

Determinación de bacterias contaminantes en el proceso de producción de alcohol etílico y su relación con la floculación de *Saccharomyces cerevisiae*

Determining contaminating bacteria in the ethyl alcohol production process and their relationship to *Saccharomyces cerevisiae* flocculation

Martín Bayona*, María Ardua**, Oscar Castellanos***, Martha Rojas****

RESUMEN

Este trabajo se desarrolló en una planta productora de etanol, y tuvo como finalidad estudiar los contaminantes bacterianos durante las etapas de dilución de la melaza, reproducción de la levadura y fermentación, mediante recuentos microbiológicos, aislamiento e identificación de las bacterias predominantes, y la relación entre la contaminación bacteriana y la floculación de las células de levadura. Se determinó el efecto de un desinfectante comercial como microbicida en el control de dichos contaminantes. Inicialmente se procedió a realizar muestreos con el fin de estandarizar la metodología a nivel laboratorio para la identificación de los contaminantes bacterianos en la melaza y la levadura productora de etanol. Los resultados obtenidos indican que los microorganismos contaminantes en el proceso analizado son: *Lactobacillus* sp. en un nivel promedio de 10×10^5 UFC/ml, y *Zymomonas mobilis* en un nivel promedio de 10×10 UFC/ml. Se comprobó que la presencia de bacterias contaminantes tiene relación directa con la floculación de la levadura, presentándose con niveles de 10^6 UFC/ml de *Lactobacillus* sp, 10^5 UFC/ml de *Zymomonas mobilis* o 10 UFC/ml de la mezcla de estos microorganismos. Este fenómeno depende también de otros factores como las características de la cepa de levadura, las condiciones del cultivo y el medio empleado. Además, se utilizó un desinfectante comercial (Sanitech®) y se observó que es muy efectivo para el control de *Zymomonas mobilis*. De otra parte, en inoculos con adición de penicilina (Alipen®), se estableció que este agente actúa de forma adecuada en la inhibición del *Lactobacillus* sp. Finalmente, se comprobó que con una concentración de 20 ppm del desinfectante comercial, no se afecta la viabilidad del *Saccharomyces cerevisiae*, aunque los niveles de contaminación alcanzaron poblaciones de 10 UFC/ml.

Palabras clave: Etanol, *Lactobacillus* sp., *Zymomonas mobilis*

ABSTRACT

This work was done in an ethanol production plant, its propose being to study contaminating bacteria in the molasses' dilution, yeast reproduction and fermentation stages by microbiological count, isolation and identification of predominating bacteria and the relationship between the bacterial contamination and yeast cell flocculation. The effect of a commercial disinfectant such as microbicide in controlling such contaminants was determined. Samples were taken to standardise laboratory methodology for identifying contaminating bacteria in molasses and ethanol producing yeast. The obtained results indicate that the contaminating micro-organisms analysed in the process were *Lactobacillus* sp. (10×10^5 UFC/ml average) and *Zymomonas mobilis* (10×10^2 UFC/ml average). It was shown that the presence of contaminating bacteria is directly related to yeast flocculation, presenting 10^6 UFC/ml *Lactobacillus* sp, 10^5 UFC/ml *Zymomonas mobilis* or 10^3 UFC/ml for a mixture of these two micro-organisms. This phenomenon also depends on many factors, such as yeast strain, culture conditions and medium employed. A commercial disinfectant (Sanitech®) was used; this was seen to be very effective for *Zymomonas mobilis* control. The penicillin (Alipen®) contained in one inoculum had a suitable effect on *Lactobacillus* sp inhibition. It was also shown that a 20 ppm concentration of commercial disinfectant did not affect *Saccharomyces cerevisiae* feasibility, though contamination levels reached 10^6 UFC/ml populations.

Key words: Ethanol, *Lactobacillus* sp., *Zymomonas mobilis*

* Bacteriólogo M. Se. Docente Pontificia Universidad Javeriana. Tel: 3208320 ext. 4110 - 4030

** Bacterióloga. Pontificia Universidad Javeriana.

*** IQ, PhD. Docente. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería. E-mail: ocasta@ing.unal.edu.co

****Microbióloga. Sucromiles.

Recibido: septiembre 12 de 2001; aceptado: febrero 28 de 2002

INTRODUCCIÓN

Gran parte del etanol industrial se obtiene por fermentación. En EE.UU la materia prima más importante para su producción la constituyen los cereales, mientras que en Europa suelen emplearse melazas de remolacha y en el resto del mundo melazas de caña de azúcar (Weeb,1995). En Colombia, el cultivo de caña de azúcar tiene gran importancia económica y social, ya que es el segundo cultivo agrícola permanente después del café (Mora,1995).

