

CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL POR VÍA FERMENTATIVA

Ing. Javier Díaz Pineda¹, Dr.C. Jesús Luis Orozco¹, Ing. Saul Dueñas Casas¹

1. Universidad de Matanzas, javier.pineda@umcc.cu

Resumen

La contaminación bacteriana constituye uno de los principales desafíos económicos en la industria del etanol, puesto que provoca la formación de ácidos orgánicos, biopelículas y la floculación de células, que afectan el rendimiento de la fermentación al disminuir la viabilidad de la levadura y desviar los azúcares a metabolitos distintos al etanol. Comúnmente en la industria se aplica un tratamiento con ácido a las células después de cada ciclo de fermentación, lo que no siempre es efectivo. En este trabajo se analizan los principales tratamientos utilizados para el control de la contaminación bacteriana en la producción de etanol por vía fermentativa, a partir de sustratos derivados de la caña de azúcar. Se enfatiza en la eficiencia y la idoneidad de productos químicos distintos de los ácidos y antibióticos, así como de los derivados de fuentes naturales. Además, se presentan algunas bacterias beneficiosas y bacteriocinas como agentes antimicrobianos no convencionales.

Palabras claves: fermentación; etanol; contaminación bacteriana; tratamientos.

Introducción

El proceso de fermentación ha sido utilizado por la humanidad durante siglos. Las bacterias están ampliamente presentes en los alimentos fermentados, bebidas y combustibles, tanto como agentes fermentativos como contaminantes. La composición del medio de fermentación, las condiciones de cultivo, las interacciones con otros microorganismos y la concentración del producto final determinan la eficacia fermentativa de las bacterias. La producción de etanol con el empleo de levadura, presenta un nicho de fermentación único en el que el sustrato no es estéril y las condiciones no son asépticas. El medio idóneo y las condiciones favorables alientan a las bacterias contaminantes a crecer y producir metabolitos que disminuyen significativamente el rendimiento de la fermentación (Amorim et al., 2011; Lopes et al., 2016).

El etanol se puede producir a través de la fermentación directa de jugos de caña de azúcar, una mezcla de jugo y melaza, o melaza diluida en agua. Los jugos de caña de azúcar y la melaza son una mezcla compleja de carbohidratos, proteínas, sales inorgánicas y ácidos orgánicos. La asparagina, la glutamina y el ácido aspártico son los aminoácidos más abundantes en los mostos a base de caña de azúcar, mientras que el disacárido sacarosa es, por mucho, el azúcar principal. También se encuentran cantidades menores de los monosacáridos, glucosa y fructosa, y el oligosacárido cestososa. Los lípidos están representados por una mezcla de n-alcanos y ésteres etílicos y metílicos de ácidos grasos (predomina el palmitato y oleato), así como los fitosteroles (estigmasterol, β -sitosterol y campesterol). Incluso siendo utilizado con éxito como sustrato para la producción de etanol durante décadas, los mostos a base de caña de azúcar presentan varias condiciones desafiantes para la levadura de fermentación *S. cerevisiae*. Además de los nutrientes, los mostos industriales utilizados en el proceso de fermentación también contienen inhibidores que pueden estar relacionados con la materia prima o el proceso. Durante las etapa de calentamiento del jugo, se producen algunos inhibidores de la fermentación, a partir de la degradación del azúcar (por ejemplo, furfural) y las melanoidinas de Maillard (Basso y Lino, 2019).

Los contaminantes bacterianos se introducen inadvertidamente en el proceso de fermentación a través de numerosas fuentes: como el suelo de las plantaciones de caña, la propia caña de azúcar, los diluyentes de los mostos de fermentación y los equipos empleados en cada etapa del proceso. Por tal motivo, lograr la asepsia resulta extremadamente difícil, teniendo en cuenta las condiciones de operación en las que se desarrolla el proceso y los grandes volúmenes de sustrato que se procesan (Basso y Lino, 2019). La existencia de estos contaminantes en niveles superiores a 107 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) puede reducir el rendimiento de la fermentación alcohólica en un 30% (Maia et al., 2019).

A pesar de los avances tecnológicos alcanzados, la contaminación microbiana sigue siendo un problema frecuente y uno de los principales desafíos económicos en las operaciones de fermentación alcohólica a gran escala (Muthaiyan et al., 2011). Estas infecciones pueden, como mínimo, afectar la eficiencia de la fermentación y, en el peor de los casos, provocar fermentaciones lentas o atascadas que ocasionan el cierre de las instalaciones industriales para su limpieza y desinfección (Rich et al., 2018). Estos retrasos provocan una pérdida de tiempo significativa, así como el encarecimiento del costo del producto final. La presencia de estos contaminantes genera pérdidas económicas considerables para las industrias, debido a que estos compiten con las levaduras por azúcares fermentables y otros nutrientes presentes en las materias primas de la fermentación, lo que resulta en una reducción de la producción de etanol (Beckner et al., 2011; Reisman, 2019).

