

**Bacterias contaminantes en el proceso
de producción de alcohol étílico**

**Contaminating bacteria in the ethyl
alcohol production process**

Carlos Rodrigo Jácome-Pilco¹
Universidad Estatal de Bolívar- Ecuador
cjacome@ueb.edu.ec

Cesar Orlando Azogue-Poaquiza²
Universidad Estatal de Bolívar- Ecuador
cazogue@mailes.ueb.edu.ec

Carlos Sebastián Escobar-Barragán³
Universidad Estatal de Bolívar- Ecuador
caescobar@mailes.ueb.edu.ec

Byron Alexanders Ramos-Escobar⁴
Universidad Estatal de Bolívar- Ecuador
bramos@mailes.ueb.edu.ec

Isidro Favian Bayas-Morejón⁵
Universidad Estatal de Bolívar- Ecuador
fbayas@ueb.edu.ec

doi.org/10.33386/593dp.2023.3.1701

V8-N3 (may-jun) 2023, pp. 58-71 | Recibido: 19 de enero de 2023 - Aceptado: 22 de febrero de 2023 (2 ronda rev.)

1 Doctor en Ciencias (PhD.) en la especialidad de Biotecnología. Docente de la Universidad Estatal de Bolívar
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9713-0228>

2 Estudiante de la universidad estatal de bolívar, carrera agroindustrial
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3809-5303>

3 Estudiante de la universidad estatal de bolívar, carrera agroindustrial
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4136-456X>

4 Estudiante de la universidad estatal de bolívar, carrera agroindustrial
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5535-9681>

5 Doctor en Biotecnología. Docente de la Universidad Estatal de Bolívar
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2920-7155>

Cómo citar este artículo en norma APA:

Jácome-Pilco, J., Azogue-Poaquiza, C., Escobar-Barragán, C., Ramos-Escobar, B., & Bayas-Morejón, I., (2023). Bacterias contaminantes en el proceso de producción de alcohol etílico. *593 Digital Publisher CEIT*, 8(3), 58-71 <https://doi.org/10.33386/593dp.2023.3.1701>

Descargar para Mendeley y Zotero

RESUMEN

En los últimos años se ha incrementado el interés por las interacciones y dinámicas poblacionales entre bacterias lácticas y levaduras en la fermentación de bebidas alcohólicas, las cuales influyen en la producción de etanol y compuestos volátiles en función de la calidad de las bebidas alcohólicas. La mayor parte de la investigación se ha centrado en estas interacciones en los procesos de fermentación, por ejemplo, vinos tintos, blancos y otros vinos fermentados. Se ha encontrado que está presente una amplia variedad de microorganismos en los procesos enzimáticos del tehuino y el mezcal. En este estudio, se analizaron 17 bacterias del ácido láctico para determinar el crecimiento celular y la resistencia a diversas concentraciones de etanol y osmolaridad. Las bacterias seleccionadas en el proceso de producción de alcohol etílico se usaron luego en varias combinaciones de levaduras bacterianas para evaluar el crecimiento de dos especies diferentes usando unidades formadoras de colonias CFU.

Palabras clave: alcohol etílico; contaminación; microorganismos; bacterias; producción

ABSTRACT

In recent years, interest has increased in the interactions and population dynamics between lactic acid bacteria and yeasts in the fermentation of alcoholic beverages, which influence the production of ethanol and volatile compounds depending on the quality of alcoholic beverages. Most of the research has focused on these interactions in fermentation processes, for example red, white and other fermented wines. A wide variety of microorganisms have been found to be present in the enzymatic processes of tehuino and mezcal. In this study, 17 lactic acid bacteria were analyzed for cell growth and resistance to various ethanol concentrations and osmolarity. The selected bacteria were then used in various combinations of bacterial yeast to assess the growth of two different species using CFU colony forming units.

Key words: Ethyl alcohol; contamination; microorganisms; bacteria; production

Introducción

La mayor parte del etanol industrial se produce a partir de un proceso de fermentación. En Estados Unidos, la materia prima más importante para su producción son los cereales, mientras que en Europa se utiliza melaza de remolacha y en otros países melaza de caña de azúcar. En Ecuador, el cultivo de la caña de azúcar es de gran importancia económica y social por ser el segundo cultivo permanente después del café (Aguilar, 2017).

El jarabe de caña de azúcar proviene del proceso de extracción de azúcar (Viquez, 2019). La melaza inversa se obtiene a partir del jarabe de azúcar de caña por hidrólisis ácida parcial seguida de neutralización y evaporación hasta el 70% de la concentración total de azúcar. Algunas levaduras pueden fermentar estos sustratos y transformarlos en alcohol (Bonmatí, 2018).

Uno de los problemas de la destilería es la contaminación bacteriana durante la fermentación, desde la materia prima hasta la destilación final, provocando pérdidas en la producción de etanol (Chambers, 2019). La contaminación bacteriana ejerce una influencia competitiva sobre el sustrato, provocando una disminución en la producción de alcohol o productos no deseados (Bermejo, 2019). Se han encontrado microorganismos contaminados en las destilerías de: *Lactobacillus* sp, *Sporolactobacillus* sp, *Zymomonas* sp, *Micrococcus* sp, *Acetobacter* sp y *Gluconobacter* sp.

Otro problema común y muy importante en las destilerías es la floculación de las células de levadura, que generalmente se observa al final de la fermentación. Es un proceso complejo de agregación de células de levadura que ralentiza la tasa de producción de alcohol (Antón, 2018). Depende de muchos factores como la cepa de levadura (genética, estado fisiológico y metabolismo), la composición del medio de fermentación, las condiciones de fermentación (contaminación bacteriana, temperatura, mezcla, aireación). Debido a la influencia de cada uno de estos parámetros en el proceso, es muy difícil estudiar este fenómeno (Cengel Y. , 2015).

