ALCOHOL**

Un gran número de factores pueden reducir el rendimiento de alcohol y disminuir la productividad de la planta. Estos factores deben ser controlados para minimizar las pérdidas de sustrato y maximizar las ganancias en términos de producto.

#### **2.4.1.1. Crecimiento Celular**

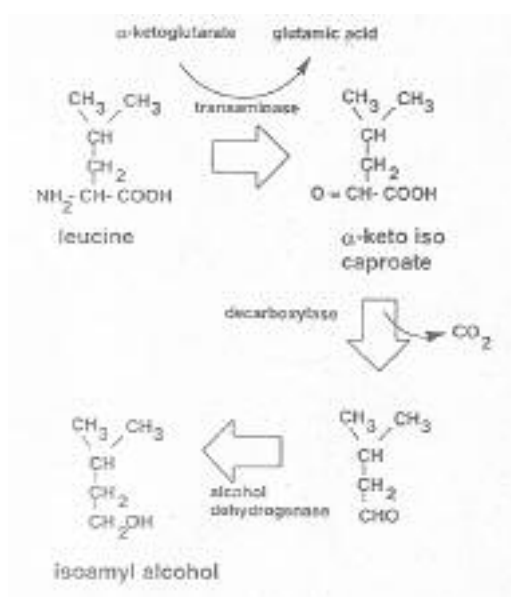
Cuando la levadura se somete a un medio favorable de oxígeno, temperatura y pH, ésta puede crecer hasta agotar el sustrato y producir una cantidad excesiva de biomasa así como de metabolitos que terminarían por cesar el proceso. En condiciones anaeróbicas el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* está seriamente relacionado con la producción de etanol, durante la fermentación se espera que sólo una mínima parte del sustrato (máximo 5%) sea utilizado para la producción de la biomasa suficiente para iniciar la fermentación. Por esta razón es importante tomar el inóculo en la fase exponencial o fase de crecimiento máxima para garantizar una eficiente tasa de conversión del azúcar en alcohol y, si se proporcionan condiciones favorables para el crecimiento celular, la fuente de carbono será el recurso para crecimiento y no estará disponible para producir etanol.

Sin embargo, el alcohol no se produce si no existe un significativo número de células y si no se garantizan las condiciones mínimas para su estabilidad, es decir para que permanezcan metabólicamente activas durante el tiempo de fermentación (Acevedo *et al*, 2003).

#### **2.4.1.2. Generación de alcoholes superiores**

Alcoholes superiores o también denominados aceites fusesel son el n-propanol, alcohol amílico, alcohol isoamílico, isobutanol y feniletil alcohol, estos productos son elaborados por vía anabólica a partir de alfa-cetoácidos ó por vía catabólica directamente a partir de algunos aminoácidos. Un aminoácido específico es transaminado a su correspondiente alfa-cetoácido y éste a su vez es decarboxilado formando un aldehído el cual es reducido a alcohol por una deshidrogenasa, dichas reacciones son influenciadas por bajos niveles de nitrógeno disponible y puede controlarse supliendo las necesidades de nitrógeno en el medio.

Estos alcoholes superiores se producen en altas tasas en sistemas de fermentación por lotes dependiendo de la cepa de levadura, de altas temperaturas en la fermentación, aireación y agitación y lo más importante, una baja disponibilidad de fuentes de Nitrógeno (Titica *et al*, 2000).



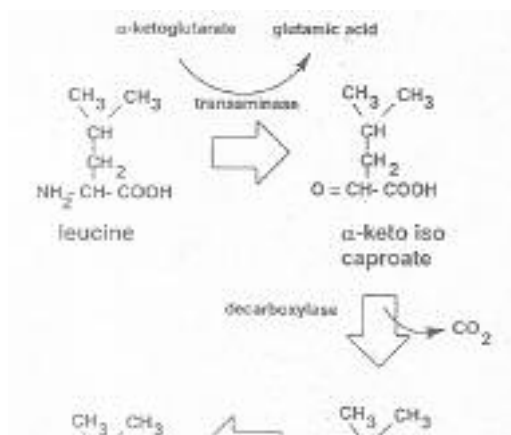
Fuente: *The alcohol textbook 3<sup>rd</sup> edition page 64.*

**Figura 3.** Conversión de leucina en alcohol isoamílico como ejemplo de la producción de alcoholes superiores

### 2.4.1.3. Generación de Ácidos Orgánicos

El ácido succínico, así como el ácido pirúvico, málico, oxaloacético, propiónico, láctico y acético, entre otros, se producen durante la fermentación de alcohol. Algunos de ellos se generan debido a limitaciones durante el ciclo del ácido cítrico y son productos indeseables pues pueden afectar la calidad organoléptica del producto.

Las bacterias contaminantes del proceso son las responsables directas de la producción y/o incremento del ácido láctico y acético en las fermentaciones alcohólicas (Jacques *et al*, 1999).



Estos ácidos, pueden inhibir el crecimiento de la levadura y existen estudios que sugieren que a concentraciones superiores a 0.8% y 0.05% de láctico y acético respectivamente pueden afectar de forma letal el desarrollo celular. Dichos niveles de ácido láctico suelen ser producidos por bacterias fermentadoras de carbohidratos que han sido aisladas en diversas plantas productoras, que tienen su origen en los molinos de caña y otras fuentes de sustratos azucarados y constituyen el principal grupo contaminante en la fermentación de alcohol. Son importantes no sólo por la producción de estos metabolitos sino por su significativa capacidad para tolerar concentraciones de etanol. (Acevedo *et al*, 2003).

La presencia de estos contaminantes constituye igualmente la razón principal de la disminución del crecimiento y viabilidad celular de la levadura pues se genera una gran competencia entre los dos grupos microbianos por los factores de crecimiento en el medio de fermentación (Jacques *et al*, 1999).

Uno de los sustratos que por su origen y tratamiento presenta mayores problemas de contaminación por bacterias ácido lácticas son las melazas de caña que se constituye como el sustrato más utilizado a nivel mundial para la producción de alcohol (Koizumi 2005).

De esta manera, el concepto de acidez volátil constituye uno de los factores a controlar durante la fermentación alcohólica pues tiene incidencia en la calidad organoléptica del alcohol y su excesiva concentración en una fermentación alcohólica inhibe el desarrollo del microorganismo fermentador.

La concentración de ácidos volátiles producidos está alrededor de 0.25- 0.50 g/L y superiores dependiendo de las condiciones de fermentación y en algunos casos incluso pueden llegar a 1.5g/L (Bely *et al*, 2003).

Muchos autores han estudiado el origen de la acidez volátil a partir de la misma *Saccharomyces cerevisiae* bajo ciertas condiciones de fermentación y han encontrado que

esta acidez, además de tener un impacto sobre las condiciones fisiológicas, es generada al inicio del crecimiento celular y es dependiente de la expresión de ciertos genes de la cepa de levadura (Bellisimi & Ingledew, 2005).

Sin embargo, poco se conoce acerca del control de esta producción bajo condiciones de azúcar alto en una fermentación, probablemente la adición de fuente de nitrógeno sea una forma de controlar dicha producción y en el caso de mostos de uvas, ésta acidez debe ser controlada eficazmente porque además de deteriorar la materia prima y el producto, inhibe considerablemente el desarrollo de la levadura.

La acidez volátil puede cuantificarse mediante método rápido por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ó mediante destilación, el primer método utiliza una fase móvil de ácido sulfúrico y cuantifica de manera exacta los miligramos de cada ácido volátil presente en la muestra analizada, por su parte, el segundo método involucra un proceso más lento y permite una cuantificación de la acidez volátil total (sin separar los diferentes tipos de ácidos orgánicos) (Bellisimi & Ingledew, 2005).

## **2.5. MELAZAS COMO SUSTRATO DE FERMENTACION**

Las melazas de caña son el principal subproducto de la industria azucarera y son la fuente de azúcares fermentables sin pretratamientos complejos, el azúcar en estas materias primas se encuentra como sacarosa, un disacárido que en contacto con agua se hidroliza y genera moléculas libres de glucosa y fructosa, cuya inversión se constituye en el sustrato listo para iniciar la fermentación. (Jacques *et al*, 1999).

### **2.5.1. Producción de melazas de caña**

Durante la producción de azúcar en los ingenios azucareros, la caña es exprimida en un molino para obtener un jugo primario, este jugo es calentado y clarificado por filtración y

adición de cal para remover las fibras y el lodo, luego este jugo se evapora para concentrar el azúcar y ocasionar su cristalización.

El jugo que contiene los cristales de azúcar es posteriormente centrifugado para separar los cristales formados y el residuo de jugo es lo que se denomina Melaza tipo A, ésta melaza es evaporada y centrifugada nuevamente para cristalizar otra cantidad importante de azúcar y el jugo que resulta de este proceso se refiere a la melaza tipo B y dicho proceso se repite nuevamente para lograr más rendimiento en términos de cristales de azúcar logrando la producción de melaza tipo C como residuo (Jacques *et al*, 1999). Este jugo de caña es normalmente evaporado y centrifugado máximo tres veces pero el número de tratamientos depende de la eficiencia de los mismos y de la importancia económica que éstos implican. (Jacques *et al*, 1999).

Las repetidas evaporaciones y centrifugaciones disminuyen el contenido de azúcar en las melazas e incrementan la viscosidad y la concentraciones de sales y otras impurezas, el resultado es un líquido viscoso, denso y de color café cuyo contenido de azúcar fermentable depende no sólo del contenido inicial de la caña que entró a la molienda sino del tipo de tratamientos que recibió y no es constante a menos que el proceso de cristalización se encuentre perfectamente estandarizado, sin embargo existen valores aproximados que se consideran para una melaza típica dependiendo de los tratamientos a los que fue sometida. (Jacques *et al*, 1999).

**Tabla 2.** Composición típica de una Miel tipo A

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIONES
Grados Bríx mín	68
Azucares totales mín (%m/m)	65
Azucares no fermentables (%m/m)	<1.0
Sólidos directos (%m/m en base húmeda)	2.0

**Tabla 3.** Composición típica de una Miel tipo B

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIONES
Grados Bríx promedio	70-75
Azucares totales mín (%m/m)	57
Azucares no fermentables (%m/m)	<1.0
Sólidos directos (%m/m en base húmeda)	2.0 - 3.0

**Tabla 4.** Composición típica de una Miel tipo C

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIONES
Grados Brix mín	85
Azucares totales mín (%m/m)	48
Azucares no fermentables (%m/m)	<5.0
Cenizas máx (%m/m)	16

Valores máximos y mínimos según NTC 1846 (Miel A) y 587 (Miel C), Según análisis departamento de calidad Sucromiles S.A. (Miel B).

### 2.5.2. Pretratamiento a las melazas de caña

Existen varios posibles tratamientos a las melazas antes de la fermentación, dirigidos a la reducción de compuestos en suspensión, los cuales pueden causar el bloqueo de las columnas de destilación. El principal problema es la presencia de componentes de calcio que se derivan de la adición de cal en el proceso de clarificación del jugo de caña, generalmente la especificación para las melazas es no contener más de 10% m/m de sólidos o metales y cenizas que puedan causar problemas en el escalamiento (Jacques *et al*, 1999).

Las incrustaciones que suelen formarse en las columnas de destilación pueden controlarse mediante acidificación de melazas diluidas con ácido sulfúrico, el cual además de controlar la contaminación de tipo bacteriano convierte las sales de calcio en sulfato de calcio, compuesto insoluble que se sedimenta y puede ser removido de los tanques de fermentación (Jacques *et al*, 1999).

### 2.5.3. Manejo de nutrientes en la fermentación con melazas

El uso de sustratos impuros como melazas de caña, constituye un medio complejo dado que contiene microelementos y vitaminas que no deben ser adicionados durante la fermentación excepto las fuentes elementales de nitrógeno y fósforo para obtener óptimos resultados, contrario a otros sustratos que por su pureza deben ser suplementadas con micronutrientes especiales.

El nitrógeno necesario en la fermentación puede ser adicionado en forma de urea, sulfato de amonio, entre otras, teniendo en cuenta que sean de bajo peso molecular pues las levaduras no generan proteasas para degradar fuentes de nitrógeno orgánicas complejas.

La fuente de nitrógeno más utilizada es la urea, pues las sales de amonio puede causar incrustaciones por la formación de compuestos secundarios y el amonio líquido puede elevar el pH favoreciendo la contaminación (Acevedo *et al*, 2003).

En el caso de la producción de alcohol para bebidas alcohólicas no se recomienda el uso de urea pues se ha demostrado que esta conlleva a la formación de etilcarbamato, compuesto carcinogénico indeseable (Acevedo *et al*, 2003).

Por su parte, el fósforo es adicionado en forma de fosfato diamónico por su demostrada facilidad de absorción por parte de la levadura favoreciendo, al igual que la fuente de nitrógeno, su desarrollo celular (Acevedo *et al*, 2003).

En el caso de mieles de caña puras la situación cambia porque este tipo de componentes se encuentran en concentraciones bajas por lo tanto deben adicionarse en mayores cantidades elementos como nitrógeno, fósforo y algunas trazas de elementos como el zinc. (Acevedo *et al*, 2003)

Algunas vitaminas necesarias para el buen crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* como la biotina, el pantotenato y inositol pueden estar presentes en las melazas o en su defecto

podrían ser adicionadas lo cual a nivel industrial no es muy rentable, por lo cual se buscan sustratos con dichas características nutricionales (Acevedo *et al*, 2003).

#### **2.5.4. Ventajas del uso de melazas de caña como sustrato**

Dentro de las ventajas del usos de melazas como material está la posibilidad de manejo a través de tuberías, la capacidad de almacenamiento durante periodos de tiempo considerables, su viable esterilización por inyección de vapor, su contenido de vitaminas y minerales que contribuyen a la nutrición del microorganismo, su bajo precio pues se constituyen como subproducto de la industria azucarera y permiten altos rendimientos de alcohol en corto tiempo, todo esto siempre y cuando se suministren las condiciones necesarias y adecuadas para su aprovechamiento (Mohamed 1996).

### **2.6. CONTAMINACION BACTERIANA EN MELAZAS**

Debido al tratamiento que reciben las melazas durante el proceso de cristalización, y por la naturaleza misma de la caña, este sustrato puede contener varias formas de contaminación bacteriana, cuyo metabolismo, en términos de producción de ácidos orgánicos implica la disminución en la actividad de *Saccharomyces cerevisiae* y por lo tanto la disminución en el rendimiento de alcohol a partir del sustrato así como también, la generación de características indeseables en el producto final (Ruckle 2005).

#### **2.6.1. Fuentes de Contaminación**

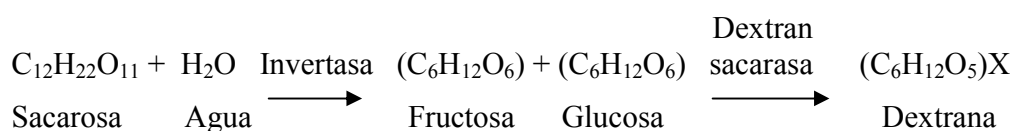
Las melazas de caña por si mismas actúan como un reservorio de contaminantes importante desde el cultivo de la caña, por su contenido de azúcar, constituyen en un medio de cultivo por naturaleza para flora microbiana oportunista, además, durante su procesamiento y/o limpiezas poco eficientes conducen al mantenimiento eficiente de microorganismos indeseables e incluso incontrolables a nivel de la fermentación alcohólica (Jacques *et al*, 1999).

Igualmente, los residuos de materia prima que se adhieren a las líneas y la recirculación y/o la propagación continua de levadura, favorecen la contaminación pues se proporcionan constantemente las condiciones adecuadas para el crecimiento microbiano, la inoculación de bacterias paralelo a la levadura en los fermentadores constituye quizás uno de los más graves problemas en las destilerías, pues después que un tipo bacterial logra colonizar un sistema, es difícilmente removible y controlable, de ahí que los mecanismos de prevención y control deban tenerse en cuenta de manera constante, principalmente en los sistemas de fermentación continuos (Bellissimi & Ingledew, 2004).

### 2.6.2. Pérdidas de Sacarosa

Una vez ocurre el corte de caña y se deterioran las estructuras vegetales externas que sirven de protección, inician las pérdidas de sacarosa a causa de altas temperaturas, causas ó reacciones químicas, deficiencias operativas y por supuesto por acción microbiana, más aún en épocas de lluvia, donde la humedad favorece el desarrollo de microorganismos indeseables. (Ravelo *et al*, 1991).

Múltiples estudios han demostrado que la acción microbiana es una de las causas principales de pérdidas de sacarosa en caña de azúcar y que el principal microorganismo causante es *Leuconostoc mesenteroides*, el cual induce la inversión y descompone la glucosa en diversos productos como ácido acético y/o láctico, los cuales disminuyen el pH del jugo o miel, además de producir la enzima dextransacarasa, la cual ocasiona la polimerización de unidades de glucosa produciéndose la llamada dextrana cuya reacción se muestra a continuación:



La dextrana es una sustancia mucilaginosa cuyo efecto perjudicial consiste en la pérdida de azúcar fermentable y la generación de una especie de película superficial al mismo tiempo aumenta la viscosidad del mosto de fermentación y su producción excesiva puede ocasionar serios taponamientos de líneas y equipos de producción (Mibielli & Filho 1999).

En cuanto a la acción térmica como tratamiento a los jugos de caña, ésta puede eliminar la mayoría de los microorganismos pero ocasiona la descomposición de la sacarosa para formar compuestos poliméricos y/o coloreados mediante reacción de maillard que constituyen los denominados infermentables ó aminoazúcares en jugos y mieles de caña, perjudiciales en cuanto a rendimiento se trata tanto en producción de azúcar como en fermentación para la producción de alcohol (Mibielli & Filho 1999).

### **2.6.3. Bacterias lácticas como contaminantes**

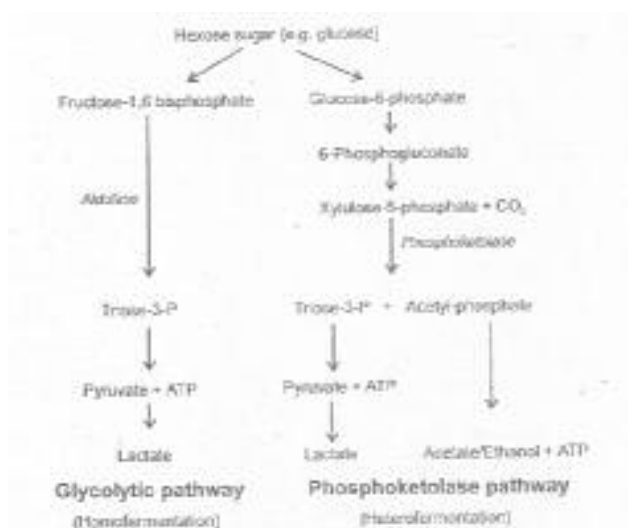
El grupo de bacterias lácticas está constituido por cocos y bacilos que comparten propiedades fisiológicas y bioquímicas y cuyo metabolismo generador de energía es fermentativo. Los sustratos fermentables son azúcares que incluyen variedad de monosacáridos, disacáridos y polialcoholes y cuyo producto final principal es el ácido láctico y en algunos casos el único dependiendo de la ruta metabólica que utilicen para convertir los carbohidratos, de ahí que las bacterias lácticas pueden dividirse en dos grupos según los productos resultantes de la fermentación de glucosa (Jacques *et al*, 1999).

#### **2.6.3.1. Metabolismo Homofermentativo y Heterofermentativo**

El grupo de bacterias lácticas denominado homofermentativo produce virtualmente un único producto de fermentación: el ácido láctico, mientras el grupo heterofermentativo produce etanol y CO<sub>2</sub> además de ácido láctico. Dicha diferencia está determinada por la presencia o ausencia de la enzima aldolasa, una de las enzimas claves en la glicólisis.

Los microorganismos heterofermentadores, carentes de aldolasa, no pueden descomponer el difosfato hexosa a fosfato triosa, en lugar de ello, oxidan la glucosa 6-fosfato a 6-fosfogluconato y entonces lo descarboxilan a pentosa fosfato, la cual se transforma en triosa fosfato y acetilfosfato por medio de la enzima fosfoctolasa (Jacques *et al*, 1999).

Esta triosa fosfato se convierte finalmente en ácido láctico con la producción neta de 1 ATP, mientras el acetilfosfato acepta electrones del NADH generado durante la producción de pentosa fosfato y así se convierte en etanol sin producción de ATP (Jacques et al, 1999). Debido a esto, los homofermentadores producen sólo un mol de ATP a partir de glucosa a diferencia de los heterofermentadores que producen dos moles de ATP igualmente a partir de glucosa (Jacques *et al*, 1999).



Fuente: *Modify of carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria*, 1983.

**Figura 4.** Fermentación de glucosa por bacterias ácido lácticas.

Estas rutas para el metabolismo de carbohidratos llevadas a cabo por las bacterias ácido lácticas pueden igualmente dividir este grupo en tres clases: homofermentativos obligados, heterofermentativos facultativos y heterofermentativos obligados, las especies de homofermentativos obligados el único producto final a partir de hexosas es el ácido láctico y la vía glicolítica es la única utilizada, las especies de este grupo producen la enzima aldolasa pero no producen la fosfoacetolasa, lo cual las inhabilita para fermentar pentosas y gluconato (Jacques *et al*, 1999).

Las especies de heterofermentativos facultativos poseen las dos enzimas aldolasa y fosfoacetolasa “inducible”, pues logran fermentar pentosas y gluconato sólo bajo ciertas condiciones pues la ruta de a fosfoacetolasa es inhibida en presencia de glucosa. (Jacques *et al*, 1999) y finalmente, las especies lácticas heterofermentativas obligadas generan una mezcla e productos finales bajo condiciones normales usando cualquiera de las vías metabólicas; estos productos finales incluyen ácido láctico, ácido acético, etanol y CO<sub>2</sub> así como pequeñas cantidades de ácidos fórmico y succínico, estos organismos excepto algunas cepas específicas, pueden fermentar pentosas y gluconato (Jacques *et al*, 1999).

**Tabla 5.** Tipos bacterianos según su metabolismo fermentativo.

Tipo	Ejemplos
Homofermentativos obligados	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> .
Heterofermentativos facultativos	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. pentosus</i> .
Heterofermentativos obligados	<i>Leuconostoc</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. fermentum</i> .

Tomado de: The alcohol textbook.

### 2.6.3.2. Requerimientos nutricionales de bacterias lácticas y subproductos

Las necesidades nutricionales de las bacterias lácticas son muy similares a las de las levaduras convirtiéndose así en sus principales antagonistas por nutrientes esenciales y factores de crecimiento que algunas veces están presentes en cantidades limitadas en los

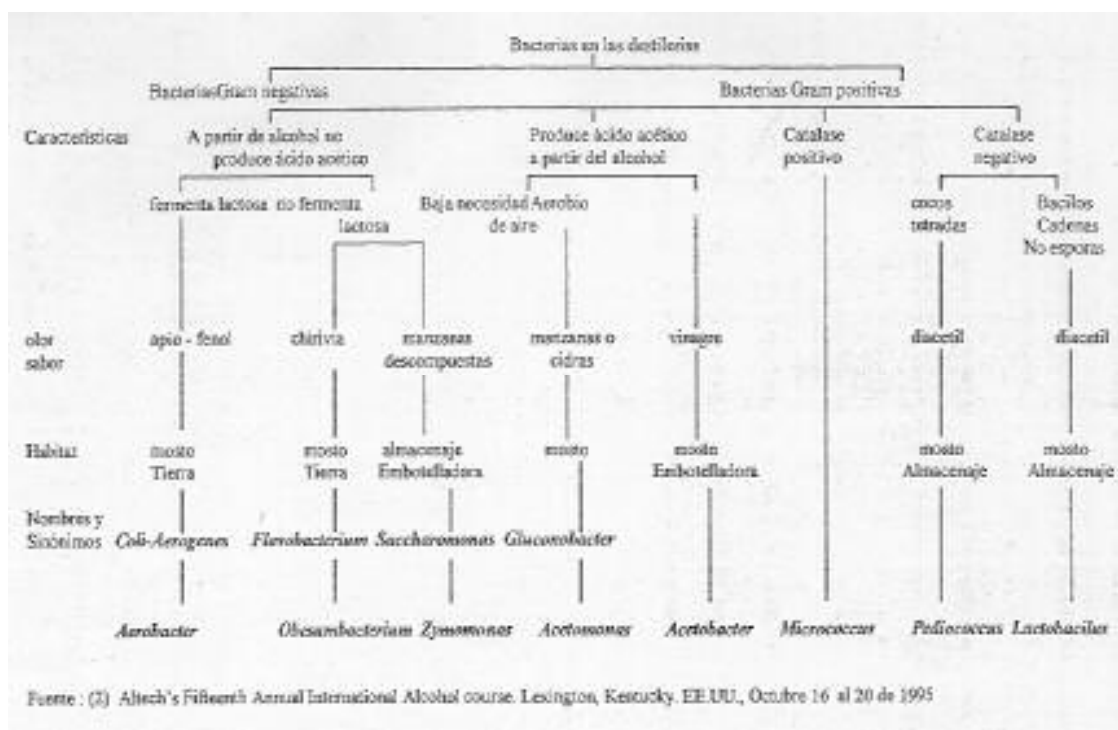
sustratos de fermentación, así como que son capaces de metabolizar las mismas fuentes de carbono para realizar su tipo de fermentación (Jacques *et al*, 1999).