Las unidades productoras de etanol comúnmente dan un tratamiento ácido a las células después de cada ciclo de fermentación para disminuir el número de bacterias, lo que no siempre es efectivo. De ahí que, se debe emplear una estrategia alternativa para evitar la multiplicación bacteriana, pero debe ser compatible con los aspectos económicos, sanitarios y medioambientales. A pesar del uso generalizado de antibióticos en las destilerías y su relativa eficacia en el control de la contaminación bacteriana, la aparición de cepas resistentes a los medicamentos ha limitado su uso (Walter et al., 2019). Además, existe una creciente preocupación con respecto a su retención en los subproductos de la fermentación, como la levadura seca que se utiliza en la alimentación del ganado y aves de corral; que podría inducir la resistencia de patógenos en estos animales (Amorim et al., 2011; Ceccato-Antonini, 2018; Mendonça et al., 2016). Los compuestos antimicrobianos alternativos derivados de plantas y residuos vegetales han sido probados para mejorar tanto el proceso de fermentación como su valor económico. Esto presenta una nueva vía para mejorar la eficiencia combinada con la sostenibilidad ambiental.

Precisamente el objetivo de este trabajo es analizar los principales tratamientos utilizados para el control de la contaminación bacteriana en la producción de etanol por vía fermentativa a partir de sustratos derivados de la caña de azúcar.

Desarrollo

Las bacterias ácido lácticas (LAB) del género *Lactobacillus* son los contaminantes bacterianos más comunes que se encuentran en las instalaciones productoras de etanol (Bonatelli et al., 2017; Ceccato-Antonini, 2018; Costa et al., 2015; Lucena et al., 2010; Skinner y Leathers, 2004). Estos microorganismos se pueden clasificar de acuerdo a su metabolismo en homofermentativos (que producen solamente ácido láctico) o heterofermentativos (que producen una mezcla de ácido láctico, etanol o ácido acético y dióxido de carbono), durante la degradación de hexosas a través de la glucólisis. Tanto el ácido láctico como el acético son inhibidores fuertes de la actividad fermentativa a pH bajos, mientras que el ácido láctico es generalmente el ácido débil más abundante en las fermentaciones industriales (Basso et al., 2014; Laluece et al., 2016; Lopes et al., 2016). Si bien se han identificado varios géneros de bacterias ácido lácticas a partir de

fermentaciones contaminadas, las especies encontradas con mayor frecuencia son: *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. casei* y *L. vini* (Carvalho-Netto et al., 2015; Da Silva-Neto et al., 2020; Lucena et al., 2010). Estos microorganismos presentan un adecuado crecimiento a $\text{pH} < 5$. En cuanto a la temperatura, *Lactobacillus* sp. aislados del jugo de caña de azúcar pueden sobrevivir por períodos cortos a temperaturas superiores entre 40 - 45 °C (Laluce et al., 2016).

El ácido láctico producido por las LAB, reduce el rendimiento de etanol al inhibir la fermentación, así como la formación y viabilidad de las yemas de levadura a concentraciones superiores a 4,8 g/L (De Souza et al., 2012; Oliva-Neto y Yokoya, 1994). Según Basso et al. (2014), el *L. fermentum* o el *L. plantarum* presentes durante la fermentación de la caña de azúcar, producen aproximadamente entre 3-4 g/L de ácido láctico. Además de los ácidos orgánicos, las LAB producen otros metabolitos como el diacetilo, ácidos grasos hidroxilados y la reuterina (un antimicrobiano que afecta a la *Saccharomyces* y otros hongos) que influyen negativamente en el crecimiento de la levadura. Estas bacterias están bien adaptadas para la supervivencia en condiciones de bajo pH, altas concentraciones de etanol y bajo contenido de oxígeno (Beckner et al., 2011; Mendonça et al., 2020). El *L. fermentum* es una bacteria heterofermentativa, capaz de inducir la floculación de las células de levadura (Carvalho-Netto et al., 2015; Ceccato-Antonini, 2018; Da Silva-Neto et al., 2020).