Las melazas de caña representan el residuo en el proceso de extracción de azúcar. Las melazas invertidas se obtienen del jarabe de caña mediante una hidrólisis ácida parcial, seguida de neutralización y evaporación hasta el 70% de concentración de azúcar total (Weeb,1995). Algunas levaduras pueden causar fermentación de estos sustratos y convertirlos en alcohol.

Uno de los problemas de las destilerías es la contaminación bacteriana durante el proceso de fermentación, desde la llegada de la materia prima hasta la destilación final, ocasionando pérdidas en la producción de etanol. Los contaminantes bacterianos establecen un efecto competitivo por el sustrato, conduciendo a un menor rendimiento de alcohol o la introducción de productos indeseables (Weisser,1996). En las destilerías han sido encontrados microorganismos contaminantes como: *Lactobacillus sp*, *Sporolactobacillus sp*, *Zymomonas sp*, *Micrococcus sp*, *Acetobacter sp* y *Gluconobacter sp* (Alltechs,1995).

Otro problema frecuente y de gran importancia en las destilerías es la floculación de las células de levadura, observado generalmente al finalizar la fermentación. Este es un proceso complejo que consiste en la agregación de las células de levadura, lo cual disminuye la velocidad de producción de alcohol. Depende de numerosos factores tales como la cepa de levadura (genética, estado fisiológico y metabolismo), la composición del medio de fermentación, las condiciones de fermentación (contaminación bacteriana, temperatura, agitación, aireación). La influencia de cada uno de estos parámetros en el proceso hace muy difícil el estudio de este fenómeno (Abate,1996).

Los efectos de los contaminantes bacterianos en la producción de alcohol hacen que se requiera de un manejo higiénico industrial adecuado, así como la adición de agentes controladores de ésta contaminación durante el proceso de fermentación. El presente trabajo consistió en identificar, aislar y caracterizar las bacterias contaminantes en el proceso fermentativo. Igualmente, se determinó la relación de éstas con la floculación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y se evaluó la efectividad de un desinfectante comercial basado en cloro (Sanitech®) en el control de los agentes contaminantes, así como su efecto sobre la viabilidad de la levadura.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en una planta productora de etanol ubicada en el Valle del Cauca, Colombia. Para el aislamiento e identificación de las bacterias contaminantes en el proceso de obtención de alcohol etílico, la evaluación de la relación de estos microorganismos con el fenómeno de floculación de la levadura y el efecto de la adición del desinfectante de cloro sobre la fermentación etanólica, se siguió la metodología descrita a continuación:

Muestreo

Se realizaron muestreos preliminares correspondientes a las melazas y levaduras que participaron en el proceso de reproducción y fermentación del alcohol. Estas muestras fueron colectadas en frascos de boca ancha esterilizados en autoclave y debidamente identificados. Se refrigeraron a 5°C, y el tiempo máximo de almacenamiento fue de 6 horas, hasta el momento de la siembra.

Siembra

Diluciones. Las siembras de las muestras de melaza que entran a la planta, así como las posteriores, se realizaron en cabina de flujo laminar, tomando 11g de cada una de las melazas y adicionando 99 ml de agua peptonada estéril (0.1%), mezclándose en un Vortex. Posteriormente se realizaron diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . A partir de esta última se efectuaron las diluciones decimales siguientes.

Tabla 1. Medios de cultivo, siembra e incubación usados en el estudio los microorganismos

Microorganismo	<i>Lactobacillus sp</i>	<i>Zymomonas sp</i>	Familia <i>Enterobacteriaceae</i>
Medio de cultivo	Agar MRS (agar para <i>Lactobacillus</i>) De Man, Rogosa y Sharpe, adicionando azul de anilina	Agar diferencial WL (de acuerdo con la metodología de Meagher, 1996)	Agar EMB (Agar Eosina-Azul de Metieno - Lactosa - Sacarosa) (Merck, 1994).
Siembra	En cajas de Petri. Para siembra en profundidad se adicionó agar y se mezcló la muestra. Para siembra en superficie se usaron 0.1 ml de muestra, esparciéndola uniformemente con asa de Drigalski (Brock, 1991).	Siembra en superficie en condiciones tanto oxigénicas, como anoxigénicas	Mediante tomas repetidas de muestras y siembras por estría se obtuvieron cultivos axénicos que posteriormente se biotipificaron.
Incubación	Durante dos días a 37°C en condiciones anoxigénicas, en jarras de anaerobiosis. (Bergeys, 1994, Merck, 1994)	Incubación de 4 días a 23°C aproximadamente. Se adicionó agar WL con penicilina para inhibir las bacterias lácticas. (Bergeys, 1994).	Las cepas fueron transferidas cada dos semanas en un medio Estándar y agar MRS.