Una buena gestión de la higiene industrial y el control de esta contaminación son necesarios durante el proceso de fermentación para estar expuestos a la contaminación bacteriana durante la producción de alcohol (Chambers, 2019). El trabajo presentado consistió en la identificación, aislamiento y caracterización de bacterias contaminadas durante la fermentación. Asimismo, se ha establecido su relación con la floculación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y se ha evaluado la eficacia de los desinfectantes comerciales a base de cloro (Sanitech®) para combatir la contaminación y su efecto sobre la vitalidad de las levaduras (Cornejo & Wilkie, 2017).

Fundamentos

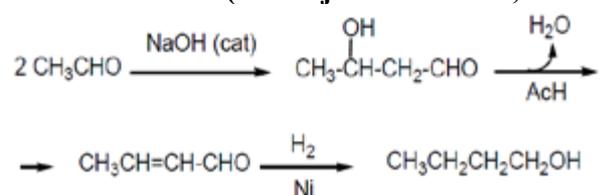
Alcohol etílico

El alcohol etílico se define como producido por la fermentación de granos u otro material que contenga almidón o azúcar. El etanol o alcohol etílico es el ingrediente básico de las bebidas alcohólicas. Puede obtenerse mediante dos procesos de producción: la destilación, que consiste en refinar bebidas fermentadas, y la fermentación, es decir, la descomposición de azúcares en diversas frutas (Lonvaud, 2018).

Comitini (2018) explica el uso del alcohol etílico es muy utilizado en la fabricación de detergentes, así como en cosméticos, perfumes y productos diversos. para uso farmacéutico y disolventes industriales) (Beasley, 2019). El alcohol se produce industrialmente por fermentación de carbohidratos o carbohidratos simples como la sacarosa o complejos como el almidón. Formación de reacciones de etanol en la fermentación de azúcar y almidón:

Figura 1

Fórmula de Fermentación de carbohidratos o sacáridos v (Cornejo & Wilkie, 2017)



Además de la fermentación de carbohidratos, el etanol se produce industrialmente mediante la hidratación de un catalizador de ácido etílico obtenido mediante un proceso de craqueo del petróleo.

El alcohol obtenido con este proceso es una mezcla de etanol puro al 95% y agua al 5%; la mezcla es azeotrópica, tiene un punto de ebullición constante de 78,15° y no se puede separar por destilación. Según los autores, la producción de alcohol etílico ha vuelto a la normalidad; en el antiguo Egipto, la levadura se fermentaba para hacer cerveza (Flotats, 2018).

También se obtienen de la fermentación de ciertos cereales y vegetales con almidón. Dependiendo del tipo de alcohol producido, puede resultar nocivo en algunos casos, por lo que se desnaturaliza con la adición de ácido sulfúrico o éter para evitar el consumo humano puede causar serios problemas de salud.

El alcohol etílico se usa en una variedad de campos, como en medicina, pinturas, cosméticos, perfumes, combustibles y en la industria de bebidas alcohólicas (Bely, 2019).

También existe un tipo de alcohol etílico elaborado a partir del petróleo que contiene un 95% de etanol y un 5% de agua y se utiliza como disolvente y se degrada según la aplicación.

En algunos países, la producción de metanol está altamente industrializada, especialmente para la producción de biocombustibles. Brasil es un importante productor de biocombustibles y ha reemplazado en gran medida a los productos del petróleo en su territorio. Estados Unidos sigue como el segundo productor más grande de etanol producido por fermentación de maíz (Madrid, 2018).

Características del alcohol etílico

Los alcoholes son sustancias polares a los hidrocarburos debido a la mayor electronegatividad del átomo de oxígeno a hidrógeno y alquilo. Esta polarización aumenta la fuerza de las interacciones entre moléculas

(enlaces de hidrógeno y tumores) que influyen en sus propiedades (Fernández, 2019).

Hay dos fuerzas intermoleculares: el enlace de hidrógeno entre las moléculas de etanol y el enlace dipolo-dipolo, que permiten la interacción del alcohol de alto punto de ebullición; esto dificulta el emparejamiento.

Los alcoholes más simples, como el metanol y el etanol, son líquidos volátiles. Los alcoholes de cuatro a diez átomos de carbono son pegajosos y densos, y algunos de sus isómeros suelen ser en su mayoría ramificados, normalmente sólidos a temperatura ambiente (Kreith, 2017).

Por otro lado, los alcoholes que contienen más de 11 átomos de carbono líquido se encuentran a temperatura ambiente. La mayoría de las bebidas espirituosas tienden a tener un olor fértil.

Debido a la estructura similar de los alcoholes al agua y su capacidad para formar enlaces de hidrógeno, los alcoholes tienden a mezclarse fácilmente con el agua (Viquez, 2019).

Los alcoholes de bajo peso molecular de este mineral son predecibles con agua en cualquier proporción; Además, disuelven cantidades inusuales de compuestos iónicos como el cloruro de sodio.

A medida que aumenta el número de átomos de carbono, disminuye la solubilidad de los alcoholes; este resultado es creado por un grupo alquilo que tiene muchos átomos de carbono en su estructura y se comporta como un alcano en lugar de un alcohol (Mantilla, Duque, & Galeano, 2017).

Sin embargo, esta característica significa que dichos alcoholes se pueden disolver en disolventes orgánicos apolares en determinadas proporciones.