Las bacterias pueden formar biopelículas en las superficies de las instalaciones de las plantas de producción de alcohol, donde las células se encuentran adheridas a una matriz viscosa que contiene sustancias poliméricas. Dentro de las biopelículas, las poblaciones bacterianas están protegidas contra los procedimientos de saneamiento; en consecuencia, las células bacterianas sobreviven, y la probabilidad de contaminación también aumenta. Estos microorganismos, presentes en las biopelículas, son más resistentes a los antibióticos y antisépticos, y pueden ser una fuente de reinfección en el tanque de fermentación (Laluce et al., 2016; Rich et al., 2015)

Las levaduras silvestres han sido un problema constante en las fermentaciones de bebidas a lo largo de la historia para los cerveceros y enólogos en particular, y han sido objeto de numerosas revisiones desde que su biología se comprendió mejor. Las levaduras silvestres o salvajes, se definen como aquellas cepas presentes en el mosto, la cerveza u otros materiales de cervecería que, por su acción, no mejoran la producción de etanol, y a menudo estropean el proceso de producción final lo suficiente como para hacer que la bebida resultante sea inaceptable organolépticamente. Tradicionalmente, han sido difíciles de distinguir de las levaduras de cultivo en función de la base morfológica y fisiológica, pero los avances más recientes en técnicas moleculares han permitido detectar y distinguir la mayoría de las posibles levaduras salvajes contaminantes. Las levaduras salvajes pueden estar presentes en niveles bajos, como unas pocas células por millón de células de levadura de cultivo. Las levaduras silvestres se dividen en levaduras no *Saccharomyces* y *Saccharomyces*. Las levaduras silvestres, que no son *Saccharomyces*, están representadas

por géneros como: *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula* y *Torulopsis* (Muthaiyan et al., 2011).

Contrariamente a la contaminación bacteriana durante la fermentación, que puede controlarse mediante el uso de antibióticos y el tratamiento con ácido, actualmente no existe un tratamiento con antibióticos para inhibir el crecimiento de la levadura salvaje. Por lo tanto, el tratamiento para la contaminación por levaduras en fermentadores implica el cambio completo de la población de levaduras en el fermentador. El daño económico potencial causado por la contaminación de la levadura solo puede superarse mediante la detección temprana de las levaduras contaminantes, seguido de la inyección de un nuevo lote de la levadura deseada. Por lo tanto, el monitoreo de contaminantes de levadura salvaje es un componente esencial de la gestión del proceso de fabricación de etanol (Muthaiyan et al., 2011).

Durante la obtención de etanol a partir del mosto de la caña de azúcar, la presencia de bacterias ácido lácticas y levaduras silvestres es inevitable, puesto que se originan a partir de la propia materia prima y el entorno industrial. La coexistencia de LAB y levaduras en el tanque de fermentación y la formación de compuestos como ácidos orgánicos y otros metabolitos extracelulares, resultan en una reducción en el rendimiento final del proceso de producción de etanol (Bonatelli et al., 2019). Además de la competencia por los nutrientes, el desvío de azúcares a metabolitos distintos al etanol, la reducción de la viabilidad celular, cambios en la morfología celular de la levadura, la floculación y la formación de biopelículas, se enumeran como factores importantes que inciden en la disminución de la productividad (Basso et al., 2014; Brexó y Sant'Ana, 2017). Según Amorim et al. (2011), se estima que 108 bacterias/mL disminuyen la producción de etanol aproximadamente entre 10 000 - 30 000 L por día en una destilería capaz de producir un millón de litros diariamente.

La contaminación bacteriana es un problema recurrente en las unidades productoras de etanol. Por lo que, el monitoreo constante del proceso fermentativo permite determinar la fuente potencial de contaminación y los factores que lo agravan, a fin de diseñar estrategias que controlen el crecimiento bacteriano (Costa et al., 2018).

Tradicionalmente, en las destilerías se lleva a cabo un tratamiento con ácido sulfúrico a las células de levadura, que disminuye significativamente la carga de bacterias contaminantes (Basso et al., 2008; Costa et al., 2018). Después de cada ciclo fermentativo, la masa celular se recupera del mosto fermentado por centrifugación y se lava posteriormente con una solución de ácido sulfúrico (pH: 1.8-2.5) durante un par de horas. Sin embargo, los sucesivos ciclos de fermentación y las condiciones no asépticas conducen al establecimiento de comunidades microbianas contaminantes que interactúan entre sí de diversas maneras (Albergaria y Arneborg, 2016; Brexó y Sant'Ana, 2017). Por lo que este tratamiento químico no siempre es lo suficientemente efectivo, y también puede afectar el cultivo inicial de levadura y comprometer el rendimiento de la fermentación. Además, la naturaleza corrosiva del ácido sulfúrico representa un grave riesgo para la salud de los

trabajadores y hace que el tratamiento final del efluente sea costoso. En estas circunstancias, se emplean métodos alternativos como el uso de antibióticos, agentes químicos y compuestos naturales (Ceccato-Antonini, 2018).