*Nitrógeno*: varios aminoácidos y vitaminas son necesarias para el crecimiento de ácido lácticas, algunas homofermentativas y heterofermentativas poseen enzimas proteasas y pueden degradar las proteínas en formas asimilables de nitrógeno, sin embargo esta característica no es general y la mayoría de ellas toman el nitrógeno necesario del medio de cultivo en el que se hallen, de manera que en este sentido son fuertemente competitivas frente a las levaduras en sistemas de fermentación (Bely *et al*, 2003).

*Oxígeno*: las bacterias lácticas se han descrito como anaerobias, sin embargo se ha demostrado que prefieren ambientes microaerofílicos y pueden sobrevivir en ambientes donde el oxígeno está completamente ausente, manejando una tasa de crecimiento baja.

Este tipo bacteriano carece de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa, las cuales son usadas por bacterias aeróbicas para convertir compuestos tóxicos: el peróxido de hidrógeno y el superóxido respectivamente, ambos formados durante sus procesos respiratorios, sin embargo *L.plantarum* y algunas especies de *pediococcus* pueden sintetizar la catalasa bajo ciertas condiciones; los iones hierro y manganeso son importantes para la actividad de la catalasa así como para neutralizar el radical superóxido ( $O^{\cdot-}$ ) (Jacques *et al*, 1999).

*Saccharomyces cerevisiae* es catalasa positiva y crece adecuadamente bajo condiciones aeróbicas, con el oxígeno como requerimiento principal en los primeros estados de la fermentación por lo que constituye en otra ventaja competitiva de las bacterias lácticas bajo condiciones anaerobias en la fermentación de la levadura. (Jacques *et al*, 1999).

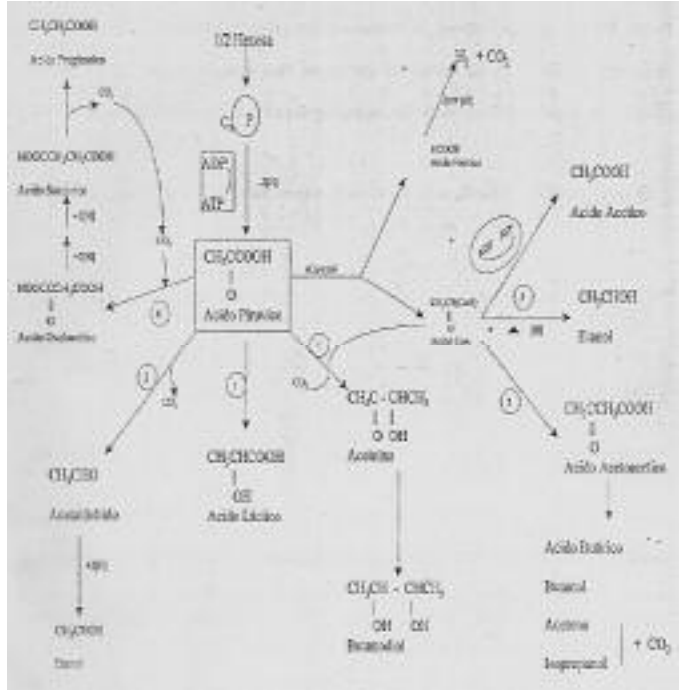


Fi

gura 5. Contaminantes bacterianos típicos en las destilerías.

*Subproductos que pueden afectar la calidad del producto:* la producción de algunos compuestos por bacterias contaminantes contribuye a la disminución de la calidad del producto final de la fermentación así como el desarrollo mismo del proceso pues el microorganismo fermentador puede ver afectada su fisiología por la presencia de sustancias extrañas y/o en altas cantidades (Jacques *et al*, 1999).

Los ácidos láctico y acético son productos que afectan notablemente las características organolépticas del producto (etanol), pues se producen a partir de él, así como la acroleína y el diacetil, una cetona que puede producirse durante la fermentación cuando el piruvato es convertido a ácido láctico y algunas especies de *Pediococcus* y *Lactobacillus* son los responsables de dicha producción, no obstante, las levaduras producen diacetil durante los primeros estados de la fermentación pero este es removido por la acción de varias enzimas y por la presencia de algunos aminoácidos en el medio (Jacques *et al*, 1999).



Fuente: Alltech's Fifteenth Annual International Alcohol course. Lexington, Kentucky.EEUU, Octubre 16 al 20 de 1995.

**Figura 6.** Productos desarrollados por contaminantes bacterianos en la fermentación.

**2.7. TRATAMIENTO DE CONTAMINACION BACTERIANA**

Los procedimientos de limpieza y sanitización para la remoción de contaminación bacteriana deben realizarse periódicamente y de acuerdo a las condiciones y necesidades del proceso. En sistemas de fermentación por lotes es más sencillo disminuir niveles de contaminantes que en un sistema de tipo continuo, en el último se ocasiona un efecto residual de diversos materiales en los tanques y cualquier sustancia, masa o partícula contaminada que no se remueva a tiempo, constituye una fuente potencial de contaminación que se transmite al sustrato fresco que ingresa al proceso (Koizumi, 2005).

En la actualidad, las destilerías utilizan diversos procedimientos para lograr una disminución de los efectos de la contaminación bacteriana y por ende su efecto en el desarrollo mismo del proceso, dentro de estos procedimientos se encuentra el uso de sustancias básicas, hipoclorito de sodio, aminas cuaternarias en el lavado de los tanques y la

adición de agentes antimicrobianos que actúan selectivamente sobre las bacterias y no tienen efecto sobre la levadura (Koizumi 2005).

Las sustancias más utilizadas en los procesos fermentativos son los antibióticos, que adicionados en concentraciones adecuadas ayudan al control de los principales contaminantes en el proceso, sin embargo, la resistencia que generan estos microorganismos tras la constante exposición a estos compuestos constituye uno de los principales motivos de estudio y ha permitido incursionar en la obtención de otros compuestos que puedan complementar el tratamiento. En general, se recomienda hacer una rotación de los mismos (antibióticos) para evitar la generación de dicha resistencia (Koizumi 2005).

### **2.7.1. Antibióticos**

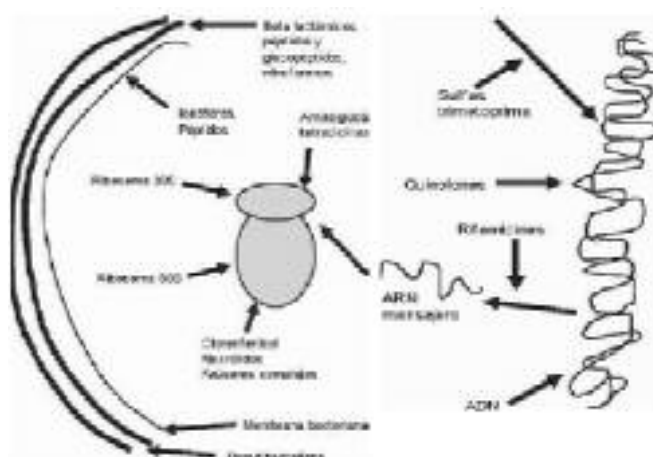
Además de los factores de control conocidos como la calidad de las materias primas, pasteurización del mosto, higiene en la manipulación, sanitización y buen mantenimiento, los antibióticos son utilizados como medida complementaria durante la fermentación de alcohol (Ruckle, 2005).

Los antibióticos son compuestos naturalmente producidos por algunos microorganismos con el propósito de inhibir a otros microorganismos, su objetivo en la naturaleza es la competencia por nutrientes como mecanismo de supervivencia. Son producidos industrialmente para ser utilizados en el tratamiento de infecciones tanto en humanos como en animales, así como en procesos industriales donde una contaminación constituye pérdidas en cuanto a rendimiento se refiere (Alcarde *et al*, 2003).

Los agentes antimicrobianos actúan por una serie de mecanismos, muy diferentes entre ellos y cuyos blancos se encuentran en diferentes regiones de la célula atacada. Las diversas regiones de ataque antibacteriano se consideran en general:

- Pared celular
- Membrana celular
- Síntesis de proteínas
- Síntesis de ácidos nucleicos (Errecalde, 2004).

En la figura 7 se presentan los tipos más comunes y sus blancos de acción dentro de la estructura microbiana.



Fuente: *Uso de Antimicrobianos en animales de consumo. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Errecalde J. 2004*

**Figura 7.** Esquema de estructuras bacterianas atacadas por diversos antimicrobianos

### 2.7.1.1. Penicilina y Virginamicina

Dentro de los antibióticos más utilizados en destilerías para controlar la contaminación por bacterias lácticas se encuentra la penicilina, producido por algunas especies de *Penicillium* como *P.notatum* y *P.chrysogenum*, es del tipo Beta-lactámico, su espectro de acción es contra bacterias Gram positivas y su mecanismo consiste en inhibir la síntesis de la pared celular limitándose la producción de nuevas células (Kelsall, 1995).

Las dosis de adición de este antibiótico dependen de la concentración inicial de contaminantes en el proceso y generalmente oscila entre 0.5 y 2.0 ppm (recomendación del fabricante), sin embargo, a nivel de planta generalmente se requieren dosis más altas, esto debido a que la penicilina no es muy estable y se ve parcialmente inactivado bajo pHs inferiores a 5.0 (Kelsall, 1995).

La estreptomycinina es un antibiótico del tipo aminoglucósido producido por especies del género *Streptomyces* y su mecanismo de acción consiste en la apertura de poros en la pared celular de bacterias Gram negativas cuyo resultado es la muerte celular en un corto periodo. Debido a su corto espectro, en las destilerías es utilizado con otros antibióticos para producir un efecto sinérgico; la mezcla más común es penicilina/estreptomycinina cuyo sinergismo ha sido demostrado siempre y cuando los valores de pH del medio sean inferiores a 7.0 (Ámsterdam 1996).

#### **2.7.1.2. Estreptograminas**

Constituyen un amplio conjunto de péptidos cíclicos con características muy peculiares producidas por diversas especies de *Streptomyces* y cada miembro se conforma por una combinación de dos moléculas o grupos: A y B, sin relación estructural alguna, las cuales corresponden a macrolactonas poliinsaturadas y hexadepsipéptidos cíclicos respectivamente; de cualquier manera, ambas inhiben la síntesis proteica bacteriana, actuando sobre el dominio de la peptidil-transferasa de la subunidad ribosomal 50S (Garza *et al*, 2000).

Sin lugar a dudas, una de las propiedades más atractivas de estos compuestos radica en el hecho de que las moléculas de ambos grupos actúan de forma sinérgica en contra de los agentes microbianos; ello origina su acción bactericida y reduce la posibilidad de que sobrevivan bacterias resistentes que pudieran surgir hacia uno u otro componentes, cuyos pesos moleculares fluctúan alrededor de 500 y 800 Daltons dependiendo del grupo al que

pertenezcan. Diversos laboratorios de investigación han logrado aislar numerosas estreptograminas, encontrando que en realidad éstas corresponden a un grupo poco homogéneo, de hecho, sólo se han obtenido algunas preparaciones comerciales utilizadas principalmente en agricultura entre las que destacan la pristinamicina y la virginamicina, la primera producida por *Streptomyces pristinaespiralis* y la segunda producida por *Streptomyces virginiae* (Garza *et al*, 2000).

Uno de los rasgos de estos compuestos consiste en su baja hidrosolubilidad, sin embargo, recientemente estudios realizados por Leclercq & Courvalin han permitido sintetizar derivados hidrosolubles que son comunes comercialmente, su espectro es amplio dado que su estructura está compuesta por dos grupos de moléculas cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de los eventos iniciales de la síntesis proteica en las bacterias blanco, de manera que esto se traduce en la liberación de cadenas peptídicas incompletas que conducen a un bloqueo total de su desarrollo posterior (Crecy *et al* 1997).

En particular la virginamicina inhibe la peptidil transferasa afectando la síntesis de proteínas de bacterias principalmente Gram positivas aerobias y anaerobias, de manera que se constituye como uno de los compuestos de interés industrial para el tratamiento de contaminantes. Su uso fue prohibido en 1999 en Europa por considerarse causante de algunos trastornos en los animales que consumían alimentos con este antimicrobiano como promotor de crecimiento, a pesar de ello, en estados unidos aún se utiliza en alimentos suministrados a cerdos (Errecalde 2004).

Varios estudios han monitoreado resistencia frente algunos antibióticos, de bacterias aisladas del agroecosistema de la caña de azúcar en Brasil, por ejemplo se registró crecimiento del 86% de las bacterias nativas en presencia constante de virginamicina y crecimiento del 43% en presencia constante de penicilina y serían necesarias concentraciones muy elevadas para lograr una inhibición real y teniendo en cuenta que el uso de estos compuestos debe ser mínimo, no es recomendable su adición en grandes

cantidades como en el caso del uso de vinaza como fertilizante de cultivos, de ahí la búsqueda de compuestos naturales para reemplazar los antibióticos se haya intensificado (Ruckle, 2005).

### **2.7.2. Otras Alternativas**

A raíz de los costos que implica el tratamiento de los contaminantes bacterianos en las fermentaciones alcohólicas se han buscado nuevas alternativas diferentes al calentamiento debido a su costo y a las pérdidas de azúcar que implica, además, la inquietud en cuanto al uso de los antibióticos en aplicaciones técnicas y agrícolas va en aumento ante el surgimiento de resistencias múltiples a los antibióticos y bacterias patogénicas, esto ha creado una fuerte demanda por alternativas naturales e inocuas pues los coproductos de la fermentación, ofrecen una contribución importante a la eficiencia económica de las destilerías y los productores de etanol, agregan valor, declarando que sus coproductos son libres de antibióticos (Koizumi 2005).

Ejemplo de ello es la Unión Europea (UE) donde los productos que se usen para alimento animal no pueden contener ningún tipo de antibiótico; de hecho, a raíz de estos cambios en la legislación de la UE, en EEUU también se está replanteando la utilización de antibióticos en alimentación animal. Concretamente, a partir del reglamento CE- 2821/98 del Consejo del 17/12/1998 y del reglamento 2205/01 de la Comisión de 14/11/2001 se ha prohibido el uso de Bacitracina de zinc, Espiramicina, *Virginamicina* y Tilosina (Santomá 2003).

Una de estas nuevas alternativas consiste en la utilización del lúpulo, el cuál posee una propiedad conservante que los cerveceros han reconocido por más de mil años, a pesar que sólo en la última década dichas propiedades han sido propiamente entendidas; la empresa Betatec HG produce una variedad de compuestos basados en lúpulo que han mostrado una capacidad para controlar el crecimiento de bacterias Gram positivas en varias aplicaciones.

Este tipo de productos antibacterianos naturales se obtienen del extracto de lúpulo con CO<sub>2</sub> mediante un proceso totalmente acuoso y contienen en esencia, ácidos de lúpulo y son muy activos contra una serie de bacterias que se encuentran típicamente durante la fermentación alcohólica como *Lactobacillus*, una concentración inhibitoria suficiente del antimicrobiano logrará impedir la generación de ácido láctico y ácido acético y por lo tanto contribuirá a prevenir las pérdidas en el rendimiento de etanol (Ruckle, 2005).

Si se adiciona una concentración bactericida al propagador es posible producir levadura limpia y como los ácidos de lúpulo son muy selectivos y pueden eliminar bacterias sin que esto afecte el rendimiento de la levadura, el resultado es una mejor propagación de la misma y por ende una fermentación más rápida (Ruckle, 2005).

Los componentes del lúpulo que actúan como agentes antimicrobianos están contenidos en la flor, en glándulas conocidas como lupulinas donde los alfa-ácidos son isomerizados mediante calentamiento a Iso-alfa-ácidos, siendo estos últimos los que realmente poseen propiedades preservantes que consisten en el bloqueo de las membranas biológicas de las bacterias (Ruckle, 2005).

En 1993, W J Simpson, investigó sobre la sensibilidad de las bacterias lácticas frente a los ácidos de lúpulo, y demostró que éstos actúan como transportadores móviles de ionóforos e inhiben el crecimiento microbiano por disipación del gradiente transmembranal de protones, como consecuencia de esto, la asimilación de azúcar por las células bacterianas es inhibida y por consiguiente a liberación de sus metabolitos como ácido láctico y/o ácido acético no pueden ser producidos ni liberados al medio (Ruckle 2005).

En las plantas de alcohol carburante la infección bacteriana es monitoreada por recuento en placa y los ácidos generados son determinados mediante HPLC y dependiendo del volumen de fermentación se evalúan las pérdidas por contaminación cuyo valor no debe superar el 0.5% m/v idealmente (Ruckle 2005).

No sólo la utilización de compuestos químicos sintéticos o naturales, constituye la alternativa para el control de las poblaciones bacterianas en una fermentación alcohólica, en un estudio realizado por Alcarde *et al*, 2002, pudo evaluarse la influencia de la radiación en la reducción de algunas bacterias de los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus* que usualmente contaminan los jugos de caña y, efectivamente el tratamiento con este tipo de radiación reduce la concentración bacteriana y como consecuencia, la acidez volátil producida es menor y la viabilidad de la levadura no se ve afectada (Alcarde *et al*, 2002).

De esta forma se puede entonces afirmar que existen varias formas de controlar los contaminantes en una fermentación alcohólica y lo importante es escoger el tipo de tratamiento adecuado no sólo según la flora microbiana presente y su incidencia en el rendimiento del proceso sino de acuerdo a los costos de inversión teniendo en cuenta volúmenes de fermentación.

### **3. FORMULACION DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES**

#### **3.1. FORMULACION DEL PROBLEMA**

En la industria, el principal objetivo a nivel de producción es aprovechar al máximo las materias primas, de manera que el problema de contaminación encontrado a nivel de planta conduce a la evaluación de la incidencia de los contaminantes bacterianos (Bacterias ácido lácticas) en el rendimiento del proceso de fermentación, pues actualmente los sustratos provenientes de la caña de azúcar tienen baja oferta y sus costos son elevados de ahí que deba cuantificarse toda pérdida en sustrato y tomarse medidas preventivas y/o de control durante las etapas del proceso, además de evaluarse los métodos utilizados actualmente y verificarse su efectividad, como es el caso del uso de antibiótico durante el proceso de propagación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **3.2. JUSTIFICACION**

Debido a los altos costos actuales de las materias primas para fermentación alcohólica y a la necesidad de aprovechar al máximo los contenidos de azúcar fermentable en las mismas se desarrolló el presente trabajo de investigación con el fin de determinar si el rendimiento de la fermentación se ve afectado por los niveles de contaminación de bacterias ácido lácticas típicamente encontrados a nivel de planta, tanto en la etapa de reproducción como en la de fermentación, traduciéndose esto en pérdidas de azúcar que deberían ser cuantificadas con el fin de tomar medidas al respecto y conocer si la utilización del antibiótico aporta un considerable beneficio al proceso.

El tipo de competencia microbiana entre bacterias contaminantes y levaduras en el proceso es un tipo de antagonismo que se presenta comúnmente cuando se fermentan sustratos azucarados y con contenido de agua suficiente para albergar microflora, que en este caso está conformado principalmente por las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), estas bacterias

son las principales contaminantes en el proceso de fermentación debido a la condición de anaerobiosis, porque además de consumir el sustrato, generan subproductos que pueden inhibir la levadura y bajar la calidad organoléptica del producto.

Además, y debido a los tiempos de retención del sustrato en los tanques, se favorece el desarrollo de estos microorganismos anaerobios facultativos que soportan ambientes extremos e incluso crean resistencia a diversos antimicrobianos luego de ser expuestos constantemente a los mismos.

En caso de obtener resultados poco favorables en cuanto a la utilización de los antibióticos podría tenerse en cuenta una variación en las concentraciones y frecuencia de uso de los mismos y/o la variación en uno de los parámetros del proceso como por ejemplo un descenso en el pH del sustrato para disminuir la carga microbiana presente.

### **3.3. ANTECEDENTES**

En general, los niveles típicos de bacterias lácticas en la etapa de propagación de la levadura están en el orden de  $10^4$  y  $10^6$  UFC/ml, los cuales, comparados con la población de levadura ( $10^8$  UFC/ml) son significativamente altas.

Teniendo en cuenta el tiempo de duplicación de bacterias menor frente al de levaduras, éstas podrían alcanzar niveles superiores en el mismo tiempo y como ambas poblaciones viven a expensas del mismo sustrato bajo competencia continua lo cual conlleva no sólo a la pérdida de sustrato sino también a la generación de compuestos indeseables en la fermentación alcohólica con la consecuente disminución en el rendimiento de la misma.

Para el control de estas bacterias contaminantes en proceso, en las grandes destilerías de Brasil se han utilizado infinidad de compuestos antibióticos en los sistemas de fermentación, en especial sistemas de tipo continuo donde se recircula la levadura, sin

embargo, con el tiempo de uso, éstos pierden su efectividad sobre el grupo microbiano determinado y dejan de ser un mecanismo de control adecuado (Ruckle, 2005).

Ante esta situación, las destilerías en Colombia han tomado en cuenta otras opciones de tratamiento al sustrato antes de iniciar la fermentación como aumento en los tiempos de calentamiento de las mieles y jugos de caña, descenso importante del pH de los mismos para garantizar que las bacterias no puedan reproducirse bajo estas condiciones, al mismo tiempo que la levadura no se afecte en su desarrollo y fermentación u opciones innovadoras como son la utilización de compuestos orgánicos como extractos de plantas para evitar el uso de compuestos con efecto residual que permanezcan en las vinazas, cuyo atractivo comercial es ser un fertilizante de tipo orgánico libre de químicos como es el caso de los antibióticos (Ruckle, 2005).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la incidencia de contaminación por bacterias ácido lácticas en el rendimiento de la fermentación alcohólica, utilizando como sustrato los subproductos de extracción de azúcar a partir de la caña y el uso de antibióticos durante la etapa de reproducción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como mecanismo de control de dichos contaminantes.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar cuantitativamente cómo afectan los niveles de contaminación el rendimiento de la fermentación en una planta de alcohol del Valle del Cauca.
- Evaluar la efectividad del uso de antibióticos como medida de control de contaminación por bacterias ácido lácticas durante el proceso de reproducción de la levadura.
- Considerar el descenso del pH en los medios de reproducción y fermentación como alternativa para el control de contaminantes de tipo ácido lácticas.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **5.1. UBICACIÓN Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

La presente investigación se llevó a cabo en la planta alcoquímica de SUCROMILES S.A, empresa biotecnológica ubicada en la recta Cali-Palmira Km 18 Departamento Valle del Cauca Colombia.

Las materias primas utilizadas para los diferentes ensayos dentro del diseño experimental fueron caracterizadas previamente para garantizar la calidad de las mismas y se incluyó el análisis microbiológico de los sustratos y la levadura (Ver Anexos 3 y 4). El manejo y almacenamiento de las muestras se realizó bajo condiciones de refrigeración (7°C) y en material estéril.