Para sembrar en superficie se tomaron 0.5 ml de la dilución 10^{-1} . Las diluciones de las muestras de levadura, inóculos, mostos y vinos se efectuaron tomando 0.1 ml de la muestra y agregando 9.9 ml de agua peptonada; a partir de éstas se efectuaron diluciones desde 10^{-2} hasta 10^{-8} (Collins, 1989). Se realizaron muestreos continuos para detectar el grado de contaminación y hallar la dilución de la siembra de cada muestra.

Recuento. Se contaron las colonias y se multiplicaron por el factor de dilución correspondiente; la interpretación de resultados se hizo tomando el intervalo entre 30 y 300. Las cajas que presentaron entre 10 y 150 UFC por siembra en superficie, se contaron y sus resultados fueron interpretados de acuerdo con dicho valor de referencia (Brock, 1991).

Según las características del sistema, que lo hacen selectivo, las bacterias a investigar son las presentadas en la Tabla 1.

Caracterización bacteriana

Para la identificación de las bacterias aisladas en cada uno de los medios de cultivo se realizaron las siguientes pruebas:

- **Coloración de Gram**
- **Morfología celular.** Las láminas anteriormente coloreadas se observaron al microscopio con objetivos de inmersión 100X y se constató la forma celular.
- **Catalasa.** Mediante las siguientes reacciones:
 - Reacción positiva: Se observó desprendimiento inmediato de oxígeno por las colonias evaluadas.
 - Reacción negativa: Sin desprendimiento de oxígeno.
- **Citocromo-oxidasa.** Se emplearon tiras de ensayo con zona de acción para la demostración de la citocromooxidasa en microorganismos.
- **Agar hierro- tres azúcares**

Se hicieron siembras tanto por estría en la superficie inclinada como en columna vertical mediante estría central; se incubaron por 48 horas a 37°C
- **Interpretación del proceso**
 - Análisis de los Picos de Flauta:
 - alcalino/profundidad alcalina (K/K): No fermentación de hidratos de carbono.
 - alcalino/profundidad acida (K/A): Glucosa fermentada; sacarosa y lactosa no fermentadas.
 - alcalino/profundidad acida (Negra) (K/A/H₂S): Glucosa fermentada, lactosa no fermentada, producción de H₂S

- ácido/profundidad acida: Glucosa, lactosa y sacarosa fermentadas.

- **Reducción de Nitrato.** El cultivo axénico que fue sometido a ensayo se incubó durante 12 - 24 horas a la temperatura óptima en caldo nutritivo estándar II, al que se le añadió 1.5 g/l de nitrato de potasio (Merck, 94). Después de la incubación se adicionaron unas gotas del reactivo de nitritos. La reacción se consideraba positiva si, transcurrido un minuto aproximadamente, se apreciaba una coloración roja, cuya intensidad dependía de la cantidad de nitrato formada (Merck, 1994). A las reacciones negativas se les agregó polvo de Zinc; los iones de Zinc indican la presencia de nitratos residuales y confirman una reacción negativa verdadera.
- **SIM.** El cultivo sometido a examen se sembró por picadura en la capa superior del medio de cultivo y se incubó por 24 horas a 37°C.

Cuantificación de los contaminantes bacterianos

Se realizaron dos muestreos por semana durante 21 semanas en 32 puntos, haciendo siembras desde 10^{-1} hasta 10^{-8} de cada muestra; se obtuvo un total de 42 recuentos, los cuales fueron promediados para determinar las UFC/ml.