Los niveles de contaminantes bacterianos se pueden reducir significativamente con la utilización de procedimientos efectivos de limpieza y desinfección de las instalaciones, pasteurización de los sustratos y adición de antibióticos. A pesar de los procedimientos de prevención, la propagación de contaminantes por encima de los niveles aceptables, es un riesgo persistente en la producción industrial de etanol. Debido a esto, una gran diversidad de antimicrobianos está disponible comercialmente. El polvo, el aire, el agua y las materias primas son fuentes de contaminantes. Por ello, los productores de etanol deben mantener los contaminantes bacterianos en niveles aceptables (≤ 106 UFC/mL) para evitar brotes de infecciones (Walker et al., 2018).

La elección de un producto antimicrobiano está determinada por su eficacia a bajas concentraciones, bajos costos y seguridad ecológica. Existen varios antisépticos químicos (dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno y metabisulfito de potasio) y antibióticos como la penicilina, estreptomina, monensina y la tetraciclina que pueden limitar el crecimiento de contaminantes en el mosto de fermentación (Laluce et al., 2016). Estudios realizados por Bischoff et al. (2007) y Muthaiyan et al. (2011), demuestran como la adición de antibióticos como la virginiamicina al proceso de fermentación, puede contener el crecimiento de *Lactobacillus*. Sin embargo, existe una creciente preocupación respecto a la aparición de cepas bacterianas resistentes, ya que la fermentación de etanol requiere dosis crecientes de antibióticos. La resistencia a los antibióticos en las bacterias es un grave problema de salud y se han aislado cepas resistentes a múltiples fármacos de las unidades productoras de etanol con episodios de contaminación bacteriana (Ceccato-Antonini, 2018).

Entre los compuestos químicos antimicrobianos que se han probado a escala industrial, el dióxido de cloro ha sido el más exitoso. Este compuesto se usa ampliamente como un poderoso agente desinfectante que tiene una amplia actividad germicida contra bacterias (Gómez-López et al., 2009; Zhu et al., 2013). Durante la fermentación alcohólica, el dióxido de cloro inhibe eficazmente el crecimiento de bacterias (*Bacillus subtilis*, *L. plantarum*, *L. fermentum* y *Leuconostoc mesenteroides*) (Meneghin et al., 2008). Muchas destilerías brasileñas han reemplazado los antibióticos y el 40% del lavado con ácido sulfúrico por el tratamiento con dióxido de cloro a 30 mg/L. Dado que este agente químico se descompone fácilmente, sin dejar residuos, los riesgos de generar mutantes resistentes a los antibióticos se reducen significativamente (Ceccato-Antonini, 2018).

Muchas investigaciones en los últimos tiempos han estudiado las actividades antimicrobianas de varias especies de plantas y sus componentes químicos activos. Se pueden encontrar numerosos compuestos antimicrobianos en hierbas, especias, frutas, verduras, semillas y hojas. De ahí que, ofrecen una opción novedosa y más segura contra la contaminación bacteriana en la industria del etanol (Gyawali e Ibrahim 2014). El empleo de productos naturales como propóleos, ácidos del lúpulo (alfa ácidos y lupulonas) y el

quitosano han demostrado sus efectos bactericidas y bacteriostáticos en fermentaciones de jugo de caña de azúcar y melaza (Tabla 1) (De Oliveira et al., 2016). Por ello, resulta necesario convencer al sector industrial de que no solo son efectivos, sino también económicamente menos costosos, más seguros y amigables con el medio ambiente en comparación con los antibióticos y el tratamiento con ácido sulfúrico. Sin embargo, la utilización generalizada de los productos naturales todavía tiene un largo camino para llegar a la industria (Ceccato-Antonini, 2018; Laluece et al., 2016).

La planta más utilizada en el entorno industrial es el lúpulo, con algunos ejemplos enumerados en la tabla 1. Los compuestos de lúpulo (extraídos del *Humulus lupulus*) se han utilizado contra microorganismos patógenos en la producción de cerveza. Los ácidos α (humulonas) y los ácidos β (lupulonas) son principalmente eficaces contra las bacterias Gram-positivas. En la industria del bioetanol, las preparaciones comerciales de estos ácidos (IsoStab[®], LactoStab[®] y Betabio 45[®]) se usan para combatir las infecciones bacterianas a concentraciones que varían de 10 a 50 mg/L en los tanques de fermentación y durante el tratamiento de células con ácido, sin efecto sobre la viabilidad de la levadura (Leite et al., 2013).

