

Universidad Tecnológica Nacional
Facultad Regional Tucumán
Escuela de Posgrado

Maestría en Ingeniería Bioenergética

**FACTORES MICROBIOLÓGICOS
INVOLUCRADOS EN LA PRODUCCIÓN
DE BIOETANOL, ASPECTOS A
CONSIDERAR.**

Lic. Fernando R. Núñez

Trabajo Final Integrador para optar al Grado Académico Superior de
Especialista en Ingeniería Bioenergética

Director: Dr. Carlos Gusils

**San Miguel de Tucumán
18 de noviembre de 2020**

Resumen

Teniendo en cuenta la demanda actual de combustibles fósiles y el agotamiento del petróleo en las reservas mundiales, en los últimos 30 años han adquirido un impulso significativo la identificación, desarrollo y comercialización de tecnologías alternativas a los combustibles fósiles.

Las energías renovables se obtienen de fuentes naturales virtualmente inagotables, ya sea por la inmensa cantidad de energía que contienen, o porque son capaces de regenerarse por medios naturales. Entre las energías renovables se encuentran los biocombustibles y las biomásas.

El bioetanol es el producto de la fermentación alcohólica, obtenido por acción microbiana, a partir de diferentes materias orgánicas (Hernández, 2007); y ha adquirido un gran valor por su capacidad para ser empleado como combustible, ya sea mezclado con gasolina o con derivados del petróleo, y especialmente por tratarse de una fuente renovable de energía.

El presente trabajo trata de dar una mirada general de los factores microbiológicos involucrados en la producción de bioetanol y los aspectos a ser considerados.

Sobre el final del trabajo se hace mención a dos visitas a un ingenio tucumano donde se observa la presencia de contaminantes microbianos. En la segunda visita se observa la disminución de los contaminantes microbianos, luego de poner en práctica las recomendaciones realizadas en la primera visita tanto de una buena práctica de limpieza como el correcto uso de antibióticos para disminuir la cantidad de contaminantes microbianos.

La presencia de contaminantes microbianos en el proceso fermentativo, se encuentra asociada principalmente a una disminución de la eficiencia en la producción de etanol lo cual conlleva a pérdidas económicas.

Palabras Claves: bioetanol, factores microbiológicos, producción

Índice

• Introducción.....	5
1. Sistema Energético Mundial	5
1.1. Situación en la Argentina.....	7
• Objetivos.....	11
• Objetivos específicos.....	11
• Bioetanol	11
• Materias Primas.....	11
• Caña de azúcar	13
• Melaza	14
• Proceso de producción industrial del bioetanol.....	17
• Microorganismos.....	17
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
1.3. Bioquímica.....	18
• Condiciones de estrés en la fermentación alcohólica y respuesta fisiológicas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.4. Estrés por etanol.....	20
1.5. Estrés oxidativo.....	21
1.6. Estrés térmico.....	22
1.7. Estrés Osmótico.....	23
1.8. Estrés nutricional.....	23
• Contaminación Microbiana.....	24
1.9. Bacterias lácticas como contaminantes.....	25
1.10. Bacterias acéticas (BA) como contaminantes.....	26
1.11. Bacterias productoras de dextranas como contaminantes...	27
1.12. Bacterias coliformes como contaminantes.....	28
• Industria SuCroalcoholera de la Provincia de Tucumán.....	29
• Datos de Zafra 2019.....	30

- Aplicación del control microbiológico en el proceso industrial de obtención de Bioetanol34
- Ensayos realizados en el laboratorio35
 - 1.13. Recuento de microorganismos en las muestras de jugos...35
 - 1.14. Análisis de la concentración bactericida mínima (CBM) de los Dos desinfectantes (ditiocarbamato y amonio cuaternario)37
 - 1.15. Reproducibilidad a escala de laboratorio del agregado de 5 y 15ppm de los desinfectantes.....38
 - 1.16. Caracterización microbiológica de las muestras.....40
- Conclusiones.....47
- Bibliografía.....49

Introducción

1. Sistema Energético mundial

La energía es inseparable de la materia y todo fenómeno material está asociado a la energía. Por ello, la energía es esencial para la vida y su empleo ha llegado a estar tan indisolublemente ligado a la actividad humana que incluso la cantidad de energía consumida per cápita se utiliza como indicador del nivel de desarrollo de un país. La existencia de recursos energéticos, así como su localización y cuantificación, no garantiza que tales recursos puedan llegar a ser económicamente aprovechados, o dicho de otra forma, que puedan emplearse para obtener energía útil o energía final.

Como sabemos, la demanda energética mundial aumenta constantemente en todos los ámbitos de nuestras vidas, e históricamente la incorporación de nuevas energías primarias no supuso, en general, la disminución en el consumo de energías finales, que aunque redujeron el porcentaje en el consumo global no así sus volúmenes absolutos.

El petróleo, el gas natural y el carbón son las tres principales fuentes de combustibles fósiles de las que depende la humanidad para cubrir sus necesidades energéticas básicas, como el calentamiento de hogares, el suministro de electricidad y de combustibles.

El problema que representan los combustibles fósiles es que no son renovables, tienen un suministro limitado, y la demanda siempre será mayor a la oferta a pesar de la permanente incorporación de tecnologías de prospección y extracción. Estas situaciones motivan a generar en el hombre y en los gobiernos a desarrollar nuevas tecnologías que le permitan acceder a fuentes de energías renovables y más limpias. Uno de los problemas de estos tipos de energías alternativas, es que todas juntas no logran cubrir la matriz energética nacional y mundial.

En el año 2017, la energía primaria consumida en todo el mundo ascendió a 13,5 millones de toneladas equivalentes de petróleo, cuyo desglose por fuentes de combustible fue la siguiente como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1: Fuentes de energía primaria en el mundo
(Fuente: BP Statistical Review of World Energy 2018, p. 9).

ENERGIA PRIMARIA	CONSUMO ANUAL	
	Millones de toneladas equivalentes de petróleo	Porcentual (%)
Petróleo	4.621,90	34,2
Carbón	3.731,50	27,61
Gas natural	3.156	23,35
Hidroeléctrica	918,60	6,79
Nuclear	596,40	4,41
Renovables	486,80	4,49
Total	13.511,20	100

Como puede observarse, el petróleo sigue siendo la primera fuente de energía primaria, seguida del carbón y del gas natural; y más distanciadas, las energías hidroeléctricas, la nuclear y el conjunto de energías renovables (eólica, fotovoltaica, termosolar, etc.).

Los biocombustibles están en pleno desarrollo y tomando cada día más fuerza; pueden sustituir parcialmente a los combustibles fósiles, dando solución a los problemas anteriormente mencionados, dado su menor impacto ambiental y la posibilidad de crear un ciclo energético, el que disminuye las emisiones de CO₂, compensando, las emisiones producidas en el proceso y las fijadas por las plantas. Este balance es neutro en caso de usarse caña de azúcar como materia prima. Para demostrar que el biocombustible tiene un balance de energía positivo, es decir contiene más energía de la que se usa en la producción, se debe considerar indicadores como la Tasa de Retorno Energético y el Ciclo de Vida. Esto permite la cuantificación la renovabilidad y el aporte neto de energía del biocombustible entregado a los consumidores (Cárdenas y colab., 2007).

El bioetanol, como combustible ofrece importantes ventajas económicas, estratégicas y de infraestructura que no fueron apreciadas en el pasado. Por ejemplo en países con limitados recursos de petróleo, la producción de bioetanol

es considerada económicamente estratégica para la reducción del déficit comercial. Desde el punto de vista medioambiental el empleo de cultivos agroenergéticos para la producción de combustibles reduce las concentraciones de dióxido de carbono. La gasolina reformulada con bioetanol reduce las emisiones de dióxido de azufre entre un 60-80%, de compuestos orgánicos entre el 13-15%, de un 10% de precursores de óxido nitroso y de entre un 20-40 % de dióxido de carbono (Turner y colab, 2011; Mičić y Jotanović, 2015).

1.1. Situación en la Argentina

Hasta finales de la década de 1930 la producción de bioetanol era económicamente competitiva con respecto a la gasolina. Sin embargo, con el mercado durante la década del 70, cuando se produjo un aumento de los precios internacionales del petróleo debido a los embargos petroleros a EEUU (1973) y la revolución iraní (1978), el precio del bioetanol fue menor al de la gasolina. Esto impulsó a una mayor inversión en el desarrollo de tecnologías y proyectos para aumentar la producción del bioetanol (Wyman, 2001). En Argentina en el año 1979 se estableció el Programa Alconafta cuyo objetivo fue promocionar el empleo de alcohol anhidro como combustible. En los años 1985-1987 se logró que doce provincias integraran el plan, consumiendo 250 millones de litros de bioetanol por año y logrando una producción máxima de 450 millones de litros. En los años siguientes debido a los problemas en la cosecha de caña de azúcar, al aumento de rentabilidad del azúcar a nivel internacional, y a las presiones que ejercieron las petroleras sobre el Estado, hicieron que no se lograra cubrir la cuota de bioetanol anhidro y que el Programa Alconafta fuera dejado de lado gradualmente hasta desaparecer por completo.

En el 2009 entra en vigencia la ley 26.093/2006 de “Régimen de Regulación y Promoción para Producción y uso Sustentable de Biocombustibles” que impulsó nuevamente la producción de bioetanol. Esta norma establece que toda nafta y gasoil que se comercialice dentro del país, debe ser mezclada con un 5% como mínimo sobre la cantidad total del producto final de bioetanol y biodiesel, respectivamente. A tal efecto, aprobaron una segunda ley (26.334/2008) y sendas

resoluciones (37/2016) acerca de las condiciones de producción y comercialización de alcohol, confirmándose que la agroindustria azucarera localizada en el norte del país proporcionará a las petroleras nacionales la cantidad de alcohol necesario para la producción de biocombustibles.

La reapertura del uso del alcohol como combustible, encarado por Tucumán en el plan Alconafta hace algunas décadas, y la ley 26.093 que posibilita nuevamente el uso de los biocombustibles, a partir de distintas materias primas de origen agroindustrial, ha creado en nuestra provincia un renovado interés acerca de este tema. Esto se puede evidenciar en la promulgación de la Resolución 37/2016, donde se resolvió incrementar, a partir del 1° de abril de 2016, de 10% a 12% mínimo en volumen el agregado de bioetanol en las naftas de uso automotor a comercializarse en todo el Territorio Nacional en el marco de las Leyes Nros. 26.093 y 26.334. En esta Resolución además se indica que debe ser cumplido obligatoriamente por las empresas encargadas de realizar las mezclas de dichos productos.

Hay informes de organismos internacionales que indican que las perspectivas a futuro de Argentina, como exportador de bioetanol, son posibles. Esta evaluación es diferente con respecto al resto de los países en vías de desarrollo, donde las perspectivas radican sólo en establecer la independencia energética (OCDE, 2013).

En Argentina la principal materia prima para la producción de bioetanol es la caña de azúcar. Recién en el año 2012 se inició la producción de bioetanol a partir del maíz, logrando a partir del 2014 superar la producción obtenida a partir de la caña de azúcar (Figura 3). Tucumán es una de las provincias más importante en cuanto al volumen de bioetanol, pero a partir del 2013 Córdoba pasó a ser la provincia de mayor producción, empleando maíz como materia prima para la fermentación (Figura 3) (Ministerio de Energía y Minería de la Nación Argentina, 2019).

Nuestro país tiene 23 ingenios azucareros, 20 de los cuales se encuentran en el NOA y 15 en la provincia de Tucumán. De los 20 ingenios distribuidos en el NOA, 16 cuentan con destilería, y sólo diez tienen la capacidad de deshidratar

alcohol para obtener el bioetanol anhidro que se usa para mezclas con naftas (Pérez y colab, 2011).

En Tucumán, la materia prima empleada como biomasa para la obtención de bioetanol es la caña de azúcar. En la Figura 1 podemos observar el área cañera de la región del NOA. Con la finalidad de visualizar la tendencia que presentó la superficie cosechable con caña de azúcar en Tucumán en la última década, se presenta un gráfico que concentra la información de las zafras 2010 a 2019. Se constata una tendencia ascendente en general hasta la zafra 2013, con una suba significativa entre 2012 y 2013. Aun cuando en la zafra 2014 se registra una disminución con respecto a la zafra precedente, en 2015 y 2016 se observan incrementos muy leves. En la zafra 2017 se observa una merma del 1,7% con respecto al ciclo anterior, luego se observa un incremento leve en las próximas zafras hasta llegar a la zafra 2019(Figura 2) (Fandos, y colab., 2019).