Además, aumentan el número de grupos hidroxilo en la molécula de alcohol, aumentan el número de enlaces de hidrógeno, mejoran la solubilidad en agua y aumentan el punto de ebullición (Morgan, 2017).

Bacterias ácido-lácticas

El proceso de fermentación del vino de uva consta de 4 tipos de bacterias del ácido láctico, principalmente BAL (Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc y Oenococcus), debido a que hay 16 microorganismos resistentes a los ácidos y al etanol, lo que hace que les permita crecer en condiciones desfavorables (Ciani, 2016).

Al inicio de la fermentación, el mosto presenta una baja población bacteriana debido a la concentración de etanol y al bajo pH de fermentación, a las pocas semanas de almacenado el vino aumenta la resistencia de ciertas bacterias del ácido láctico a estos compuestos.

Bacterias ácido-acéticas

Son conocidos por su capacidad para oxidar azúcares y alcoholes y se metabolizan a ácidos orgánicos como productos finales (Incropera, 2015). Este tipo de bacterias intervienen en importantes procesos de fabricación donde pueden producir altas concentraciones de ácido acético a partir del etanol, lo que las hace importantes en la producción de vinagre, pero indeseables en la fermentación de bebidas alcohólicas.

Interacciones microbianas

Un pequeño ecosistema como un mosto fermentado alberga varios microorganismos porque es un ambiente con excelentes propiedades nutricionales (Manoni, 2018).

Durante el proceso de fermentación se producen interacciones entre diferentes microorganismos del bioproceso, y la influencia de un microorganismo sobre la población de otro, involucrado en el desarrollo al estimular o estimular diferentes mecanismos, se refleja a través de interacciones tanto positivas como negativas que determina cada una de las interacciones.

Clasificación de interacciones microbianas

Las interacciones microbianas se clasifican según los efectos de una especie sobre otra con los metabolitos excretados por

cada microorganismo, así como la competencia por el sustrato, lo que incide en la relación entre ellos, tal como se observa en la tabla 1.

Tabla 1

Clasificación de interacciones microbianas

Interacción	
Positiva	
Mutualismo	Diferentes especies se benefician por la presencia de otra
Comensalismo	Una especie se beneficia sin dañar a otras
Neutra	No hay efecto de promoción o inhibición de crecimiento
Negativa	
Amensalismo	Interacción en la que un producto metabólico de una especie tiene un efecto negativo sobre otra
Antibiosis	Una especie detrimenta el desarrollo de otras por productos metabólicos específicos para daño celular

Fuente: (Houdkova, 2016)

Microorganismos contaminantes

Leveau y Bouix descubrieron en su Texx Alcohol Book que se han encontrado microorganismos infecciosos en destilerías como Lacotacillus sp, Sporolactobacillus sp, Zymomonas sp, Micrococcus sp, Acetobacter sp y Guconobacter sp (Cañas, 20017).

Las bacterias del ácido láctico aisladas de la melaza de caña para estudiar la posibilidad de producir ácido láctico por fermentación directa de sacarosa. Descubrió cuatro crecimientos bacterianos que describían características generales comunes como morfología celular, colonización, tinción de Gram, presencia de catalasa y fermentación de azúcares (glucosa y fructosa) (Domínguez, 2016).

Bonmatí (2018) realizó un estudio para identificar las bacterias que contaminan el proceso de producción de alcohol etílico y su relación con la floculación de Saccharomyces cerevisiae. Primero, se tomaron muestras para estandarizar la metodología a nivel de laboratorio e identificar contaminantes bacterianos en melazas y etanol productores de levadura.

Los resultados mostraron que los microorganismos contaminados en el proceso analizado fueron: *Lactobacillus* sp. Con un nivel medio de 10×10^5 UFC / ml y *Zymomonas mobilis* con un nivel medio de 10×10^2 UFC / ml (Gomera, 2018).

El proceso de fermentación está influenciado por enzimas que provocan cambios químicos y físicos en la materia orgánica. *Saccharomyces cerevisiae* o especies similares representan aproximadamente el 96% de la fermentación etanólica; El etanol se produce en la ruta Embden-Meyerhof-Parnassus (EMP) (Jutglar, 2017).

La materia prima más importante es la levadura. La palabra levadura significa inmediatamente fermentación porque los dos términos a menudo se combinan a lo largo de la historia.

Sin embargo, se puede plantear la hipótesis de que el desarrollo del concepto de levadura se inició alrededor de 1680, pero tras la investigación del genio Pasteur en 1876, se definió como un organismo vivo con características propias (Lonvaud, 2018).

Durante el proceso de fermentación que se da en la producción de alcohol, se produce una contaminación bacteriana, generalmente con la formación de ciertos compuestos, especialmente ácidos orgánicos, que inhiben la acción de las levaduras y crean metabolitos que confieren al producto propiedades finales no deseadas (Pan, 2018).

Esto se debe a que las levaduras y los gérmenes luchan por los alimentos a través del metabolismo y los nutrientes resultantes; Esto desencadena la producción de bacterias o levaduras no deseadas que cambian para proporcionar alimento y poder permanecer en el medio ambiente.

Por eso Fermentec ha introducido en su metodología métodos que ayudan a aumentar la confianza en el proceso de fermentación y en la producción de alcohol (Diaz & Montalvo, 2017).

Método de determinación de la viabilidad celular de levaduras

El control de la levadura incluye el número de células. La duración depende del uso de eritrosina. El porcentaje de células viables, el porcentaje de replicación y la población en millones / ml se determinan transfiriendo la muestra ya teñida a una cámara de Neubauer donde se cuentan en 100 cuadrículas utilizando una lente focal de 10x y preferiblemente un objetivo de 40x (Pogglo, 2019).