Dentro del experimento se distinguen dos etapas fundamentales: Etapa de reproducción de la levadura y Etapa de fermentación.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en un sistema de fermentación por lotes simulando lo que se lleva a cabo a nivel de planta en la cual existen una cuba madre donde se inicia la reproducción y se inocula la crema de levadura, dos cubas de reproducción adicionales que parten de esta cuba madre y son alimentadas constantemente con melaza ó miel de tercera dilución y donde se mantiene constantemente la levadura para realizar los inóculos en seis fermentadores, los cuales se alimentan con melaza o miel de segunda dilución y en los que se maneja un volumen efectivo de trabajo que oscila entre 230000 y 250000 litros y del cual el 30% corresponde al inóculo obtenido en las cubas de reproducción.

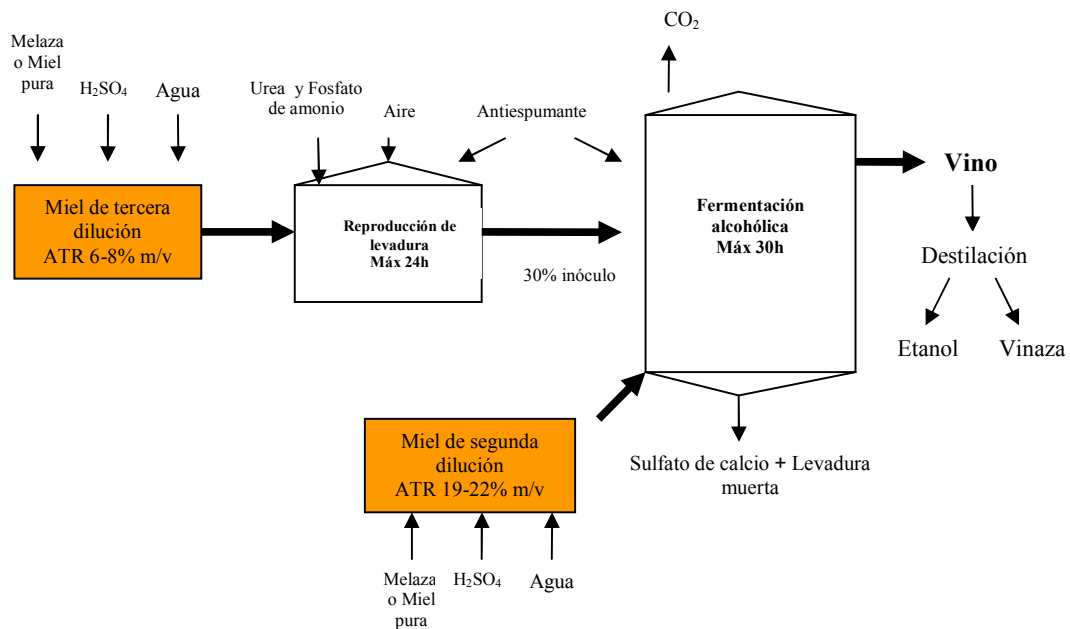
Las melazas o mieles diluidas en el proceso pueden dividirse de la siguiente forma de acuerdo a la etapa en la que son utilizadas:

- Melaza ó miel de tercera dilución: utilizada durante la etapa de reproducción de la levadura y la cual, tras adición de agua, ácido sulfúrico y homogenización, registra

un % de azúcares totales reductores entre 6%-8% m/v y cuya densidad depende del tipo de miel utilizada.

- Melaza ó miel de segunda dilución: utilizada durante la etapa de fermentación y la cual tras adición de agua, ácido sulfúrico y homogenización, registra un % de azúcares totales reductores entre 19%-22% m/v.

El esquema del proceso puede resumirse en la figura 8:



**Figura 8.** Esquema del proceso de fermentación por lotes

El diseño de cada etapa (reproducción y fermentación) se llevó a cabo contemplando parámetros (condiciones que se mantuvieron estables entre ensayos), variables de control (condiciones a evaluar entre ensayos) y variables de respuesta a través de las cuales se determinó el resultado de la evaluación.

### 5.1.1. Parámetros y variables en la etapa de reproducción

Parámetro	Valores	Unidades
Temperatura	30-32	°C

pH	4.6	NA
Aireación	5	L/mín
Nutrientes (urea y fosfato)	0,6 y 0,4 (respectivamente)	g/900ml
Antiespumante	30	ppm
Concentración de azúcares reductores (ATR)	6-8	% m/v
Población inicial de levadura	$3 \times 10^8$	UFC/ml
Viabilidad inicial de levadura	>85%	% células vivas
Morfología de la levadura	Homogenea/Heterogenea	NA
Tiempo de reproducción	24	horas

Variables de control (independientes)	Valores	Unidades
Concentración de los compuestos antibióticos	0.5, 1.0 y 2.0	ppm

Variables de Respuesta (dependientes)	Unidades
Concentración de microorganismos contaminantes al final del proceso	UFC/ml de Bacterias lácticas
Población de levadura al final de la propagación	UFC/ml de células de levadura
Acidez volátil al final del proceso	ppm

### 5.1.2. Parámetros y variables en la etapa de fermentación

Parámetros	Valores	Unidades
Volumen de inóculo	30	% del volumen efectivo de trabajo (VET)
Población de levadura en el inóculo	$>3 \times 10^8$	células/ml
Viabilidad de la levadura	>85%	% células vivas
Concentración de azúcares reductores (ATR)	19-22%	% m/v
Adición de antiespumante	50	ppm
Tiempo de fermentación	30	horas

Variables de control (independientes)	Unidades
Población inicial de contaminantes bacterianos (BAL) en los diferentes tratamientos.	UFC/ml

<b>Variables de respuesta (dependientes)</b>	<b>Unidades</b>
Porcentaje de alcohol al final de la fermentación	% v/v
Azúcar reductor residual (AR)	% m/v
Población de contaminantes bacterianos (BAL)	UFC/ml
Rendimiento del proceso de fermentación	%
Eficiencia del proceso de fermentación	%
Productividad	g/L * h

\*NA: No Aplica.

## **5.2. METODOS**

### **5.2.1. Pretratamiento del sustrato**

En todos los casos se realizó precalentamiento por inyección de vapor alcanzando los 90°C del sustrato tanto para la etapa de reproducción como para la etapa de fermentación (mieles de tercera y segunda dilución respectivamente) para la producción de alcohol con melaza y jugo de caña concentrado, seguido de enfriamiento hasta 32°C.

### **Etapa de Reproducción**

#### **5.2.2. Tratamiento con Antibiótico**

##### **5.2.2.1 Hidratación de levadura activa seca**

Se pesaron 4g de levadura activa seca (por cada ensayo) e hidrataron mediante agitación mecánica en un vaso de precipitado estéril con agua a 41°C. Se determinó la población y viabilidad de la levadura hidratada mediante recuento en cámara de Neubauer (Anexo 2).

##### **5.2.2.2. Preparación del sustrato para la reproducción**

El medio de cultivo para esta etapa del proceso correspondió a melaza de tercera dilución cuya densidad fue  $\leq 1.070$ g/ml y jugo de caña concentrado de tercera dilución cuya

densidad fue  $\leq 1.030$ g/ml. Estas densidades corresponden aproximadamente a un 6-8% p/v de azúcares totales reductores en cada uno de los casos. El pH inicial fue de 4.6 regulado por adición de ácido sulfúrico.

Se inocularon 3ml de la levadura hidratada en 900ml de miel de tercera dilución y se adicionaron los nutrientes urea y fosfato de amonio a una concentración de 1.1g/L y 0.67g/L respectivamente, las cuales equivalen a 1g de urea y 0.6g de fosfato de amonio por cada 900ml de medio.

Finalmente se adicionaron 30 ppm de antiespumante prosil (Certificado de calidad e inocuidad para la levadura por: Protécnica Ingeniería Ltda) para evitar la formación excesiva de espuma y facilitar la medición de los volúmenes deseados para iniciar su propagación.

La inoculación de la levadura hidratada para los diversos tratamientos se realizó cuando la melaza y/o jugo de caña de tercera dilución (previamente precalentados a 90°C) alcanzaron una temperatura de 32°C.

La temperatura se mantuvo constante a 30°C en baño termostataado y el oxígeno necesario en esta etapa se suministró mediante la inyección de aire a un flujo de 5 L/mín durante 24 horas de proceso de reproducción.

Al tiempo "0", así como transcurrido el tiempo de reproducción (24 horas) se realizó la determinación de la población y viabilidad de la levadura (Anexo 2), Adicionalmente se determinaron los niveles de contaminación con los que se inició el proceso y se cuantificó la acidez volátil (anexos 3 y 6).

Los ensayos se dividieron de la siguiente manera según la concentración de antibiótico adicionada:

**Tabla 6.** Tratamientos con antibiótico para la etapa de propagación con melaza y jugo de caña

<b>TRATAMIENTO CON PENICILINA</b>	<b>TRATAMIENTO CON VIRGINAMICINA</b>
Control (0 ppm)	Control (0 ppm)
0.5 ppm	0.5 ppm
1.0 ppm	1.0 ppm
2.0 ppm	2.0 ppm

Cada ensayo tanto para penicilina como para virginamicina a las concentraciones mencionadas (0.5, 1.0 y 2.0 ppm y su respectivo control) y para los dos sustratos de estudio (melaza y jugo de caña concentrado) se llevó a cabo en cuatro repeticiones bajo los mismos parámetros.

#### **5.2.2.3. Determinación de los niveles de contaminación**

Además de determinar la morfología de la levadura hidratada que ingresó al proceso, se determinaron los niveles de contaminación por bacterias ácido lácticas en los sustratos sin dilución, la melaza y el jugo de caña de tercera dilución tanto al iniciar (hora 0), como al finalizar el proceso de reproducción (24 horas después) tras los diferentes tratamientos con el antibiótico respectivo al igual que en los controles.

Esta población contaminante (Bacterias ácido lácticas-BAL) se determinó mediante recuento en placa (siembra en profundidad) en medio MRS a partir de diluciones decimales de la muestra (Anexos 2 y 3).

### **Etapa de fermentación**

#### **5.2.2.4. Determinación del inóculo para la fermentación**

Una vez se determinó la población y viabilidad de la levadura para cada ensayo, se midió el volumen de inóculo que se llevó a la fermentación (900ml) garantizando que el número de levaduras inoculadas se encontrara alrededor de  $3 \times 10^8$  células/ml, determinadas mediante recuento en cámara de Neubauer, para iniciar el proceso.

Igualmente, se determinó mediante recuento en placa en medio MRS, el número de bacterias contaminantes que ingresaron a la fermentación como parte del inóculo tras los diferentes tratamientos con los antibióticos.

Para cada concentración de penicilina ó virginamicina utilizada en esta etapa de reproducción, se realizó un ensayo de fermentación con el fin de determinar el efecto del mismo (tratamiento con el antimicrobiano) en el rendimiento final del proceso.

#### **5.2.2.5. Preparación del sustrato para la fermentación**

El sustrato para esta etapa del proceso fue melaza de segunda dilución a una densidad se 1.100 - 1.120 g/ml y Jugo de caña concentrado de segunda dilución cuya densidad estaba entre 1.070 y 1.100, lo cual equivale a 19-22% (p/v) de azúcares totales reductores.

El pH se ajustó a 4.6 con la adición de ácido sulfúrico, la determinación del porcentaje de azúcar exacto alimentado a la fermentación se realizó mediante titulación por el método de felhing (Anexo 7), la densidad del sustrato fue directamente proporcional a la concentración de azúcar que se determinó previamente.

Las fermentaciones fueron alimentadas siguiendo el modelo utilizado en planta, el volumen efectivo de trabajo (3000ml) se dividió en seis (6) volúmenes iguales de 350ml para alimentar cada hora, restando el volumen del inóculo (900ml) el cual se adicionó con la primera alimentación en la hora cero (simulando lo que se lleva a cabo en la planta), para lograr una adaptación lenta a la presión osmótica generada por la concentración de azúcares en el sustrato y disminuir tiempo de fermentación.

Durante el proceso de fermentación se generó la condición de anaerobiosis al sistema a través de un tapón hermético en la parte superior de la botella Schoot pero permitiendo la eficiente salida del CO<sub>2</sub> generado en el proceso a través de una extensión de la botella conectada a una manguera.

Durante el tiempo de llenado se adicionaron 50 ppm del antiespumante para evitar pérdidas de sustrato por generación de espuma, además, se proporcionó agitación en forma circular mediante plancha agitadora, para simular el sistema de “recirculado” que se lleva a cabo en planta, de manera que la totalidad de la población de levadura estuviera en contacto con el sustrato a fermentar y ésta, no tendiera a sedimentarse afectando el tiempo y/o desarrollo del proceso.

#### **5.2.2.6. Determinación del Rendimiento (%), Eficiencia (%) y Productividad (g/L\*h) del proceso.**

Para cada uno de los tratamientos con el antibiótico y los controles respectivos, el porcentaje de alcohol se expresó en %v/v y el porcentaje de azúcar residual en (p/v) obtenidos después de la fermentación, a partir de estos resultados y teniendo en cuenta el azúcar reductor inicial que ingresó al proceso, se calculó el rendimiento experimental de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Producto generado (g)}}{\text{Sustrato consumido (g)}} \times 100$$

Donde tanto el producto generado como el sustrato consumido fueron expresados en gramos. El sustrato consumido resultó de la diferencia entre el sustrato inicial, incluyendo el consumido en la etapa de reproducción y el sustrato final, es decir, el azúcar reductor presente en la miel de tercera y segunda dilución menos el azúcar residual al final del proceso, respectivamente.

Para la determinación de la eficiencia global del proceso se reemplazó la masa de alcohol, obtenida a través del método colorimétrico por destilación con dicromato de potasio

(Anexo 8), generada en el proceso y la masa de alcohol esperada teóricamente en la fórmula:

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{Rendimiento real}}{\text{Rendimiento teórico (Determinado estequiométricamente a partir del azúcar ingresado al proceso y afectado en 0,95 de acuerdo a Pasteur)}} * 100$$

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{Masa de alcohol producido (g)}}{\text{Masa teórica de alcohol a partir del sustrato (g)}} * 100$$

Además de rendimiento y eficiencia se calculó la productividad para cada una de las fermentaciones, que se expresó de la siguiente manera:

$$\text{Productividad} = \frac{\text{masa de alcohol producido(g)}}{(\text{volumen total (L)} * \text{Tiempo de fermentación(h)})}$$

Los resultados de rendimiento, eficiencia y productividad del proceso de fermentación, obtenidos para cada uno de los tratamientos con los antibióticos, se compararon entre sí y se determinó el tipo de tratamiento adecuado a utilizar en la fermentación alcohólica.

### **5.2.3. Tratamiento con descenso pH**

Las condiciones y parámetros de fermentación fueron similares a las utilizadas en el caso de los tratamientos con el antibiótico. La variación de pH se realizó durante las dos etapas, Reproducción y Fermentación:

Control: pH 4.6 (manejado en planta actualmente)

Tratamiento 1: pH 4.0

Tratamiento 2: pH 3.5

Tratamiento 3: pH 3.0

Para cada uno de los tratamientos se adicionó ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para alcanzar el pH esperado (no se adicionó antibiótico durante la propagación). Igualmente se determinó la

concentración de bacterias lácticas en los sustratos de tercera y segunda dilución iniciales (antes de adicionar el ácido) y de esta forma se estableció la efectividad de este tratamiento en el control de contaminantes y probablemente en el rendimiento de la fermentación al igual que para los tratamientos anteriores (antibiótico a 0.5, 1.0 y 2.0ppm).

De cada ensayo (pH 3.0, 3.5 y 4.0 con su respectivo control) se realizaron cuatro repeticiones bajo los mismos parámetros para obtener una matriz de datos representativa. Los datos se registraron de forma codificada para su posterior análisis.

### 5.2.3.1. Diseño Experimental

**Tabla 7.** Tratamiento con descenso de pH para la etapa de propagación con melaza y jugo de caña concentrado

TRATAMIENTO DESCENSO DE pH
pH 3.0
pH 3.5
pH 4.0
Control (pH 4.6)

### 5.3. RECOLECCION DE LA INFORMACIÓN

Debido a que la investigación es de tipo experimental, la recolección de la información se llevó a cabo paralelo a los ensayos, los datos arrojados por cada uno de ellos, se codificaron y expresaron mediante una sigla con el fin de facilitar su tabulación como se muestra a continuación:

Tratamiento con Penicilina (P)

Tratamiento con Virginamicina (V)

Tratamiento con pH (H)

Melaza como sustrato (A)

Jugo de caña concentrado como sustrato (B)

Concentración de antibiótico 0.5 ppm (1)

Concentración de antibiótico 1.0 ppm (2)

Concentración de antibiótico 2.0 ppm (3)

Control (sin adición de antibiótico) (4)

Tratamiento con pH 3.0 (1)

Tratamiento con pH 3.5 (2)

Tratamiento con pH 4.0 (3)

Tratamiento con pH 4.6 (4)

Utilizando esta codificación se diligenciaron formatos (Ver Anexos 9 y 10) que incluyó los siguientes valores: la concentración de azúcar, la población de levadura, la población de contaminantes, la acidez volátil, la densidad y demás datos que se obtuvieron tanto en el proceso de reproducción como en el de fermentación para cada tratamiento así como para los controles respectivos.

#### **5.4. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN**

El análisis de los datos obtenidos experimentalmente se realizó mediante análisis de varianza de doble vía para cada uno de los sustratos evaluados (ANOVA, dos vías).

El análisis se realizó con un nivel de significancia de 0.05, a partir de los datos de rendimiento.

En el caso del tratamiento de disminución de pH, las fuentes de variación fueron los diferentes valores de pH a los que se sometieron los sustratos de fermentación así como el efecto a partir de los mismos. El análisis de varianza se realizó a partir del rendimiento (producto/sustrato) calculado con los datos resultantes de cada ensayo con un nivel de significancia de 0.05.

Para los datos de productividad en los que se involucra el tiempo de fermentación, se determinaron las medidas de tendencia central y se estableció cuál tratamiento es el más efectivo teniendo en cuenta el sustrato y el producto evaluado.

## **6. RESULTADOS**

Los datos utilizados para la construcción tanto de las tablas como de las figuras que aparecen en este capítulo, salvo que se indique lo contrario en el texto, son los datos promedio de las cuatro repeticiones realizadas para cada ensayo.

### 6.1. Caracterización del sustrato

**Tabla 8.** Características físico-químicas y microbiológicas de melaza y jugo de caña

Parámetros	Melaza	Jugo de caña concentrado
Azúcares totales reductores (%m/m)	53.63	72.70
Grados Brix (%)	85.80	72.80
Densidad (g/ml)	1.41	1.34
Sólidos directos (%m/m)	5.30	0.67
Sólidos ácidos (%m/m)	8.77	0.58
Acidez volátil (ppm)	6530	1602
Recuento de Bacterias Acido lácticas (UFC/g)	7.1E+04	3.4E+02
Recuento de coliformes totales (UFC/g)	<10	<10
Recuento de Levaduras salvajes (UFC/g)	<10	<10

En la caracterización de los sustratos puros antes de iniciar la fermentación (sin calentamiento), que se resume en la tabla 10, puede observarse que los recuentos de coliformes totales y levaduras salvajes son <10 UFC/g de muestra, mientras que los recuentos de bacterias ácido lácticas son del orden de  $10^4$  y  $10^2$  para melaza y jugo de caña respectivamente. Los recuentos registrados en la tabla anterior para el jugo de caña concentrado (sin dilución ni calentamiento previo) corresponden al crecimiento de colonias mucilaginosas en dilución  $10^1$  de la muestra pura: estas colonias son típicas del género *Leuconostoc* (Ver figura 9a).

En las diluciones mayores, el crecimiento típico observado correspondió al género *Lactobacillus* (Ver figura 9b), es decir colonias pequeñas puntiformes inmersas en el medio

de cultivo MRS, similares a las obtenidas en todas las diluciones para el caso de la melaza de caña.

Para cada uno de los casos se realizaron pruebas confirmatorias (Anexo 5) para las colonias presuntivas que se resumen en las Tabla 11.

**Tabla 9.** Pruebas de identificación de los microorganismos aislados de los sustratos de fermentación

<b>Pruebas</b>	<b>Género <i>Leuconostoc</i> (Aislado en Jugo de caña concentrado)</b>	<b>Género <i>Lactobacillus</i> (Aislado en Melaza y Jugo de caña concentrado)</b>
Crecimiento en medio MRS	Colonias mucilaginosas transparentes redondas similares a gotas de agua.	Colonias muy pequeñas blancas puntiformes
Coloración de Gram	Cocos Gram positivos	Bacilos Gram positivos
Crecimiento en medio Hipersacarosa	Crecimiento Positivo (+)	Crecimiento Negativo (-)

El tipo de crecimiento puntiforme en medio MRS de bacilos Gram positivos y cuya fuente de aislamiento son sustratos azucarados como las mieles de caña, corresponde a presuntivo del género *Lactobacillus* y normalmente se encuentra a lo largo de los procesos de fermentación. Estas bacterias lácticas se encuentran tanto en los medios de propagación de la levadura como en los vinos al final del proceso.

En las plantas industriales, el género *Lactobacillus*, gracias a su maquinaria metabólica logra crecer y/o mantenerse en ambientes aerobios, microaerofílicos e incluso en anaerobiosis (Jacques *et al*, 1999).



**Figura 9a.** Colonias en medio MRS a partir de jugo de caña concentrado sin calentamiento típicas del género *Leuconostoc*.



**Figura 9b.** Colonias puntiformes en medio MRS aisladas en melaza y jugo de caña típicas del género *Lactobacillus*.

## 6.2. Dilución de sustrato en la etapa de Reproducción

Cada una de las mieles puras a utilizar como sustratos de fermentación (melaza y jugo de caña), se diluyó con agua de pozo hasta lograr un porcentaje de azúcares totales reductores (ATR) entre 6 y 8% (p/v). Esta melaza o jugo de caña diluido se denomina miel de tercera dilución porque se obtiene después de realizar dos diluciones previas.

En la tabla 12, se presentan las características iniciales de la miel de tercera dilución con la que se inició el proceso de propagación de la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* a partir de los dos sustratos. Estos datos iniciales permitieron conocer bajo qué condiciones inició el proceso, para posteriormente ser comparados con los obtenidos tras los diferentes tratamientos objeto de la presente investigación.

**Tabla 10.** Características iniciales de Miel de Tercera dilución

Sustrato	Ensayos	Densidad (g/ml)	Acidez Volátil (ppm)	Concentración de BAL (UFC/ml)
Melaza	Penicilina	1.050	357	4.0 E+03
	Virginamicina	1.049	364	3.5 E+03
	pH	1.051	362	3.3 E+03
Jugo de Caña Concentrado	Penicilina	1.025	128	3.6 E+02
	Virginamicina	1.024	145	2.9 E+02
	pH	1.025	145	2.1 E+02

Los recuentos de bacterias lácticas corresponden a crecimiento de colonias planas puntiformes típicas del género *Lactobacillus*, confirmadas mediante coloración de Gram y crecimiento en Agar hipersacarosa (Anexo 5).

No se registra crecimiento de colonias mucilaginosas transparentes y grandes en el medio de cultivo (MRS) después del calentamiento (70°C) de ninguno de los dos sustratos evaluados.

Los valores de acidez volátil en melaza duplican los valores obtenidos para el jugo de caña concentrado al inicio de la etapa de reproducción, igualmente los recuentos de bacterias lácticas en melaza, exceden en una unidad logarítmica los registrados en el jugo de caña.

### 6.3. Dilución de sustrato en la etapa de Fermentación

A partir de las mieles concentradas (melaza y jugo de caña), se obtuvieron mieles de segunda dilución para iniciar la fermentación a través de la adición de agua (cantidad determinada a partir de los azúcares totales reductores de la miel concentrada) logrando una concentración de azúcares totales reductores entre 19 y 22% m/v.