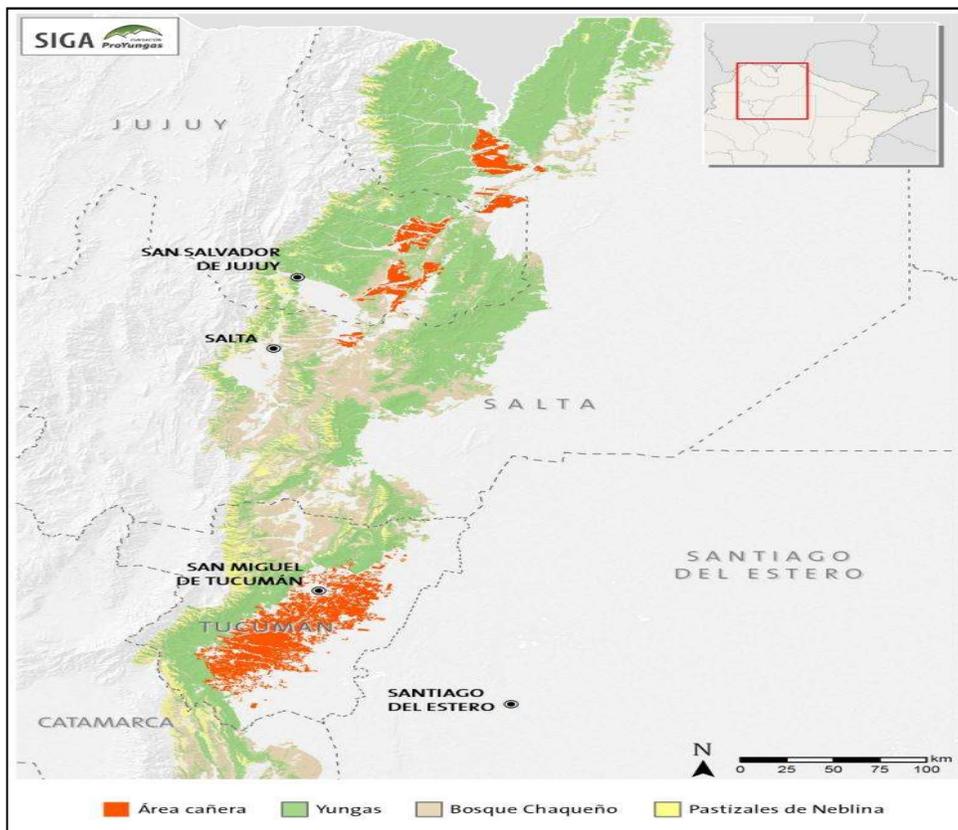


Figura 1. Distribución espacial de los cultivos de caña de azúcar de la región del NOA. (Sección Sensores Remotos y SIG – EEAOC).

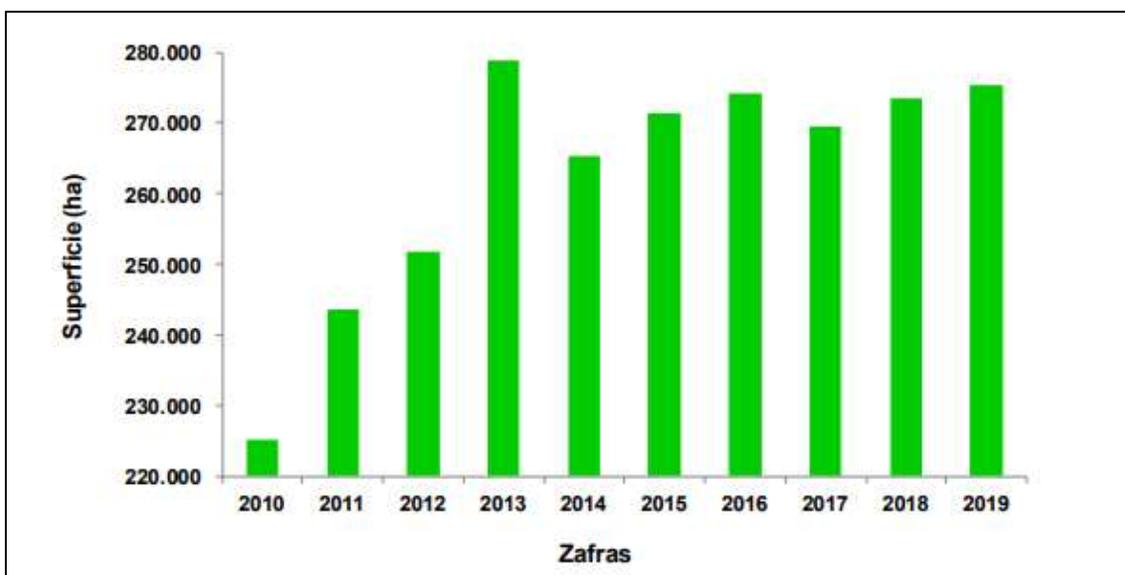


Figura 2. Evolución de la superficie cosechable con caña de azúcar en Tucumán entre las zafras 2010 y 2019 (Fandos y colab., 2019).

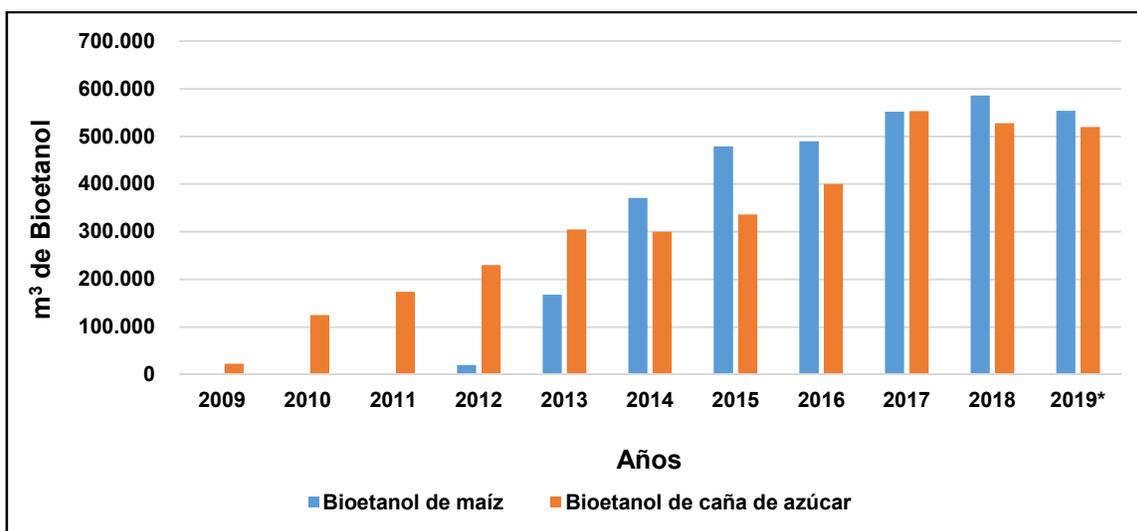


Figura 3. Producción de Bioetanol tanto de maíz como de caña de azúcar en Argentina desde el año 2009 al año 2019. (Ministerio de Energía y Minería de la Nación Argentina, 2019).

Objetivos

General

El aspecto más importante de la fermentación alcohólica que engloba todos los factores que afectan el proceso, es el rendimiento de etanol, relacionado directamente con la productividad industrial. El objetivo general de este trabajo es hacer una revisión de todos los factores microbiológicos involucrados en la producción del bioetanol y los posibles contaminantes bacterianos del proceso fermentativo.

Específicos:

- Descripción del proceso de producción de Bioetanol desde las materias primas hasta el producto final.
- Búsqueda bibliográfica de datos de zafras anteriores de los ingenios tucumanos.
- Visita a Ingenios.
- Implementar diferentes metodologías para la cuantificación de bacterias en el proceso fermentativo de diferentes muestras.

Bioetanol

El bioetanol (alcohol etílico) es un líquido claro, incoloro con un característico olor agradable, y es el producto de la fermentación alcohólica, obtenido por acción microbiana, a partir de diferentes materias orgánicas azucaradas (Hernández Nodarse, 2007); y ha adquirido un gran valor por su capacidad para ser empleado como combustible, ya sea mezclado con gasolina o con derivados del petróleo, y especialmente por tratarse de una fuente renovable de energía. Por lo tanto su empleo como biocombustible, proporciona una alternativa de mejor calidad, mayor pureza y menor impacto ambiental.

Materias primas

Las fuentes de carbono empleadas como materia prima para la obtención de bioetanol, pueden clasificarse en (Hernández Nodarse, 2007):

- a) Materiales azucarados como jugo de caña de azúcar, melazas, sorgo sacarífero, etc. Son materias primas que poseen un alto contenido de azúcares simples y fermentables, como la glucosa, la fructosa, la galactosa y la sacarosa, entre otros. La ventaja de utilizar este tipo de fuentes consiste en que no es necesario realizar tratamientos previos para obtener los azúcares fermentables, puesto que estos ya se encuentran presentes.
- b) Materiales amiláceos como yuca, maíz, papa, sorgo granífero, etc. En el caso de los cereales, estos deben someterse previamente a un proceso de hidrólisis del almidón, con el fin de romper este biopolímero en azúcares fermentables que estén disponibles para los microorganismos encargados de la fermentación alcohólica.
- c) Materiales celulósicos como bagazo, madera, residuos agrícolas, etc. Las materias primas con alto contenido de celulosa son las fuentes más abundantes de biomasa a nivel global, y su uso ha tenido un creciente interés global; sin embargo, la compleja composición química de estas fuentes ha planteado retos tecnológicos que aún no han podido ser satisfactoriamente superados.

En la Figura 3 se grafican las diferentes materias orgánicas y proceso que son sometidas para permitir la obtención de etanol hidratado y/ o anhidro.

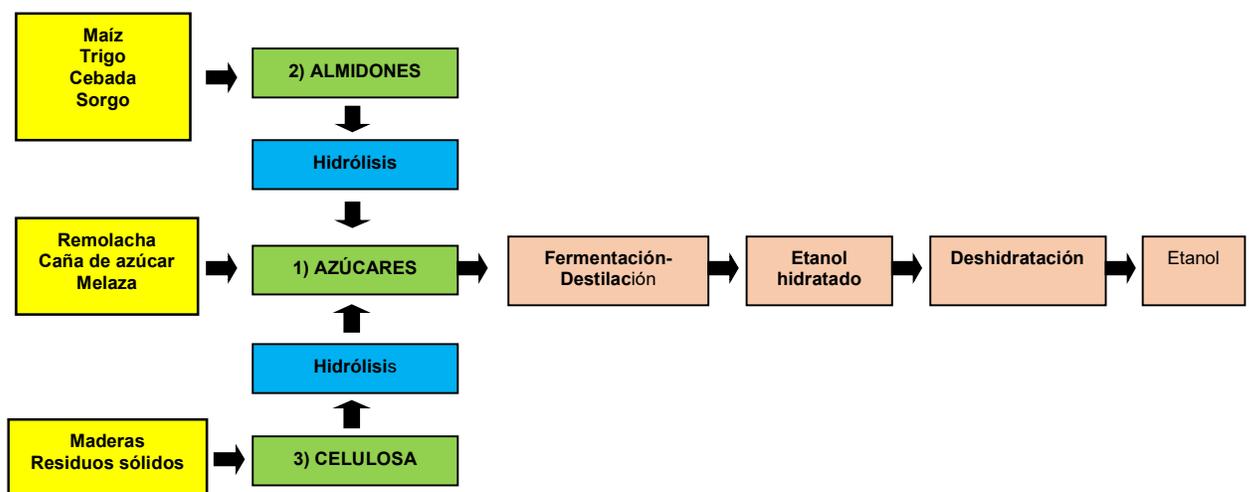


Figura 3. Esquema del proceso completo de obtención de etanol, a partir de las principales materias primas que se utilizan para su producción (García y García, 2006).

Caña de azúcar

La caña de azúcar es una planta semiperenne con ciclo fotosintético de tipo C4, perteneciente al género *Saccharum*, de la familia de las gramíneas, compuesta por especies de gramas altas perennes, oriundas de regiones templadas a tropicales de Asia, específicamente de India. La parte aérea de la planta se compone, esencialmente, por los tallos, en los que se concentra la sacarosa, y por las puntas y hojas, que constituyen la paja de la caña de azúcar.

La caña, después de ser cosechada, se descarga en mesas transportadoras para luego ser sometidas a un proceso de preparación que consiste en romper y desfibrar las celdas de los tallos por medio de troceadoras, picadoras oscilantes y desfibradoras. Para extraer la sacarosa contenida en el jugo, se hace circular la caña de azúcar por un tándem de molinos (trapiche) o difusor con la adición de agua en contra corriente. El jugo extraído por cualquiera de ambos métodos se somete a un proceso de limpieza que involucra una serie de etapas hasta la clarificación y decantación.

El jugo de caña está compuesto por azúcares, sustancias solubles llamadas no azúcares y agua (Tabla 2). Entre los primeros, la sacarosa es el principal constituyente, siguiendo en concentraciones decrecientes glucosa, fructosa y oligosacáridos. Los no azúcares son sales de ácidos orgánicos e inorgánicos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, proteínas, polisacáridos solubles, almidón, ceras, grasa y otros compuestos minoritarios, tales como flavonoides, polifenoles, etc. (van der Poel y colab., 1998).

Tabla 2. Composición química de jugo de caña de azúcar (van del Poel y colab., 1998)

Constituyentes del Jugo	% Sólidos Solubles
Azúcares	75 - 92
Sacarosa	70 - 88
Glucosa	2 - 4
Fructosa	2 - 4
Sales de	3 - 4,5
Ácidos orgánicos	1 - 3
Ácidos inorgánicos	1,5 - 4,5
Ácidos Orgánicos	1,5 - 5,5
Ácidos carboxílicos	1,1 - 3,0
Aminoácidos	0,5 - 2,5
Constituyentes orgánicos no azúcares	
Proteínas	0,5 - 0,6
Almidón	0,001 - 0,050
Gomas	0,30 - 0,60
Ceras y grasas	0,05 - 0,15
Otros	3,0 - 5,0

Es importante indicar que existen parámetros que nos permiten evaluar la calidad del jugo obtenido. Algunos de estos indicadores de calidad podemos mencionar:

- 1) **Sólidos solubles (°Brix):** mide la concentración de sólidos solubles.
- 2) **Pol % en jugo:** mide concentración de sacarosa. Esta sustancia tiene la capacidad de desviar la luz polarizada.
- 3) **Pureza:** es relación Pol/Brix. Es un parámetro característico de la calidad de los jugos.

Melaza

El jugo clarificado obtenido pasa luego a la sección evaporación para eliminar gran parte del agua presente en el jugo. El jugo clarificado posee aproximadamente un 82-87 % de agua, por efecto del trabajo de los evaporadores

de múltiple efecto se logra reducir el contenido de agua al 33-40 % (60-67 °Brix), denominándose "melado" al jugo concentrado que sale de los evaporadores.