MODELO EXPERIMENTAL

Las variables evaluadas correspondieron a: Efecto del dióxido de cloro (Sanitech®) sobre la viabilidad de la levadura, este desinfectante como agente controlador de los contaminantes bacterianos identificados, y relación de estos últimos con la floculación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Ensayo de fermentación

Se tomaron 10 erlenmeyer de 1000 ml c/u, colocados en un agitador a 100 r.p.m. y a temperatura de 30°C; se marcaron de la siguiente forma: PC, Penicilina Control; PL, Penicilina Lácticas; PZ, Penicilina Zymomonas; SC, Sanitech Control; SL, Sanitech Lácticas; SZ, Sanitech Zymomonas; PLZ, Penicilina Lácticas- Zymomonas; SLZ, Sanitech Lácticas-Zymomonas; Bacterias Lácticas - Zymomonas; Control negativo.

Preparación de inóculos

Substrato. Se partió de una cantidad de 6 litros de melaza de tercera dilución de la planta (pH 4.55, 30°C), esterilizada en autoclave y distribuida en los 10 erlenmeyer. Se adicionó a cada uno urea y ácido fosfórico para cumplir con las necesidades nutricionales de la levadura. Se tomaron muestras de 200 ml en períodos de 12 horas, y simultáneamente se alimentaba una cantidad igual de melaza estéril (dilución 10^{-3} , pH 4.50 - 4.65, 30°C), junto con urea y el agente inhibidor correspondiente.

Dilución de bacterias. Las bacterias previamente aisladas e identificadas como *Lactobacillus* sp. y *Zymomonas* sp., fueron transferidas cada dos semanas en AGAR MRS y WL respectivamente (Kinner, 1990). Además, se enriquecieron en agua peptonada al 0.1% (caldo rico en sustancias nutritivas que produce una alta cuota de sobrevivencia de bacterias dañadas subletalmente y un crecimiento intenso). Se tomaron las diluciones que presentaron un recuento de 10^4 UFC/ml, y se conservaron en nevera a 8°C.

Preparación del bactericida. El dióxido de cloro (Sanitech®) se activó utilizando 3.25 onzas de Sanitech® para un galón y 10 gramos de ácido cítrico. Se trabajó a una concentración de 20 ppm de desinfectante (lo recomendado por el fabricante) para no afectar la viabilidad la levadura (Alltechs.1995).

EXAMEN DIRECTO

Se realizó a cada inóculo en períodos de 12 horas, con el fin de evaluar la pureza de la levadura, observando la uniformidad del desarrollo de las células fúngicas (Tamaño, forma, distribución, estado de reproducción, floculación).

Método. La muestra suspendida en un portaobjetos se examinó al microscopio con los objetivos de 10X y 40X. La distribución aproximada fue de 200 células de levadura en el campo de 40X.

Morfología. Con el objetivo 10X se contaron los flóculos de 5 campos y se promediaron; si se observaban menos de 5 flóculos, la prueba se consideraba baja; de 5 a 10 flóculos se tomó como floculación intermedia; más de 10 flóculos se consideró como floculación alta (Sucromiles, 1996).

Impurezas. Se reportó la cantidad de cristales existentes con cruces; el mínimo rango fue de 0 cruces y el máximo de 4 cruces en cristales y suciedad.

Contaminación bacteriana

- Bacterias: Su presencia fue visualmente diferencial de las células de levadura al microscopio.
- Bacilos en cadena: Los bacilos observados al microscopio son compatibles con *Lactobacillus* sp.

Determinación del número de células de levadura

A la cámara de Neubauer se transfirió una gota de la suspensión preparada con 1 ml de solución de azul de metileno al 1%, 1 ml de suspensión de levadura y 98 ml de agua, y se procedió al conteo de células (con el cuadro de 1 mm x 1 mm), de acuerdo con la técnica propuesta por Sucromiles (1996), así:

Los cuadros de menor tamaño (0.2 mm X 0.2 mm) sirvieron de guía para el cómputo. Se empezó a contar desde la parte superior de los cuadros menores ubicados dentro del cuadro grande central (1 mm X 1 mm) y se continuó hasta la base; si las células tocaban los límites de los cuadros menores, debían contarse solamente aquellas que tocaban la parte inferior y el lado izquierdo del cuadro; si las células tocaban la parte superior o el lado derecho no se contaban.