Las características iniciales de las mieles de segunda dilución con las que se realizó la etapa de fermentación se registran en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Características iniciales de Miel de Segunda dilución

Sustrato	Ensayos	Densidad (g/ml)	Acidez Volátil (ppm)	Concentración de BAL (UFC/ml)
Melaza	Penicilina	1.099	705	2.1 E+03
	Virginamicina	1.100	814	2.0 E+03
	pH	1.100	816	3.4 E+03
Jugo de Caña Concentrado	Penicilina	1.081	338	3.4 E+02
	Virginamicina	1.080	334	3.0 E+02
	pH	1.078	332	2.2 E+02

Los recuentos de bacterias lácticas corresponden a crecimiento de colonias planas puntiformes típicas del género *Lactobacillus*, confirmadas mediante coloración de Gram y crecimiento en Agar hipersacarosa (Anexo 5).

Nuevamente se observa que los valores de acidez volátil así como los recuentos de bacterias lácticas son más altos en melaza que en jugo de caña.

#### **6.4. Preparación y alistamiento de la levadura**

En cuanto a la cepa, se utilizó levadura activa seca del género *Saccharomyces* especie *cerevisiae*. Previo a iniciar cada etapa de reproducción en todos los ensayos, se realizó recuento en cámara de Neubauer (Anexo 2) y aislamiento en medio YM (Anexo 4), una vez se realizó la hidratación de la levadura a 41°C con el fin de determinar tanto la población como la viabilidad de la misma así como la homogeneidad de las colonias en medio sólido.

La viabilidad de la levadura hidratada fue comprobada a través del crecimiento en el medio sólido YM tal como se observa en la tabla 12, análisis que expresó que el microorganismo fermentador se encontraba en condiciones adecuadas para iniciar el proceso en todos los tratamientos, en la figura 10 se observan las colonias de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura activa hidratada) en medio YM.

El recuento inicial de la levadura hidratada se realizó mediante recuento en cámara de Neubauer (Anexo 2) y en general para todos los ensayos fue del orden de  $10^9$  UFC/ml de muestra y el porcentaje de viabilidad en todos los casos fue superior al 90%.

**Tabla 12.** Crecimiento en medio sólido de la levadura hidratada y recuento en cámara de Neubauer

Ensayo	Crecimiento en medio YM (Positivo/Negativo)	Población de la levadura en cámara de Neubauer (células/ml)	% de viabilidad de la levadura en cámara de Neubauer
Melaza con penicilina	Positivo	2.4E+09	92
Melaza con Virginamicina	Positivo	3.0E+09	94
Jugo de caña con Penicilina	Positivo	3.1E+09	92
Jugo de caña con Virginamicina	Positivo	2.7E+09	93
Tratamiento con pH Melaza	Positivo	2.7E+09	91
Tratamiento con pH Jugo de caña	Positivo	3.0E+09	92



**Figura 10.** Crecimiento positivo en medio sólido YM de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*

## 6.5. TRATAMIENTO CON ANTIBIÓTICO EN LA ETAPA DE REPRODUCCIÓN

### 6.5.1. Reproducción con Melaza

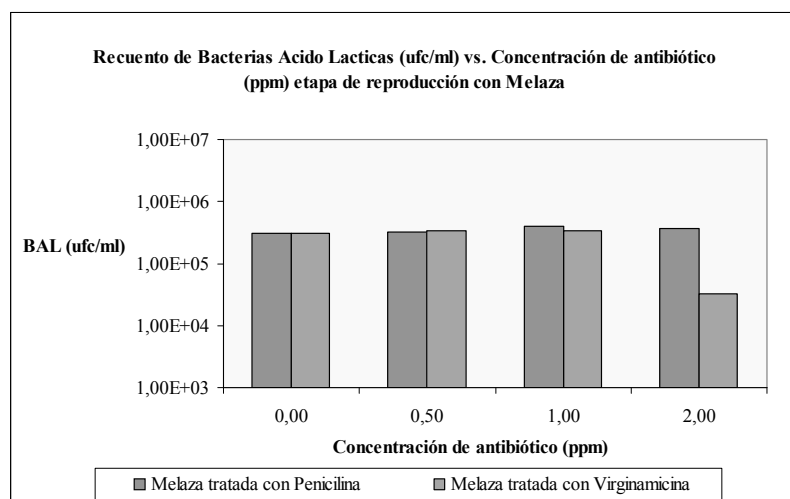
Después de los tratamientos con los antibióticos penicilina y virginamicina en la reproducción de la levadura (24 horas) utilizando melaza de caña como sustrato azucarado, se obtuvo la información registrada en las tablas 13 y 14, la cual corresponde a las variables de respuesta frente a los parámetros controlados del proceso y pueden verse claramente los resultados para cada concentración en la figura 11.

**Tabla 13.** Variables de respuesta etapa de reproducción con Melaza tratada con Penicilina (24 horas)

Tratamiento	Concentración de antibiótico (ppm)	Recuento de Levadura <i>neubauer</i> (células/ml)	Viabilidad de Levadura (%)	Recuento BAL (UFC/ml)	Acidez Volátil (ppm)
Control P4A	0.00	3.0 E+08	100	3.1 E+05	1618
P1A	0.50	3.1 E+08	100	3.2 E+05	1649
P2A	1.00	3.1 E+08	100	4.0 E+05	1595
P3A	2.00	2.9 E+08	100	3.6 E+05	1631

**Tabla 14.** Variables de respuesta etapa de reproducción con Melaza tratada con Virginamicina (24 horas)

Tratamiento	Concentración de antibiótico (ppm)	Recuento de Levadura <i>neubauer</i> (células/ml)	Viabilidad de Levadura (%)	Recuento BAL (UFC/ml)	Acidez Volátil (ppm)
Control V4A	0.00	3.1 E+08	100	3.1 E+05	1458
V1A	0.50	3.1 E+08	100	3.4 E+05	1492
V2A	1.00	3.0 E+08	100	3.3 E+05	1481
V3A	2.00	3.3 E+08	100	3.2 E+04	1385



**Figura 11.** Población de BAL (ufc/ml) Vs Concentración de antibiótico (ppm) en etapa de reproducción con melaza (24 horas)

Finalizada la etapa de reproducción con melaza, los resultados de y gemación de la levadura fueron del 100% y morfología homogénea.

### 6.5.2. Reproducción con Jugo de Caña Concentrado

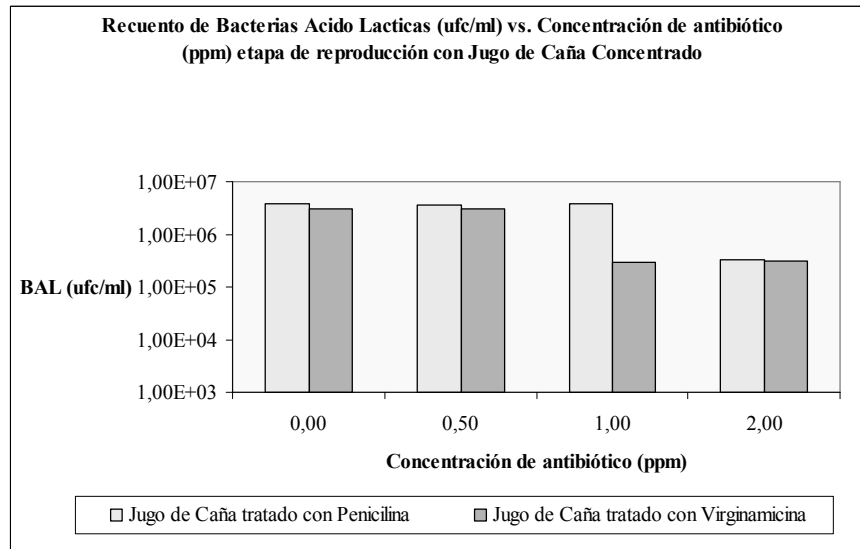
En el caso de los tratamientos con los antibióticos penicilina y virginamicina durante 24 horas de reproducción de la levadura utilizando jugo de caña concentrado como sustrato azucarado, se obtuvo la información que se registra en las tablas 15 y 16 e igualmente corresponde a las variables de respuesta frente a los parámetros controlados del proceso. La concentración de contaminantes (BAL) puede observarse en la figura 12.

**Tabla 15.** Variables de respuesta etapa de reproducción con Jugo de caña concentrado tratado con Penicilina (24 horas)

Tratamiento	Concentración de antibiotico (ppm)	Recuento de Levadura neubauer (células/ml)	Viabilidad de Levadura (%)	Recuento BAL (UFC/ml)	Acidez Volátil (ppm)
Control P4B	0.00	3.0 E+08	100	3.8 E+06	2748
P1B	0.50	3.0 E+08	100	3.5 E+06	2844
P2B	1.00	3.1 E+08	100	3.7 E+06	2816
P3B	2.00	3.0 E+08	100	3.3 E+05	2774

**Tabla 16.** Variables de respuesta etapa de reproducción con Jugo de caña concentrado tratado con Virginamicina (24 horas)

Tratamiento	Concentración de antibiotico (ppm)	Recuento de Levadura neubauer (células/ml)	Viabilidad de Levadura (%)	Recuento BAL (UFC/ml)	Acidez Volátil (ppm)
Control V4B	0.00	3.0 E+08	100	3.0 E+06	2888
V1B	0.50	3.1 E+08	100	3.0 E+06	2922
V2B	1.00	3.0 E+08	100	3.0 E+05	2972
V3B	2.00	3.0 E+08	100	3.1 E+05	2872



**Figura 12.** Población de BAL (ufc/ml) Vs Concentración de antibiótico (ppm) etapa de reproducción con jugo de caña concentrado (24 horas)

En el caso de Jugo de caña como sustrato, después de 24 horas de reproducción, el resultado de gemación fue del 100% y morfología homogénea en todos los casos.

### 6.5.3. Fermentación con Melaza

Tras 30 horas de fermentación por la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (ethanol technology) utilizando melaza de caña como sustrato, se obtuvieron los valores correspondientes a la concentración de alcohol (%v/v) obtenido a partir del azúcar reductor presente en el medio de cultivo y con el inóculo tratado previamente con los antibióticos respectivos.

En las tablas 17 y 18 se muestran las variables de respuesta tras la fermentación.

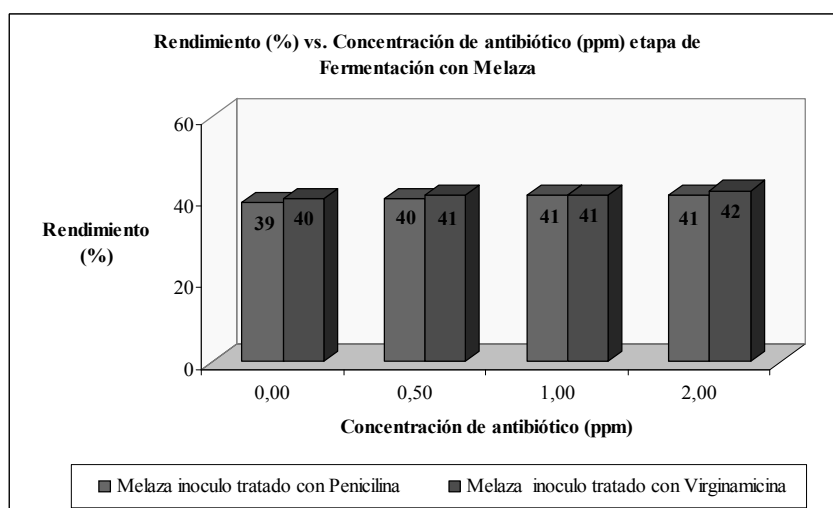
**Tabla 17.** Variables de respuesta etapa de fermentación de Melaza inoculo tratado con Penicilina (30 horas)

Tratamiento/ ppm antibiótico	Alcohol (% v/v)	Azúcar Residual (% m/v)	Rendimiento (%)	Eficiencia (%)	Productividad (g/L* <i>h</i> )
Control P4A/0.0	8.07	1.80	39	81.01	2.13
P1A/0.5	8.08	2.07	40	81.16	2.13
P2A/1.0	8.31	1.88	41	83.44	2.19
P3A/2.0	8.38	1.92	41	84.17	2.21

**Tabla 18.** Variables de respuesta etapa de fermentación de Melaza inoculo tratado con Virginamicina (30 horas)

Tratamiento/ ppm antibiótico	Alcohol (% v/v)	Azúcar Residual (% m/v)	Rendimiento (%)	Eficiencia (%)	Productividad (g/L* <i>h</i> )
Control V4A/0.0	8.04	1.86	40	82.56	2.12
V1A/0.5	8.05	1.83	41	82.64	2.12
V2A/1.0	8.24	1.78	41	84.64	2.17
V3A/2.0	8.35	1.86	42	85.71	2.20

Estos resultados de rendimiento, eficiencia y productividad del proceso pueden observarse en las figuras 13, 14 y 15 respectivamente y para cada uno de los tratamientos.



**Figura 13.** Rendimiento (%) Vs concentración de antibiótico (ppm) en etapa de fermentación con melaza (30 horas)

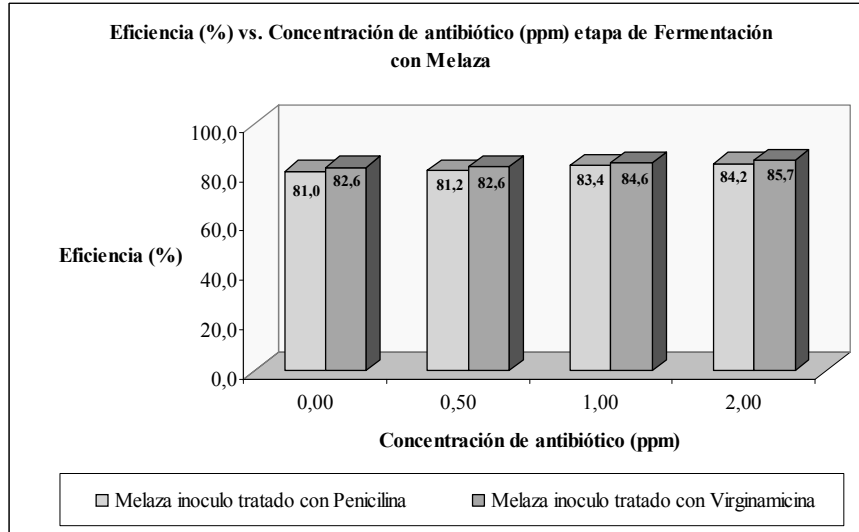


Figura 14. Eficiencia (%) Vs Concentración de antibiótico (ppm) en etapa de fermentación con melaza (30 horas)

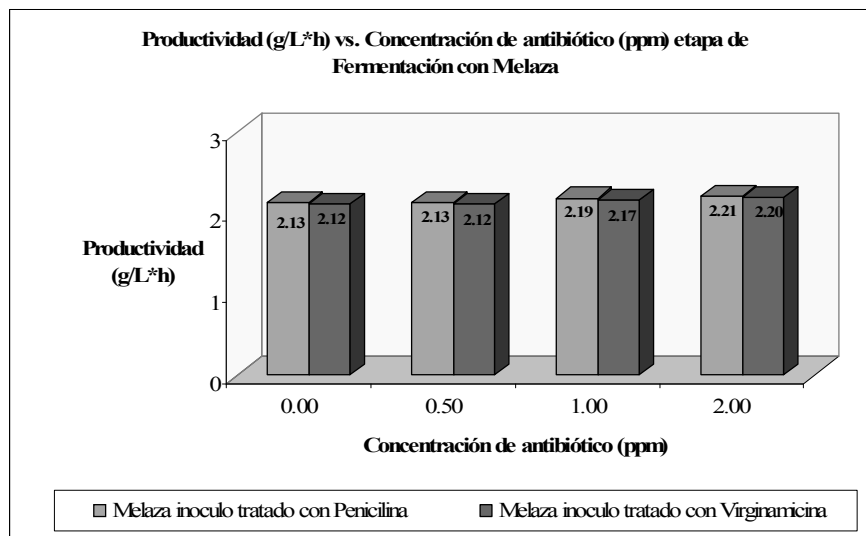


Figura 15. Productividad (g/L\*h) Vs Concentración de antibiótico (ppm) en etapa de fermentación con melaza (30 horas)

#### 6.5.4. Fermentación con Jugo de Caña Concentrado

En el caso de los tratamientos con los antibióticos penicilina y virginamicina utilizando jugo de caña concentrado como sustrato de fermentación, se obtuvo la información que puede observarse en las tablas 19 y 20 que igualmente corresponden a las variables de respuesta frente a los parámetros preestablecidos y además registran cuantitativamente el rendimiento final de fermentación para cada uno de los tratamientos y la eficiencia y productividad global del proceso a nivel de laboratorio.

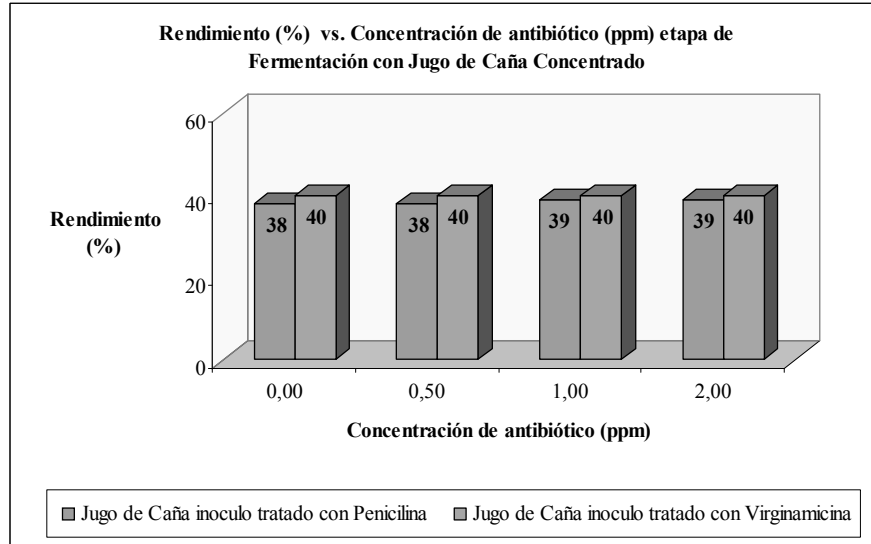
**Tabla 19.** Variables de respuesta etapa de fermentación de Jugo de caña concentrado inóculo tratado con Penicilina (30 horas).

Tratamiento/ ppm antibiótico	Concentración de antibiótico (ppm)	Alcohol (% v/v)	Azúcar Residual (% m/v)	Rendimiento (%)	Eficiencia (%)	Product ividad (g/L*h)
Control P4B/0.0	0.00	7.69	0.72	38	78.41	2.03
P1B/0.5	0.50	7.68	0.84	38	78.31	2.02
P2B/1.0	1.00	7.82	0.87	39	79.79	2.06
P3B/2.0	2.00	7.88	1.12	39	80.35	2.08

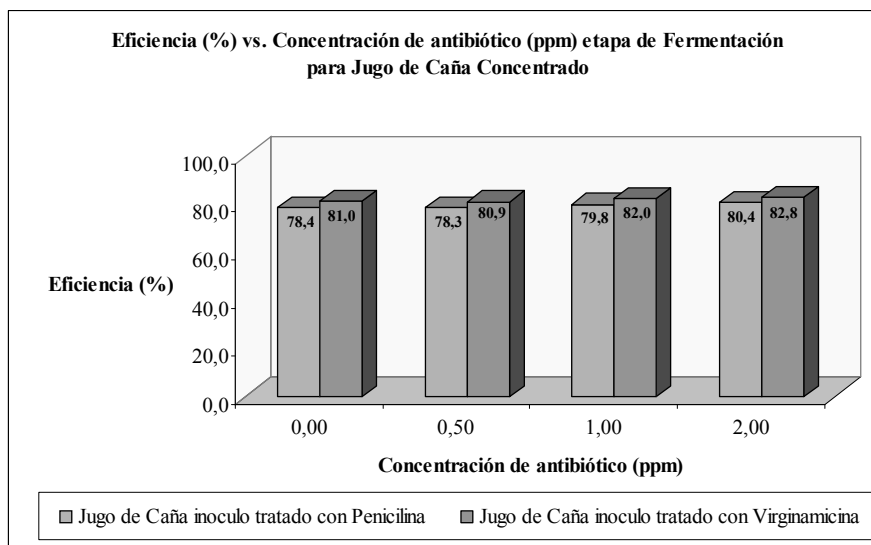
**Tabla 20.** Variables de respuesta etapa de fermentación de Jugo de caña concentrado inóculo tratado con Virginamicina (30 horas).

Tratamiento/ ppm antibiótico	Concentración de antibiótico (ppm)	Alcohol (% v/v)	Azúcar Residual (% m/v)	Rendimiento (%)	Eficiencia (%)	Product ividad (g/L*h)
Control V4B/0.0	0.00	8.02	0.66	40	81.02	2.12
V1B/0.5	0.50	8.01	0.60	40	80.89	2.11
V2B/1.0	1.00	8.12	0.72	40	82.04	2.14
V3B/2.0	2.00	8.20	0.73	40	82.81	2.16

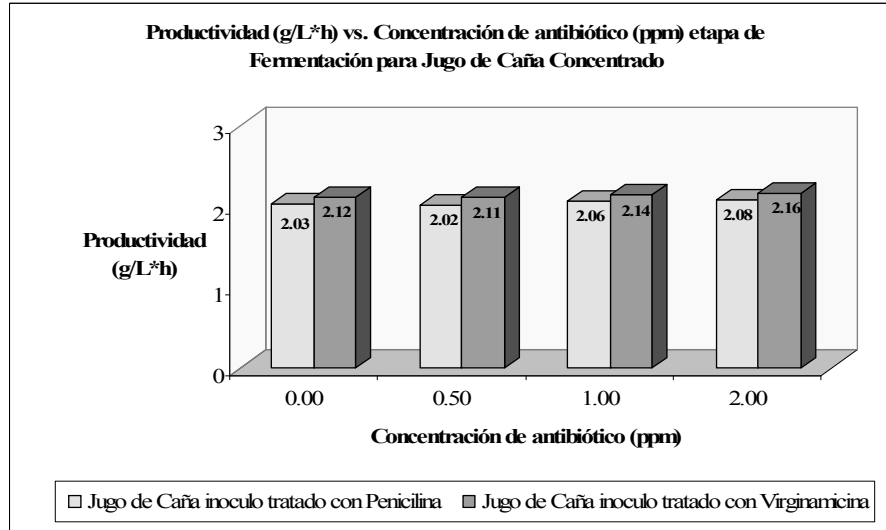
En las figuras 16, 17 y 18 pueden observarse los resultados de rendimiento, eficiencia y productividad respectivamente para cada uno de los tratamientos.



**Figura 16.** Rendimiento (%) Vs Concentración de antibiótico (ppm) en etapa de fermentación con Jugo de caña concentrado (30 horas)



**Figura 17.** Eficiencia (%) Vs Concentración de antibiótico (ppm) en etapa de fermentación con jugo de caña concentrado (30 horas)



**Figura 18.** Productividad (g/L\*h) Vs Concentración de antibiótico (ppm) en etapa de fermentación con jugo de caña (30 horas)

## 6.6. TRATAMIENTO CON DESCENSO DE pH

### 6.6.1. Etapa de Reproducción

**Tabla 21.** Variables de respuesta etapa de reproducción con Melaza bajo ajuste de pH (24 horas)

Tratamiento	pH	Recuento de Levadura neubauer (células/ml)	Viabilidad de Levadura (%)	Recuento BAL (UFC/ml)	Acidez Volátil (ppm)
H1A	3.0	2.0 E+06	78	3.2 E+04	1488
H2A	3.5	3.4 E+07	78	4.6 E+04	1483
H3A	4.0	3.6 E+08	100	3.3 E+05	1478
Control H4A	4.6	3.8 E+08	100	3.3 E+05	1477

**Tabla 22.** Variables de respuesta etapa de reproducción con Jugo de caña concentrado bajo tratamiento de ajuste de pH (24 horas)

Tratamiento	pH	Recuento de Levadura neubauer (células/ml)	Viabilidad de Levadura (%)	Recuento BAL (UFC/ml)	Acidez Volátil (ppm)
H1B	3.0	2.8 E+06	79	3.4 E+04	1816
H2B	3.5	2.8 E+07	84	3.4 E+04	1869
H3B	4.0	2.8 E+07	100	3.4 E+06	1867
Control H4B	4.6	3.0 E+08	100	3.4 E+06	2157

En la figura 19 pueden observarse los resultados de recuento de bacterias lácticas en etapa de reproducción para cada uno de los tratamientos con descenso de pH.