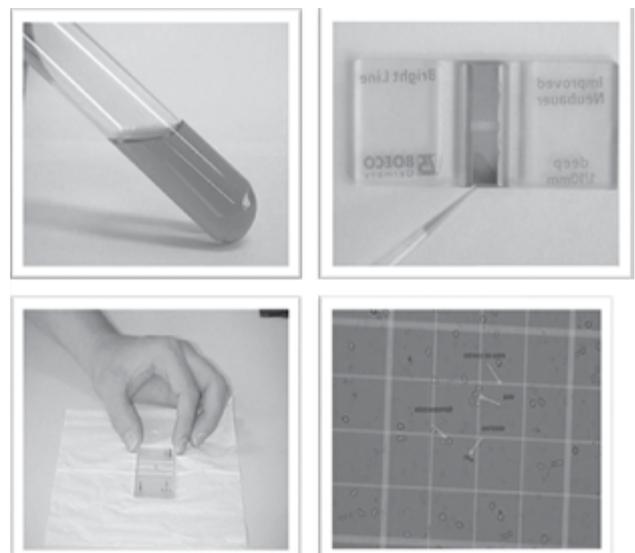
Los resultados se basan en la validación de las condiciones de fermentación actuales para mejorar la precisión de los datos finales obtenidos. Por tanto, la definición de levadura en todos los aspectos de su viabilidad se consigue mediante el procedimiento de eritrosina (Linscott, 2017).

La viabilidad es el porcentaje de células activas en la población de levaduras en la muestra seleccionada para evaluación; Para ello, se procesan valores de al menos el 50% de las desviaciones (Yuan, 2017).

La multiplicación es levadura en fase de crianza con un intervalo de referencia del 20 al 60% (Tower, 2010).

Figura 1

Viabilidad de la levadura (Vélez, Pinedo, Viramontes, Ortega, & Melgoza, 2008)



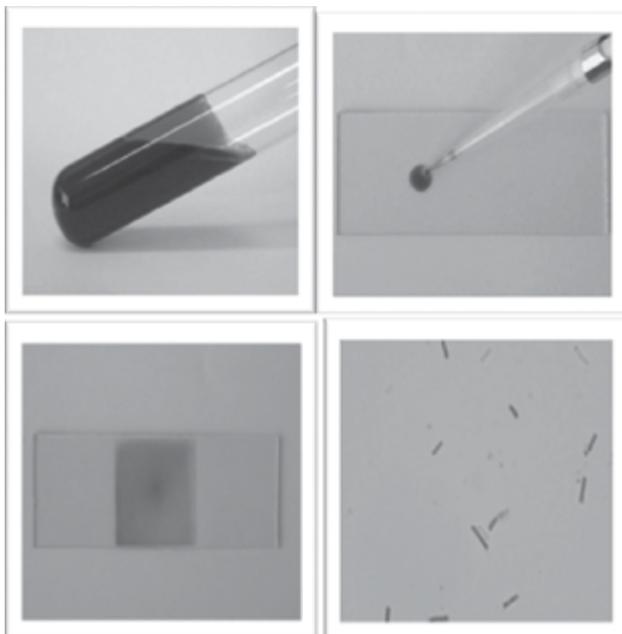
Método para el cálculo de bacterias Cuantificación de la contaminación

El método de recuento bacteriano se aplica a un microscopio óptico para determinar la población de varillas / ml presentes en los pasos de fermentación más importantes como la alimentación, el tanque 354 y el proceso de regeneración. Debido a lo anterior, es posible lograr un diseño de varilla que brinde mayor precisión en las pruebas, lo que en última instancia es mucho más confiable cuando el número de varillas / ml de muestra está entre 10⁶ y 10⁷ (Tiukova, 2017).

El método utiliza azul del Nilo y azul de metileno, estabilizados durante 24 horas antes de su uso. Se indicó que el recorrido no debe exceder de 3 a 5 metros para ser viable. Asimismo, las células vivas no se tiñen y las células no viables se tiñen con tintes (Rul, 2018).

Figura 2

Tinción de células (Tower, 2010)



Prueba de sensibilidad de bacterias a agentes antimicrobianos por espectrofotometría

La prueba mide el efecto de los fármacos antimicrobianos, como los antibióticos y otros compuestos, mediante la lectura espectrofotométrica de la densidad óptica

(absorción) de una suspensión microbiana inducida con o sin el producto de prueba (Rossouw, 2017).

Es una técnica relativamente fácil de usar que permite determinar el producto y / o dosis más eficaz en un tiempo relativamente corto (6 a 8 horas), lo que la hace más económica y racional (Sorensen, 2017).

La estandarización de esta metodología asegura que los contaminantes en el proceso de fermentación se puedan controlar de acuerdo con la evaluación cuantitativa previa de contaminación.

Verificar el uso y la cantidad de tubos según los antibióticos probados; Contendrán un medio especial para el proceso; Además, se incluye cicloxamida que es un inhibidor de levaduras y finalmente se toma una lectura inicial y final (Prado, 2017).

Además, define cómo la cuantificación de la contaminación es fundamental para determinar cuándo el proceso requiere antibióticos y si esto debe tenerse en cuenta.

Figura 3

Cuenta colonias (Sardon, 2013)



Los lactobacilos son células alargadas resistentes a un ambiente ácido. Sin embargo, una diferencia muy importante es la absorción total de oxígeno de las bacterias acéticas. Los miembros del grupo están muy oxigenados. Esto elimina la contaminación potencial por fermentación aeróbica (Piskur, 2018).