Tabla 1. Productos naturales con efectos bactericidas y/o bacteriostáticos para ser empleados en la industria del etanol.

<i>Producto</i>	<i>Medio de fermentación</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Principales resultados (referencia)</i>
Ácidos del lúpulo	Mezcla de trigo y melazas de remolacha azucarera	<i>L. fermentum</i> y <i>L. brevis</i>	Los ácidos del lúpulo (90-160 mg/L) fueron efectivos para prevenir el crecimiento y la producción de ácido láctico por especies de <i>Lactobacillus</i> (Rückle y Senn, 2006).
	Jugo de caña de azúcar y melaza	Bacterias nativas	Los ácidos del lúpulo (10 mg/L) resultaron efectivos a una menor concentración, similar al efecto de la monensina. La viabilidad de la levadura no se vio afectada (Madaleno et al., 2016).
	Jugo de caña de azúcar	Bacterias nativas	El extracto de lúpulo fue eficaz contra las bacterias nativas de manera similar al tratamiento con monensina. La concentración óptima fue de 46 mg/L a una concentración de levadura de 35 g/L e independientemente de la concentración bacteriana (Leite et al., 2013).
Propóleos	Jugo de caña de azúcar	Bacterias ácido lácticas	Los extractos de propóleo marrón y verde (700 μ L/L) disminuyeron el número de LAB sin efecto sobre la viabilidad de la <i>S. cerevisiae</i> y la fermentación (Mutton et al., 2014).

	Jugo de caña de azúcar	<i>L. fermentum</i> y <i>B. subtilis</i>	Los extractos hidroalcohólicos de propóleo verde (10 mg/L) lograron reducir el número de <i>L. fermentum</i> y <i>B. subtilis</i> en un 54,24% y 67,02% respectivamente durante la fermentación. No hubo ningún efecto sobre las células de <i>S. cerevisiae</i> (Viégas, 2011).
Quitosano	Agar medium (MRS)	<i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>Pediococcus claussenii</i> y <i>Pediococcus damnosus</i>	Todas las cepas bacterianas mostraron una disminución en su tasa de crecimiento a una concentración de quitosano de 0,5 g/L (Garg et al., 2010; Pan et al., 2011).

El propóleo es un ejemplo de un producto natural derivado de animales con buen potencial para controlar la contaminación bacteriana. Es una sustancia resinosa recogida por las abejas de los brotes y las hojas de los árboles, mezclada con polen y enzimas. Dado que el bajo número de microorganismos observados en las colmenas se asocia con el propóleo, se ha evaluado sus propiedades antimicrobianas contra levaduras, mohos y bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Existen muchas aplicaciones del propóleo en la medicina, cosmetología, industria alimentaria, agricultura, etc. Aunque los estudios sobre su aplicación en procesos de fermentación de etanol se han restringido a experimentos a pequeña escala, han arrojado resultados positivos en términos de control de la contaminación bacteriana sin afectar los rendimientos de fermentación (Kalogeropoulos et al., 2009).

El quitosano es un compuesto muy versátil con actividad antimicrobiana. Se deriva de la quitina de los caparzones de los crustáceos y micelios fúngicos por desacetilación y es capaz de inhibir el crecimiento de LAB a una concentración de 0,1 g/L, sin afectar la viabilidad de la levadura. Una característica especial del quitosano es que su acción aumenta a pH bajos, característica que a menudo está presente durante la fermentación, debido a la solubilidad de los grupos de aminoácidos cargados. Se ha informado de la acción del quitosano sobre los contaminantes microbianos de la fermentación del vino y la cerveza (Bağder et al., 2015; Pan et al., 2011; Valera et al., 2017).

Un punto importante que comúnmente se descuida en los estudios sobre contaminación bacteriana es cómo interactúan los contaminantes entre sí. Rich et al. (2018) identificaron un grupo de 26 cepas bacterianas que restauraron el rendimiento de fermentación dañado por la presencia de *L. fermentum*, sin provocar contaminación. Las cepas bacterianas beneficiosas fueron *L. plantarum*, *L. casei* y *L. pontis*. La naturaleza de las interacciones depende de la producción de péptidos/proteínas que tienen actividad biológica contra microorganismos específicos (Silva Sabo et al., 2014). Cuatro cepas bacterianas pertenecientes a las especies *Bacillus subtilis* y *B. cereus* inhiben el crecimiento de *L.*

fermentum, *L. brevis*, *L. mucosae* y *L. amylovorus*. La especie *Bacillus* produce un lipopéptido antibacteriano, que se puede utilizar en la industria del etanol combustible (Manitchotpisit et al., 2013).