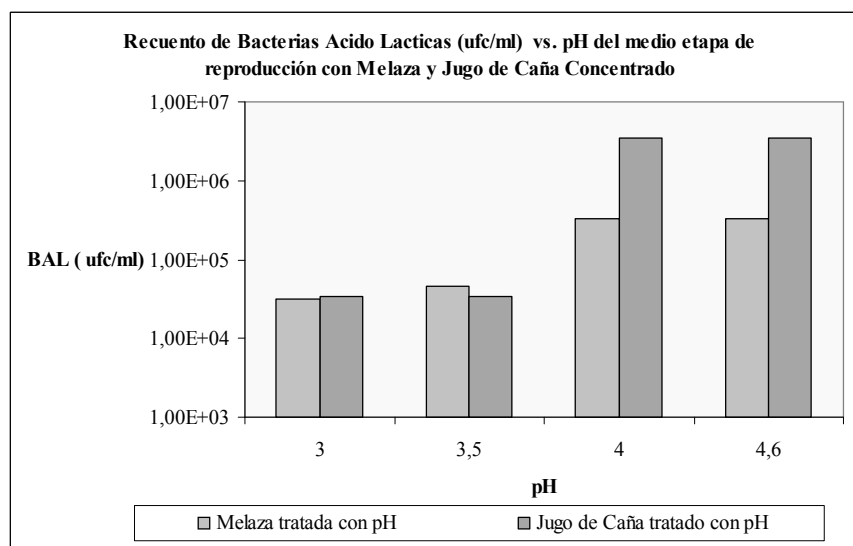


Figura 19. Población de BAL (ufc/ml) Vs Tratamiento con pH en etapa de reproducción (24 horas)

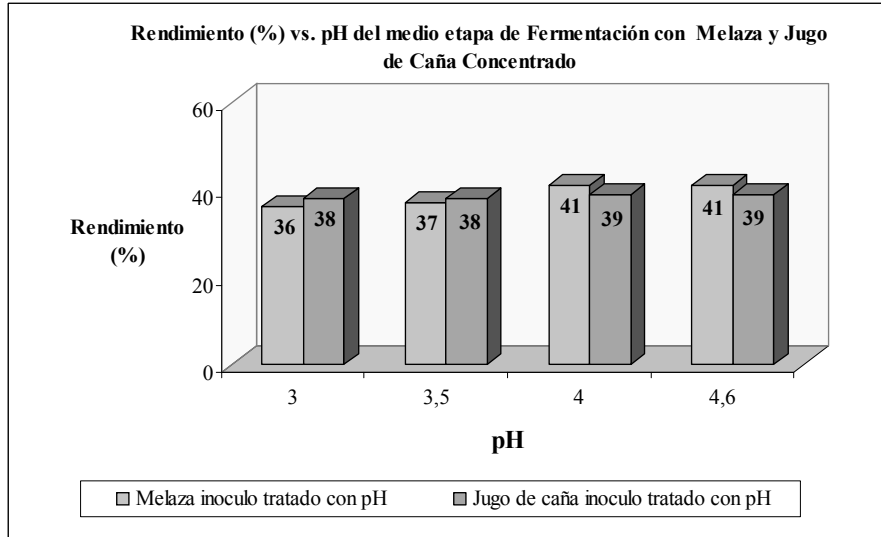
### 6.6.2. Etapa de Fermentación

**Tabla 23.** Variables de respuesta etapa de fermentación de Melaza inoculo tratado con ajuste de pH (30 horas)

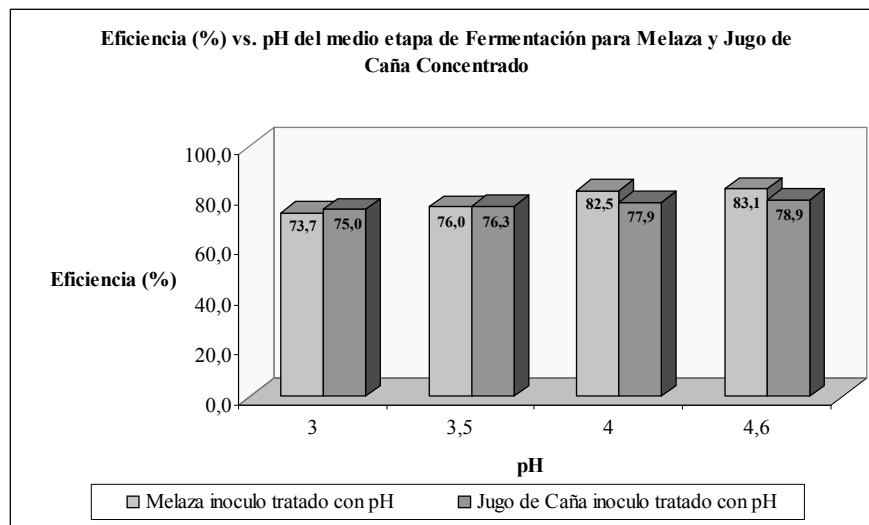
Tratamiento	pH	Alcohol (% v/v)	Azúcar Residual (% m/v)	Rendimiento (%)	Eficiencia (%)	Productividad (g/L*h)
H1A	3.0	7.28	3.52	36	73.69	1.92
H2A	3.5	7.51	2.52	37	76.00	1.98
H3A	4.0	8.15	2.15	41	82.48	2.15
Control H4A	4.6	8.21	2.05	41	83.13	2.16

**Tabla 24.** Variables de respuesta etapa de fermentación de Jugo de caña concentrado inoculo tratado con ajuste de pH (30 horas)

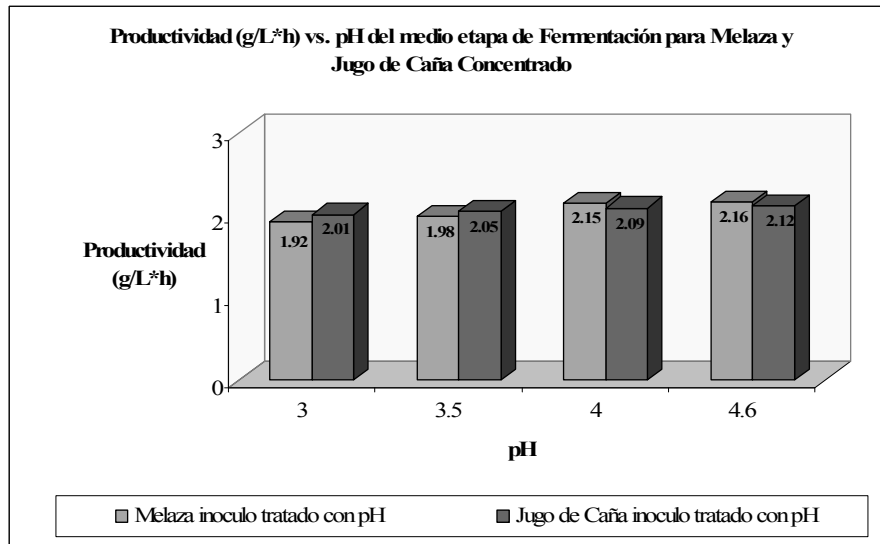
Tratamiento	pH	Alcohol (% v/v)	Azúcar Residual (% m/v)	Rendimiento (%)	Eficiencia (%)	Productividad (g/L*h)
H1B	3.0	7.65	1.30	38	75.03	2.01
H2B	3.5	7.78	1.19	38	76.31	2.05
H3B	4.0	7.94	0.81	39	77.85	2.09
Control H4B	4.6	8.05	0.80	39	78.90	2.12



**Figura 20.** Rendimiento (%) Vs Tratamiento con pH en etapa de fermentación con melaza y jugo de caña concentrado



**Figura 21.** Eficiencia (%) Vs Tratamiento con pH en etapa de fermentación con melaza y jugo de caña concentrado



**Figura 22.** Productividad (g/L\*h) Vs pH del medio en etapa de fermentación con melaza y jugo de caña (30 horas)

## 7. ANALISIS DE VARIANZA

### 7.1. ANOVA doble vía

Los datos que registran en las tablas de análisis de varianza doble vía con nivel de significancia de 0.05, corresponden a los obtenidos para porcentaje de rendimiento en cada uno de los tratamientos con los dos antibióticos analizados.

**Tabla 25.** Fórmulas generales para el análisis de varianza de dos vías.

Recursos de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Valor de F
Tratamientos (Dosis de antibiótico)	k-1	$SS_{TR}$	$MS_{TR}=SS_{TR}/k-1$	$MS_{TR}/MS_E$
Antibióticos	n-1	$SS_{B1}$	$MS_{B1}=SS_{B1}/n-1$	$MS_{B1}/MS_E$
Error	k(n-1)	$SS_E$	$MS_E=SS_E/k(n-1)$	
Total		$SS_T=SS_{TR}+SS_{B1}+SS_E$		

**Donde:**

**n:** número de observaciones

**k:** número de tratamientos

**T:** total

**$SS_T$ :** Suma total de cuadrados

**$SS_{TR}$ :** Suma total de cuadrados entre tratamientos

**$SS_E$ :** Suma de cuadrados de error

**$SS_{B1}$ :** Suma de cuadrados del segundo recurso de variación (antibióticos)

**MS:** Media de cuadrados

### 7.1.1. ANOVA doble vía para Melaza como sustrato de fermentación

**Tabla 26.** Datos de rendimiento (%) obtenidos con Melaza como sustrato de fermentación

TAntibiótico	Tratamiento (Dosis en ppm)				Total
	0,00	0,50	1,00	2,00	
Penicilina	39	40	41	41	161
Virginamicina	40	41	41	42	164
Total	79	81	82	83	325

#### Primer recurso de variación

Hipótesis Nula para tratamientos ( $H_0$ ): No existe diferencia significativa entre los efectos de las diferentes dosis de antibiótico sobre el valor de rendimiento de fermentación.

Hipótesis Alternativa para tratamientos ( $H_1$ ): Existe diferencia significativa entre los efectos de las diferentes dosis de antibiótico sobre el valor de rendimiento de fermentación.

#### Segundo recurso de variación

Hipótesis Nula para los dos productos evaluados ( $H_0$ ): No existe diferencia significativa en el efecto de los dos antibióticos evaluados sobre el rendimiento de fermentación.

Hipótesis Alternativa para los dos productos evaluados ( $H_1$ ): Existe diferencia significativa en el efecto de los dos antibióticos evaluados sobre el rendimiento de fermentación.

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN:** La hipótesis nula ( $H_0$ ) se acepta sólo si el valor de F calculado no excede el valor de F tabulado y se rechaza si el valor de F calculado excede el valor de F tabulado.

**Tabla 27.** ANOVA doble vía (Melaza como sustrato de fermentación)

Recursos de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Valor de F	F Tabulado
Tratamientos (Dosis antibiótico)	3	4,38	1,46	12,17	9,28
Antibióticos	1	1,13	1,13	9,42	10,10
Error	3	0,36	0,12		
Total	7	5,87			

( $\alpha = 0.05$ )

#### Primer recurso de variación

**SE RECHAZA  $H_0$ , se acepta  $H_1$ ,** es decir, si existe diferencia significativa entre los efectos de las diferentes dosis de antibiótico para melaza como sustrato de fermentación con un nivel de significancia de 0.05.

#### Segundo recurso de variación

**SE ACEPTA  $H_0$ , se rechaza  $H_1$ ,** es decir, no existe diferencia significativa entre los efectos de los antibióticos penicilina y virginamicina sobre el rendimiento de fermentación utilizando melaza como sustrato.

#### 7.1.2. ANOVA doble vía para Jugo de caña como sustrato de fermentación

**Tabla 28.** Datos de rendimiento (%) obtenidos con Jugo de caña como sustrato de fermentación

Antibiótico	Tratamiento (Dosis en ppm)				Total
	0,00	0,50	1,00	2,00	
Penicilina	38	38	39	39	154
Virginamicina	40	40	40	40	160
<b>Total</b>	78	78	79	79	314

### Primer recurso de variación

Hipótesis Nula para tratamientos ( $H_0$ ): No existe diferencia significativa entre los efectos de las diferentes dosis de antibiótico sobre el valor de rendimiento de fermentación.

Hipótesis Alternativa para tratamientos ( $H_1$ ): Existe diferencia significativa entre los efectos de las diferentes dosis de antibiótico sobre el valor de rendimiento de fermentación.

### Segundo recurso de variación

Hipótesis Nula para los dos productos evaluados ( $H_0$ ): No existe diferencia significativa en el efecto entre los dos antibióticos evaluados.

Hipótesis Alternativa para los dos productos evaluados ( $H_1$ ): Existe diferencia significativa en el efecto entre los dos antibióticos evaluados.

**Tabla 29.** ANOVA doble vía (Jugo de caña como sustrato de fermentación)

Recursos de Variación	Grados de Libertad	Sumas de Cuadrados	Media de Cuadrados	Valor de F	F Tabulado
Tratamientos (Dosis de	3	0,50	0,17	1,00	9,28

<b>antibiótico)</b>					
<b>Antibióticos</b>	1	4,50	4,50	26,47	10,10
<b>Error</b>	3	0,50	0,17		
<b>Total</b>	7	5,50			

( $\alpha = 0.05$ )

#### **Primer recurso de variación**

**SE ACEPTA  $H_0$ , se rechaza  $H_1$ ,** es decir, no existe diferencia significativa entre los efectos de las diferentes dosis de antibiótico para Jugo de caña como sustrato de fermentación con un nivel de significancia de 0.05.

#### **Segundo recurso de variación**

**SE RECHAZA  $H_0$ , se acepta  $H_1$ ,** es decir, existe diferencia significativa entre los efectos de los antibióticos penicilina y virginamicina sobre el rendimiento de fermentación utilizando Jugo de caña como sustrato.

## **7.2. ANOVA una vía**

Los datos que registran en las tablas de análisis de varianza una vía con nivel de significancia de 0.05, corresponden a los obtenidos para porcentaje de rendimiento en cada uno de los tratamientos con las variaciones de pH en los dos sustratos de fermentación.

**Tabla 30.** Fórmulas generales para análisis de varianza una vía.

Recursos de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Valor de F
pH del sustrato	k-1	$SS_{TR}$	$MS_{TR}=SS_{TR}/k-1$	$MS_{TR}/MS_E$
Error	k(n-1)	$SS_E$	$MS_E=SS_E/k(n-1)$	
Total	kn-1	$SS_T=SS_{TR}+SS_E$		

( $\alpha = 0.05$ )

**Donde**

**n:** número de observaciones

**k:** número de tratamientos

**T:** total

**$SS_T$ :** Suma total de cuadrados

**$SS_{TR}$ :** Suma total de cuadrados entre tratamientos

**$SS_E$ :** Suma de cuadrados de error

**MS:** Media de cuadrados

**7.2.1. ANOVA una vía para tratamiento con pH en Melaza como sustrato de fermentación**

**Tabla 31.** Datos de rendimiento (%) obtenidos con Melaza como sustrato de fermentación

Sustrato	pH				Total
	3,0	3,5	4,0	4,6	
Melaza	36	38	41	40	155
	36	36	40	41	153
	35	36	40	40	151
	37	38	41	41	157
<b>Total</b>	144	148	162	162	616

Hipótesis Nula ( $H_0$ ): No existe diferencia significativa entre los efectos de los diferentes valores de pH evaluados de sobre el rendimiento de fermentación.

Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ): Existe diferencia significativa entre los efectos de los diferentes valores de pH evaluados sobre el rendimiento de fermentación.

**Tabla 32.** ANOVA una vía Melaza como sustrato de fermentación

Recursos de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Valor de F	F Tabulado
pH del Sustrato	3	66	22	32,84	3,49
Error	12	8	0,67		
<b>Total</b>	15	74			

( $\alpha = 0.05$ )

Se **RECHAZA  $H_0$** , se **acepta  $H_1$** , es decir, existe diferencia significativa entre los efectos de los diferentes valores de pH evaluados sobre el rendimiento con melaza como sustrato de fermentación.

**7.2.2. ANOVA una vía para tratamiento con pH en Jugo de caña como sustrato de fermentación**

**Tabla 33.** Datos de rendimiento (%) obtenidos con Jugo de caña concentrado como sustrato de fermentación

Sustrato	pH				Total
	3,0	3,5	4,0	4,6	
Jugo de Caña	39	39	40	39	157
	39	38	39	39	155
	35	37	37	38	147
	37	38	39	40	154
<b>Total</b>	150	152	155	156	613

Hipótesis Nula ( $H_0$ ): No existe diferencia significativa entre los efectos de los diferentes valores de pH evaluados de sobre el rendimiento de fermentación.

Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ): Existe diferencia significativa entre los efectos de los diferentes valores de pH evaluados sobre el rendimiento de fermentación.

**Tabla 34.** ANOVA una vía (Jugo de caña como sustrato de fermentación)

Recursos de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Valor de F	F Tabulado
-----------------------	--------------------	-------------------	--------------------	------------	------------

<b>pH del Sustrato</b>	3	5,69	1,90	1,15	3,49
<b>Error</b>	12	19,75	1,65		
<b>Total</b>	15	25,44			

Se **ACEPTA H<sub>0</sub>**, se **rechaza H<sub>1</sub>**, es decir, no existe diferencia significativa entre los efectos de los diferentes valores de pH evaluados sobre el rendimiento con Jugo de caña como sustrato de fermentación.

### 7.3. Medidas de tendencia central para datos de productividad de las fermentaciones

**Tabla 35. Medidas de tendencia central datos de productividad**

Sustrato y Tratamiento del inóculo	Media aritmética Productividad (g/L*h)	Desviación estándar
Melaza tratamiento con Penicilina	2,165	0,0012
Melaza tratamiento con Virginamicina	2,152	0,0011
Jugo de caña tratamiento con Penicilina	2,040	0,00005
Jugo de caña tratamiento con Virginamicina	2,13	0,0003
Melaza tratamiento con descenso de pH	2,05	0,0100
Jugo de caña tratamiento con descenso de pH	2,06	0,0010

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para iniciar el proceso de reproducción de la levadura en la fermentación alcohólica a partir de mieles de caña, fue necesario diluir tanto la melaza como el jugo concentrado para lograr una menor concentración de azúcares totales reductores; al diluir estas mieles, la cantidad

de agua disponible para los microorganismos ( $A_w$ ) aumentó y por ende se favoreció su desarrollo.

La adición de agua, de acuerdo a lo reportado por Jacques *et al* en 1999, además de facilitar la hidrólisis de la sacarosa presente en las mieles, probablemente ocasionó la dilución de los demás componentes de las mismas, de manera que se redujo la presión osmótica y como consecuencia, a través de las paredes celulares de las levaduras y bacterias, aumentó el flujo de iones y moléculas desde y hacia el interior celular, logrando así su activación metabólica y consecuente división bajo condiciones de aireación adecuadas para conseguir la oxidación de las moléculas energéticas presentes en el medio de cultivo (Jacques *et al*, 1999).

La consecuencia de este fenómeno de dilución de las mieles sobre las poblaciones bacterianas puede observarse en el notable incremento de bacterias lácticas tras 24 horas de propagación de la levadura en los diferentes ensayos, así mismo, fue directamente proporcional el volumen de agua adicionada con respecto a la concentración de azúcares en el sustrato puro, es decir que se adicionó mayor cantidad de agua de dilución al jugo de caña que a la melaza para lograr un porcentaje de azúcares totales reductores similar para ambos casos.

El azúcar propio de las mieles de caña es la sacarosa, disacárido no considerado como azúcar reductor, sin embargo, éste es fermentable por la levadura porque dentro de su material enzimático posee la enzima invertasa, la cual cataliza la reacción en la que la sacarosa se desdobra en dos azúcares reductores: glucosa y fructosa.

No obstante, en la fermentación alcohólica, la hidrólisis de sacarosa en las mieles de caña, es facilitada a través de la adición de agua con la consecuente generación de glucosa y fructosa, ambos monosacáridos ingresan en la vía glucolítica para la generación de energía y dos moléculas de piruvato, las cuales constituyen los precursores de las dos moléculas de etanol por cada hexosa que lleva a cabo esta vía, de manera que todo el azúcar reductor en

las fermentaciones del ensayo se asumieron como glucosa para efectos de balances estequiométricos teniendo en cuenta que ambos monómeros tienen la misma ruta final dentro de la vía metabólica (Jacques *et al*, 1999).

Además de hidrolizarse, el azúcar propio de las mieles de caña se sometió a la acción de ácido sulfúrico, para lograr la disminución del pH del medio y reducir los riesgos de contaminación por microorganismos y facilitar la inversión de la sacarosa. Este descenso de pH debe ser controlado para no ocasionar daños metabólicos e inactivación de la levadura, pues algunas cepas comerciales toleran valores de pH específicos que por lo general son superiores a 2.0 de manera que el criterio para la determinación del pH del medio debe incluir su inocuidad sobre la levadura, el control de los contaminantes bacterianos y la inversión de la sacarosa presente en el sustrato (Jacques *et al*, 1999), así que los valores de pH evaluados deberían cumplir con estas características para ser seleccionados como aplicables al proceso, sin embargo, el pH estándar en planta es de 4.6 no sólo por su inocuidad sobre la levadura sino por costos teniendo en cuenta los altos volúmenes de mosto que se manejan.

Adicional a esto, el uso de ácido sulfúrico en el pretratamiento de las mieles de caña se realiza para ocasionar la precipitación de compuestos en suspensión que generan problemas de taponamientos y bloqueos tanto en intercambiadores de calor como en columnas de destilación, especialmente el calcio que se adiciona en forma de cal durante la clarificación del jugo de caña para la extracción de azúcar. El ácido sulfúrico reacciona con el calcio de algunas sales presentes en el medio formando sulfato de calcio, compuesto conocido como yeso, el cual es insoluble y se precipita en los tanques facilitando su separación y logrando un vino libre de sólidos suspendidos y por ende evitando problemas de operación (Jacques *et al*, 1999).

No obstante, la generación de este sulfato de calcio disminuye cuando la temperatura del medio aumenta, de manera que lo ideal es que una vez termine el tiempo de fermentación,

el vino permanezca algunas horas en reposo antes de la destilación (4-5 horas) para lograr la disminución de la temperatura del mismo con la consecuente decantación del sulfato de calcio (*Ethanol technology guide* 2001); esta disponibilidad de tiempo depende de la capacidad de la destilería y de la existencia de un tanque de decantación y una centrífuga que separe estos compuestos sólidos del vino de fermentación.

La cepa de levadura utilizada para llevar a cabo las fermentaciones fue una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* activa seca que se suspendió en agua a 41°C para lograr su activación metabólica y que después de la hidratación registró una viabilidad superior al 90% ya que dentro de los componentes en los que se halla suspendida se encuentran vitaminas como biotina y otros nutrientes que al hidratarse, generan una crema reconstituyente lista para iniciar procesos de propagación(*Ethanol technology guide* 2001), esta cepa de levadura es homogénea y en medio sólido específico creció formando colonias cremosas, redondas, de borde regular.

Dicha activación metabólica de las levaduras lleva consigo la preparación de las paredes celulares para el intercambio y asimilación de nutrientes exteriores y activación de las enzimas necesarias para la degradación de los compuestos orgánicos y consecuente respiración y división celular; estas células requieren este proceso de aclimatación metabólica para recuperar su actividad y lograr una producción de alcohol eficiente, el tipo de levadura activa seca, favorece el hecho de disponer de levadura en momentos precisos y disminuye costos de mantenimiento de banco de cepas, este proceso de propagación es el que permite obtener el número de células deseadas a expensas de un sustrato determinado, sin embargo, este tipo de levadura es recomendada básicamente para ser utilizada en sistemas de fermentación por lotes, pues en sistemas continuos, el riesgo de contaminación bacteriana es más alto y normalmente se utilizan cepas propagadas por escalamiento (Bellisimi & Ingledew, 2005).