Luego el melado pasa al proceso de cristalización para lograr la formación de los cristales de azúcar (sacarosa), se requiere eliminar el agua presente en el melado. Esto se realiza durante la cocción de las templeas en equipos llamados "tachos", que no son otra cosa que evaporadores de simple efecto que trabajan al vacío. En un sistema de tres templeas se producen tres tipos de masas cocidas o templeas: las "A", las "B" y las "C".

Las templeas A son las de azúcar comercial y las otras son materiales para procesos internos que permiten obtener finalmente una miel final o melaza con bajo contenido de sacarosa.

Esta melaza con bajo contenido de sacarosa es lo que se utiliza como materia prima en la fermentación para la obtención de etanol.

Para elaborar las templeas A se concentra la masa hasta obtener 91 – 92 °Brix. Al llegar a esta concentración se descarga la templea o masa cocida hacia los cristalizadores. Para lograr la separación de los cristales presentes en la templea se emplean centrifugas de primera de alta velocidad. Los cristales separados son denominados "azúcar A", que es el azúcar comercial, y la miel separada es llamada "miel A", que es recirculada al piso de tachos para su agotamiento interno.

La miel agotada del cocimiento de tercera se denomina melaza y tiene un valor de sacarosa residual que es difícil de cristalizar por procedimientos normales y que resulta antieconómico por otros, tomando el nombre de "perdida en melaza".

La melaza es un líquido viscoso de color oscuro, cuya composición química varía de acuerdo al procesamiento fabril, al tipo de caña o a la región de cosecha de la misma. Del análisis de muestras de melazas realizado en los laboratorios de la EEAOC, se puede estimar que la composición aproximada de esta materia prima en la región del NOA es sacarosa (15 - 46%), azúcares reductores directos (9 - 35%), sustancias minerales (15 - 22%) y sólidos disueltos (78 - 87%). A continuación, en la Tabla 3 podemos observar valores estadísticos de los parámetros obtenidos en muestras de melaza procesados en la EEAOC durante las últimas zafras.

Tabla 3. Caracterización química de melazas (Datos estadísticos)

PARÁMETROS	VALORES				
	Promedios	Medianas	DS	Mínimos	Máximos
pH en azúcar	5,63	5,63	0,22	5,37	5,88
Zinc (mg Zn/Kg)	5,34	4,80	2,67	3,10	9,90
Hierro (mg Fe/Kg)	48,42	51,00	9,94	35,00	60,10
Cobre (mg Cu/Kg)	3,42	3,70	1,05	1,80	4,40
Calcio (g Ca/Kg)	6,05	5,65	1,07	5,40	8,20
Magnesio (g Mg/Kg)	1,47	1,50	0,05	1,40	1,50
Cadmio (mg Cd/Kg)	0,23	0,20	0,06	0,20	0,30
Molibdeno (µg Mo/Kg)	144,50	144,50	149,20	39,00	250,00
Sodio (g Na/Kg)	0,62	0,60	0,29	0,29	0,97
Potasio (g K/Kg)	42,07	43,00	5,81	34,70	48,00
Manganeso (mg Mn/Kg)	11,28	12,00	2,43	7,40	14,00
Plomo (mg Pb/Kg)	2,40	2,20	0,53	2,00	3,00
Arsénico (mg As/Kg)	0,40	0,40	0,10	0,30	0,50
Cobalto (mg Co/Kg)	1,13	1,10	0,05	1,10	1,20
Sacarosa (g/100 g)	32,35	35,65	9,85	15,36	45,92
Fructosa (g/100 g)	6,26	5,40	4,13	2,33	16,32
Glucosa (g/100 g)	4,86	4,74	3,28	1,46	12,07
Azúcares Reductores Directos (%)	16,00	14,49	6,71	9,23	31,63
Azúcares Reductores Totales (%)	55,45	55,74	2,89	50,28	60,23
Materia Seca (%)	70,21	79,14	23,77	22,53	86,48
Brix Densimétrico (%)	84,44	84,36	2,57	78,76	87,08
Brix Refractométrico (%)	81,00	81,24	2,36	76,40	84,14
Cenizas Conductimétricas (%)	11,30	11,24	1,66	9,71	13,01
Proteínas (%)	4,28	4,28	2,43	2,56	6,00
Grasas (%)	4,02	4,02	5,64	0,03	8,00
Nitrógeno Kjeidahl (%)	0,33	0,43	0,21	0,01	0,45
Fósforo Total (mg P/Kg)	131,50	131,50	24,75	114,00	149,00

El uso de melazas como sustrato para la producción de bioetanol tiene una serie de ventajas, tales como su almacenamiento durante períodos de tiempo prolongados sin que ocurran contaminaciones microbianas considerables, su esterilización por inyección de vapor, y por poseer nutrientes (vitaminas y minerales) que contribuyen a la nutrición de los microorganismos a emplear en el proceso fermentativo. Además, tiene el beneficio económico por ser un subproducto de la industria azucarera, y debido a su contenido en azúcares, permite alcanzar altos rendimientos de alcohol en corto tiempo, trabajando en

condiciones adecuadas para su aprovechamiento (Acevedo y colab., 2003; Calderón Pérez, 2007).

Proceso de producción industrial de bioetanol

El proceso de producción de etanol consta de las siguientes etapas:

1. **Adecuación de la materia prima:** se acondicionan las materias primas (jugo de caña de azúcar, mieles, melaza o mezclas de estos) para obtener un mosto de alimentación adecuado nutricionalmente, para que los microorganismos empleados en este proceso transformen la materia azucarada en etanol.
2. **Fermentación:** el proceso típico de producción de alcohol por lotes a partir de caña de azúcar, es denominado proceso Melle-Boinot (17). La fermentación se caracteriza por una reacción bioquímica de transformación de azúcares reductores en bioetanol y dióxido de carbono, por acción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Del mosto fermentado, por centrifugación se obtienen vino y levaduras. Estas últimas son recirculadas a los fermentadores.
3. **Destilación:** este es un proceso por el cual, se separa en columnas especiales del vino los compuestos que tienen diferentes puntos de ebullición.
4. **Deshidratación:** es la eliminación del agua del alcohol obtenido, y se realiza empleando tamices moleculares o con solventes orgánicos como el ciclohexano.

Microorganismos

Los microorganismos más apropiados para la producción de bioetanol a partir de azúcares son las levaduras (*Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), como también algunas bacterias, como *Zymomonasmobilis*.

Saccharomyces cerevisiae es la especie de levadura mayormente empleada en procesos de fermentación industrial, fundamentalmente por sus aplicaciones en

lo relacionado a la elaboración de pan, bebidas alcohólicas (cervezas, vinos, etc.) y producción de alcohol combustible.

1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo muy utilizado para realizar procesos fermentativos, debido principalmente a que no es exigente en sus requerimientos culturales (nutrición y condiciones ambientales), tolera altas concentraciones de bioetanol y, además en la fermentación, produce bajos niveles de subproductos. Es capaz de crecer y producir sustancias a altas concentraciones de azúcares, presenta elevada viabilidad celular por lo cual se realizan reciclado de las mismas y por último, algunas de ellas tienen la capacidad de floculación que facilita el proceso de separación.

Es un organismo eucariota, unicelular, y tiene un metabolismo facultativo, es decir, sus componentes enzimáticos y rutas metabólicas le permiten sobrevivir tanto en ambientes aerobios como anaerobios. Generalmente, tiene forma redondeada u ovalada, y su tamaño oscila entre 2-8 μ m de diámetro por 3-5 μ m de longitud, según la etapa de vida y condiciones de crecimiento.

Presenta un ciclo de reproducción sexual y asexual, sin embargo, se observa comúnmente, la reproducción asexual por fisión binaria o gemación.

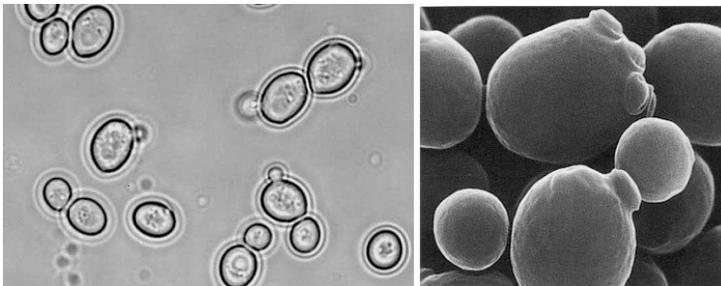


Figura 5. Fotos correspondientes a observación de *S. cereviceae* A) microscopía óptica; B) microscopía electrónica

1.3. Bioquímica

Saccharomyces cerevisiae en presencia de oxígeno, utiliza la vía glicolítica y el ciclo de Krebs como metabolismo oxidativo para la generación de energía y

biomasa (Figura 6). En estas condiciones, el microorganismo inicia su proceso de respiración, el cual se realiza en tres etapas:

1. El piruvato, por acción del complejo piruvato deshidrogenasa, es oxidado a Acetil-CoA.
2. En el ciclo del ácido cítrico, la oxidación del carbono produce CO_2 , transportadores electrónicos reducidos y generación de ATP.
3. Los transportadores electrónicos reducidos se reoxidan, aportando energía para la síntesis de más ATP, en la cadena respiratoria.

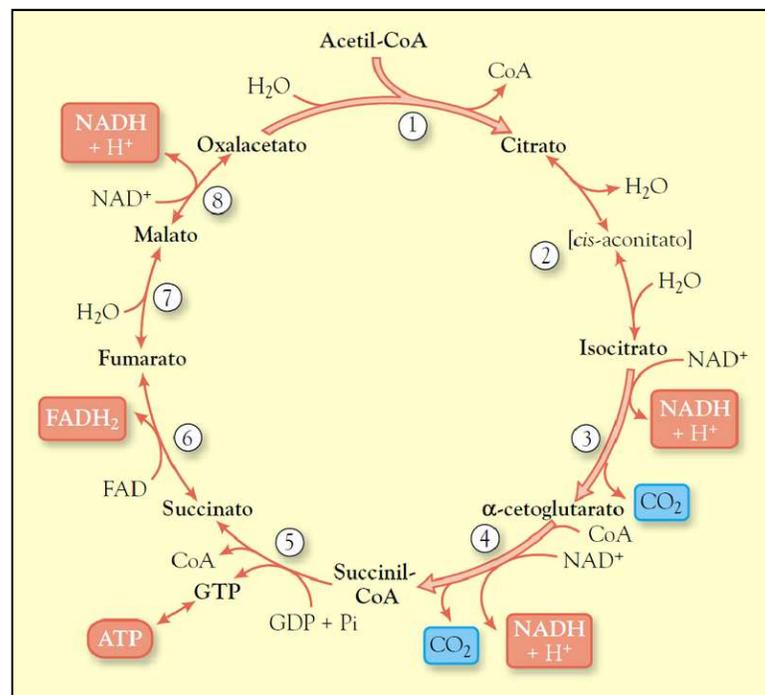


Figura 6. Ciclo de Krebs

De esta manera se genera la energía necesaria para que los organismos puedan producir intermediarios orgánicos para la generación de estructuras celulares y por ende para su reproducción (Mathews y colab., 2002; Calderón Pérez, 2007).

Por otro lado, en condiciones anaerobias, el metabolismo del piruvato sigue otra vía que se denomina vía fermentativa (Figura 7). El piruvato tiene numerosos destinos alternativos en los microorganismos anaerobios y microaerófilos. En el

caso de las levaduras, el piruvato es transformado en bioetanol por los siguientes pasos: 1) el piruvato por descarboxilación no oxidativa pasa a acetaldehído, catalizada por piruvato descarboxilasa; 2) se produce la reducción del acetaldehído a bioetanol por NADH y catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (Calderón Pérez, 2007).

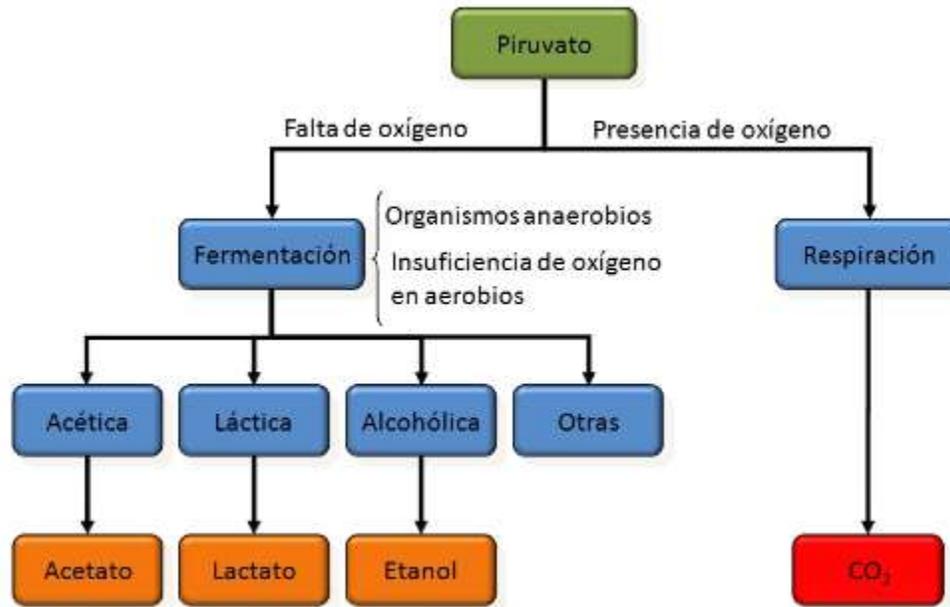


Figura 7. Vías de metabolización del piruvato teniendo en cuenta la presencia de oxígeno.