Fecmentec es una empresa especializada en fermentación alcohólica y control del laboratorio de la producción de azúcar y alcohol que ha desarrollado nuevas metodologías y tecnologías para el sector industrial, ayudando a mejorar los procesos de producción industrial mediante el control y seguimiento de los microorganismos actuales. En la mano de ahí la importancia de estos métodos y su aplicación (Mills, 2016).

Parámetros fisicoquímicos de análisis de bebidas fermentadas

La oferta de bebidas fermentadas es muy amplia, por lo que sus propiedades y composición son muy diferentes, por lo que se dan ciertas definiciones generales a este tipo de bebida (Rufes, 2018).

Grado de alcohol

El título es el volumen o porcentaje de alcohol etílico expresado en cm^3 por 100 cm^3 de bebida alcohólica a 20°C . La graduación alcohólica de la bebida se expresa en la escala Gay-Lussac (GL) (Dihigo, 2019).

Extracto seco

masa correspondiente a sustancias que no se volatilizan en determinadas condiciones físicas, que deben ajustarse para que las sustancias del extracto sufran ligeras variaciones. El extracto seco se expresa en gramos por litro (Duarte, 2018).

Metanol

Es un líquido incoloro que se encuentra en la fabricación de alcohol etílico técnico, también conocido como alcohol metílico. El metanol es uno de los alcoholes más simples, es altamente tóxico, su consumo puede matar la ceguera, huele a etanol y en su forma pura tiene un olor generalmente desagradable. Se encuentra en la mayoría de las bebidas alcohólicas, pero en bajas concentraciones inofensivas (Ivey, 2018).

Aldehído

El término aldehído es la abreviatura de alcohol deshidratado porque el alcohol lo libera

de hidrógeno durante su oxidación (García, 2016). Este compuesto está presente en las bebidas alcohólicas en forma de acetaldehído, producto obtenido de la oxidación del alcohol que se produce durante su transformación en ácido acético. El acetaldehído se considera inodoro. En algunas bebidas, el aroma del acetaldehído se considera agradable y complementa el sabor (Kleerebezem, 2018).

Éteres

Estos compuestos se forman como resultado de la deshidratación intermolecular resultante de la reacción de una molécula de ácido orgánico y una molécula de alcohol para formar una molécula de agua y éster. Como contienen muchos alcoholes y ácidos, pueden combinarse para formar una gran cantidad de ésteres diferentes (Manrique, 2017).

Los ésteres de bajo peso molecular se encuentran a menudo en flores y frutas, que son líquidos volátiles con un olor agradable como el sabor a plátano derivado del acetato de isoamilo o butirato de etilo que se encuentra en la piña, así como en algunos sabores artificiales. Se preparan a partir de una mezcla de ésteres (Beasley, 2019).

En las bebidas fermentadas, los ésteres más importantes derivan de una mezcla de alcoholes superiores y ácido acético, y también derivan de la interacción del alcohol con la malta, el ácido tartárico y el ácido láctico.

El contenido de éster de las bebidas alcohólicas se expresa como acetato de etilo. Los ésteres se encuentran en las uvas y se forman durante la fermentación y maduración del vino (Gomera, 2018).

Pesos especiales

Esta definición se utiliza en la fermentación de bebidas alcohólicas en lugar de por gravedad. La densidad se obtiene dividiendo la masa o densidad de un líquido por la misma masa o densidad que el agua pura y a la misma temperatura (Kleinbach, 2016).

Contaminación bacteriana

Bacterias: su presencia difiere visualmente de las células de levadura al microscopio. Micobacterias en cadena: vistos al microscopio, los bastones son compatibles con *Lactobacillus* sp (Kleinbach, 2016).

Número de células de levadura Una gota de suspensión preparada con 1 ml de solución de azul de metileno al 1%, 1 ml de suspensión de levadura y 98 ml de agua se transfirió a la cámara de Neubauer y se transfirió el número de células (1 mm x 1) (Panesso, 2018).

En los cálculos se utilizaron cuadrados más pequeños (0,2 mm x 0,2 mm). El recuento comienza desde la parte superior de los cuadrados más pequeños del cuadrado central grande (1 mm x 1 mm) y continúa hacia abajo; si las celdas se acercan a los bordes de cuadrados más pequeños, solo se incluyen aquellas que hacen contacto con los lados inferior e izquierdo del cuadrado; si las celdas pertenecían al lado superior o derecho, no se incluyeron.

Control microbiológico

Las inoculaciones se realizaron cada 24 horas para evaluar la población bacteriana en cuanto a la salud de la levadura y la actividad bactericida.

Se tomaron muestras dentro de los ocho meses posteriores a la introducción de la materia prima para ser transferida a la destilería con el fin de estandarizar la metodología de muestreo y cultivos microbiológicos, creando así colonias bien definidas de *Lactobacillus* sp. y *Zymomonas*. móvil. El aislamiento de estas muestras se almacenó en agar MRS (*Lactobacillus* sp) y medio estándar (*Zymomonas mobilis*). Se les añadió agua con peptona al 0,1% y se colocaron en medio de selección MRS y WL para comprobar la pureza de las colonias (Vélez, Pinedo, Viramontes, Ortega, & Melgoza, 2008).

Aislamiento e identificación

Se observó crecimiento colonial de *Lactobacillus* sp y *Zymomonas mobilis* en agar MRS y WL (ver Tabla 2).