Las bacteriocinas no son más que proteínas o péptidos antibacterianos producidos por bacterias y liberados en el medio extracelular. La fracción F4, un metabolito bacteriano secundario producido por una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, resultó altamente efectiva contra *Lactobacillus sp.*, sin efecto sobre la viabilidad y fermentación de la levadura. La adición de este metabolito durante la fermentación con jugo de caña de azúcar y melaza implicó una disminución de la floculación y la formación de espuma (Ceccato-Antonini, 2018; Góis et al., 2013).

Tabla 2. Resumen de los principales tratamientos utilizados para el control de la contaminación bacteriana, sus ventajas y desventajas.

<i>Tratamientos</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
Tratamiento ácido	<ul style="list-style-type: none"> ▪ En condiciones apropiadas, no afecta la viabilidad de la levadura ▪ Generalmente efectivo para reducir la contaminación bacteriana 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Riesgos de salud ▪ Eliminación del efluente
Antibióticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Efectivo contra bacterias Gram-positivas, especialmente <i>Lactobacillus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aparición de cepas farmacorresistentes ▪ Retención en la masa celular de la levadura utilizada para alimento de aves y ganado
Dióxido de cloro	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sustituye parte del tratamiento ácido sin dejar residuos en la masa celular de levadura 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Efecto sobre la viabilidad de la levadura en función de la concentración.
Productos naturales (lúpulos, propóleos, quitosano y otros extractos de plantas)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Las preparaciones comerciales de lúpulo están disponibles para la industria del bioetanol ▪ Sin efectos sobre la viabilidad de la levadura, pero eficaz contra las bacterias ▪ Sin residuos en la masa celular de levadura 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Solo estudios a pequeña escala para propóleos, quitosano y otros extractos de plantas hasta el momento
Bacterias beneficiosas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Acción contra bacterias específicas mediante la producción de péptidos /proteínas. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Solo estudios a pequeña escala hasta el momento
Bacteriocinas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La nisina afecta a los <i>Lactobacillus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Solo estudios a pequeña escala hasta el momento

El empleo de bacteriocinas constituye otra alternativa efectiva para controlar los contaminantes bacterianos, ya sea producida por las bacterias *in situ* o agregada como un compuesto purificado en el medio de fermentación. Muchos microorganismos liberan moléculas pequeñas que se difunden en su entorno y ayudan en la comunicación de célula a célula. Este fenómeno se denomina detección de *quórum*, que media la expresión génica para modular algunos procesos bacterianos importantes, como la formación de biopelículas, la esporulación y la síntesis de antibióticos (Brexó y Sant'Ana, 2017). La tabla 2, resume los diferentes enfoques analizados en la presente revisión para controlar la contaminación bacteriana, sus ventajas y desventajas.

Conclusiones

Las bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* son los contaminantes bacterianos más comunes que se encuentran en las instalaciones productoras de etanol. La presencia de estos microorganismos ocasiona pérdidas económicas considerables para la industria, debido a que consumen los azúcares y nutrientes presentes en las materias primas, así como producen ácidos que inhiben el crecimiento de la levadura, provocando afectaciones en el rendimiento de la fermentación. Para evitar la reducción de la producción de etanol por contaminación bacteriana, se han utilizado varios agentes antimicrobianos, como productos químicos y antibióticos. Entre los antisépticos químicos que se han probado a escala industrial, el dióxido de cloro ha sido el más exitoso, debido a que es un poderoso agente desinfectante que tiene una amplia actividad germicida contra bacterias. Actualmente, la penicilina y la virginiamicina son los dos principales antibióticos utilizados en las industrias del etanol. En consecuencia, la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos está creando una fuerte demanda de alternativas naturales seguras, respetuosas con el medio ambiente y económicamente menos costosas en comparación con los antibióticos tradicionalmente empleados en los fermentadores. El empleo de productos naturales como propóleos, ácidos del lúpulo y el quitosano han demostrado sus efectos bactericidas y bacteriostáticos en fermentaciones de jugo de caña de azúcar y melaza. La utilización de bacterias beneficiosas y bacteriocinas constituye otro tratamiento efectivo para controlar la contaminación bacteriana.