Condiciones de estrés en la fermentación alcohólica y respuesta fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae*

Dentro de las condiciones de estrés que enfrenta la célula de la levadura en la fermentación etanológica, la inhibición por etanol, la temperatura, el estrés oxidativo y la presión osmótica son las condiciones más adversas que enfrentan las levaduras durante este proceso (Stanley y colab., 2010).

A continuación, se detallan las características de las principales condiciones de estrés que enfrenta *S. cerevisiae*.

1.4. Estrés por etanol

La disminución en la fluidez y la permeabilidad de la membrana son los primeros efectos provocados por el etanol, seguido por una deficiencia en el

sistema de transporte de compuestos esenciales como aminoácidos y glucosa. Asimismo, el etanol compromete funciones vitales como la reducción del tamaño celular, el flujo metabólico y la viabilidad (Figura 8).

Como consecuencia del estrés por etanol, disminuye la cantidad de ácidos grasos saturados (ácido palmítico) pero se incrementan los ácidos grasos no saturados (ácido oleico), se acelera la biosíntesis del escualeno y ergosterol así como la de fosfatidil inositol, se incrementa la actividad de la superóxido dismutasa, aumentan los niveles de trehalosa y la síntesis del citocromo P450.

La resistencia a etanol se ve aumentada cuando en la membrana se encuentran ácidos grasos de cadena larga. Cualquier combinación de este alcohol con temperatura alta, estrés osmótico, de privación de nutrientes o bajo pH intensifican y amplifican los efectos negativos del etanol (Lentini y colab., 2003).

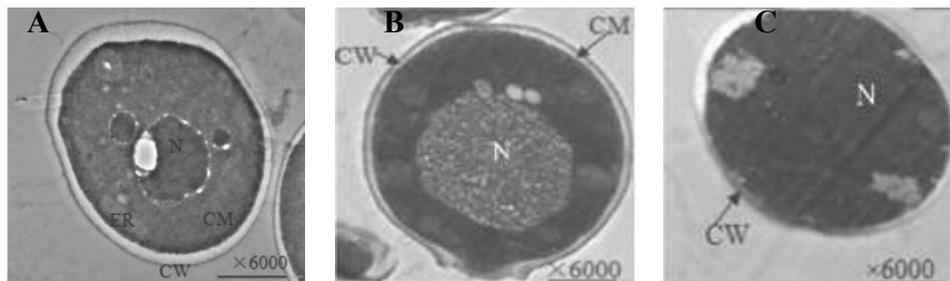


Figura 8. Fotos de microscopía electrónica de transmisión. Podemos relacionar los cambios ultraestructurales provocados por el etanol con la fisiología del estrés celular de las levaduras. A) Sin alcohol; B) agregado de 5% de etanol; C) agregado de 10% de etanol. (N: nucléolo; CM: membrana citoplasmática; CW: pared celular; ER: retículo endoplasmático) (Ma y colab., 2013).

1.5. Estrés oxidativo

El daño que se lleva a cabo en presencia de especies reactivas del oxígeno (EROs), por ejemplo, el anión superóxido, el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el aniónhidroxilo (OH^-) y/o por cambios en el estado redox de la célula es denominado estrés oxidativo (Martin y colab., 2003).

Las proteínas, el ADN, los lípidos y los diferentes componentes celulares pueden sufrir numerosos daños como consecuencia de la respiración celular debido a la alta concentración de oxígeno disuelta en el medio de cultivo. Asimismo, la peroxidación de distintos lípidos conlleva a la disminución de la fluidez de la membrana, receptores anclados en ella y la permeabilidad de iones importantes para la regulación osmótica. Sin embargo, la célula puede defenderse y contrarrestar los efectos nocivos utilizando mecanismos antioxidantes no enzimáticos o enzimáticos. Los sistemas considerados no enzimáticos generalmente son pequeñas moléculas tanto hidrosolubles como liposolubles que pueden unirse a las especies reactivas del oxígeno. Dentro de esta clasificación, se encuentra el glutatión (GSH), las poliaminas, ácido eritroascórbico y flavohemoglobinas.

No obstante, las defensas enzimáticas son aún más efectivas, como por ejemplo, la enzima catalasa (CAT) y la enzima glutatión S transferasa (GST). Otras enzimas como la superóxidodismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, tiorredoxina-peroxidasa y peroxirredoxinas también son de suma importancia para la detoxificación de la célula.

1.6. Estrés térmico

La temperatura afecta procesos metabólicos y puede actuar como activador o inhibidor en el desarrollo del microorganismo. En particular, elevadas temperaturas desnaturalizan proteínas y ácidos nucleicos. La levadura puede crecer a bajas temperaturas (1-3°C) o altas temperaturas (cerca de 40°C) pero su temperatura óptima oscila entre 25-34°C. Cuando las levaduras son expuestas a temperaturas fuera del rango óptimo activan mecanismos que tienden a mantener la homeostasis celular (Walker, 2000).

Existen proteínas denominadas “proteínas de choque térmico” (PCT o HSP Heat Shock Protein) que permiten que el microorganismo se adapte a este tipo de estrés. La proteína de choque térmico más estudiada es la Hsp104 ya que posee un rol decisivo en la adquisición de tolerancia a altas temperaturas y otros tipos de estrés.

1.7. Estrés Osmótico

La presión osmótica hace referencia de la presión hidrostática necesaria para frenar el pasaje de agua a través de una membrana que separa dos soluciones con diferentes concentraciones. Cuando la concentración de un osmolito aumenta, entonces la actividad de agua disminuye, generando shock osmótico. Especialmente, *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura osmotolerante que puede soportar actividades de agua (a_w) entre 0,9 y 0,94 dependiendo de la temperatura, el medio de cultivo, el pH de la solución y la sustancia que induce la reducción de la actividad.

Las levaduras han desarrollado mecanismos de sensado, respuesta y adaptación a cambios generados en el entorno de la célula. Dentro de los primeros segundos, frente a un estrés osmótico la primera respuesta es la extrusión de agua intracelular. Posteriormente, en la etapa de adaptación al estrés suceden diversos cambios como la reestructuración del citoesqueleto de actina, arresto temporario del ciclo de vida y reprogramación del metabolismo.

Al mismo tiempo, se activa la maquinaria implicada en la resistencia a estrés, la cual incluye los siguientes mecanismos: incremento en la concentración intracelular de glicerol, eliminación de iones tóxicos, inducción de genes responsables del metabolismo redox, expresión de proteínas anti-estrés y fragmentación vacuolar (Pereira y colab., 2003).

1.8. Estrés nutricional

La supervivencia celular sólo es posible cuando una fuente de carbono se encuentra disponible en el medio de cultivo en el cual la levadura está presente. Cuando esta fuente de carbono se encuentra ausente, la célula no logra satisfacer sus necesidades y entra en una etapa de estrés nutricional.

La tasa de supervivencia depende del nutriente que se encuentra en falta. Se observó que la carencia de nutrientes naturales como fuente de carbono y energía, fosfato, sulfato o nitrato resulta en el aumento en la tasa de muerte,

mientras que la pérdida de aminoácidos u otros metabolitos en mutantes auxotróficas causan un rápido descenso de la vitalidad (Petii y colab., 2011).

La depleción de azúcares fermentables o de nitrógeno asimilable ocasiona la entrada de las levaduras en fase estacionaria en donde disminuye su proliferación.

Un mecanismo de adaptación más dramático para la célula de la levadura es la autofagia. Este fenómeno aparece en respuesta a un agotamiento nutricional, por ejemplo, las fuentes de carbono y nitrógeno (Abeliovich y Klionsky, 2001).

Contaminación microbiana

La presencia de contaminantes microbianos en el proceso fermentativo, se encuentra asociada principalmente a una disminución de la eficiencia en la producción de etanol. La mayoría de las destilerías de alcohol, utilizan mieles y/o melazas como sustrato principal, sin embargo, una práctica común en estos días, es emplear como alternativa el jugo de caña de azúcar, o una combinación de melaza-jugo a distintas concentraciones de azúcares fermentables. El jugo de la caña de azúcar es un sustrato complejo que permite el crecimiento de diferentes levaduras y bacterias ácido lácticas (de Souza Liberal y colab., 2007). Las levaduras conviven con poblaciones de bacterias y levaduras salvajes que compiten por el sustrato y producen metabolitos que afectan la fermentación. Una de las principales preocupaciones de la industria sucroalcoholera es combatir los microorganismos contaminantes del proceso de producción de alcohol, los cuales son causantes de pérdida de rendimiento fermentativo como: a) consumo de azúcar, b) disminución de la viabilidad de las células de levaduras debido a los metabolitos y a las toxinas secretadas al medio, c) floculación de las levaduras por interacciones específicas, lo que acarrea como consecuencia menor superficie para metabolizar los azúcares como también pérdidas de células de levaduras en el fondo de las cubas o en la centrifuga.

Los microorganismos más comunes encontrados en el jugo de caña de azúcar son bacterias de los géneros *Flavobacterium*, *Xanthomonas*,

Pseudomonas, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Bacillus* y *Corynebacterium* (Gallo, 1989).

Sólo unos pocos informes describen la comunidad de levaduras asociadas a la caña de azúcar, que puede contener especies capaces de actuar como contaminantes industriales. (Sherata, 1960) identificó inicialmente, 14 géneros de levaduras en la caña de azúcar y en su jugo, que pertenecen a *Cándida*, *Endomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Torulopsis*.

Entre los contaminantes que más aparecen en los procesos fermentativos, ocurriendo inclusive en los procesos de fermentación alcohólica, están las bacterias con predominancia de las Gram-positivas de dos géneros *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Leuconostoc* (Ceccato-Antonini, 1998).

1.9. 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 (Figura 8). Los sustratos fermentescibles son azúcares que incluyen varios 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 utilice para convertir los carbohidratos, de ahí que las bacterias lácticas pueden dividirse en dos grupos según los productos resultantes de la fermentación de la glucosa.

El grupo de bacterias lácticas denominados homofermentativos produce un único producto de fermentación, que es el ácido láctico; mientras que el grupo heterofermentativo produce etanol y CO₂ además de ácido láctico.

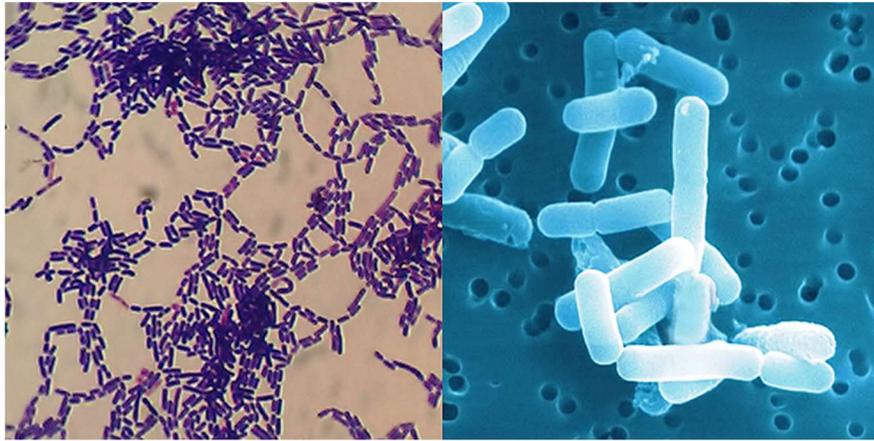


Figura 8. Fotos de observación por microscopio óptico y electrónico de un lactobacilo

1.10. Bacterias acéticas (BA) como contaminantes

Bajo este nombre se conoce un grupo de bacterias pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Neoasia*, *Granulibacter* y *Saccharibacter* (Yamada y Yukphan, 2008). Sin embargo, esta clasificación está en constante revisión (Figura 9).

Al microscopio, las bacterias acéticas (BA) son Gram negativas, de entre 0,4 y 4,5 μm de largas y entre 0,4-1 μm de anchas, con forma elipsoidal y que pueden presentarse de manera individual, en parejas o en cadenas. Presentan flagelos de forma períttrica o polar, y no pueden formar endosporas como estructura de supervivencia. Este grupo de microorganismos necesita del oxígeno como aceptor final de electrones, por lo que tienen un metabolismo aerobio obligado. Generalmente, las BA son catalasa positiva, oxidasa negativa y pueden utilizar el etanol como fuente de carbono. El pH óptimo de crecimiento está entre 5 y 6,5, si bien puede llegar a crecer a pH cercanos a 3.

Las bacterias acéticas pueden convertir la glucosa y fructosa en ácido glucónico y oxofructosa, respectivamente. De igual manera, las BA pueden metabolizar algunas hexosas como manitol, manosa o ribosa. Además, y en asociación con las levaduras, pueden producir ácido acético y acetaldehído, lo que incrementa la acidez volátil del mosto. La acumulación de estos metabolitos suele depender de la cepa y de la concentración de los diferentes azúcares.

La **fermentación acética** es un proceso químico mediado por la acción de un grupo de bacterias pertenecientes al género *Acetobacter*. Mediante este proceso, estas bacterias actúan sobre el alcohol etílico (etanol), oxidándolo, obteniendo como productos finales ácido acético (CH_3COOH) y agua (H_2O). El proceso se caracteriza por la oxidación del etanol en ácido acético, lo que puede elevar la acidez volátil del vino. En las BA, esta ruta metabólica se favorece cuando la concentración de oxígeno es baja. El acetaldehído es un metabolito intermedio en la ruta hacia el ácido acético que se puede encontrar libre en el medio. Como norma general, podemos decir que se produce acetaldehído cuando hay poco oxígeno disuelto en el medio y cuando la concentración de etanol es alta; justo las condiciones que se dan en el vino.