Tabla 2

Características de colonias

Microorganismos	Características
Bacterias lácticas (MRS con azul de anilina y cicloexamida)	Colonias redondas, convexas, bordes regulares de color azul, acidificaciones del medio 1-5 mm de diámetro
<i>Zymomonas</i> (Medios WL con cicloexamida y penicilina)	Colonias redondas con bordes regulares de color verde profundo, de 1-4 mm de diámetro.
<i>Zymomonas</i> (Medio Standar con cicloexamida y penicilina)	Después de 4 días de incubación a 30 grados centígrados las colonias son brillantes, redondas de 1-2 mm de diámetro
Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , variedad Allyeast superstar,	Colonias redondas, color habano y cremosas

Fuente: (Fernández, 2019)

Los organismos contaminados identificados son consistentes con los reportados por Mark & Phipps Enrfab, Inc. 1988: *Lactobacillus* es un contaminante en destilerías. También estoy de acuerdo con Altech. Los *zimon* son bacterias que se encuentran en los caldos de fermentación, contaminantes en las destilerías que fermentan la glucosa en forma aeróbica a través de Et-ner-Doudoroff (Vélez, Pinedo, Viramontes, Ortega, & Melgoza, 2008).

El número de microlotes contaminados

El microorganismo *Lactobacillus* sp en un perfil de dilución de 10⁻² melazas correspondió a un máximo de 104 UFC / ml. Se observaron tres puntos críticos en el proceso:

1. Ingreso a la planta: La contaminación puede ocurrir por falta de vapor para asegurar condiciones estériles antes del muestreo (tanque de almacenamiento de melaza, tanque de almacenamiento, tubería o punto de descarga).
2. Segundo intercambiador para diluir la melaza.
3. Tuberías para tanques de fermentación.

El nivel máximo de bacterias del ácido láctico en el perfil de la melaza a una dilución

de 10-3 fue de 104 UFC / ml. Los puntos críticos del proceso son: el mezclador (Yuan, 2017).

En este caso, es necesario controlar el programa de esterilización y solicitar una desinfección más frecuente. Durante el proceso de producción de alcohol, el grado máximo de contaminación con *Lactobacillus* sp fue de 105 UFC / ml (Vélez, Pinedo, Viramontes, Ortega, & Melgoza, 2008)

Zymomonas registrado en un perfil de dilución de melaza de 10-2 y 10-3 como máximo 101 UFC / ml. El mosto se convierte en puntos críticos en el proceso de producción de etanol inmediatamente después de la inoculación con la población de 105 UFC / ml de *Zymomonas*. Este aumento probablemente se deba a que los vinos no gotean y permanecen en el sistema de enfriamiento de la línea VAT y / o trasvase de semillas (Viquez, 2019).

El control y minimización de las bacterias del ácido láctico es importante porque una concentración de ácido láctico al 1,4% inhibe el potencial de fermentación de las levaduras. Asimismo, la presencia de *Zymomonas mobilis* compite con la levadura por el sustrato y la fermentación de glucosa en etanol (Díaz & Montalvo, 2017).

En poblaciones más grandes, este microorganismo aumenta la producción de H₂S, creando un olor desagradable que puede convertirse en un problema ambiental. Finalmente, se encontró que la población de levadura seca de 16x10² UFC / g estaba dentro del rango obtenido para esta clase de levadura.

Ensayo de fermentación

Los estudios directos y de viabilidad realizados cada 12 horas durante la prueba de fermentación in vitro mostraron que la levadura perdió aproximadamente el 20% de su viabilidad de inoculación sin desinfección después de 36 horas. Las células de levadura se floclaron en la misma inoculación después de 72 horas y se observó una población de bacterias en cadena de 107 UFC / ml y una viabilidad del 33,6% (Flotats, 2018).

Esto sugiere la necesidad de usar un germicida para controlar las microcargas contaminadas ya que esto hace que la levadura pierda vitalidad y reduzca su fermentabilidad.

En el control, compuesto únicamente por melaza, nutrientes y levadura, se observó la formación de pequeñas escamas a las 72 horas, lo que sugiere que la edad del ciclo es uno de los muchos factores que influyen en la floclación de la levadura.

El inóculo controlado, PC y SC mostró un porcentaje de viabilidad similar a las 105 horas. En estudios directos donde se observó floclación, los cultivos microbianos poblacionales mostraron 106 UFC / ml de *Lactobacillus* sp y 105 UFC / ml de *Zymomonas mobilis*, sugiriendo que la contaminación y altos niveles de estos microorganismos están relacionados con la floclación de *Saccharomyces. Cerevisiae*. Las poblaciones de dos microorganismos contaminados a una concentración de 103 UFC / ml inician la floclación de la levadura (Mills, 2016).

Zymomonas mobilis

En cultivos microbianos, se observó que el inóculo que contenía *Lactobacillus* sp con dióxido de cloro Sanitech® y penicilina mostró solo un leve crecimiento de este microorganismo durante el ciclo de levadura de 48-72 horas, confirmando que los dos desinfectantes (dióxido) analizados como penicilina como agentes para combatir las bacterias del ácido láctico a través de su actividad bactericida (Mills, 2016).

Las semillas de dióxido de cloro Sanitech y *Zymomonas mobilis* mostraron una disminución adicional en la población microbiana después de una disminución de 96 veces en la población de 104 UFC / ml, mientras que las semillas de penicilina y las semillas de *Zymomonas mobilis* mostraron una disminución adicional en la población de 104 UFC / ml. de 106 UFC / ml durante el mismo período, lo que sugiere que el dióxido de cloro es más eficaz que la penicilina para eliminar la *Zymomonas mobili* (Domínguez, 2016)s.