Controles microbiológicos. Se realizaron cultivos cada 24 horas para evaluar la población bacteriana con respecto al estado de la levadura y la acción de los bactericidas. (Aquarone, 1975)

Se realizaron muestreos durante ocho meses, desde la llegada de la materia prima a la planta hasta el paso a destilerías, con el fin de estandarizar la metodología de muestreo y la realización de cultivos microbiológicos, obteniendo colonias de *Lactobacillus* sp y *Zymomonas mobilis* bien definidas. Los aislados de estos muestreos fueron preservados en agar MRS (*Lactobacillus* sp) y en un medio estándar (*Zymomonas mobilis*). Estos se enriquecieron en Agua peptonada 0.1% y se sembraron en cajas en un medio selectivo MRS y WL, para constatar la pureza de las colonias (Canchos, 1991).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación

De las colonias de *Lactobacillus* sp y *Zymomonas mobilis* se observó crecimiento en Agar MRS y WL (ver características tabla 2).

Tabla 2. Características de las colonias identificadas

Microorganismos	Características
Bacterias Lácticas (MRS con azul de anilina y ciclohexamida)	Colonias redondas, convexas, bordes regulares, de color azul, acidificantes del medio, 1 - 5 mm de diámetro. Coloración de Gram: se observaron bacilos Gram positivos
<i>Zymomonas</i> (Medio WL con ciclohexamida y penicilina)	Colonias redondas, bordes regulares, de color verde profundo, de 1 - 4 mm de diámetro. Coloración de Gram: se observaron bacilos Gram negativos, generalmente en pares.
<i>Zymomonas</i> (Medio Standard con ciclohexamida y penicilina)	Después de 4 días de incubación a 30°C, las colonias son brillantes redondas de 1 - 2 mm de diámetro, bordes regulares, de color entre blanco y crema. Coloración de Gram: bacilos Gram negativos.
Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , variedad Allyeast superstar. Medio Sabouraud 2% glucosa con Novobiocin)	Colonias redondas, color habano y cremosas.

Tabla 3. Características bioquímicas de las bacterias aisladas.

Pruebas	<i>Lactobacillus</i> especie	<i>Zymomonas mobilis</i>
	MRS	WL
Coloración de Gram	+	-
Morfología Celular	Bacilo	Bacilo
Catalasa	-	+
Oxidasa	-	-
Movilidad	-	-
Indol	-	-
Crecimiento en agar nutritivo	-	-
Crecimiento en agar EMB	-	-
Reducción de nitratos	-	-
Crecimiento a 37°	+	+
Crecimiento a 20°	+	+
Crecimiento en forma anoxigenica y oxigenica	+	+
Crecimiento solo en condiciones aerobias	-	-
Producción de H ₂ S	-	D
Resistente a la penicilina	-	+
Inhibido por novobiosona	+	+
Fermentación de:		
Glucosa	+	+
Fructuosa	+	+
Lactosa	+	-
Sacarosa	+	D
Arabinosa	-	-

Convenciones: + positivo, - negativo, D: débilmente

Durante los muestreos, fueron seleccionadas de los medios de cultivo las diferentes colonias para ser aisladas y purificadas, conservándose en Agar MRS y SM (Medio Standard) a 8°C. En el quinto mes se revivieron las colonias aisladas y se inició la caracterización realizando pruebas bioquímicas (Tabla 3). Los resultados se compararon con las pruebas y descripciones taxonómicas de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1-1994. Con base en éstos se determinó que los contaminantes bacterianos anoxigénicos presentes durante el proceso de producción de alcohol son: *Lactobacillus* sp y *Zymomonas mobilis*.

Los microorganismos contaminantes identificados coinciden con lo reportado en la literatura por Mark & Phipps Enrfab, inc. 1988: "Los *Lactobacillus*

son contaminantes frecuentes en las destilerías". Igualmente, están de acuerdo con Altech (Fifteen Annual International Alcohol course, EEUU 1992): "Las *Zymomonas* son bacterias que se encuentran en los medios de fermentación, contaminantes en destilerías que fermentan glucosa anaeróbicamente por la vía de Etner - Doudoroff".

Recuento de la microcarga contaminante

El microorganismo *Lactobacillus* sp en el perfil de dilución 10^{-2} de melaza, correspondió a un orden máximo de 10^4 UFC/ml. Se observaron tres puntos críticos en el proceso: **1.** La entrada a la planta: Puede ocurrir contaminación debido a que no hay vapor para garantizar las condiciones de esterilidad, antes de la toma de la muestra (tanque de recepción de melaza, tanque elevado de almacenamiento, línea de conducción o punto de muestreo). **2.** El intercambiador de la melaza de segunda dilución. **3.** La línea de conducción hacia las cubas de fermentación.