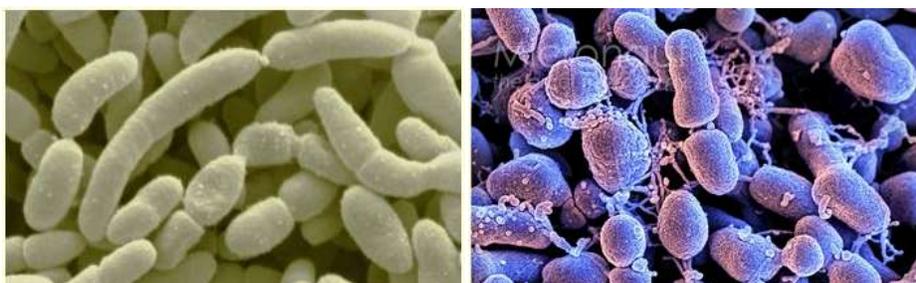


Figura 9. Fotos de observación por microscopio electrónico de bacterias acéticas

1.11. Bacterias productoras de dextranas como contaminantes

Las dextranas son polisacáridos de elevado peso molecular, formados por glucosas unidas por enlaces α -1.6 al menos en el 50%, con ramificaciones enlazadas α -1.3 aunque también puede presentar otras unidas α -1.2 o α -1.4.

La dextrana es una sustancia mucilaginoso cuyo efecto perjudicial consiste en la pérdida de azúcares fermentables y la generación de una espesa película superficial que produce aumento de la viscosidad del mosto de fermentación, por lo que su producción excesiva puede ocasionar serios taponamientos de líneas y equipos de producción (Chen, 2001).

Las dextranas no son compuestos propios de la caña, el contenido de estos polisacáridos en la caña es muy bajo o casi cero. Su formación ocurre por la acción de la enzima dextrana sacarasa de microorganismos contaminantes que se

alojan en la savia de la planta o la atacan posteriormente al ser dañada su corteza. La infestación de la caña por el insecto *Diatraea saccharalis*, conocido como “borer”, y el ataque de roedores favorecen la contaminación microbiana de la gramínea en el campo.

El *Leuconostoc mesenteroides* es la bacteria láctica que fundamentalmente agrede a la caña (Figura 10). El nivel de exposición del tejido interno de la caña se incrementa con el corte mecanizado, el trozado o por la quema, lo cual provoca la inactivación de las enzimas fenol oxidasas de acción protectora o bactericida en la planta. Bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, la dextrana sacarasa hidroliza la sacarosa y forma dextranas. Junto con el jugo, estas dextranas se extraen en los molinos y contaminan los procesos, y su nivel en el jugo llega a exceder las 10.000 ppm (1%) en los casos extremos. El efecto perjudicial de las dextranas comienza desde el momento en que estas se forman, ya que para ello se consume sacarosa de manera irreversible.

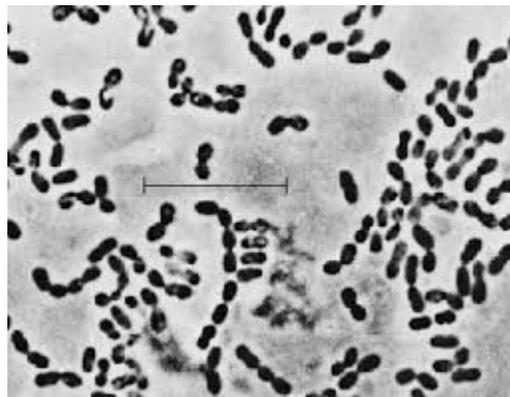


Figura 10. Fotos de observación por microscopio óptico de bacterias productoras de dextrana

1.12. Bacterias coliformes como contaminantes.

Las bacterias Gram negativas (Figura 11) que se encuentran con mayor frecuencia en el agua son las bacterias entéricas que colonizan el tracto gastrointestinal del hombre y son eliminadas a través de la materia fecal. Cuando estos microorganismos se introducen en el agua, las condiciones ambientales son muy diferentes y por consiguiente su capacidad de reproducirse y de sobrevivir son limitadas. Debido a que su detección y recuento a nivel de laboratorio son

lentos y laboriosos, se ha buscado un grupo alternativo de indicadores que sean de más rápida y fácil detección. El grupo más utilizado es el de las bacterias coliformes.

El grupo de microorganismos coliformes es adecuado como indicador de contaminación bacteriana ya que los coliformes;

- Son contaminantes comunes del tracto gastrointestinal tanto del hombre como de los animales de sangre caliente.
- Están presentes en el tracto gastrointestinal en grandes cantidades.
- Permanecen por más tiempo en el agua que las bacterias patógenas.

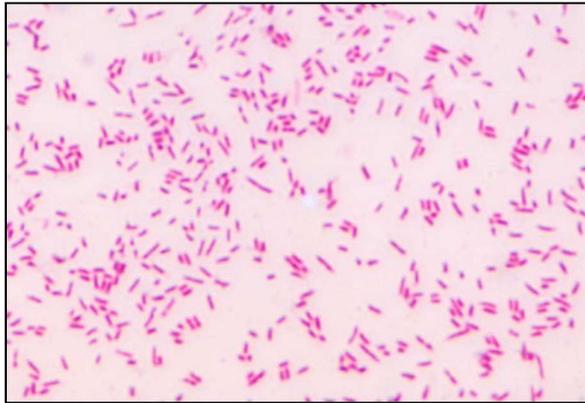


Figura 11. Fotos de observación por microscopio óptico de bacterias coliformes

Industria Sucroalcoholera de la Provincia de Tucumán

En la provincia de Tucumán existen 15 ingenios, de los cuales sólo 11 poseen destilerías con capacidades instaladas (m^3/d) que van desde 60 hasta 700 m^3/d de alcohol hidratado, de los cuales 8 tienen las instalaciones necesarias para producir alcohol anhidro (Figura 12).

Dependiendo de la destilería, el proceso de fermentación para la obtención de etanol se lleva a cabo por un sistema de lote o Batch o un por un sistema continuo, 8 de las cuales trabajan con sistema Batch, 3 con sistema continuo y 1 de las destilerías cuenta con ambos sistemas.

Las destilerías que utilizan sistema Batch poseen todas cubas abiertas y las que utilizan sistema continuo poseen cubas cerradas para su funcionamiento.

Ninguna de las destilerías de la provincia cuenta con sistemas para recuperación del CO₂ producido durante la fermentación alcohólica como así tampoco de recuperación del alcohol que se pierde por evaporación durante el proceso fermentativo.

La alimentación de las cubas se realiza dependiendo de la disponibilidad del ingenio ya sea utilizando solo melazas, mezclas de melazas y mieles, mezclas de melazas y jugos o mezclas de melazas, mieles y jugos.

La totalidad del agua que se utiliza para el proceso fermentativo proviene de pozos ubicados en los predios de los ingenios, la calidad de esta agua debe ser controlada para evitar problemas de contaminación durante el proceso fermentativo.

De las 11 destilerías con que cuenta la provincia solo 1 no utiliza antibióticos para controlar las contaminaciones durante el proceso fermentativo.

En la Figura 12 se puede observar la capacidad instalada (m³/d) de cada uno de los ingenios tucumanos.

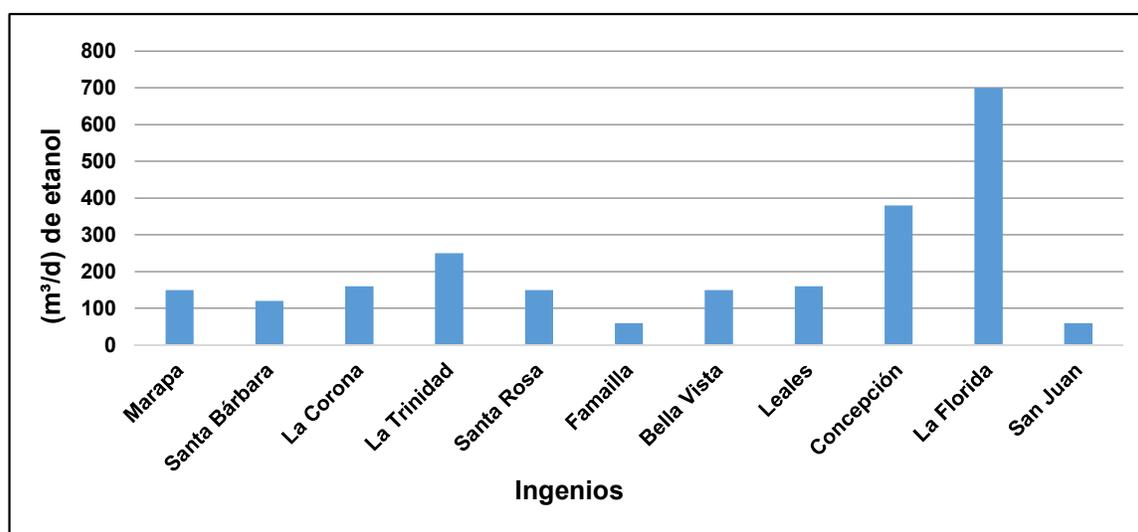


Figura 12. Capacidad Instalada de almacenamiento de etanol de los ingenios tucumanos

Datos de Zafra 2019

En la figura 13 se observan los datos obtenidos del instituto de Producción del Azúcar y Alcohol de Tucumán para la zafra 2019.

INGENIOS	Caña bruta molida total (t)	Azúcar físico total (t)	Azúcar equivalente según DDJJ (t)	Rendimiento azúcar equivalente (% caña de azúcar)	Alcohol total elaborado (m3)
Aguilares	492.757	42.002	42.205,335	8,565	0,000
Bella Vista	573.825	36.533	48.519,896	8,456	9.511,720
Concepción	2.860.117	235.735	285.379,958	9,978	53.253,500
Cruz Alta	715.218	59.207	59.206,865	8,278	0,000
Famailá	947.522	90.701	90.701,077	9,572	6.875,497
La Corona	919.276	45.957	71.495,075	7,777	27.880,737
La Florida	2.107.146	65.431	177.317,810	8,415	121.406,199
La Providencia	1.383.458	140.606	140.212,264	10,135	0,000
La Trinidad	1.765.102	126.292	149.762,787	8,485	35.487,863
Leales	1.168.986	81.786	101.328,696	8,668	24.752,573
Marapa	689.752	58.325	62.613,231	9,078	12.083,000
Nuñorco	621.463	54.215	54.212,620	8,723	0,000
San Juan	0	0	0,000	0	0,000
Santa Barbara	0	0	0,000	0	0,000
Santa Rosa	1.169.930	73.462	103.781,571	8,871	31.905,845
Total Zafra	15.414.552	1.110.252	1.386.737,185	8,996	323.156,934

La producción total de alcohol en la campaña 2019 incluye alcohol producido con melaza de la zafra 2018 en los ingenios Bella Vista, Santa Rosa, La Corona, La Florida y Famailá.

Nota:

* Los datos publicados corresponden a la información suministrada mediante DDJJ por los ingenios.

* El azúcar equivalente informado corresponde a la sumatoria de azúcar físico y alcohol no proveniente de melaza expresado en toneladas de azúcar. El azúcar físico informado corresponde a la sumatoria de azúcar blanco y azúcar crudo.

Figura 13. Datos de zafra 2019

En las Figuras 13 y 14 pueden observarse los datos combinados de la molienda de caña bruta y de caña neta (t) para cada ingenio.

La Molienda de caña bruta se refiere a las toneladas de caña con el contenido de materias extrañas (trash) incluidas. Una vez eliminado este contenido de materias extrañas (trash) se obtiene la molienda de caña neta en (t).

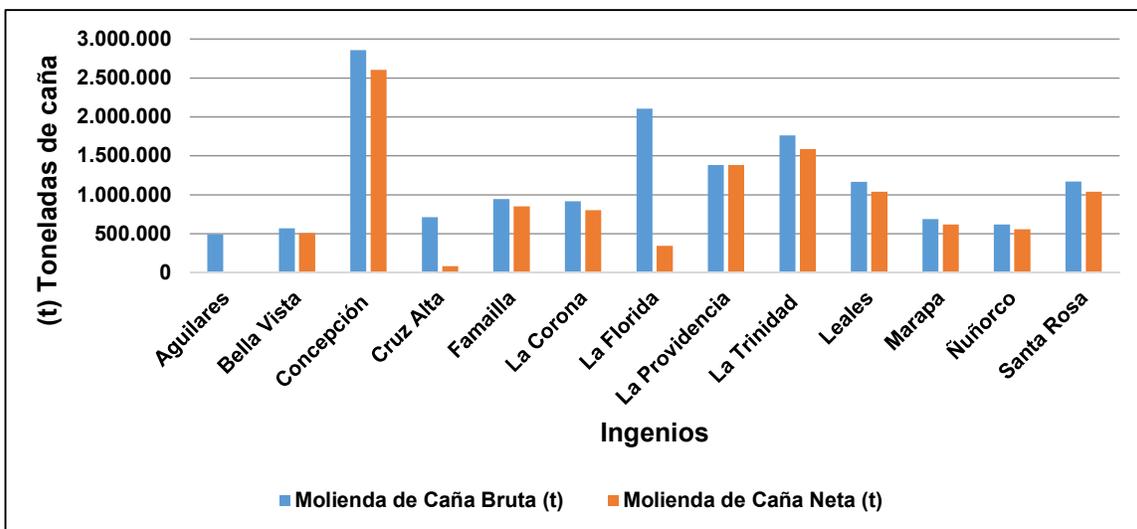


Figura 14. Molienda de caña bruta/neta (t).