Referencias bibliográficas

ALBERGARIA, H. y ARNEBORG, N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* [en línea], No. 5, Vol. 100, 2016, pp. 2035-2046. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7255-0>.

AMORIM, H. V., LOPES, M. L., DE CASTRO OLIVEIRA, J. V., BUCKERIDGE, M. S. y GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied*

Microbiology and Biotechnology [en línea], No. 5, Vol. 91, 2011, pp. 1267-1275. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3437-6>.

BAĞDER, S., GÜLGÖR, G., TOKATLI, M., ERTEN, H., İŞCI, A. y ÖZÇELİK, F. Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* [en línea], No. 3, Vol. 107, 2015, pp. 675-686. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0362-6>.

BASSO, L. C., DE AMORIM, H. V., DE OLIVEIRA, A. J. y LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research* [en línea], No. 7, Vol. 8, 2008, pp. 1155-1163. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>.

BASSO, T. O., GOMES, F. S., LOPES, M. L., DE AMORIM, H. V., EGGLESTON, G. y BASSO, L. C. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* [en línea], No. 1, Vol. 105, 2014, pp. 169-177. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0063-6>.

BASSO, T. O. y LINO, F. S. O. Clash of kingdoms: How do bacterial contaminants thrive in and interact with yeasts during ethanol production? In T.P. BASSO y L.C. BASSO eds. *Fuel ethanol production from sugarcane*. London: IntechOpen, 2019, p. 23-38.

BECKNER, M., IVEY, M. L. y PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology* [en línea], No. 4, Vol. 53, 2011, pp. 387-394. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03124.x>.

BISCHOFF, K. M., SKINNER-NEMEC, K. A. y LEATHERS, T. D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [en línea], No. 11, Vol. 34, 2007, pp. 739-744. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0250-4>.

BONATELLI, M. L., IENCZAK, J. L. y LABATE, C. A. Sugarcane must fed-batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: impact of sterilized and non-sterilized sugarcane must. *Antonie van Leeuwenhoek* [en línea], No. 8, Vol. 112, 2019, pp. 1177-1187. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01250-2>.

BONATELLI, M. L., QUECINE, M. C., SILVA, M. S. y LABATE, C. A. Characterization of the contaminant bacterial communities in sugarcane first-generation industrial ethanol production. *FEMS Microbiology Letters* [en línea], No. 17, Vol. 364, 2017, Disponible en: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx159>.

BREXÓ, R. P. y SANT'ANA, A. D. S. Microbial interactions during sugar cane must fermentation for bioethanol production: does quorum sensing play a role? *Critical Reviews in Biotechnology* [en línea], No. 2, Vol. 38, 2017, pp. 231-244. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1332570>.

CARVALHO-NETTO, O. V., CARAZZOLLE, M. F., MOFATTO, L. S., TEIXEIRA, P. J. P. L., NORONHA, M. F., CALDERÓN, L. A. L., MIECZKOWSKI, P. A., ARGUESO, J. L. y PEREIRA, G. A. G. Saccharomyces cerevisiae transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. *Microbial Cell Factories* [en línea], No. 1, Vol. 14, 2015, pp. 13. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0196-6>.

CECCATO-ANTONINI, S. R. Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [en línea], No. 6, Vol. 34, 2018, pp. 80. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2463-2>.

COSTA, M. A. S., CERRI, B. C. y CECCATO-ANTONINI, S. R. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. *Letters in Applied Microbiology* [en línea], No. 1, Vol. 66, 2018, pp. 77-85. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/lam.12819>.

COSTA, O. Y. A., SOUTO, B. M., TUPINAMBÁ, D. D., BERGMANN, J. C., KYAW, C. M., KRUGER, R. H., BARRETO, C. C. y QUIRINO, B. F. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [en línea], No. 1, Vol. 42, 2015, pp. 73-84. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1533-1>.

DA SILVA-NETO, J. M., COVRE, E. A., ROSA, B. C. y CECCATO-ANTONINI, S. R. Can ethanol partially or fully replace sulfuric acid in the acid wash step of bioethanol production to fight contamination by *Lactobacillus fermentum*? *Brazilian Journal of Chemical Engineering* [en línea], 2020, Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s43153-020-00033-x>.

DE OLIVEIRA, T. A., BATISTA, F., BERNADETE, M. y DE ALMEIDA, J. B. Producción de aguardiente utilizando extracto de alfa ácidos del lúpulo en el control biocida del proceso fermentativo. *Centro Azúcar*, No. 1, Vol. 43, 2016, pp. 18-24.