Las bacterias lácticas en el perfil de melaza de dilución 10^{-3} tuvieron un nivel máximo de 10^4 UFC/ml. Los puntos críticos detectados en el proceso son: el mezclador y la línea de conducción de entrada a las cubas de reproducción. En este

caso se debe controlar el programa de esterilidad, así mismo, evaluar si se requiere una frecuencia mayor de sanitización. Durante el proceso de producción de alcohol, el grado de contaminación por *Lactobacillus* sp fue de un orden máximo de 10^5 UFC/ml.

El microorganismo *Zymomonas* en el perfil de melaza de dilución 10^{-2} y 10^{-3} , registró un nivel máximo de 10^1 UFC/ml. Los puntos críticos en el proceso de producción de etanol son los mostos inmediatamente después de ser inoculados, con una población de *Zymomonas* de 10^5 UFC/ml. Este aumento es causado posiblemente por los vinos que no se drenan y quedan en el sistema de refrigeración de la cuba y/o la línea de transferencia del inóculo. Es importante el control y minimización de las bacterias lácticas, debido a que una concentración de 1.4% de ácido

láctico inhibe la capacidad de fermentación de la levadura (Crueger,1993;Tamarit,1997). De igual forma, la presencia de *Zymomonas mobilis* compite con la levadura por el sustrato y fermenta la glucosa a etanol. En poblaciones mayores, este microorganismo aumenta la producción de H_2S , lo cual genera un olor desagradable que puede convertirse en un problema de carácter ambiental (Bergeys,1994). Finalmente se encontró que la levadura seca, con una población de 16×10^2 UFC/g, está dentro de los valores detectados para esta clase de levadura.

Ensayo de fermentación

Los resultados de los exámenes directos y de viabilidad realizados cada 12 horas durante el ensayo *in vitro* de fermentación, mostraron que a las 36 horas, la levadura perdió aproximadamente el 20% de viabilidad en el inóculo que no contenía desinfectante. En este mismo inóculo a las 72 horas, las células de levadura se encontraban floculadas y se observó una población de 10^7 UFC/ml de bacilos en cadena y una viabilidad del 33.6%. Esto indicó la necesidad de utilización de un agente bactericida para el control de la microcarga contaminante, ya que ocasiona pérdida de viabilidad de la levadura y disminución de su capacidad de fermentación (Shepherd,1994; Schoserth, 1996).

En el control, que sólo contenía melaza, nutrientes y levadura, se observó a las 72 horas la formación de pequeños flóculos, indicando que posiblemente uno de los numerosos factores que influyen en la floculación de la levadura, es la edad de ésta en el ciclo (Alltechs,1995).

Los inóculos control, PC, y SC presentaron a las 105 horas un porcentaje de viabilidad similar. En los exámenes directos en los cuales se observaba floculación, los cultivos microbiológicos presentaron una población de 10^6 UFC/ml de *Lactobacillus* sp y de 10^5 UFC/ml de *Zymomonas mobilis*, lo cual indica que niveles de contaminación altos de estos microorganismos se relacionan con la floculación de *Saccharomyces cerevisiae*. Poblaciones de 10^3 UFC/ml de los dos microorganismos contaminantes inician la floculación de la levadura (Meagher,1996; Deanda,1996).

Zymomonas mobilis

En los cultivos microbiológicos se observó que los inóculos que contenían *Lactobacillus* sp con dióxido de cloro Sanitech® y con Penicilina, ocurrió sólo un ligero incremento de este microorganismo dentro de las 48 a 72 horas del ciclo de la levadura, lo que confirma que tanto el desinfectante analizado (dióxido de cloro) como la penicilina, son agentes controladores de las bacterias lácticas, debido a su poder bactericida.

El inóculo de dióxido de cloro Sanitech® y *Zymomonas mobilis* mostró un mayor descenso en la población de éste microorganismo a las 96 horas, con una población de 10^4 UFC/ml, mientras que el inóculo que contenía penicilina y *Zymomonas mobilis* registró una población de 10^6 UFC/ml en el mismo período, lo que sugiere que el dióxido de cloro es más eficaz que la penicilina para la inhibición de *Zymomonas mobilis*.

El dióxido de cloro Sanitech® utilizado a 20 ppm no afectó la viabilidad de la levadura, pero los niveles de contaminación alcanzaron poblaciones de 10^6 UFC/ml. Sin embargo, éstos son niveles altos, por lo cual deben usarse concentraciones mayores del desinfectante para tener un mejor efecto bactericida.