La cantidad de azúcar y melaza producida por cada ingenio durante la zafra 2019 pueden verse en la Figura 15. En dicha gráfica las barras en color celeste representan las toneladas de azúcar producida por cada ingenio, mientras que las barras en color naranja representan las toneladas de melaza producida.

Al analizar los datos se observó que en tres ingenios (La Corona, La Providencia y Santa Rosa) la cantidad de melaza producida superaba ampliamente la cantidad de azúcar elaborada, esto se debe a que dichos ingenios incluyen en los datos declarados una cantidad de melaza de la zafra anterior (zafra 2018).

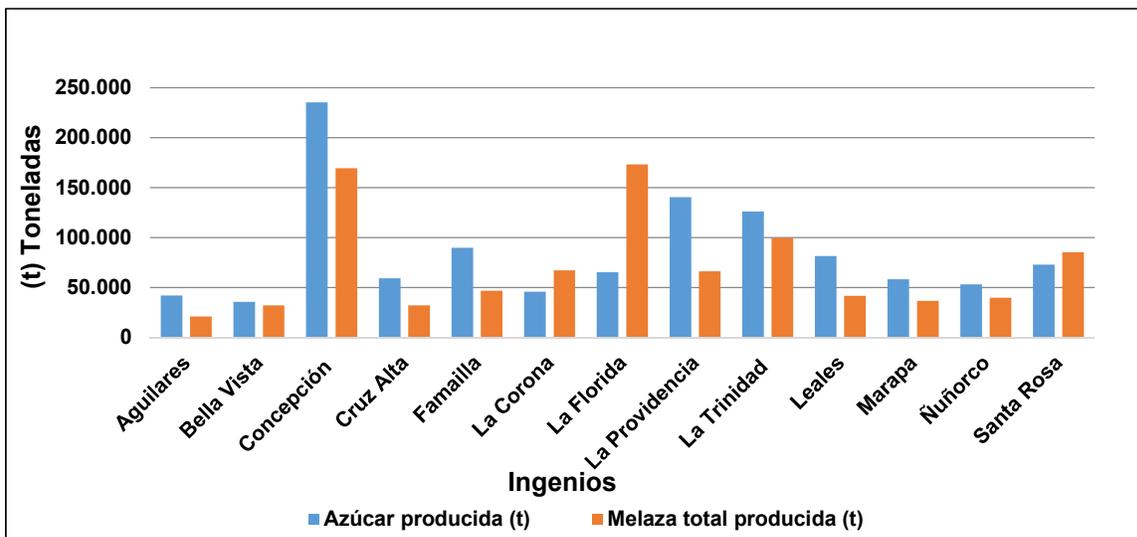


Figura 15. Producción de azúcar (t) y de melaza (t) por los ingenios de Tucumán

La cantidad de alcohol en m³ producida por cada uno de los ingenios que poseen destilería en la provincia de Tucumán está graficado en la Figura 16.

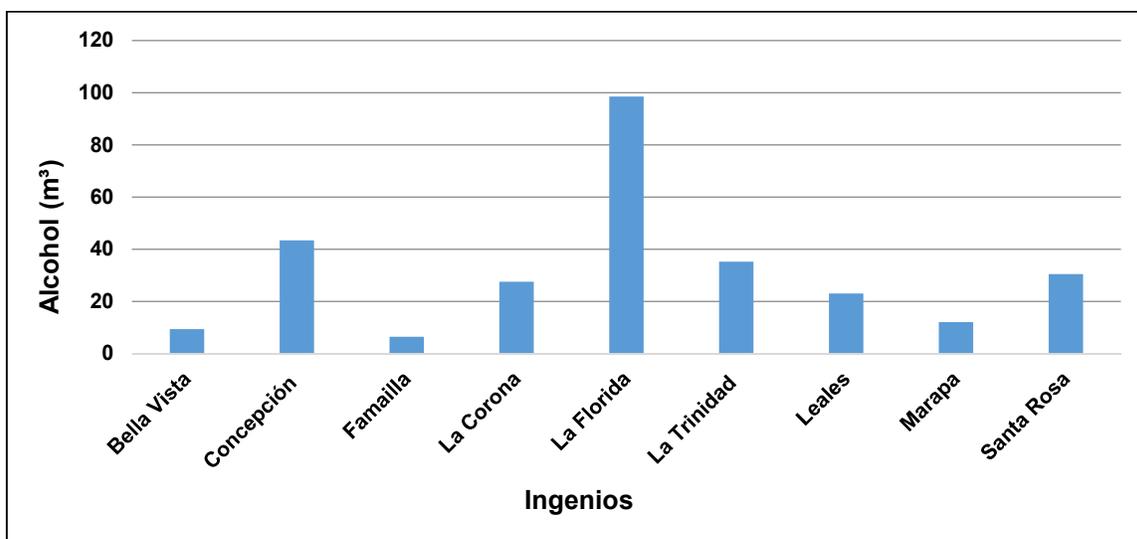


Figura 16. Producción de alcohol (m³) por los ingenios de Tucumán

En los últimos años la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres viene trabajando conjuntamente con la industria azucarera, ya que el 80 % de los casos de consulta por problemas en las destilerías era debido a contaminaciones microbiológicas. Para ello se hizo un relevamiento de cada proceso fermentativo para ver como las condiciones de cada proceso pueden o no

afectar al producto final y de esta forma tratar de disminuir o eliminar toda posible fuente de contaminación durante el proceso fermentativo.

Aplicación del Control Microbiológico en Proceso Industrial de Obtención de Bioetanol

Se realizó una visita a una destilería de la Provincia de Tucumán para realizar un relevamiento del proceso industrial de fermentación etanólica. Se detectaron las siguientes situaciones:

- ✓ Una deficiente higiene del sector de trapiche, con restos de bagazo alrededor de los molinos, acumulación de agua y jugos como también sectores con desarrollo de biofilm microbiano. Estas situaciones son factores importantes para el desarrollo de microorganismos que pueden afectar la calidad del jugo de caña de azúcar (por ejemplo, el desarrollo de bacterias productoras de polisacáridos), por lo tanto los procesos de obtención de azúcar y etanol.
- ✓ Además, se estaban agregando 4,5 ppm de ditiocarbamato en el jugo de caña de azúcar proveniente del quinto molino. El problema es que este producto se venció en el 2011, por lo cual no se puede asegurar que tenga la actividad antimicrobiana indicada por el productor para su uso. En la zaranda rotativa se observaron acumulación de grandes cantidades de formación polisacáridos conocidas como “huevos de rana” en la parte exterior de la misma. Se comprobó que estos sean polisacáridos de dextrana porque dio positivo el ensayo en el laboratorio del estudio de solubilidad en agua y posterior precipitación con alcohol.
- ✓ En el filtro de banda no se observó la presencia de este tipo de estructura química. En la base donde se recibe el agua se detectó el desarrollo de biofilm, que al observar las muestras al microscopio se determinó que la naturaleza biológica del mismo es por bacterias y algas.

De los aspectos detectados se realizaron las siguientes recomendaciones:

- ✓ Realizar higiene y sanitización del sector de molinos en cada turno con agua caliente y desinfectantes

- ✓ Aumentar la dosis del sanitizante a tres veces el valor del que se estaba agregando.
- ✓ Rotar los sanitizantes
- ✓ Incorporar esta sustancia tanto en el jugo del quinto molino como en el tanque de jugo mixto.
- ✓ Limpiar y sanitizar la zaranda rotativa de igual modo como se indicó anteriormente.
- ✓ En el filtro de banda no se debería agregar más el sanitizante ya que no tiene un tiempo de acción considerable en contacto con la superficie. Se recomienda agregar un alguicida y refregar con cepillo o paño los sectores donde se pueda acceder.

Ensayos realizados en el laboratorio

Se tomaron muestras de jugos de quinto molino y mixto para realizar las siguientes determinaciones:

1.13. Recuento de microorganismos en las muestras de jugos

Se realizó empleando la metodología de siembra por agotamiento en superficie empleando medios selectivos y diferenciales: PCA (Britania) para aerobios mesófilos totales; APG (Britania) para hongos y levaduras; MRS agar y APT agar (Merck) para bacterias lácticas; McClesky-Faville (10g tripteína, 5g extracto de levaduras, 20g sacarosa, 1000 ml agua destilada) (ICUMSA) para bacterias productoras de polisacáridos. Las placas de Petri se incubaron a las temperaturas y tiempos adecuados para cada microorganismo.

En las Tabla 4 y Figura 17 podemos observar el aumento significativo en jugo mixto de todos los microorganismos estudiados en este trabajo, principalmente de bacterias productoras de polisacáridos y de levaduras. Cabe destacar que dentro de la morfología microscópica de colonias en medio rico en sacarosa que produjeron polisacárido, se detectó bacterias de diferentes morfologías, cocos Gram positivos compatibles con *Leuconostoc mesenteroides* y bacilos Gram negativos (enterobacterias). En la placa de PCA para crecimiento de

microorganismos en general también se detectó el desarrollo de *Pseudomonas* sp. Estas bacterias no se confirmaron como *P. aeruginosa* al no producir los pigmentos característicos en los medios PP y PF (Britania).

Es importante analizar la alta tasa de multiplicación de microorganismos en el jugo mixto con respecto al obtenido del quinto molino, lo que nos estaría indicando que el jugo de primera y/ o segunda presión es el punto de ingreso de mayor cantidad de microorganismos.

Tabla 4. Recuento de microorganismos en jugos azucarados obtenidos del sector de trapiche (Valores expresados en UFC/ml)

	Jugo			
	Jugo Quinto Molino		Jugo Mixto	
	UFC/ml			
	Promedio	DS	Promedio	DS
AMT	6,2 10 ⁸	3,3 10 ⁸	1,0 10 ¹²	2,7 10 ¹¹
Bacterias lácticas	3,7 10 ⁸	1,1 10 ⁸	2,1 10 ¹¹	2,0 10 ¹¹
Productores de Polisacáridos	1,6 10 ⁸	1,3 10 ⁸	7,7 10 ¹¹	4,0 10 ¹⁰
Hongos	N.D.	--	55	35
Levaduras	1,6 10 ⁸	1,4 10 ⁸	1,8 10 ¹¹	1,1 10 ¹⁰

AMT: aerobios mesófilos totales; N.D.: No Detectado

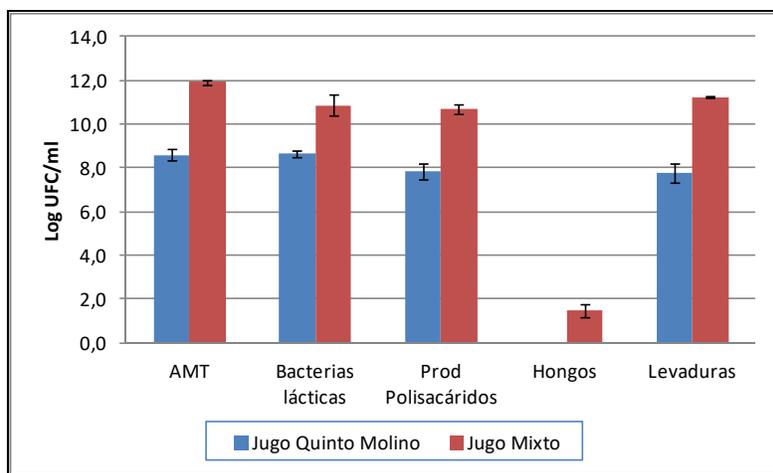


Figura 17. Recuento de microorganismos en jugos de caña de azúcar del quinto molino y del tanque de jugo mixto (Valores expresados en logaritmos)

1.14. Análisis de la concentración bactericida mínima (CBM) de los dos desinfectantes (ditiocarbamato y amonio cuaternario).

Se realizaron diluciones sucesivas de los desinfectantes en ambos jugos azucarados (quinto molino y mixto). Los tubos se incubaron a 30°C durante 1 hora (tiempo estimado e indicado por personal del ingenio en el que el desinfectante está en contacto con el jugo antes de las etapas térmicas del proceso).

Posteriormente se realizaron los recuentos de microorganismos en los medios de cultivos detallados en el punto anterior.

Para expresar los resultados indicaremos en concentraciones para el caso del ditiocarbamato y en diluciones para el amonio cuaternario por falta del dato de actividad de este último.

Para ambos desinfectantes la CBM se obtuvieron en la segunda dilución realizada (concentración de ditiocarbamato de 350 mg/L; y dilución de 1/10000 del amonio cuaternario) para el caso de jugo de quinto molino. Para el jugo mixto se necesitó de una dilución menor para tener la muerte total de los microorganismos, esto se debe al mayor número de microorganismos en este último jugo.

Al realizar el recuento de bacterias productoras de polisacáridos a partir de los tubos con diferentes concentraciones del desinfectante se obtuvo la siguiente gráfica (Figura 18):

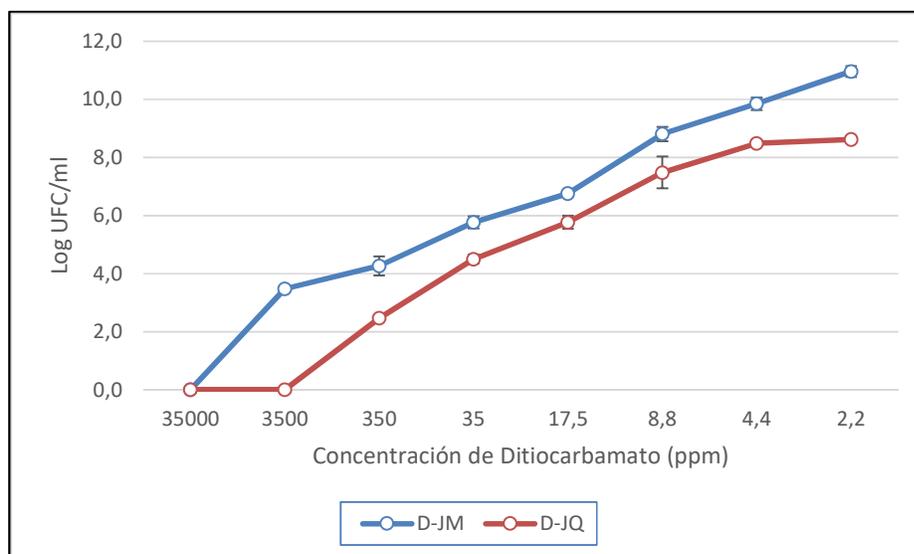


Figura 18. Sobrevida de bacterias productoras de polisacáridos en estudio de determinación de CBM empleando ditiocarbamato

En la Figura 18 se observa que se necesitaría agregar en jugos mixtos y del quinto molino concentraciones de 35 y 18 ppm, aproximadamente, del desinfectante para lograr un recuento de estas bacterias en el orden deseado para impedir que se produzcan infecciones en el trapiche.