El dióxido de cloro Sanitech usado a una concentración de 20 ppm no afectó la viabilidad de la levadura, pero el nivel de contaminación alcanzó 106 UFC / ml. Sin embargo, estos son niveles altos, por lo que deben usarse concentraciones **más altas de desinfectante para lograr el mejor efecto germicida** (Antón, 2018).

Conclusiones

Cabe recordar que la fase de fermentación es el proceso más variable y descontrolado, conteniendo defectos de impurezas y presencia de levaduras ajenas a la cepa de partida, lo que conlleva pérdidas de materia prima. Miel y materiales naturales de alta calidad. consumo para producir un litro de alcohol.

La eficiencia general de las fábricas de alcohol se logra mediante la mejora continua del proceso; Para ello, es necesario tener en cuenta las limitaciones que puedan surgir.

En consecuencia, los laboratorios industriales están actualmente subestimados y abandonados como punto de referencia para el desarrollo de la producción;

En este punto, este artículo tiene como objetivo conectar los hilos de la Alianza de Ingenieros, Bacteriólogos y / o Microbiólogos con el fin de comprender y optimizar cuidadosamente sus procesos y evitar el desperdicio en el producto final, es decir, reutilizar productos y aumentar el valor agregado.

El desarrollo del estudio propuesto permitió la identificación de contaminantes microbianos en las etapas de aclareo de melazas, proliferación de levaduras y fermentación durante la producción de etanol utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y se detectaron microorganismos siguientes: *Lactobacillus* sp. ... con una tasa promedio de 10×10^5 UFC / ml y *Zymomonas mobilis* con una tasa promedio de 10×10^2 UFC / ml.

Además, las poblaciones de *Lactobacillus* sp superiores a 106 UFC/ml obtenidos en cultivos microbiológicos se combinaron con la prueba directa en la que se observaron copos de levadura.

Asimismo, *Saccharomyces cerevisiae* se flocluló a 105 UFC / ml para *Zymomonas mobilis*. Se observó una floclulación completa de *Saccharomyces cerevisiae* debido a la contaminación con *Lactobacillus* y *Zymomonas mobilis* a niveles mínimos de 103 UFC/ml. El uso de desinfectantes comerciales (Sanitech®) ha sido controlado con éxito por *Zymomonas mobilis*.

Al inocular un suplemento de penicilina (Alipen®), se ha demostrado que el agente es eficaz para inhibir *Lactobacillus* sp. Finalmente, se encontró que una concentración de 20 ppm de un desinfectante comercial no afecta la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae*.

Referencias bibliográficas

- Aguilar, Q. T. (2017). Industrial Microbiology: Microorganisms of Industrial Interest. *Ingeniería e Investigación Vol. 31 No. 3*, 56-65.
- Antón, M. (2018). "Breaking Frontiers and Barriers in Engineering: Education, Research and Practice". *LACCET*, 21-23.
- Beasley, S. (2019). *Lactic acid bacteria isolated from canine faeces. Journal of applied microbiology.* Barcelona: Editorial Marcombo.
- Bely, M. (2019). *Impact of mixed Torulaspora delbrueckii–Saccharomyces cerevisiae culture on high-sugar fermentation. International journal of food microbiology.* Oklahoma: Editorial Enterprises.
- Bermejo, F.O. (2019). *Saccharomyces cerevisiae–Oenococcus oeni interactions in wine: current knowledge and perspectives. Prospect. Vol. 8, No. 2*, 37-43.
- Bonmatí, A. F. (2018). Enhancing the Sweetness of Yoghurt through Metabolic Remodeling of Carbohydrate Metabolism in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*. *Applied and environmental microbiology. Water Science and Technology*, 109-116.

- Cañas, P. (20017). *Influence of inoculation time of an autochthonous selected malolactic bacterium on volatile and sensory profile of Tempranillo and Merlot wines*. Madrid: Editorial Mundi.
- Cengel, Y. (2015). *Lactobacillus sicerae sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from Spanish natural cider*. México D.F.: Editorial Mc Graw Hill.
- Chambers, P. (18 de Noviembre de 2019). Pretorius, Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO reports*, 914 - 920. Recuperado el 25 de Enero de 2014, de Surface meteorology and Solar Energy: <https://eosweb.larc.nasa.gov/sse/>
- Ciani, M. (2016). *interactions in inoculated wine fermentation*. *Frontiers in Microbiology*. Rio de Janeiro: Editorial Interciencia.
- Comitini, E. (2018). Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound (s) active against . *Revista Tecnológica Espol-RTE, Vol.23, N. 1, 135-142*.
- Cornejo, C., & Wilkie, A. (2017). The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *Revista Tecnológica Espol-RTE, Vol.23, N. 1, 135-142*.
- Diaz, F., & Montalvo, J. (2017). Antagonistic interaction between yeasts and lactic acid bacteria of oenological relevance: Partial characterization of inhibitory compounds . *Energética Vol. XXIV, No. 1, 24 - 35*.
- Dihigo, L. (2019). Simultaneous and successive inoculations of yeasts and lactic acid bacteria on the fermentation of an unsulfited Tannat grape must. *Revista Computarizada De Producción Porcina*, 12 - 16.
- Domínguez, P. (2016). Biochemical transformations produced by malolactic fermentation, in Wine chemistry and biochemistry. *Instituto de Investigaciones Porcinas.*, 18 - 20.
- Duarte, W. (2018). *Effect of Co-Inoculation of Saccharomyces cerevisiae and Lactobacillus fermentum on the Quality of the Distilled Sugar Cane Beverage Cachaça*. Madrid: Editorial Mundi-Prensa.
- Fernández, J. (2019). *Interaction of Saccharomyces cerevisiae and Lactococcus lactis in the fermentation and quality of artisanal cachaça*. Madrid: Editorial Mundi-Prensa.
- Flotats, X. (2018). Culture-independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated . *SUIS N° 72, 23 - 27*.
- García, G. (2016). *Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana*. Madrid: Editorial Mundi-Prensa.
- Gomera, L. (2018). *Fermentative capabilities and volatile compounds produced by Kloeckera/Hanseniaspora and Saccharomyces yeast strains in pure and mixed cultures*. Madrid: Editorial Bellisco.
- Houdkova, L. (2016). Enological properties in wild and commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts: relationship with competition during alcoholic fermentation. *Thermal Science Vol. 12, 27-33*.
- Incropera, P. (2015). *The effect of Debina grapevine indigenous yeast strains of Metschnikowia and Saccharomyces on wine flavour*. New York: Editorial John Wiley & Sons.
- Ivey, M. (2018). *Microbial interactions in food fermentations. Annual review of food science and technology*. México D.F.: Editorial Thomson.