CONCLUSIONES

El desarrollo de la investigación planteada permitió determinar los contaminantes microbianos durante las etapas de dilución de la melaza, reproducción de la levadura y fermentación en el proceso de producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae*, encontrándose que, de acuerdo con lo reportado, estos microorganismos son: *Lactobacillus* sp. en un nivel promedio de 10×10^5 UFC/ml, y *Zymomonas mobilis* en un nivel promedio de 10×10^2 UFC/ml. Adicionalmente, poblaciones de un orden mayor a 10^6 UFC/ml de *Lactobacillus* sp, detectadas en los cultivos microbiológicos, se relacionaron con el examen directo en donde se observaron flóculos de levadura. Así mismo, con un nivel de 10^5 UFC/ml para *Zymomonas mobilis* se presentó floculación de *Saccharomyces cerevisiae*. Se observó completa floculación de *Saccharomyces cerevisiae* por contaminación de *Lactobacillus* sp y *Zymomonas mobilis*.

en niveles mínimos de 10^3 UFC/ml. El uso del desinfectante comercial (Sanitech®) logró efectivamente el control de *Zymomonas mobilis*. En inóculos con adición de penicilina (Alipen®), se estableció que este agente actúa de forma adecuada en la inhibición del *Lactobacillus* sp. Finalmente, se comprobó que con una concentración de 20 ppm del desinfectante comercial, no se afecta la viabilidad del *Saccharomyces cerevisiae*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abate, C. Cailleri, D. 1996. Ethanol producer by a mixed culture of flocculent strain of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol, 45:p. 580-583
- Alltech's. 1995. Fifteenth anual intemaional alcohol course. Lexington, KerTtucky. EE.UU.
- Aquarone, E. Borsony, W. 1975. Biotecnología, Tópicos de Microbiología Industrial. Editorial Edgar Blucher. Vol. 1.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1994. Vol. 1.
- Brock, T. Mdigan, T.1991. Microbiología, sexta edición.
- Canchos, R. 1991. Contaminantes bacterianos Fermentacao alcohólica star. Marzo-Junio.
- Collins, C. 1989. Métodos Microbiológicos. Zaragoza, España :Editorial Acribia S.A.
- Crueger, W. 1993. Anneliese. Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial. Zaragoza, España :Editorial Acribia S.A.
- Deanda, K. 1996. Development of an Arabinosae Fermenting *Zymomonas mobilis* strain by Metabolic pathway Engineering. Applied And Environmental Microbiology, DEC. 4465-4470.
- Kinner, N. 1990. Bacterial taxonomy. NY.
- Meagher, M. 1996. Cloning and Expression of the *Zymomonas mobilis* "Production of Ethanol" Genes in *Lactobacillus casei*'. Current Microbiology. 33. 1756-1761.
- Merck. 1994. Manual de medios de cultivo.
- Miguez, O. Bernardo, J. 1988. Tesis de Maestría en física. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
- Mora, Z. 1995. Estudio de las Microfloras Contaminantes durante la etapa de molienda de Caña en relación con el proceso de elaboración de azúcar. Cali. Trabajo de Grado (Biología Botánica). Universidad del Valle. Facultad de ciencias, Carrera de Biología.
- Schoserth, S.M. 1996. Ethanol Transport in *Zymomonas mobilis* Measured by using in vivo Nuclear Magnetic Resonance spin transfer. Journal of Bacteriology. 1756-1761.
- Shepherd, P, Fraissignes, B. Peet, W. 1994. Fermentation proles Design from Hydrocarbons. Biotechnology E Bioeng. Symp. Nov, 721-732.
- Sucromiles S. A. 1996. División alcoquímica aseguramiento de la calidad. Cali - Valle del Cauca.
- Tamarit, J. 1997. Diffental inactivation of Alcohol Dehydrogenase Isoenzymes in *Zymomonas mobilis* by oxygen. Journal of Bacteriology, 1102-1104.
- Webb, F. 1995. Ingeniería Bioquímica. 356 - 359
- Weisser, P. 1996. Expression of the *Escherichia coli* *pmi* Gene, encoding Phosphomannose-isomerase in *Zymomonas mobilis*, leads to utilization of Mannose as a Novel Growth Substrate, which can be used as a selective marker. Applied and Environmental Microbiology. 4155-4161.