El tiempo máximo de 24 horas como tiempo de propagación en los ensayos se determinó partiendo de que la cepa comercial en este tipo de sustrato azucarado requiere de un tiempo de adaptación entre 2-4 horas pues no ha sido propagada de forma continua y su fase exponencial bajo condiciones de alimentación continua en la planta de producción oscila entre 12 y 18 horas dependiendo de la velocidad de alimentación, suministro de aire y temperatura adecuada (entre 28 y 30°C), no obstante, en algunos casos la cepa no logra la población necesaria y/o los inóculos tardan en ser solicitados y debe prolongarse el tiempo (hasta 24 horas) y mejorarse las condiciones de mantenimiento.

Estos parámetros resultaron en un incremento considerable de células en fase de crecimiento exponencial pues el número de células viables es indispensable a la hora de determinar el inóculo para fermentación, sin embargo, el verdadero problema en la industria sigue siendo la fase de adaptación celular, pues las levaduras utilizan los nutrientes de las mieles para sintetizar sus componentes celulares sin observarse un incremento en la población (Bellisimi & Ingledeew, 2005).

Pasadas 24 horas a partir del momento en que la levadura tuvo contacto con las mieles de tercera dilución bajo parámetros controlados, la población obtenida en el medio es del orden de  $10^8$  células de levadura/ml, ésta población cuya viabilidad generalmente es superior al 90%, fue suficiente para iniciar la fermentación pues poblaciones superiores a  $10^6$  logran colonizar fácilmente el sustrato teniendo en cuenta que el volumen del inóculo corresponde al 30% del volumen efectivo de trabajo (VET) (Manual de Operaciones Planta alcoquímica SUCROMILES S.A).

La contaminación en melaza y jugo de caña correspondió a colonias presuntivas del género *Lactobacillus* y en el caso de jugo de caña sin calentamiento se registró crecimiento de colonias típicas del género *Leuconostoc*.

El género *Leuconostoc* especie *mesenteroides*, es el microorganismo que normalmente se aísla en los derivados de caña de azúcar, esta especie, teóricamente puede eliminarse cuando la temperatura del medio supera los 70°C y cuando el pH es inferior a 4.5, sin embargo, otros géneros de bacterias lácticas logran tolerar altas temperaturas gracias a la resistencia de su material enzimático y se activan una vez la temperatura desciende, ejemplo de ello es el género *Lactobacillus* que se encuentra normalmente en líneas de producción que han sido sometidas a inyección de vapor y que alcanzan temperaturas de incluso 100°C (Jacques *et al*, 1999), de manera que así puede explicarse que durante las fermentaciones sólo se registró crecimiento típico de *Lactobacillus* pues la temperatura aplicada sobre los sustratos de tercera y segunda dilución fue de aprox 70°C garantizando así la eliminación del género *Leuconostoc* pero la permanencia de estos bacilos termoresistentes.

La razón elemental por la cual debe eliminarse de los sistemas de fermentación *Leuconostoc mesenteroides*, mediante cualquier tipo de tratamiento, es su efecto nocivo y colonizador que radica en la generación de compuestos poliméricos y más específicamente dextranas. Las dextranas son polímeros insolubles sintetizados a partir de la sacarosa y cuyo efecto en el vino es perjudicial pues ocasiona pérdidas de azúcar para la fermentación alcohólica además de causar encrustamientos que conllevan problemas de proceso a causa del aumento de presión, además, su presencia podría establecer un foco importante de contaminantes microbianos por formar una masa compacta de difícil remoción constituyéndose en punto crítico en las industrias azucareras (Mibielli & Filho, 1999).

Para la detección oportuna de este microorganismo en un sistema de fermentación alcohólica existen diversos métodos, algunos se basan en la estructura de su DNA, por ejemplo PCR específica de especie en la que se detectan las enzimas del metabolismo del ácido láctico y se da un amplificado de DNA fácilmente detectable por electroforesis (Reguant *et al*, 2003), no obstante, éstas técnicas moleculares no están disponibles a nivel

industrial debido a sus altos costos, por esta razón, los métodos de identificación de estas especies bacterianas en las plantas productoras de vinos se realiza mediante métodos tradicionales como recuentos en placa en medios específicos y por determinación química de los polímeros producidos por los microorganismos. (Mibielli & Filho, 1999).

En el caso de *Leuconostoc mesenteroides*, las dextranas pueden identificarse mediante hidrólisis ácida con la consecuente liberación de azúcares reductores ó mediante el cultivo del microorganismo en medios líquidos y/o agarizados con sacarosa donde la generación de dextrana es visible (Mibielli & Filho, 1999).

De otro lado, el género *Lactobacillus*, encontrado en todos los ensayos tanto en etapa de reproducción como en fermentación e identificado claramente como bacilos Gram positivos, son los causantes de las colonizaciones más importantes sobre las mieles de caña debido a la simplicidad de su metabolismo pues el piruvato generado por glucólisis lo reducen a lactato cuando las condiciones de oxígeno son insuficientes para oxidar todo el NADH formado y se origina la denominada fermentación láctica (Mathews *et al*, 2002). Su crecimiento es rápido en cuanto a número de células/ml se refiere contrario a géneros como *Leuconostoc*, cuyo efecto nocivo principal es la polimerización de la sacarosa en el medio (Mibielli & Filho, 1999).

Teniendo en cuenta que tanto la melaza como el jugo de caña de tercera dilución sometidas a calentamiento previo a 70°C registraron crecimiento de *Lactobacillus*, una vez adicionados los productos antibióticos ya existía una población inicial capaz de resistir esta temperatura de calentamiento y de reproducirse de manera que el antibiótico no causó efecto sobre la misma, probablemente si se utilizaran concentraciones más altas de estos antibióticos se lograría controlar la propagación de esta población contaminante inicial.

El comportamiento de la población bacteriana actividad en el jugo de caña, tratado con virginamicina a concentraciones iguales o superiores a 1ppm indicó que la estructura

molecular de este antibiótico logra una mayor efectividad sobre las bacterias lácticas presentes en este sustrato azucarado, pues éste actúa sobre la síntesis proteica bacteriana, específicamente sobre el dominio de la peptidil-transferasa de la subunidad ribosomal 50S (Garza et al, 2000), y además, el bajo contenido de sólidos del jugo de caña, pudo haber favorecido la solubilidad de este producto antibiótico y por ende su dispersión en todo el medio líquido, razón por la cual tuvo mayor contacto con los microorganismos presentes.

Adicional a esto, puede suponerse que el contenido de iones en el sustrato influye de manera importante en el desarrollo tanto de la levadura como de la microflora contaminante, se deduce que es más fácil desarrollarse en melazas con alto contenido iónico, sales minerales y sólidos que en jugos o mieles puras. En promedio, los datos para de cationes en jugos de caña concentrados registran 941ppm de Potasio, 8ppm de Hierro, 190ppm de magnesio y 400ppm de Calcio (Registros laboratorio Investigación y Desarrollo Químico SUCROMILES S.A) y teniendo en cuenta que estos componentes se concentran a medida que se somete a calentamiento el sustrato, en una melaza pueden registrarse valores de 26000ppm de potasio, 700ppm de magnesio y 1000ppm de Calcio (PRAJ *Technical Analytical Report*, 1999).

En los valores de rendimiento y productividad de las fermentaciones puede aplicarse este concepto, pues independientemente de los niveles de contaminación, la producción de alcohol fue significativamente más alta cuando se utilizó melaza como sustrato en este tipo de sistemas de fermentación, el máximo valor de rendimiento fue de 42% obtenido con melaza (inóculo tratado con virginamicina 2.0 ppm) mientras el máximo obtenido con jugo de caña fue de 40%.

Los inóculos previamente tratados con penicilina y virginamicina y llevados a fermentación, influyeron de manera positiva en el rendimiento y productividad de la fermentación con melaza, ésta era la suposición planteada desde el inicio de la investigación y los resultados tras 30 horas de proceso revelaron que efectivamente si existe

diferencia significativa entre los efectos de las diferentes dosis de cada antibiótico para melaza de caña con un nivel de significancia de 0.05 ( $P=0.05$ ), es decir que el rendimiento de la fermentación varió con respecto a las dosis aplicadas durante la etapa de reproducción de la levadura.

Adicional a esto, se evidenció que no hay diferencia significativa entre los efectos de los dos antibióticos analizados, es decir, que el rendimiento de la fermentación bajo los mismos parámetros no mostró que la penicilina tiene un mejor efecto que la virginamicina en el control de las bacterias lácticas en el proceso y viceversa, de manera que la elección entre uno y otro producto podría depender básicamente de su costo comercial y de la disponibilidad de los mismos.

Los valores de productividad de las fermentaciones con melaza no varían significativamente entre sí con las diferentes dosis de los antibióticos adicionados durante la etapa de propagación los valores oscilan entre 2.12 y 2.21 g de alcohol/ litro de vino\*hora de fermentación, los datos no se dispersan significativamente alrededor de su media pues su desviación estándar es de 0.001 g. La producción de alcohol en todos los casos fue similar durante las 30 horas de fermentación, este tiempo es el máximo utilizado en planta para lograr una fermentación total de los azúcares y consecuentemente un mínimo de azúcar residual.

Normalmente en fermentaciones con melaza en sistemas de fermentación por lotes, el porcentaje de azúcar residual es superior al 2% (p/v) con un máximo de 2.4% (p/v) en condiciones apropiadas, sin embargo, en las fermentaciones a nivel de laboratorio este residual fue menor en la mayoría de los casos pues los volúmenes inferiores permiten un mayor control de los parámetros del proceso y una vez se realiza el escalamiento, las concentraciones de azúcar pueden lograr la inhibición por metabolito, pues la levadura se satura y deja de fermentar, este fenómeno metabólico se debe a que las enzimas catalizadoras en las diferentes vías sufren una represión por exceso de sustrato o exceso de

actividad, además, la célula al no tener oxígeno disponible y realizar exclusivamente metabolismo fermentativo entra en una fase de latencia, momento en el cuál, cesa la conversión de azúcar en alcohol y se genera este porcentaje de azúcar no fermentado (Jacques *et al*, 1999).

El rendimiento teórico esperado corresponde al 51.1% a partir de la glucosa fermentable, sin embargo y teniendo en cuenta el aporte de Pasteur que consiste en que sólo el 95% de los azúcares totales reductores son convertidos en alcohol por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el 5% restante es utilizado para crecimiento del microorganismo, producción de otros metabolitos, consumo por parte de contaminantes bacterianos y conversión en productos infermentables, entre otros (Jacques *et al*, 1999), fenómeno que evidentemente se dio en las fermentaciones del ensayo pues ningún rendimiento fue superior al 42%, de manera que más del 5% de azúcares totales reductores fueron utilizados para la generación no sólo de biomasa en propagación sino que adicionalmente otra parte del azúcar fue utilizado para la generación de otros compuestos diferentes al alcohol durante las fermentaciones tales como ácidos orgánicos y alcoholes superiores, indeseables en el proceso .

Los rendimientos obtenidos estuvieron entre el 38-42%, lo cual es menor en un 13,1% y un 9,1% respectivamente al máximo posible, esto debido adicionalmente a que la población bacteriana incrementó con respecto a la inicial presente en el sustrato lo cual a su vez fue una evidencia indirecta del consumo de azúcar por contaminación, así como el incremento de acidez volátil en el medio de fermentación.

Normalmente la producción de acidez volátil es atribuida a contaminantes bacterianos, sin embargo, la bibliografía reporta que en las mieles de caña y por ende en un mosto fermentado pueden encontrarse tres (3) categorías básicas de ácidos: ácidos orgánicos naturales que son los que proceden directamente del sustrato azucarado, normalmente son de origen vegetal y se encuentran en la mayoría de mostos de fermentación, dentro de estos

se encuentran los ácidos tartárico, málico y cítrico; ácidos orgánicos derivados, aquellos producidos durante los procesos fermentativos a los que es sometido el mosto y son fundamentalmente los ácidos acético, láctico y succínico y finalmente, los ácidos inorgánicos cuyo origen es mineral, entre los que se destaca el ácido sulfúrico, presente normalmente en forma de sulfatos (Blasco 2001).

En el caso de acidez volátil para los sustratos concentrados, se tiene que para la melaza de caña utilizada el valor inicial fue de 6530 ppm, significativamente superior al registrado por el jugo de caña concentrado (1602 ppm), ésta acidez, entendida como el contenido de ácidos orgánicos presentes en la muestra puede asociarse a la presencia de contaminantes bacterianos pero adicionalmente al mismo origen de las mieles pues durante los cultivos de caña pues el desarrollo de compuestos químicos es diverso y así como sucede con los viñedos donde las plantas durante su proceso de maduración natural, generan ácidos detectados posteriormente en el vino (Blasco 2001), en la caña podría presentarse una situación similar, de manera que en un jugo o miel de primera extracción, donde el contenido de agua no es suficiente para el desarrollo de bacterias y la presión osmótica es tan alta, la acción bacteriana sobre la producción de acidez volátil es incierta por lo que se podría inferir que una parte de la acidez volátil contenida en la melaza es de origen vegetal y la otra parte corresponde a la acción microbiana y al tratamiento de la misma durante el proceso de extracción del azúcar.

En el caso de mieles y vinos el método utilizado más comúnmente para medir acidez volátil es el método por arrastre de vapor de agua y posterior titulación con una solución básica (Blasco 2001), sin embargo, este resultado arroja valores de ácidos totales y no permite conocer cuál es el ácido específico que se encuentra en mayor concentración en una muestra, probablemente este sea un punto clave a desarrollar para conocer la incidencia de esta variable en el análisis de rendimiento del proceso fermentativo en estudio.

La concentración de acidez volátil tras la etapa de reproducción de la levadura en melaza excedió en 1177 ppm (promedio de observaciones para todos los ensayos) a los valores promedio del sustrato inicial: melaza de tercera dilución, de manera que estos ácidos volátiles fueron generados durante ésta etapa del proceso por las bacterias contaminantes.

Estudios realizados por Remize *et al* en el año 2000, revelan que algunas cepas de levadura, denominadas levaduras salvajes ó silvestres de tipo *Saccharomyces* y No *Saccharomyces*, también producen cantidades importantes, usualmente entre 57 y 145ppm, de estos ácidos orgánicos en especial acético, que establece un balance organoléptico de la fermentación y que para le levadura constituye una especie de regulación metabólica frente a la acidez exterior, pero aumenta la acidez volátil que sumada a la generada por las bacterias contaminantes constituye el total de acidez en el proceso y por ende pérdidas de azúcar fermentable (Remize *et al*, 2000).

La producción de ácido acético por la levadura es controlada por ella misma durante el metabolismo fermentativo, en la fermentación alcohólica, el acetato es generado por *Saccharomyces cerevisiae* y a través del complejo enzimático piruvato descarboxilasa, acetaldehído deshidrogenada y acetil-CoA sintasa se da el transporte acetil-coA desde la mitocondria hacia el citosol, de manera que en este compartimiento de la célula de levadura se origina la formación de acetato lo que conduce además a la regeneración de equivalentes reducidos: NADH y NADPH para mantener el balance redox al interior celular, de forma que la importancia fisiológica de la producción del acetato dentro de la célula es inminente.(Remize *et al*, 2000).

No obstante, cuando la producción de ácido acético es excedida por parte de la levadura, éste es expulsado al exterior para mantener el balance interno y es justo en este momento cuando se generan los altos valores de acidez volátil en vinos, estos estudios se han realizado en vinos de uva y fermentaciones con cebada donde las concentraciones de ácidos orgánicos son controladas drásticamente, sin embargo, los estudios en fermentaciones para

la producción de alcohol con mieles de caña no enfatizan en la producción innata de ácidos orgánicos por parte de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, esta producción normalmente se atribuye a bacterias contaminantes y levaduras salvajes presentes durante la fermentación alcohólica (Remize *et al*, 2000).

Estudios realizados en algunos mostos y vinos de uvas se confirma que el ácido acético es producido por la levadura fermentadora: rangos de 200-400ppm se producen normalmente por *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación, los vinos dulces son más propensos a niveles elevados de acidez volátil, niveles de 1000ppm fueron obtenidos durante la fermentación en mostos de alta concentración (>15% m/v azúcar reductor) a partir de uvas de primera calidad (Rodriguez & Smith, 2001).

Huang *et al*, 1994, observaron variaciones en el nivel de ácido acético tan altas como 4000ppm debidas al aumento en los cultivos de *Lactobacillus* durante la primera fermentación de los vinos, además, se indica que la actividad de estos microorganismos es la causa principal de acidez volátil y su origen en las uvas se atribuye al deterioro por parte de insectos que posiblemente llevan consigo este tipo de bacterias y a tratamientos de control ineficientes durante la cosecha de las mismas (Rodriguez & Smith, 2001).

De acuerdo con los resultados de rendimiento en fermentaciones a partir de jugo de caña concentrado bajo tratamiento con virginamicina (40% de rendimiento en todos los tratamientos), este antibiótico, utilizado en concentraciones superiores a 0.5ppm favorece que el inóculo mejore sus características microbiológicas, pues controla la población de bacterias lácticas (población de BAL del orden de  $10^5$ ), contrario a lo que ocurrió en fermentaciones cuyo inóculo fue tratado con penicilina a concentraciones de 0.5ppm en las que se obtuvo un rendimiento del 38% y concentraciones de 1.0ppm y 2.0ppm en las que se obtuvo un rendimiento máximo de 39% y cuya población de BAL ambos casos fue del orden de  $10^6$ .

Los porcentajes de azúcar residual tras las 30 horas de fermentación con jugo de caña fueron inferiores al 1.2%(p/v), de manera que se esperaba que todo el azúcar que ingresó al proceso se convirtiera en alcohol, es decir que el rendimiento sería de aproximadamente 48.5% (según Pasteur), sin embargo, esto no ocurrió pues el máximo valor alcanzado fue de 40%.

Estos resultados evidencian que las condiciones de proceso permitieron pérdidas de azúcar probablemente por: generación de otros compuestos diferentes al etanol por parte de los microorganismos contaminantes que son en esencia bacterias lácticas en jugo de caña como sustrato de fermentación; consumo de azúcar por parte de la levadura para su multiplicación (durante la fermentación la tasa de respiración y multiplicación de la levadura es baja, sin embargo, ocurre para evitar la muerte celular) y factores de operación, constituyen pérdidas de rendimiento superiores al 7%.

Infortunadamente, el recuento inicial en fermentación no se tuvo en cuenta una vez se inoculó con la levadura y consecuentemente el recuento final no permitió conocer el incremento de biomasa con respecto al inicial, además, tras las 30 horas de fermentación, la biomasa en el medio tiende a sedimentarse y al entrar en su fase estacionaria su viabilidad disminuye hasta ser del 20-30% que comparada con la inicial (100%) es significativamente baja (Cuando se realizaron los análisis al vino en los ensayos, ésta biomasa ya había sido separada del mismo).

En la industria, la biomasa al final de la fermentación sólo se tiene en cuenta tras centrifugación cuando se recupera mezclada con el sulfato de calcio generado, no se realiza recuento de células en el vino, se conoce por históricos que la viabilidad es baja pero no se determina población de manera constante.

Los valores de acidez volátil en el jugo de caña después de la etapa de reproducción en los diferentes tratamientos son altos (entre 2748-2972ppm) comparados con los obtenidos después de la etapa de reproducción con melaza (Entre 1385-1649ppm), evidenciando que la producción de estos metabolitos por acción bacteriana es importante y teniendo en cuenta que los valores de ácido láctico y ácido acético tolerables por la levadura son de 8000ppm y 500ppm respectivamente se sugiere que esta acidez volátil básicamente corresponde al primero (Bely et al 2003), el cuál fue producido durante las fermentaciones por la población de Bacterias ácido lácticas (BAL) presente en el sustrato.

En la caracterización de los sustratos iniciales no se realizó determinación de bacterias acéticas debido a que normalmente en los controles microbiológicos de rutina no se encontraban bacterias Gram negativas a lo largo del proceso. Esta determinación de bacterias acéticas debería incluirse dentro del seguimiento microbiológico al proceso y descartar cualquier posibilidad de su presencia en el mismo.

En los ensayos a partir de melaza son similares a los obtenidos con jugo de caña de manera que podría asumirse que por un lado la misma naturaleza de la melaza ocasiona pérdidas por generación de azúcar residual tras la fermentación, mientras que las pérdidas con jugo de caña como sustrato, corresponden a la capacidad de este medio diluido para facilitar la proliferación de poblaciones de bacterias lácticas y por ende la pérdida de azúcar por la generación de biomasa, nuevamente se contemplaría la posibilidad de medir biomasa al final de cada fermentación mediante recuento pues en esta investigación el objetivo era esencialmente evaluar las poblaciones de bacterias lácticas en etapa de reproducción tras el tratamiento con antibióticos y su repercusión en el rendimiento de la fermentación

En la evaluación de alternativas para el control de la población contaminante, el tratamiento de descenso del pH tanto del medio de propagación como de fermentación con melaza y jugo de caña se obtuvo que en este caso la cepa comercial (activa seca) de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada, es sensible a pH 3.0 y 3.5 ya que tanto la población como la viabilidad

se vieron afectadas al utilizar este pH en el medio, el intercambio de los iones  $H^+$  con el medio probablemente generaron en las células un desequilibrio iónico que bloqueó los canales de intercambio celular pues un medio hipertónico ocasiona una respuesta repulsiva por parte de la célula, seguramente la maquinaria enzimática igualmente se vio afectada por estos valores de pH y la actividad metabólica general de la levadura entró en un estado de inercia (Blumberg & Alder, 1997).

Paralela a la disminución de población y viabilidad de la levadura, la población de bacterias ácido lácticas disminuyó de la misma forma, recuentos en el orden de  $10^4$  fueron los obtenidos cuando el pH del medio fue de 3.0 y 3.5, comparados con los obtenidos a pH 4.0 y 4.6, sin embargo los valores de acidez volátil son similares entre uno y otro tratamiento pues su rango fue de 11ppm entre sí de manera que estos valores no podrían atribuirse únicamente a la acción bacteriana; nuevamente cabe la posibilidad que el método para la determinación de acidez volátil pueda tener la limitante de determinar acidez volátil total sin discriminación del tipo de ácido encontrado en mayor concentración.

A partir de estos resultados durante la etapa de reproducción tanto para melaza como para jugo de caña concentrado a valores de pH 3.0 y 3.5, se obtuvieron como consecuencia rendimientos inferiores en la fermentación: 36 y 37% para melaza y 38% para jugo de caña, comparados con los obtenidos a pHs 4.0 y 4.6: 41% para melaza y 39% para jugo de caña.

Los valores de azúcar residual al final de las fermentaciones aumentaron conforme la población de levadura fue menor al final de la etapa de reproducción en cada caso, es decir que con pH de 3.0 y 3.5 tanto para melaza como para jugo de caña, las poblaciones fueron menores y por ende los valores de azúcar residual al final de la etapa de fermentación fueron mayores, corroborando que para esta relación en fermentación por lotes (30% inóculo: 70% mosto), la población adecuada de levadura es del orden de  $10^8$  células/ml para garantizar la conversión eficiente del azúcar presente en el mosto fermentable (Jacques *et al*, 1999).

El análisis estadístico muestra que utilizando jugo de caña como sustrato de fermentación sometido a cambios de pH sí existe diferencia significativa entre los efectos de los valores de pH evaluados sobre el rendimiento de la fermentación debida a la disminución de la capacidad metabólica y reproductiva de la levadura, cuyo efecto inmediato es la incapacidad para fermentar los azúcares reductores del sustrato, los valores de productividad son inferiores a pH 3.0 y 3.5, de manera que el efecto de este descenso de pH no favorece el proceso y por el contrario incluye un consumo adicional de ácido sulfúrico.

Ante estos resultados, la opción de utilizar el descenso de pH sobre los dos sustratos de fermentación evaluados no representa beneficios importantes en cuanto a rendimiento de fermentación se refiere, por el contrario afecta el proceso de manera considerable más ampliamente en melaza, pues los valores de rendimiento a pH's 4.0 y 4.6 con este sustrato de fermentación son significativamente más altos que los obtenidos con jugo de caña concentrado 41% Vs 39% respectivamente; esto podría indicar que bajo descenso de pH no hay una relación directamente proporcional entre las poblaciones de bacterias y el rendimiento de las fermentaciones con los dos sustratos mencionados, probablemente se trata de otros factores que afectan dichos resultados.