- Jutglar, L. (2017). *Comitini, and M. Ciani, Influence of vintage and selected starter on Torulaspora delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae sequential fermentation.*. Barcelona: Editorial Ceac.
- Kleerebezem, M. (2018). *Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis.* Brasilia: Editorial Cirad.
- Kleinbach, M. (2016). *Interactions between Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces cerevisiae in tequila must type medium fermentation.*. Chicago: Editorial Thomson.
- Kreith, F. (2017). *Importance of acetic acid bacteria in food industry.* México D.F.: Editorial Thomson.
- Linscott, B. (2017). *Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts.*. Oklahoma: Editorial Enterprises.
- Lonvaud, F. (2018). *Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine, in Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications.* México D.F.: Editorial Mc Graw Hill.
- Madrid, A. (2018). *Oenococcus alcoholitolerans sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes.* Madrid: Editorial Mundi.
- Manoni, A. P. (2018). Sequential inoculation versus co-inoculation in Cabernet Franc wine fermentation. Food Science and Technology International. *African Journal of Biotechnology Vol. 8 (2)*, 116-125,.
- Manrique, A. (2017). *Evaluation of technological effects of yeast–bacterial co-inoculation in red table wine production.* México D.F.: Editorial Oxford.
- Mantilla, J., Duque, C., & Galeano, C. (2017). Quantitative study of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains. *Revista Ingeniería e Investigación Vol. 27 No.3*, 133-142.
- Mills, A. (2016). *The inhibitory activity of wine yeast starters on malolactic bacteria.* *Annals of microbiology.* Editorial Irwin: Editorial Irwin.
- Morgan, S. (2017). *Sulfur dioxide addition at crush alters Saccharomyces cerevisiae strain composition in spontaneous fermentations at two Canadian wineries.* Madrid: Editorial Bellisco.
- Pan, W. (2018). *Kinetics of sugars, organic acids and acetaldehyde during simultaneous yeastbacterial fermentations of white wine at different pH values.* Madrid: Editorial Mundi.
- Panesso, F. C. (2018). Redox interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in mixed culture under enological conditions. *Scientia et Technica Año XVII, No 47.*, 35 - 40.
- Piskur, J. (2018). *How did Saccharomyces evolve to become a good brewer?*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Pogglo, D. F. (2019). Bacterial communication and group behavior. *Livestock Research for Rural Development*, 9.
- Prado, N. (2017). *Volatile compounds generation during different stages of the Tequila production process.* Barcelona: Editorial Reverté.
- Rossouw, D. (2017). *The impact of co-inoculation with Oenococcus oeni on the transcriptome of Saccharomyces cerevisiae and on the flavour-active metabolite profiles during fermentation in synthetic must.* *Food microbiology.* Madrid: Editorial Mundi.
- Rufes, P. (2018). *Differential roles of the two-component peptides of lactocin*

- 705 in antimicrobial activity. .
 Barcelona: Editorial Marcombo.
- Rul, F. (2018). *How microbes communicate in food: a review of signaling molecules and their impact on food quality*. Brasilia: Editorial Cirad.
- Sardon, J. (2013). *Alteration of the growth rate and lag time of Leuconostoc*. Madrid: Editorial Paraninfo.
- Sorensen, B. (2017). *Effect of the fatty acid composition of acclimated oenological Lactobacillus plantarum on the resistance to ethanol*. Burlington: Editorial Elsevier.
- Tiukova, I. (2017). *Interaction of Lactobacillus vini with the ethanolproducing yeasts Dekkera bruxellensis and Saccharomyces cerevisiae*. Chicago: Editorial Thomson.
- Tower, M. W. (2010). Simultaneous inoculation of yeasts and lactic acid bacteria: Effects on fermentation dynamics and chemical composition of Negroamaro wine. *Inc.Snohomish*, 53.
- Vélez, C., Pinedo, C., Viramontes, O., Ortega, C., & Melgoza, A. (2008). Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. *Revista TECNOCENCIA Chihuahua*, Vol. 11, No. 2, 37 - 42.
- Viquez, J. (2019). Fermentation of cow milk and/or pea milk mixtures by different starter cultures: Physico-chemical and sensorial properties. *Revista ECAG Informa* No. 50, 22 - 27.
- Yuan, Y. (2017). *Directional isolation of ethanol-tolerant acetic acid bacteria from industrial fermented*. Burlington: Editorial Elsevier.