1.15. Reproducibilidad a escala de laboratorio del agregado de 5 y 15 ppm de los desinfectantes.

En este ensayo usamos sólo el jugo mixto para evaluar el agregado de las dos concentraciones de ambos desinfectantes sobre la flora microbiana de interés.

Se incorporaron los dos desinfectantes hasta concentraciones finales de 5 y 15 ppm. Se dejaron una hora en contacto y se procedió a tomar muestras para realizar el recuento de microorganismos empleando medios de cultivos selectivos y/ o diferenciales detallados anteriormente.

Tabla 5. Análisis de reducción porcentual de microorganismos en jugo mixto después del agregado de dos concentraciones de desinfectantes

	% de reducción de células			
	AMT	BAL	PSC	Levaduras
A-5 ppm	11,1 ± 1,9	14,6 ± 2,5	13,5 ± 3,8	28,8 ± 1,0
D-5 ppm	16,2 ± 1,6	15,5 ± 1,8	13,8 ± 4,6	29,1 ± 2,9
A-15 ppm	22,3 ± 0,6	25,8 ± 3,4	26,4 ± 7,4	52,7 ± 8,2
D-15 ppm	28,8 ± 5,5	25,3 ± 4,6	26,9 ± 8,9	53,8 ± 1,7

AMT: aerobios mesófilos totales; BAL: bacterias lácticas; PSC: bacterias productoras de polisacáridos. A: Amonio cuaternario; D: ditiocarbamato.

En la Tabla 5 se observa que cuando se agregaron las sustancias en estudio en la menor de las concentraciones la reducción del recuento de las bacterias en él fue entre 10 y 14%, mientras que cuando se agregaron 15 ppm se obtuvo aproximadamente el doble del efecto. En caso de las levaduras la reducción fue del 30 y 50%, respectivamente.

Se realizó una segunda visita a la industria luego de las recomendaciones realizadas, donde se observaron que:

- ✓ La higiene del sector de trapiche en esta visita mejoró en forma considerable.
- ✓ Se estaban agregando aproximadamente 15 ppm de ditiocarbamato en las bateas de los jugos provenientes del quinto molino y mixto.
- ✓ En la zaranda rotativa ya no se observaron la acumulación de estructuras de polisacáridos conocidas como “huevos de rana” en la parte exterior de la misma. Esto se logró por la limpieza y desinfección con agua a altas temperaturas realizadas en cada turno de trabajo.

- ✓ En el filtro de banda se observó una mejor limpieza ya que no se detectaron la presencia de estructuras tipo biofilm.

En esta segunda visita se realizaron diferentes ensayos de laboratorio, para lo cual se tomaron las siguientes muestras:

- 1) Jugo de primera presión
- 2) Jugo secundario
- 3) Jugo de quinto molino
- 4) Jugo mixto
- 5) Jugo sulfitado
- 6) Jugo encalado
- 7) Jugo clarificado
- 8) Melaza

1.16. Caracterización microbiológica de las muestras

Se determinaron los siguientes microorganismos empleando la metodología de siembra por agotamiento en superficie empleando medios selectivos y diferenciales: PCA (Britania) para aerobios mesófilos totales; APG (Britania) para hongos y levaduras; MRS agar y APT agar (Merck) para bacterias lácticas; McClesky-Faville (10g tripteína, 5g extracto de levaduras, 20g sacarosa, 1000 ml agua destilada) (ICUMSA) para bacterias productoras de polisacáridos. Las placas de Petri se incubaron a las temperaturas y tiempos adecuados para cada microorganismo.

Tabla 6. Recuento de microorganismos en jugos azucarados y melaza (Valores expresados en UFC/ml)

	Jugos							
	Primera Presión		Quinto Molino		Secundario		Mixto	
	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS
AMT	6,0 10 ⁸	7,0 10 ⁸	8,0 10 ⁷	1,6 10 ⁸	2,3 10 ⁹	2,6 10 ⁹	4,0 10 ⁸	3,9 10 ⁸
Bacterias lácticas	4,0 10 ⁷	8,0 10 ⁷	1,1 10 ⁸	1,5 10 ⁸	2,0 10 ⁷	6,0 10 ⁷	4,0 10 ⁷	6,0 10 ⁷
Prod Polisacáridos	2,9 10 ⁸	2,0 10 ⁸	9,0 10 ⁷	2,1 10 ⁸	1,5 10 ⁸	1,0 10 ⁸	1,9 10 ⁸	1,5 10 ⁸
Levaduras	7,0 10 ⁷	1,0 10 ⁸	2,9 10 ⁸	3,0 10 ⁸	1,0 10 ⁷	2,0 10 ⁷	4,4 10 ⁸	5,3 10 ⁸

	Jugos						Melaza	
	Sulfitado		Encalado		Clarificado			
	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS
AMT	4,8 10 ⁸	6,8 10 ⁸	6,3 10 ⁸	6,8 10 ⁸	3000	2000	600	500
Bacterias lácticas	6,0 10 ⁷	3,0 10 ⁷	4,0 10 ⁷	1,0 10 ⁸	0,0	0,0	0,0	0,0
Prod Polisacáridos	1,2 10 ⁸	1,9 10 ⁸	3,0 10 ⁸	1,0 10 ⁸	0,0	0,0	800	1000
Levaduras	4,9 10 ⁸	1,5 10 ⁸	1,7 10 ⁸	3,1 10 ⁸	5000	800	600	800

AMT: aerobios mesófilos totales; Prom: Promedio; DS: Desviación estándar

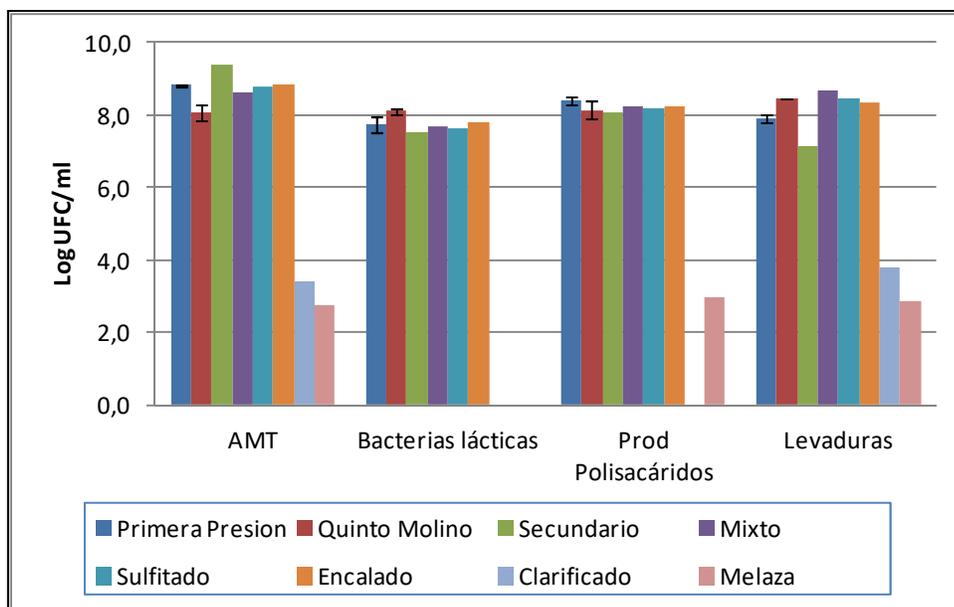


Figura 19. Recuento de microorganismos en jugos de caña de azúcar y melaza (Valores expresados en logaritmos)

En las Tabla 7 y Figura 19, podemos observar un perfil de recuentos de microorganismos estudiados muy similar a valores esperados para este seguimiento en muestras obtenidas del proceso industrial.

En la Figura 20 podemos ver el desarrollo de diferentes tipos de colonias de microorganismos productores de polisacáridos, obtenidos de la muestra de jugo de 1º presión.



Figura 20. Desarrollo de colonias productoras de polisacáridos de una muestra de jugo de 1º presión

Al realizar el estudio comparativo con las muestras tomadas en la primera visita, se analizó la reducción porcentual de la población microbiana en las mismas muestras (Figura 21). El jugo del quinto molino presentó una reducción baja, 8% para AMT, 5% para bacterias lácticas y menos de 1% para bacterias productoras de polisacáridos. Esta reducción podría deberse a la variabilidad normal por tratarse de muestras obtenidas en diferentes días. Al analizar los valores obtenidos en el jugo mixto, se observa valores de reducción de la población microbiana entre el 20 y 31% teniendo en cuenta las muestras anteriores. Estos datos nos estarían indicando que el agregado de la dosis del desinfectante y en los puntos recomendados tuvieron un efecto positivo sobre el desarrollo de los microorganismos productores de polisacáridos.

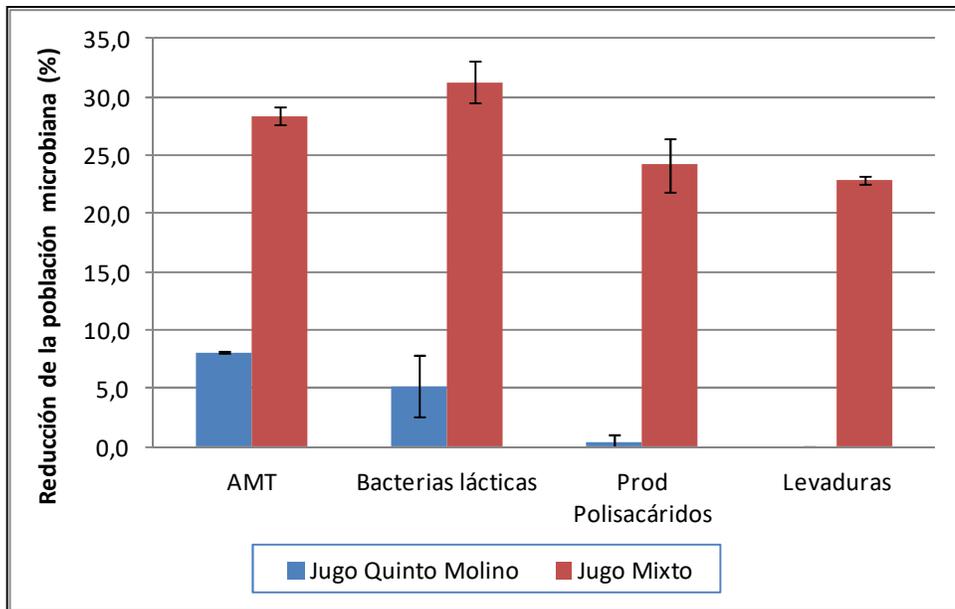


Figura 21. Reducción porcentual del recuento de microorganismos en jugos del quinto molino y mixto (Relación de las muestras tomadas en las dos visitas realizadas)

Otra forma de estudiar el efecto del agregado de desinfectante en el sector de trapiche es analizar la tasa de multiplicación. Esta tasa indica el aumento de la población bacteriana entre el jugo primario y el jugo mixto. Se puede admitir una tasa de multiplicación igual a 2,0.

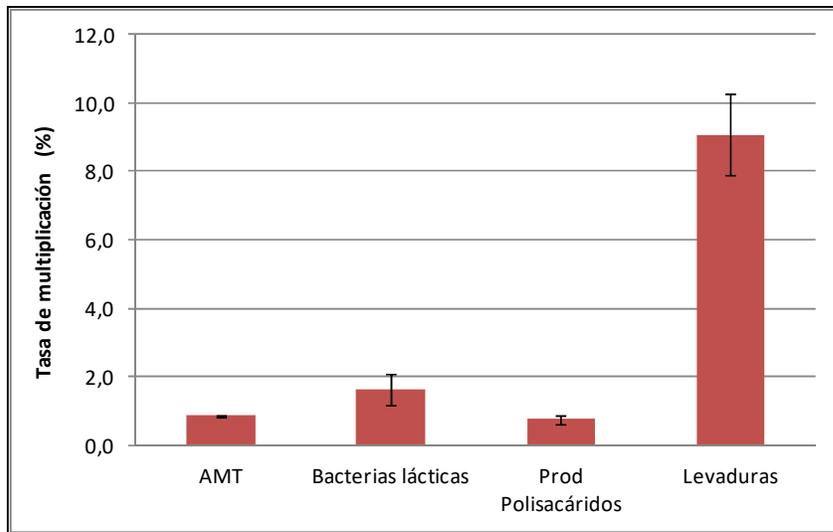


Figura 22. Tasa de multiplicación en trapiche (segunda visita)

En la Figura 22 se observa una tasa de multiplicación menor a 2 para el recuento de microorganismos totales, lo que nos estaría indicando que dentro del trapiche no se produce un aumento significativo de la población microbiana entre jugo de primera presión y mixto. En este caso se analizó como fue el efecto de la multiplicación teniendo en cuenta los microorganismos de interés para este trabajo. Para las bacterias lácticas como para las productoras de polisacáridos se obtuvieron valores menores a 2; en cambio para las levaduras se obtuvo un valor promedio de 9. En la Figura 22 se observa que el desinfectante agregado tiene un efecto menor sobre la población de levaduras.