Una explicación a este evento podría ser que en sistemas de fermentación por lotes, el tiempo de retención de la levadura en reproducción así como el tiempo que tardan los vinos fermentados en ser destilados es menor con respecto a sistemas continuos donde suele ser más importante el control de los contaminantes bacterianos, pues básicamente las poblaciones bacterianas no permanecen el tiempo suficiente en el sistema para lograr la colonización de los sustratos y reproducirse a tal punto que logren afectar el rendimiento de la fermentación (Jacques *et al*, 1999).

Probablemente la utilización de compuestos antibióticos para generar levadura limpia e iniciar la etapa de propagación debe hacerse a concentraciones superiores a 2.0ppm para lograr un mejor efecto en el control de las bacterias ácido lácticas contaminantes y evitar

pérdidas de azúcar en etapa de reproducción, además, la acidulación del sustrato de fermentación debe ser constante como control de los contaminantes, como mecanismo facilitador para la inversión de la sacarosa y precipitación de la levadura y las sales de calcio (sulfato de calcio generado) sin que se afecte su metabolismo y sin ocasionar pérdidas por consumo innecesario.

De esta manera, el estándar de pH que hasta el momento se ha manejado para melaza (4.6) en planta es el adecuado en el proceso sin que la cepa de levadura actual vea afectada en su metabolismo y el consumo de ácido sulfúrico sea razonable, sin embargo, cuando exista la posibilidad de usar jugo de caña concentrado como sustrato de fermentación, la opción de disminuir el pH del medio puede ser favorable pues el incremento de la población de bacterias lácticas es superior cuando se utiliza este sustrato debido a sus características y al nivel de agua que debe adicionarse para lograr una concentración de azúcar determinada.

## 9. CONCLUSIONES

- Se demostró que la población de bacterias ácido lácticas presentes naturalmente en las mieles de caña utilizadas como sustratos de fermentación para la producción de alcohol, en sistemas de fermentación por lotes pueden ser controladas con el uso de antibióticos, sin embargo, ésta población contaminante a niveles menores o iguales a  $10^6$  en el inóculo, no afectó significativamente el rendimiento de la fermentación.
- Se pudo constatar que el uso de penicilina y virginamicina puede tenerse en cuenta como medida de control de contaminación por bacterias ácido lácticas, no obstante, las concentraciones sugeridas por el fabricante en este caso no fueron suficientes y no aportaron un beneficio significativo al proceso.
- Se observó que el tratamiento de descenso de pH (3.0 y 3.5) en los medios de reproducción y fermentación con melaza y jugo de caña no constituye una alternativa o medida favorable para el control de bacterias lácticas, pues afecta la población y viabilidad de la levadura y por ende repercute en el rendimiento y productividad de la fermentación.
- El uso de virginamicina en jugo de caña concentrado como sustrato de fermentación a concentración de 1.0ppm y 2.0ppm logró disminuir una unidad logarítmica el recuento de bacterias lácticas en la etapa de propagación con respecto al control donde no se utilizó ningún antibiótico, sin embargo, el rendimiento y productividad de las fermentaciones inoculadas bajo estas condiciones no varió significativamente.

## 10. RECOMENDACIONES

- En la fermentación alcohólica a partir de mieles de caña es necesario disminuir principalmente la población contaminante inicial, pues es a partir de esta es que se incrementan los niveles a lo largo del proceso ya que las condiciones del mismo son favorables no sólo para la levadura sino para bacterias ácido lácticas; para lograr esta disminución, sería necesario reevaluar y estandarizar el tiempo de exposición a temperatura de 70°C y lograr el calentamiento suficiente de manera que la población inicial sea tan baja que no logre incrementar dramáticamente durante el tiempo de propagación de la levadura.
- Realizar ensayos a escala piloto utilizando concentraciones de antibiótico similares y concentraciones más altas para evaluar si favorecen la disminución de la población de bacterias lácticas y conocer si con el escalamiento, los resultados son más efectivos y el inóculo que se obtiene tras la propagación representa la obtención de valores de rendimiento y productividad más altos.
- Evaluar si se está generando exceso de biomasa en fermentación ya que este podría ser un factor importante a tener en cuenta a la hora de analizar pérdidas de azúcar pues la división celular puede estar ocurriendo durante el tiempo de fermentación y esta medición podría constituir otro dato importante para el análisis de resultados de rendimiento y productividad de las fermentaciones.
- El método actual con el que se determina acidez volátil en mieles y vinos es general, no indica cual es el ácido que se produce en mayor cantidad, sería conveniente hacer esta determinación mediante HPLC para lograr una aproximación más real al origen de valores de acidez volátil en mieles y su drástico incremento en vinos de fermentación.

- Sería favorable validar y estandarizar el método para la detección de bacterias acéticas durante la etapa de reproducción de la levadura y contemplar el hecho que estas bacterias puedan constituir un riesgo para la pérdida de azúcar en el proceso y en caso de presentarse, si los metabolitos que producen inciden en los valores de acidez volátil normalmente registrados en proceso.

## 11. REFERENCIAS

- **Acevedo, A; Godoy, R y Bolaños, G.** 2003. *Incremento de la producción de alcohol en fermentación de melazas mediante la utilización del complejo enzimático Rhyzozyme.* XXII Congreso Colombiano de Ingeniería Química. Bucaramanga. Agosto 13-15.
- **Alcarde, A; Walder, J & Horii, J.** 2002. *Influence of gamma radiation on microbiological parameters of the ethanolic fermentation of sugar-cane must.* Radiation Physics and Chemistry. Vol 66. 411-413 pp.
- **Amsterdam, D.** 1996. *Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media.* In: Antibiotics in Laboratory medicine. Maryland, Williams and Wilkins. 52-78 pp.
- **Bely, M; Rinaldi, A & Dubourdieu, D.** 2003. *Influence of assimilable Nitrogen on Volatiles Acidity production by Saccharomyces cerevisiae during high sugar fermentation.* Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol 96 N° 6. 507-512 pp.
- **Bellissimi, E & Ingledew, W.** 2004. *Metabolic acclimatization: preparing active dry yeast for fuel ethanol production.* Process Biochemistry. Vol 40. 2205-2213 pp.
- **Blasco, Iñaki.** 2001. *Los ácidos del vino.* Reporte técnico. II Simposio Vinicultura Abril 17. Chile. 13 pp.
- **Blumberg, A & Alder, L.** 1997. *Physiology of osmotolerance in fungi.* Adv. Microbiol. Physiol. Vol 33. pp 145-212.

- **Converti, A; Arni, S; Sato, S; Monteiro, J & Aquarone, E.** 2003. *Simplified Modeling of fed-Batch alcoholic fermentation of sugarcane blackstrap molasses.* Wiley Periodicals Inc. Vol 7. 2045-2060 pp.
- **Crecy, L; Saurin, W; Thibaut, D; Gil, P; Naudin, L; Crouzet, J & Blanc, V.** 1997. *Streptogramin B, Biosynthesis in Streptomyces pristinaespiralis and Streptomyces virginiae: Molecular characterization of the last structural peptide synthetase gene.* Antimicrob Agents Chemoter. Vol 41. N° 9.
- **Errecalde, J.** 2004. *Uso de antimicrobianos en animales de consumo.* Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata. Argentina. 67pp.
- **Ethanol technology guide.** 2001. *International Fuel Ethanol Workshop and trade show.* New York. 445 pp.
- **Garza, R; Vilchis, E; Hernandez, L & Perea, L.** 2000. *Estreptograminas: un modelo interesante para hacerle frente a la resistencia bacteriana.* Facultad de Química. UNAM. 20 pp.
- **Huang, Y; Edwards, C & Peterson, J.** 1994. *Relationship between stuck fermentation of grappe juice and inhibition of wine yeast by lactic acid bacteria.* Presented at the Annual Meeting of the Northwest Chapter of the American Society for Enology and Viticulture. Lake Chalan, WA.
- **Ingledeu, W; Sosulski, F & Magnus, C.** 1996. *An assessment of yeast foods and their utility in brewing and enology.* Journal of American Society of Brewing Chemistry. Vol 44. 166-170 pp.

- **Jacques, K; Lyons, T & Kelsall, D.** 1999. *The Alcohol Textbook*. 3<sup>rd</sup> Edition. Nottingham University press. Chapters 1, 3, 5, 6, 20 y 21. 386pp.
- **Kandler, O.** 1983. *Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria*. Antonie Van Leeuwenhoek. Chapter 49. 209-224 pp.
- **Kelsall, D.** 1995. *The management of fermentations in the production of alcohol*. In: The alcohol textbook Nottingham University Press. Nottingham UK. 89-101pp.
- **Koizumi, T.** 2005. *The Brazilian ethanol programme: impacts on world ethanol and sugar markets*. International Sugar Journal. Vol 107. N° 1275.
- **Leclerq, R & Courvalin, P.** 1998. *Streptogramins : An answer to antibiotic resistance in gram-positive bacteria*. Lancet. Vol 352. N° 9128.
- **Manual de Operaciones Planta Alcoquímica.** 1996. Manual de Operaciones Sucromiles S.A. Cali Colombia. 312 pp.
- **Mathews, C; Van Holde, K & Ahern, K.** 2002. *Bioquímica*. 3<sup>a</sup> Edición. Ed. Addison Wesley. Madrid España. 502-548 pp.
- **Mibielli, G & Filho, F.** 1999. *Sintese do processo de obtencao de dextrana clinica e fructose a partir de sacarose*. XIX Interamerican Congress of Chemical Engineering. Universidade estadual de campinas . Campinas Brasil. 1-10 pp.
- **Mohamed, Y.** 1996. *The use of molasses for the production of acetone-butanol...* Proceedings of the XIX congress of the international society of sugar cane technologist. Jakarta Indonesia. 957-963 pp.

- **Nelson & Cox.** 2001. Lenhinger. Principles of biochemistry. Third edition. Worth edition. New york. 1790pp.
- **Oliveira, S; Paiva, T; Visconti, A & Giudici, R.** 1999. *Continuous alcoholic fermentation process: model considering loss of cell viability.* Bioprocess Engineering. Vol 20. 157-160 pp.
- **PRAJ.** 1999. *Technical Analytical Report.* Technology Development centre. Page 13.
- **Pramanik, K.** 2003. *Parametric studies on batch alcohol fermentation using Saccharomyces yeast, extracted from toddy.* J-Chin-Inst-Chem-Engrs. Vol 34 N° 4. 487-492 pp.
- **Ravelo, S; Ramos, E & Torres, B.** 1991. Inhibition of oligo and polysaccharide formation during sugar cane deterioration. Int Sugar Journal. Vol 93. N° 1113. 180-183 pp.
- **Reguant, C; Carreté, R & Bordons, A.** 2003. Nuevo método de PCR (Multiplex RAPD) para diferenciar cepas de *Oenococcus oeni*. ACE Revista de Enología. Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Unidad de Enología del Centro de Referencia en Tecnología de Alimentos (CeRTA). 6pp.
- **Remize, F; Andrieu, E & Dequin, S.** 2000. *Engineering of the Piruvate Dehydrogenase Bypass in Saccharomyces cerevisiae: Role of the Cytosolic Mg and mitochondrial K Acetaldehyde Dehydrogenases in Acetate Formation during*

*Alcoholic Fermentation*. Applied and Environmental Microbiology. Vol 66. N° 8. pp 3151-3159.

- **Rodriguez, D & Smith, R.** 2001. *Reducción de acidez volátil en vinos por medio de adsorción selectiva de ácido acético de un permeato separado del vino por Osmosis inversa*. Vinovation Inc and Oenovation Internacional LLC. Santiago de Chile. pp 374-378.
- **Ruckle, L.** 2005. *Hop acids as natural antibacterials in ethanol fermentation*. International Sugar Journal. Vol 107 N° 1275. 162-165pp.
- **Santomá, G.** 2003. *Propuestas nutricionales en la alimentación avícola ante los nuevos retos del mercado*. Alimentación secciones avícolas. Barcelona España. 371-377.
- **Tomasso, M.** 2004. *Tolerancia de las levaduras al etanol*. *Tesis de Grado*. Universidad de la República. Facultad de Química. Uruguay.

## 12. ANEXOS

### ANEXO 1

#### DETERMINACION DE LA MORFOLOGIA DE LA LEVADURA

- Mezclar vigorosamente la muestra ya que la levadura se precipita fácilmente.
- Tomar una gota de la muestra y colocarla sobre una lámina portaobjetos y cubrir con una laminilla.
- Montar la lámina en el microscopio y enfocar en el objetivo de 10X, después pasar al objetivo de 40X donde se realiza la observación.
- Determinar el porcentaje de gemación y homogeneidad de la levadura.

## ANEXO 2

### RECUENTO EN CÁMARA DE NEUBAUER Y PORCENTAJE DE VIABILIDAD

#### Levadura Hidratada:

- Diluir 11 g de levadura hidratada en un frasco de vidrio, adicionando 99g de agua de pozo.
- Mezclar hasta obtener una solución homogénea.
- Tomar  $1\text{ cm}^3$  de la solución de levadura hidratada II y llevar a un balón aforado de  $100\text{ cm}^3$  adicionado con azul de metileno al 1%.
- Montar la muestra en la cámara de recuento y realizar el recuento en el cuadrante del centro y teniendo en cuenta las células que están gemando a partir del tamaño de las mismas.
- El recuento de células obtenidas se multiplica por el factor de dilución  $10^7$  y se expresa en células/  $\text{cm}^3$ .
- El porcentaje de viabilidad se obtiene multiplicando el número de células vivas \* 100 y dividiendo por el número de células totales.

#### Levadura en Proceso de Reproducción y Fermentación:

- Mezclar vigorosamente la muestra de la cuba a analizar.
- Tomar  $1\text{ cm}^3$  de muestra de la cuba de reproducción o el fermentador utilizando una pipeta graduada y verter en un balón aforado de  $100\text{ cm}^3$  adicionado con azul de metileno al 1%.
- Se realiza el mismo montaje del anterior literal.
- El recuento de células obtenidas se multiplica por el factor de dilución y el factor de la cámara.
- El porcentaje de viabilidad se obtiene multiplicando el número de células vivas \* 100 y dividiendo por el número de células totales.

### **ANEXO 3**

#### **DETERMINACION DE LA CONCENTRACION EN MEDIO SÓLIDO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

##### **A. MUESTREO**

La toma de muestras debe realizarse bajo condiciones de esterilidad y con instrumentos previamente esterilizados 15 minutos a 15 libras de presión y 121°C, según los niveles esperados de contaminantes y dependiendo del tratamiento previo de cada muestra se realizan diluciones seriadas en agua tamponada ó agua peptonada con ayuda de micropipeta y dentro de una cámara de flujo laminar previamente limpia, cada una de las diluciones deseadas se vierte en cajas de petri estériles en los volúmenes adecuados para la dilución.

##### **B. SIEMBRA EN PLACA**

Para el aislamiento e identificación de bacterias acidolácticas se utiliza el medio de cultivo agarizado MRS (Marca Difco) y la técnica de siembra en profundidad, el cual se prepara utilizando 70g/L del medio de cultivo sólido, calentamiento hasta ebullición, adición de antifúngico y posterior autoclavado 15 minutos a 15 libras de presión y 121°C, enfriamiento hasta 37°C, pH final 6.5 y bajo cámara de flujo laminar se vierte el medio sobre las cajas de petri previamente adicionadas con la muestra, se espera su solidificación y se adiciona una segunda capa sellante para garantizar la condición de anaerobiosis.

##### **C. INCUBACIÓN**

Cuando el medio de cultivo ya se ha solidificado, las cajas se invierten y se incuban en cámaras de anaerobiosis a 37°C por 48 horas, luego de transcurrido este tiempo las colonias de bacterias acidolácticas tienen un tamaño considerable y entonces se procede a realizar el recuento teniendo en cuenta la correspondiente dilución realizada a la muestra.



La muestra de la levadura hidratada en agua a 41°C se toma con un asa estéril y se siembra por aislamiento en el medio sólido específico, en este caso medio YM.

### **B. INCUBACIÓN**

Las cajas de petri sembradas con el microorganismo se incuban de 30-32°C durante 48 horas y tras este tiempo se realiza la observación directa de las colonias.

### **C. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

Las colonias redondas, grandes que presenten color crema y borde uniforme corresponden a la levadura evaluada, las colonias más pequeñas que puedan crecer en el medio corresponden a colonias bacterianas, sin embargo para evitar este crecimiento puede adicionarse al medio un antibiótico que evite falsos positivos y facilite el crecimiento de la levadura únicamente ( Ej. novobiocina).

Sin embargo, es recomendable realizar una coloración simple con cristal violeta de las diferentes colonias para verificar su morfología microscópicamente.

<b>Composición MEDIO YM</b>	<b>g/L</b>
Extracto de levadura	3.0
Extracto de malta	3.0
Peptona	5.0
Dextrosa	10
Agar-agar	20
pH 6.2	

Esterilizar a 121 °C y 15 libras de presión. Adicionar novobiocina al 0.1 %.

### **RECuento de Levaduras Salvajes**

#### **A. MUESTRA**

La muestra corresponde a las mieles de caña utilizadas como sustratos de fermentación.

## **B. INCUBACIÓN**

Las cajas de petri sembradas con la muestra se incuban a 30°C durante 48 horas y tras este tiempo se realiza la observación directa de las colonias.

## **C. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

Cualquier colonia que crezca en este medio de cultivo es presuntiva de levadura salvaje debido a su composición especial diferencial, de manera que a partir de las colonias que se registren, se realiza una coloración simple con cristal violeta de las diferentes colonias para verificar su morfología microscópicamente, las levaduras salvajes presentan morfologías variadas, algunas son alargadas, romboides, cóncavas, sin embargo pueden tener morfología similar a la de *Saccharomyces* cuando se encuentran en condiciones ideales.

## **ANEXO 5**

### **PRUEBAS ADICIONALES PARA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES BACTERIANOS**

#### **Coloración de Gram**

- Tomar con asa estéril la colonia que desea identificarse y suspenderla en un portaobjetos con una gota de agua estéril.
- Fijar la solución en calor
- Adicionar el colorante cristal violeta durante 1 minuto, lavar con agua destilada, adicionar lugol y poner en contacto por 1 minuto, lavar con agua destilada, decolorar con alcohol acetona por 15 segundos, lavar con agua destilada, anadir colorante fucsina básica, lavar con agua destilada y secar a temperatura ambiente.
- Observar al microscopio y determinar morfología celular (cocos, bacilos, coco-bacilos) y comportamiento frente a coloración (Gram negativos: color rosado, Gram positivos: color violeta).

#### **Siembra en Agar hipersacarosa**

- Tomar la colonia a evaluar con asa estéril
- Sembrar por aislamiento en el medio agarizado Hipersacarosa
- Incubar 24-48 horas a 30°C
- Leer e interpretar los resultados: colonias transparentes, opacas, productoras de goma típicas de leuconostoc, de hecho básicamente sólo este género puede crecer en este medio.

#### **Medio de cultivo Hipersacarosa**

Composición	g/L
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	3

Bacto peptona	2.5
Sacarosa	150
Fosfato dipotásico	2
Cloruro de sodio	1
pH final	6.8 +/- 0.2

## **ANEXO 6**

## DETERMINACION DE ACIDEZ VOLÁTIL EN MIELES Y EN VINOS

- Medir volumétricamente 100ml de la muestra de miel diluida ó vino y adicionarlos en un balón de 500 ó 1000ml fondo redondo.
- Adicionar a la muestra, 200ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% ( esta solución no debe tener contacto con las paredes del balón, para evitar la formación de trióxido de azufre ó dióxido de azufre que pueden ser arrastrados por el destilado originando lecturas de destilación erróneas.
- Conectar el balón al equipo de destilación cuidando de no tener ningún escape de la muestra ni de los vapores originados. (ver figura).
- Mantener en agitación constante mediante plancha agitadora y la manta de calentamiento debe estar en 70°C.
- Recolectar 200ml del destilado en erlenmeyer de vidrio correctamente lavado y seco.
- Adicionar al destilado 5 gotas del indicador fenoftaleína.
- Titular con NaOH 0,1 meq/ml hasta que el color rosa permanezca durante 30 segundos.
- Realizar un blanco de corrección así:  
100ml de agua destilada + 200ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% y determinar el blanco de titulación de la misma manera que se titula la muestra.
- Restar la lectura de titulación del blanco, de la lectura de titulación de la muestra y calcular.

### CALCULOS:

$$AV \text{ en ppm: } (V_{tm} - V_{tb}) * FD * 171.4$$

Donde:

V<sub>tm</sub>: Volumen de titulación de la muestra

V<sub>tb</sub>: Volumen de titulación del blanco

FD: Factor de dilución

171.4: Constante

## ANEXO 7

### METODO DE FELHING PARA DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES REDUCTORES

- Pesar 10g de miel, diluirla en 100ml de agua destilada y transferirla a un balón aforado de 500ml, llevar a ese volumen con agua destilada y agitar.
- En un balón aforado de 100ml, adicionar 25ml de la solución anterior, 10ml de agua y 10ml de HCl al 25%, mezclar y calentar en baño termostático a 70°C durante 30 minutos.
- Enfriar y adicionar 3 gotas de fenoftaleína 1% m/v.
- Neutralizar el exceso de HCl adicionando NaOH 25% hasta un viraje rosa y luego lentamente HCl hasta su desaparición.
- Enfriar y completar el volumen a 100ml con agua destilada.
- Transferir la solución invertida y neutralizada a una bureta.
- En un erlenmeyer de 500ml mezclar 5ml de solución felhing A y 5ml de solución felhing B y adicionar con la bureta aproximadamente 10-15ml de la solución dependiendo de la miel.
- Mezclar en plancha agitadora y calentar a ebullición por dos minutos, adicionar 6 gotas de azul de metileno 1% m/v y continuar agitando.
- Comenzar a titular gota a gota lentamente con la solución invertida hasta la aparición de un color rojo ladrillo incluso en la espuma.
- Mantener la emisión de vapor que evitará la oxidación regresiva que podría ocasionar el aire sobre la solución.
- Repetir la titulación utilizando como volumen inicial el volumen hallado anteriormente menos 1ml, promediar estos valores de titulación y calcular.

CALCULOS:

$$\%m/m \text{ ATR: } FF * (VFA + VFB) * FD * 100/Vt$$

Donde:

FF: factor de estandarización de la solución de felhing.

VFA + VFB: volumen de la solución de felhingA + felhingB

FD: factor de dilución de la miel

Vt: Volumen de la solución invertida gastado en la titulación.

En el caso de vinos y diluciones de las mieles el % de ATR's debe calcularse a partir de un volumen definido de la muestra, cuyo tratamiento será el mismo que para mieles puras y el volumen de aforo será de 100ml:

Vino 25ml/100ml

Miel de segunda dilución (aprox 22%): 3ml/100ml

Miel de tercera dilución (aprox 7%): 5ml/100ml.

La variación en el cálculo será el factor de dilución: (100/volumen de la muestra)

## ANEXO 8

### DETERMINACION DE PORCENTAJE DE ALCOHOL EN VINOS

- Enfriar la muestra entre 20-25°C y homogenizar.
- En un enlenmeyer de 250ml adicionar 20ml de dicromato de potasio 0.2meq/ml, 25ml de agua destilada y 10ml de ácido sulfúrico concentrado, dejar enfriar esta mezcla.
- Medir volumétricamente 0.5ml de la muestra de vino y adicionarlos aun balón de fondo plano de 250ml que contenga perlas de vidrio y 25ml de agua destilada.
- Conectar estas soluciones con una manguera y tapón hermético y calentar la muestra a ebullición recogiendo los vapores en la solución de dicromato de potasio hasta la tercera parte del volumen inicial de la mezcla.
- Dejar enfriar después de la destilación y titular el exceso de dicromato de potasio con una solución de sulfato ferroso amónico (0,15meq/ml) estandarizada, utilizando tres gotas ferroína como indicador hasta el viraje de éste a color ámbar (café-rojizo).
- Hacer un blanco con agua destilada y calcular.

### CALCULOS:

$$\%v/v: \frac{(V_b - V_t) * N * \text{pmOH} * \frac{1}{4000} * 100}{\text{Vol Muestra (ml)} * \text{dOH}}$$

Donde:

Vb: volumen del blanco

Vt: Volumen de titulación del vino

N: Normalidad del sulfato ferroso

pmOH: 46.07

Densidad del etanol puro (dOH): 0.79 g/ml

## ANEXO 9

REGISTROS DE RESULTADOS DE ENSAYO ETAPA DE REPRODUCCION

**Tabla 36.** Características iniciales de Miel de Tercera dilución

Sustrato	Antibiótico / pH	Ensayo	Densidad (g/ml)	Acidez Volátil (ppm)	Concentración de BAL (UFC/ml)
Melaza	Penicilina	1	1.049	354	5.0 E+03
		2	1.052	358	2.0 E+03
		3	1.051	355	2.1 E+03
		4	1.048	362	7.0 E+03
	Virginamicina	1	1.048	365	4.0 E+03
		2	1.050	370	4.0 E+03
		3	1.050	356	3.1 E+03
		4	1.049	364	3.0 E+03
	pH	1	1.050	359	3.1 E+03
		2	1.052	368	3.3 E+03
		3	1.050	358	4.0 E+03
		4	1.051	361	2.8 E+03
Jugo de Caña Concentrado	Penicilina	1	1.025	129	1.1 E+02
		2	1.023	127	4.5 E+02
		3	1.025	131	3.2 E+02
		4	1.026	124	5.4 E+02
	Virginamicina	1	1.022	152	1.1 E+02
		2	1.024	141	3.6 E+02
		3	1.025	138	2.6 E+02
		4	1.025	149	4.1 E+02
	pH	1	1.026	150	1.8 E+02
		2	1.024	142	3.4 E+02
		3	1.024	148	1.3 E+02
		4	1.026	141	1.8 E+02

**Tabla 37.** Características iniciales de Miel de Segunda dilución

Sustrato	Antibiótico / pH	Ensayo	Densidad (g/ml)	Acidez Volátil (ppm)	Concentración de BAL (UFC/ml)
Melaza	Penicilina	1	1.100	714	1.1 E+03
		2	1.098	701	1.0 E+03
		3	1.098	689	2.0 E+03
		4	1.098	714	4.1 E+03
	Virginamicina	1	1.100	802	3.2 E+03
		2	1.100	816	1.6 E+03
		3	1.098	841	1.9 E+03
		4	1.100	795	1.4 E+03
	pH	1	1.100	809	2.6 E+03
		2	1.110	830	3.2 E+03
		3	1.100	822	3.6 E+03
		4	1.100	804	4.1 E+03
Jugo de Caña Concentrado	Penicilina	1	1.081	338	2.6 E+02
		2	1.082	351	3.1 E+02
		3	1.080	342	3.7 E+02
		4	1.081	319	4.0 E+02
	Virginamicina	1	1.080	340	2.6 E+02
		2	1.081	335	4.2 E+02
		3	1.079	331	3.7 E+02
		4	1.080	328	1.5 E+02
	pH	1	1.077	327	1.2 E+02
		2	1.079	332	1.5 E+02
		3	1.078	345	3.1 E+02
		4	1.078	322	3.1 E+02

**Tabla 38.** Variables de respuesta etapa de reproducción de Melaza tratado con Penicilina (24 horas)

Ensayo	Tratamiento	Concentración de antibiótico (ppm)	Recuento de Levadura (UFC/ml)	Viabilidad de Levadura (%)	Recuento BAL (UFC/ml)	Acidez Volátil (ppm)
1	Control P4A	0.00	3.1 E+08	100	3.5 E+05	1624
	P1A	0.50	3.2 E+08	100	2.9 E+05	1641
	P2A	1.00	3.1 E+08	100	4.0 E+05	1580
	P3A	2.00	2.9 E+08	100	3.3 E+05	1661
2	Control P4A	0.00	3.0 E+08	100	2.6 E+05	1642

	P1A	0.50	3.1 E+08	100	3.1 E+05	1615
	P2A	1.00	2.9 E+08	100	3.9 E+05	1511
	P3A	2.00	2.9 E+08	100	4.1 E+05	1596
3	Control P4A	0.00	3.0 E+08	100	2.5 E+05	1608
	P1A	0.50	3.1 E+08	100	3.4 E+05	1700
	P2A	1.00	3.2 E+08	100	4.0 E+05	1689
	P3A	2.00	2.9 E+08	100	4.0 E+05	1664
4	Control P4A	0.00	2.9 E+08	100	3.6 E+06	1598
	P1A	0.50	2.8 E+08	100	3.3 E+05	1640
	P2A	1.00	3.1 E+08	100	3.8 E+05	1600
	P3A	2.00	2.9 E+08	100	2.9 E+04	1602

**Tabla 39.** Variables de respuesta etapa de reproducción de Melaza tratado con Virginamicina (24 horas)

Ensayo	Tratamiento	Concentración de antibiótico (ppm)	Recuento de Levadura (UFC/ml)	Viabilidad de Levadura (%)	Recuento BAL (UFC/ml)	Acidez Volátil (ppm)
1	Control V4A	0.00	3.1 E+08	100	3.2 E+05	1412
	V1A	0.50	3.0 E+08	100	3.6 E+05	1450
	V2A	1.00	2.8 E+08	100	2.9 E+05	1532
	V3A	2.00	3.2 E+08	100	3.1 E+04	1405
2	Control V4A	0.00	3.4 E+08	100	3.3 E+05	1507
	V1A	0.50	2.9 E+08	100	3.8 E+05	1521
	V2A	1.00	2.9 E+08	100	3.6 E+05	1489
	V3A	2.00	3.1 E+08	100	3.4 E+04	1427
3	Control V4A	0.00	3.3 E+08	100	3.0 E+05	1408
	V1A	0.50	3.3 E+08	100	2.9 E+05	1521
	V2A	1.00	3.4 E+08	100	3.2 E+05	1472
	V3A	2.00	2.8 E+08	100	3.2 E+04	1308
4	Control V4A	0.00	2.7 E+08	100	2.8 E+05	1504
	V1A	0.50	3.1 E+08	100	3.4 E+05	1475
	V2A	1.00	3.2 E+08	100	3.5 E+05	1429
	V3A	2.00	3.3 E+08	100	3.2 E+04	1398

**Tabla 40.** Variables de respuesta etapa de reproducción de Jugo de caña concentrado tratado con Penicilina (24 horas)

Ensayo	Tratamiento	Concentración de antibiótico (ppm)	Recuento de Levadura (UFC/ml)	Viabilidad de Levadura (%)	Recuento BAL (UFC/ml)	Acidez Volátil (ppm)
1	Control P4B	0.00	3.0 E+08	100	3.9 E+06	2714
	P1B	0.50	3.1 E+08	100	2.8 E+06	2904
	P2B	1.00	3.1 E+08	100	3.1 E+06	2876
	P3B	2.00	2.9 E+08	100	2.5 E+05	2708
2	Control P4B	0.00	3.0 E+08	100	3.8 E+06	2729
	P1B	0.50	3.2 E+08	100	3.9 E+06	2859
	P2B	1.00	3.1 E+08	100	4.2 E+06	2814
	P3B	2.00	3.0 E+08	100	3.1 E+05	2759
3	Control P4B	0.00	2.9 E+08	100	3.3 E+06	2802
	P1B	0.50	2.9 E+08	100	3.2 E+06	2755
	P2B	1.00	3.0 E+08	100	3.6 E+06	2802
	P3B	2.00	2.9 E+08	100	3.5 E+05	2806
4	Control P4B	0.00	3.0 E+08	100	4.1 E+06	2745
	P1B	0.50	2.9 E+08	100	4.0 E+06	2856
	P2B	1.00	3.0 E+08	100	3.9 E+06	2771
	P3B	2.00	3.0 E+08	100	4.0 E+05	2821

**Tabla 41.** Variables de respuesta etapa de reproducción de Jugo de caña concentrado tratado con Virginamicina (24 horas)

Ensayo	Tratamiento	Concentración de antibiótico (ppm)	Recuento de Levadura (UFC/ml)	Viabilidad de Levadura (%)	Recuento BAL (UFC/ml)	Acidez Volátil (ppm)
1	Control V4B	0.00	2.9 E+08	100	2.7 E+06	2914
	V1B	0.50	3.0 E+08	100	2.9 E+06	2925
	V2B	1.00	3.0 E+08	100	3.3 E+05	3004
	V3B	2.00	3.0 E+08	100	3.1 E+05	2906
2	Control V4B	0.00	3.0 E+08	100	3.5 E+06	2778
	V1B	0.50	3.1 E+08	100	3.4 E+06	2894
	V2B	1.00	2.8 E+08	100	2.8 E+05	2994
	V3B	2.00	2.9 E+08	100	3.2 E+05	2870

3	Control V4B	0.00	2.9 E+08	100	2.4 E+06	3002
	V1B	0.50	2.9 E+08	100	2.3 E+06	3009
	V2B	1.00	2.8 E+08	100	2.6 E+05	2994
	V3B	2.00	3.0 E+08	100	2.5 E+05	2708
4	Control V4B	0.00	3.0 E+08	100	3.3 E+06	2856
	V1B	0.50	3.1 E+08	100	3.4 E+06	2859
	V2B	1.00	3.1 E+08	100	3.2 E+05	2896
	V3B	2.00	3.1 E+08	100	3.5 E+05	3002

**Tabla 42.** Variables de respuesta etapa de reproducción de Melaza con ajuste de pH (24 horas)

Ensayo	Tratamiento	pH	Recuento de Levadura (UFC/ml)	Viabilidad de Levadura (%)	Recuento BAL (UFC/ml)	Acidez Volátil (ppm)
1	H1A	3.0	1.4 E+06	74	3.1 E+04	1498
	H2A	3.5	3.0 E+07	76	4.4 E+04	1502
	H3A	4.0	3.6 E+08	100	2.8 E+05	1470
	Control H4A	4.6	4.0 E+08	100	3.8 E+05	1485
2	H1A	3.0	2.1 E+06	79	4.2 E+04	1479
	H2A	3.5	4.1 E+07	79	4.7 E+04	1509
	H3A	4.0	3.3 E+08	100	1.0 E+05	1418
	Control H4A	4.6	3.8 E+08	100	1.8 E+05	1475
3	H1A	3.0	1.8 E+06	80	2.3 E+04	1492
	H2A	3.5	2.9 E+07	81	3.9 E+04	1514
	H3A	4.0	4.2 E+08	100	5.8 E+05	1481
	Control H4A	4.6	4.1 E+08	100	4.6 E+05	1439
4	H1A	3.0	2.7 E+06	77	3.0 E+04	1481
	H2A	3.5	3.6 E+07	77	5.2 E+04	1408
	H3A	4.0	3.3 E+08	100	3.6 E+05	1584
	Control H4A	4.6	3.1 E+08	100	2.8 E+05	1508

**Tabla 43.** Variables de respuesta etapa de reproducción de Jugo de caña concentrado con ajuste de pH (24 horas)

Ensayo	Tratamiento	pH	Recuento de Levadura (UFC/ml)	Viabilidad de Levadura (%)	Recuento BAL (UFC/ml)	Acidez Volátil (ppm)
1	H1B	3.0	2.9 E+06	78	3.5 E+04	1860
	H2B	3.5	2.6 E+07	86	3.7 E+04	1900
	H3B	4.0	2.7 E+07	99	2.8 E+06	1870
	Control H4B	4.6	2.9 E+08	100	3.2 E+06	2100
2	H1B	3.0	2.8 E+06	79	4.1 E+04	1794
	H2B	3.5	3.1 E+07	86	3.8 E+04	1879
	H3B	4.0	3.0 E+07	100	3.9 E+06	1855
	Control H4B	4.6	2.9 E+08	100	3.6 E+06	2021
3	H1B	3.0	2.5 E+06	79	2.6 E+04	1809
	H2B	3.5	2.6 E+07	81	2.7 E+04	1824
	H3B	4.0	2.5 E+07	99	3.4 E+06	1861
	Control H4B	4.6	2.8 E+08	100	3.0 E+06	2300
4	H1B	3.0	2.9 E+06	81	3.4 E+04	1800
	H2B	3.5	2.8 E+07	84	3.2 E+04	1872
	H3B	4.0	3.1 E+07	100	3.3 E+06	1880
	Control H4B	4.6	3.1 E+08	100	3.6 E+06	2205

**ANEXO 10**

**REGISTROS DE RESULTADOS DE ENSAYO ETAPA DE FERMENTACION**

**Tabla 44.** Variables de respuesta etapa de fermentación de Melaza inoculo tratado con Penicilina (30 horas)

Ensayo	Tratamiento	Concentración de antibiótico (ppm)	Alcohol producido (% v/v)	Azúcar Residual después de 30h de fermentación (% m/v)	Miel 3 dilución (% m/v de azúcar reductor)	Miel 2 dilución (% m/v de azúcar reductor)	Rendimiento (%)	Eficiencia (%)
1	Control P4A	0.00	8.06	2.01	6.78	20.32	39	80.66
	P1A	0.50	8.11	2.32			40	81.16
	P2A	1.00	8.29	1.96			41	82.96
	P3A	2.00	8.35	1.43			41	83.57
2	Control P4A	0.00	8.13	2.08	7.08	21.01	38	78.62
	P1A	0.50	8.09	2.00			38	78.23
	P2A	1.00	8.30	2.00			39	80.27
	P3A	2.00	8.34	2.41			39	80.65
3	Control P4A	0.00	7.92	1.76	6.84	19.61	39	81.71
	P1A	0.50	8.00	1.78			40	82.52
	P2A	1.00	8.25	1.84			41	85.12
	P3A	2.00	8.39	1.89			42	86.55
4	Control P4A	0.00	8.15	1.35	7.02	19.81	40	83.05
	P1A	0.50	8.12	2.18			42	82.74
	P2A	1.00	8.38	1.70			42	85.41
	P3A	2.00	8.43	1.96			40	85.91

**Tabla 45.** Variables de respuesta etapa de fermentación de Melaza inoculo tratado con Virginamicina (30 horas)

Ensayo	Tratamiento	Concentración de antibiótico (ppm)	Alcohol producido (% v/v)	Azúcar Residual después de 30h de fermentación (g/ml)	Miel 3 dilución (% m/v de azúcar reductor g/ml)	Miel 2 dilución (% m/v de azúcar reductor g/ml)	Rendimiento (%)	Eficiencia (%)
1	Control V4A	0.00	8.04	2.01	6.78	19.20	42	85.23
	V1A	0.50	8.11	1.76			42	85.87
	V2A	1.00	8.25	1.92			43	87.46
	V3A	2.00	8.48	2.05			44	89.90

2	Control V4A	0.00	8.09	1.38	7.01	20.02	40	81.67
	V1A	0.50	8.03	1.76			40	81.06
	V2A	1.00	8.23	1.28			40	83.09
	V3A	2.00	8.34	1.32			41	84.19
3	Control V4A	0.00	7.95	1.86	6.69	20.07	39	80.56
	V1A	0.50	8.02	2.01			40	81.27
	V2A	1.00	8.21	1.9			41	83.29
	V3A	2.00	8.26	1.94			41	83.71
4	Control V4A	0.00	8.09	2.19	6.81	19.80	40	82.77
	V1A	0.50	8.05	1.78			40	82.36
	V2A	1.00	8.28	2.02			41	84.71
	V3A	2.00	8.31	2.14			41	85.02

**Tabla 46.** Variables de respuesta etapa de fermentación de Jugo de caña concentrado inculo tratado con Penicilina (30 horas)

Ensayo	Tratamiento	Concentración de antibiótico (ppm)	Alcohol producido (% v/v)	Azúcar Residual después de 30h de fermentación (g/ml)	Miel 3 dilución (% m/v de azúcar reductor g/ml)	Miel 2 dilución (% m/v de azúcar reductor g/ml)	Rendimiento (%)	Eficiencia (%)
1	Control P4B	0.00	7.73	0.86	6.92	19.50	38	79.97
	P1B	0.50	7.67	0.87			38	79.35
	P2B	1.00	7.80	0.92			39	80.70
	P3B	2.00	7.86	0.99			40	81.32
2	Control P4B	0.00	7.61	0.07	6.83	19.40	38	79.22
	P1B	0.50	7.70	0.69			39	80.16
	P2B	1.00	7.90	0.93			40	82.24
	P3B	2.00	7.91	0.84			40	82.35
3	Control P4B	0.00	7.68	0.93	6.93	20.08	38	77.45
	P1B	0.50	7.64	1.01			37	77.04
	P2B	1.00	7.77	0.80			38	78.35
	P3B	2.00	7.84	1.95			39	79.06
4	Control P4B	0.00	7.72	1.00	6.79	20.40	37	76.98
	P1B	0.50	7.69	0.78			37	76.68
	P2B	1.00	7.81	0.81			38	77.88
	P3B	2.00	7.89	0.68			38	78.67

**Tabla 47.** Variables de respuesta etapa de fermentación de Jugo de caña concentrado inoculo tratado con Virginamicina (30 horas)

Ensayo	Tratamiento	Concentración de antibiótico (ppm)	Alcohol producido (% v/v)	Azúcar Residual después de 30h de fermentación (g/ml)	Miel 3 dilución (% m/v de azúcar reductor g/ml)	Miel 2 dilución (% m/v de azúcar reductor g/ml)	Rendimiento (%)	Eficiencia (%)
1	Control V4B	0.00	8.05	0.30	6.60	19.92	40	82.25
	V1B	0.50	7.99	0.46			39	81.63
	V2B	1.00	8.19	0.72			41	83.68
	V3B	2.00	8.23	0.91			41	84.09
2	Control V4B	0.00	8.04	0.92	6.56	20.01	40	81.89
	V1B	0.50	7.98	0.75			40	81.28
	V2B	1.00	8.19	0.63			41	83.41
	V3B	2.00	8.15	0.62			40	83.09
3	Control V4B	0.00	7.99	0.70	7.20	20.54	38	78.61
	V1B	0.50	8.05	0.78			39	79.21
	V2B	1.00	7.93	0.91			38	78.02
	V3B	2.00	8.18	0.61			39	80.48
4	Control V4B	0.00	8.01	0.71	6.72	20.01	40	81.34
	V1B	0.50	8.02	0.41			40	81.44
	V2B	1.00	8.18	0.62			40	83.06
	V3B	2.00	8.23	0.78			41	83.57

**Tabla 48.** Variables de respuesta etapa de fermentación de Melaza inoculo tratado con ajuste de pH (30 horas)

Ensayo	Tratamiento	pH	Alcohol producido (% v/v)	Azúcar Residual después de 30h de fermentación (g/ml)	Miel 3 dilución (% m/v de azúcar reductor g/ml)	Miel 2 dilución (% m/v de azúcar reductor g/ml)	Rendimiento (%)	Eficiencia (%)
1	H1A	3.0	7.20	3.38	7.04	19.70	36	73.67
	H2A	3.5	7.54	3.01			38	77.15
	H3A	4.0	8.13	2.21			41	83.18
	Control H4A	4.6	8.10	2.08			40	82.87
2	H1A	3.0	7.35	3.49	7.20	20.00	36	74.01
	H2A	3.5	7.41	2.72			36	74.6
	H3A	4.0	8.17	2.25			40	82.26
	Control H4A	4.6	8.25	2.11			41	83.06

3	H1A	3.0	7.15	3.55	6.96	20.00	35	72.31
	H2A	3.5	7.37	2.01			36	74.54
	H3A	4.0	8.04	2.01			40	81.31
	Control H4A	4.6	8.13	2.04			40	82.22
4	H1A	3.0	7.41	3.64	6.94	20.06	37	74.77
	H2A	3.5	7.70	2.34			38	77.70
	H3A	4.0	8.24	2.13			41	83.15
	Control H4A	4.6	8.36	1.98			41	84.36

**Tabla 49.** Variables de respuesta etapa de fermentación de Jugo de caña concentrado inoculo tratado ajuste de pH (30 horas)

Ensayo	Tratamiento	pH	Alcohol producido (% v/v)	Azúcar Residual después de 30h de fermentación (g/ml)	Miel 3 dilución (% m/v de azúcar reductor g/ml)	Miel 2 dilución (% m/v de azúcar reductor g/ml)	Rendimiento (%)	Eficiencia (%)
1	H1B	3.0	7.74	1.32	6.78	19.81	39	79.23
	H2B	3.5	7.77	1.02			39	79.54
	H3B	4.0	7.95	0.85			40	81.38
	Control H4B	4.6	7.92	0.86			39	81.07
2	H1B	3.0	7.91	1.41	6.91	20.10	39	71.95
	H2B	3.5	7.83	1.28			38	71.22
	H3B	4.0	8.04	0.72			39	73.13
	Control H4B	4.6	8.04	0.91			39	73.13
3	H1B	3.0	7.41	1.21	6.86	21.00	35	72.23
	H2B	3.5	7.81	1.40			37	75.83
	H3B	4.0	7.89	0.72			37	76.60
	Control H4B	4.6	8.11	0.78			38	78.74
4	H1B	3.0	7.53	1.24	6.91	19.85	37	76.72
	H2B	3.5	7.72	1.04			38	78.66
	H3B	4.0	7.88	0.95			39	80.29
	Control H4B	4.6	8.11	0.64			40	82.64

## ANEXO 11

Muestra de Calculo para rendimiento, eficiencia y productividad

### Reproducción

$$\frac{\% \text{ azúcar reductor en Miel 3 dilución} * \text{Volumen de medio para reproducción}}{100\%} = \text{m azúcar reductor}$$

### Fermentación

$$\frac{\% \text{ azúcar reductor en Miel 2 dilución} * \text{Volumen de medio para fermentación}}{100\%} = \text{m azúcar reductor}$$

$$\text{m azúcar reductor de reproducción} + \text{m azúcar reductor de fermentación} = \text{m azúcar total que entra al proceso}$$

$$\text{m azúcar total entra al proceso} * \frac{\text{PM etanol}}{\text{PM azúcar}} * \text{Rendimiento pasteur} = \text{m alcohol teórico}$$

$$\text{Volumen de medio para reproducción} + \text{Volumen de medio para fermentación} = \text{Volumen efectivo de trabajo}$$

$$\frac{\% \text{ de alcohol producido} * \text{Volumen efectivo de trabajo}}{100\%} = \text{Volumen de alcohol producido (al 100\% producido)}$$

$$\text{Volumen de alcohol producido} * \text{densidad de alcohol puro} = \text{m de alcohol producido}$$

### Rendimiento

$$\frac{\text{m alcohol producido} * 100}{(\text{m azúcar total que entra al proceso} - \text{m azúcar residual})}$$

### Eficiencia

$$\frac{\text{m alcohol producido} * 100}{\text{m alcohol teórico}}$$

### Productividad

$$\text{m producto/volumen} * \text{tiempo} \quad (\text{g/L} * \text{h})$$

Ejemplo

Reproducción

$$\frac{6.92 \% \text{ g/ml} * 900 \text{ ml}}{100\%} = 62.28 \text{ g azúcar reductor}$$

Fermentación

$$19.5 \% \text{ g/ml} * 2100 \text{ ml} = 409.5 \text{ g de azúcar reductor}$$

$$62.28 \text{ g} + 409.5 \text{ g} = \mathbf{471.78 \text{ g}} \text{ azúcar total}$$

$$471.78 \text{ g azúcar} * \frac{92 \text{ g etanol}}{180 \text{ g azúcar}} * 0.95 = \mathbf{229.08 \text{ g}} \text{ de alcohol teórico}$$

$$\frac{7.67 \% \text{ ml/ml} * 3000 \text{ ml}}{100 \%} = 230.1 \text{ ml de alcohol (al 100\% de producción)}$$

$$230.1 \text{ ml} * 0.79 \text{ g/ml} = \mathbf{181.78 \text{ g}} \text{ de alcohol producido}$$

Rendimiento

$$\frac{181.78 \text{ g de alcohol}}{(471.78 \text{ g azúcar} - 0.87)} * 100 = 39 \%$$

Eficiencia

$$\frac{181.78 \text{ g de alcohol}}{229.08 \text{ g de alcohol teórico}} * 100 = 79.35 \%$$

Productividad

$$\frac{181.78 \text{ g de alcohol}}{3 \text{ Litros} * 30 \text{ horas}} \longrightarrow \frac{2.01 \text{ g alcohol}}{\text{L} * \text{h}}$$