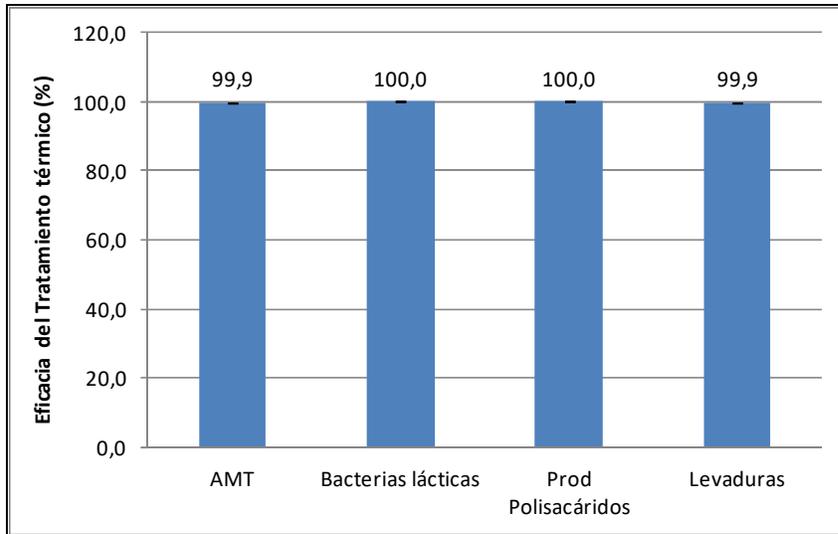


Figura 23. Eficacia del tratamiento térmico de jugo (segunda visita)

La eficacia del tratamiento térmico nos indica el porcentaje de la población bacteriana que está presente en el jugo mixto se elimina por el calentamiento y decantación. En la Figura 23 se observa la eliminación total de las bacterias lácticas y de las productoras de polisacáridos, no así de las levaduras donde se produce una eliminación del 99,9%. Este valor refleja en lo obtenido para AMT.

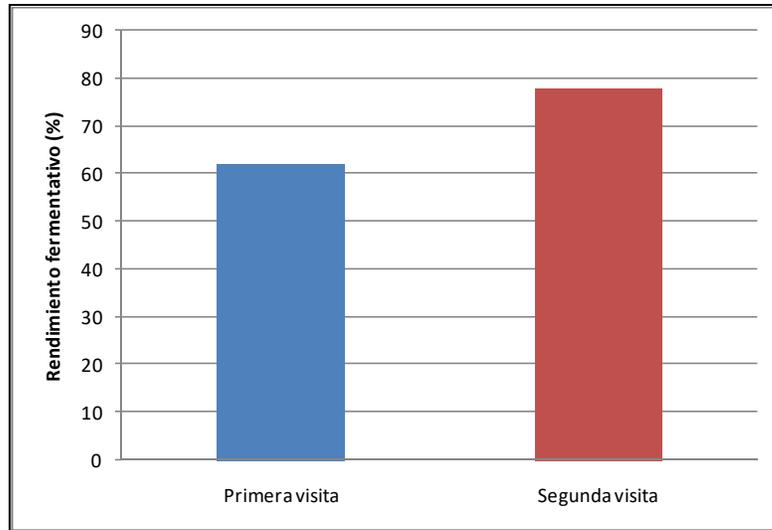


Figura 24. Rendimiento fermentativo industrial

En la Figura 24 podemos observar que, al realizar las acciones recomendadas para controlar la presencia de bacterias en el jugo de caña de azúcar, se reflejaron en un incremento en el rendimiento fermentativo obtenido a partir de las muestras de la segunda visita en comparación con la primera visita.

Conclusiones

De los resultados obtenidos de las visitas a las destilerías se puede sacar como conclusiones la importancia de la aplicación del control microbiológico en el proceso industrial de obtención de bioetanol, para lo cual es de vital importancia la limpieza y sanitización de las instalaciones y el correcto uso de los sanitizantes elegidos.

De los análisis realizados en el laboratorio se puede sacar en claro que los jugos de primera y/ o segunda presión son el punto de ingreso de mayor cantidad de microorganismos.

En cuanto al análisis de la concentración bactericida mínima (CBM) en la Figura 18 se observa que se necesitaría agregar en jugos mixtos y del quinto molino concentraciones de 35 y 18 ppm, aproximadamente, del desinfectante (ditiocarbamato) para lograr un recuento de estas bacterias en el orden deseado para impedir que se produzcan infecciones en el trapiche, dichos valores están

muy por arriba de lo que se informó que se dosificaba en la primera visita (4,5 ppm de ditiocarbamato).

Al realizar la segunda visita donde fueron tomadas y realizadas las sugerencias hechas por el personal de la EEAOC en la primera visita en cuanto a la higiene y al agregado en las cantidades apropiadas de ditiocarbamato (15 ppm) en las bateas de jugo provenientes del quinto molino y mixto, se observó una disminución de los valores de entre 3 y 4 unidades logarítmicas en los recuentos de microorganismos en el jugo mixto mientras que en el jugo del quinto molino no se observa prácticamente una disminución apreciable en el recuento comparando los valores de la segunda visita con los de la primera visita.

La reducción porcentual de la población microbiana en las muestras (Figura 21), nos muestra que el jugo del quinto molino presentó una reducción baja, 8% para AMT, 5% para bacterias lácticas y menos de 1% para bacterias productoras de polisacáridos. Dicha reducción podría deberse a la variabilidad normal por tratarse de muestras obtenidas en diferentes días. Al analizar los valores obtenidos en el jugo mixto, se observa valores de reducción de la población microbiana entre el 20 y 31% teniendo en cuenta las muestras anteriores. Estos datos nos estarían indicando que el agregado de la dosis del desinfectante y en los puntos recomendados muestran un efecto positivo sobre el desarrollo de los microorganismos productores de polisacáridos.

Todos estos cambios realizados por las recomendaciones del personal de la EEAOC trajeron como consecuencia un aumento importante en el rendimiento fermentativo industrial comparando la primera visita donde ese rendimiento fermentativo era levemente superior a 60% llegando en la segunda visita donde las recomendaciones fueron tomadas en cuenta a un valor muy cercano al 80%, esto se traduce directamente en un aumento económico considerable.

Bibliografía

- Abeliovich H., Klionsky D.J. 2001. Autophagy in yeast: Mechanistic insights and microbiol., Mol. Biol. Rev. 65(3):.463-479.
- Acevedo A., Godoy R., Bolaños, G. 2003. Incremento en la producción de alcohol en fermentación de melazas mediante la utilización del complejo enzimático Rhyzozyme. XXII Congreso Colombiano de Ingeniería Química. Bucaramanga.
- BP Statistical Review of World Energy. 2018. Dirección web: <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2018-full-report.pdf>. Último acceso: 03/03/2020
- Calderón Pérez N.M. 2007. Evaluación del uso de antibióticos como mecanismo para el control de contaminantes bacterianos en la fermentación para la producción de alcohol etílico. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Carrera de Microbiología Industrial Bogotá D.C.
- Cárdenas G., Diez O., Quaia E. 2007. Bioetanol: un combustible con posibilidades productiva en Tucumán; 28(1): 9-11.
- Ceccato-Antonini, S.R. 1998. Moniotoriamiento microbiológico en destilerías: una necesidad. STAB, Piracicaba. 16 (5):18-19
- Chen J. 2001. Manual del Azúcar de Caña. México: Limusa.
- de Souza Liberal A.T.; Basíllica A.C., do Monte Resende A., Brasileiro B.T., da Silva-Filho E.A., de Moraes J.O., Simoes D.A., de Moraes M.A. 2007. Identification of Dekkera bruxellensis as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. J. Appl. Microbiol.; 2: 538-547.
- Fandos C., Scandaliaris J., Scandaliaris P., Carreras Baldrés J.I., Soria F.J., Giardina J., Fernández de Ullivarri J., Romero E. 2019. Reporte Agroindustrial. Relevamiento satelital de cultivos en la provincia de Tucumán. Boletín N° 166. Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC). Dirección web: <https://www.eeaoc.gob.ar/wp-content/uploads/2019/07/RA166.pdf>. Último acceso: 19/07/2020.

- García J.M., García J.A. 2006. Biocarburantes Líquidos: Biodiesel y Bioetanol. Informe de Vigilancia Tecnológica VT 4. Universidad Rey Juan Carlos del Círculo de Innovación en Tecnologías Medioambientales y Energía (CITME). Madrid [España].
- Gallo RC. 1989. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. 388p. Tese Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidad de Campinas.
- Hernández Nodarse C.M.T. 2007. Tendencias actuales en la producción de etanol Facultad de Ingeniería - Universidad Rafael Landívar Boletín Electrónico N° 08.
- Lentini A., Rogers P., Higgins V., Dawes I., Chandler M., Stanley G., Chambers P. 2003. The impact of ethanol stress on yeast physiology. brewing yeast fermentation performance, Second Edition, Smart K, ed. 25-38.
- Ley de Biocombustibles N° 26.093 (Régimen de Regulación y Promoción para la Producción y Uso Sustentables de Biocombustibles) Promulgada: 12 de Mayo de 2006.
- Dirección web: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/115000-119999/116299/norma.htm>. Último acceso: 04/03/2020
- Ley de Biocombustibles N° 26.334 (Régimen de Promoción de la Producción de Bioetanol) Promulgada de Hecho: 02 de Enero de 2008. Dirección web: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/135000-139999/136339/norma.htm>. Último acceso: 04/03/2020
- Ma M., Han P., Zhang R., Li H. 2013. Ultrastructural changes of *Saccharomyces cerevisiae* in response to ethanol stress. *Can J Microbiol.*; 59(9): 589-97.
- Martin V., Quain D.E., Smart K.A. 2003. Brewing yeast oxidative stress responses: Impact of brewery handling. brewing yeast fermentation performance: Smart K.A. (ed): 61-73
- Mathews C., Van Halde K, Ahern K. 2002. Bioquímica. 3ª Edición. Ed. Addison Wesley. Madrid, España.
- Mičić V., Jotanović M. 2015. Bioethanol as fuel for internal combustion engines. *Zastita Materijala*; 56: 403 – 408. Dirección web: <http://idk.org.rs/wp-content/uploads/2015/12/3VLADANMICIC-konacno.pdf>.

Último acceso: 15/05/2018.

Ministerio de Energía y Minería de la Nación Argentina. Biocombustibles. Dirección web: <http://www.energia.gob.ar/contenidos/verpagina.php?idpagina=3025>.

Último acceso: 15/05/2018.

Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE)/ Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2013. OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2013-2022, Texcoco, Estado de México, Universidad Autónoma Chapingo. Dirección web: <http://www.fao.org/docrep/018/i3307s/i3307s.pdf>. Último acceso: 15/05/2018.

Pereira E.J., Panek A.D., Araujo E.C. 2003. Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell Stress & Chaperones*; 8(2): 120–124.

Pérez D., Paredes V., Rodríguez G. 2011. Biocombustibles en Argentina y Tucumán, cifras de la industria en el período 2009- 2011. Reporte Agroindustrial. Estadísticas y márgenes de cultivos tucumanos. Boletín N° 52. Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC). Dirección web: <http://www.eeaoc.org.ar/publicaciones/categoria/22/133/Biocombustibles-en-la-Argentina-y-Tucuman-cifras-de-la-industria-en-el-periodo-2009--2011.html>. Último acceso: 15/05/2018.

Petti A.A., Crutchfield C.A., Rabinowitz J.D., Botstein D. 2011. Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and non respiratory mitochondrial function, *PNAS*, 108, 45, E1089–E1098.

Resoluciones 37/2016. Disposiciones reglamentarias que acompañan el régimen de promoción de bioetanol. Dirección web: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=260152>. Último acceso: 04/03/2020.

Sherata A.M. 1960. Yeasts isolated from sugar cane and its juice during the production of aguardente de cana. *Appl. Microbiol*; 8: 73–75.

Stanley D., Fraser S., Chambers P.J., Rogers P., Stanley G.A. 2010. Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 37: pp.139-149.

- Turner D., Xu H., Cracknell R.F., Natarajan V., Chen X. 2011. Combustion performance of bio-ethanol at various blend ratios in a gasoline direct injection engine. *Fuel*; 90: 1999–2006. Dirección web: <https://www.birmingham.ac.uk/Documents/college-eps/mechanical/research/dmf-engine-performance/combustion-performance-of-bio-ethanol-at-various-blend-ratios-in-a-gasoline-direct-injection-engine-.pdf>. Último acceso: 15/05/2020.
- Van der Poel P.W., Schiweck H., Schwartz T. 1998. Sugar technology. Beet and cane sugar manufacture. Bartens, Berlin, Germany
- Walker GM. 2000. Effects of physical stresses on yeast growth. In *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd Publishing House. 149-160.
- Wyman, CE. 2001. Twenty years of trials, tribulations, and research progress in bioethanol technology. Paper presented at the Twenty-Second Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Dirección web: <https://link.springer.com/article/10.1385/ABAB:91-93:1-9:5>. Último acceso: 04/03/2020.
- Yamada Y., Yukphan P. 2008. Genera and species in acetic acid bacteria. *Int. J. FoodMicrobiol.*, 125: 15–24.
- Yepez, Y.1995. Selección de cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con alta producción de etanol y que tolere mayores niveles de azúcar que los usados en la Planta Alcoquímica Sucromiles S.A. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Bogotá, Colombia. 34-48.