DE SOUZA, R. B., SANTOS, B. M. D., DE FÁTIMA RODRIGUES DE SOUZA, R., SILVA, P. K. N. D., LUCENA, B. T. L. y DE MORAIS, M. A. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [en línea], No. 11, Vol. 39, 2012, pp. 1645-1650. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1167-0>.

GARG, P., PARK, Y. J., SHARMA, D. y WANG, T. Antimicrobial effect of chitosan on the growth of lactic acid bacteria strains known to spoil beer. *J. Exp. Microbiol. Immunol.*, Vol. 14, 2010, pp. 7-12.

GÓIS, C., LOPES-SANTOS, L., BERANGER, J., DE OLIVEIRA, A., SPAGO, F. y ANDRADE, G. The control of *Lactobacillus sp.* by extracellular compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* in the fermentation process of fuel ethanol industry in Brazil. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems* [en línea], Vol. 3, 2013, pp. 194-201. Disponible en: <https://doi.org/10.4236/jsbs.2013.33027>.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M., RAJKOVIC, A., RAGAERT, P., SMIGIC, N. y DEVLIEGHERE, F. Chlorine dioxide for minimally processed produce preservation: a review. *Trends in Food Science & Technology* [en línea], No. 1, Vol. 20, 2009, pp. 17-26. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.005>.

KALOGEROPOULOS, N., KONTELES, S. J., TROULLIDOU, E., MOURTZINOS, I. y KARATHANOS, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry* [en línea], No. 2, Vol. 116, 2009, pp. 452-461. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.060>.

LALUCE, C., LEITE, G., ZAVITOSKI, B., ZAMAI, T. y VENTURA, R. Fermentation of sugarcane juice and molasses for ethanol production. In I. O'HARA y S. MUNDREE eds. *Sugarcane-based biofuels and bioproducts*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2016, p. 53-86.

LEITE, I. R., FARIA, J. R., MARQUEZ, L. D. S., REIS, M. H. M., DE RESENDE, M. M., RIBEIRO, E. J. y CARDOSO, V. L. Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. *Fuel Processing Technology* [en línea], Vol. 106, 2013, pp. 611-618. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.09.050>.

LOPES, M. L., PAULILLO, S. C. D. L., GODOY, A., CHERUBIN, R. A., LORENZI, M. S., GIOMETTI, F. H. C., BERNARDINO, C. D., AMORIM NETO, H. B. D. y AMORIM, H. V. D. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology* [en línea], Vol. 47, 2016, pp. 64-76. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>.

LUCENA, B. T. L., DOS SANTOS, B. M., MOREIRA, J. L. S., MOREIRA, A. P. B., NUNES, A. C., AZEVEDO, V., MIYOSHI, A., THOMPSON, F. L. y DE MORAIS, M. A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiology* [en línea], No. 1, Vol. 10, 2010, pp. 298-306. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-298>.

MADALENO, L. L., MINARI, G. D., DE ANNUNZIO, F. R., DE CARVALHO, M. R., JÚNIOR, G. R. B., SALES, D. C. y FRIGIERI, M. C. Use of antimicrobials for contamination control during ethanolic fermentation. *Científica* [en línea], No. 2, Vol. 44, 2016, pp. 226-234. Disponible en: <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2016v44n2p>.

MAIA, N. J. L., CORRÊA, J. A. F., RIGOTTI, R. T., DA SILVA JUNIOR, A. A. y LUCIANO, F. B. Combination of natural antimicrobials for contamination control in ethanol production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [en línea], No. 10, Vol. 35, 2019, pp. 158. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2734-6>.

MANITCHOTPISIT, P., BISCHOFF, K. M., PRICE, N. P. J. y LEATHERS, T. D. *Bacillus spp.* produce antibacterial activities against lactic acid bacteria that contaminate fuel ethanol plants. *Current Microbiology* [en línea], No. 5, Vol. 66, 2013, pp. 443-449. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0291-4>.

MENDONÇA, A. A., DA SILVA, P. K. N., CALAZANS, T. L. S., DE SOUZA, R. B., ELSZTEIN, C. y DE MORAIS JUNIOR, M. A. Gene regulation of the *Lactobacillus vini* in response to industrial stress in the fuel ethanol production. *Microbiological Research* [en línea], Vol. 236, 2020, pp. 126450. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126450>.

MENDONÇA, A. A., LUCENA, B. T. L., MORAIS, M. M. C. y MORAIS, M. A. First identification of Tn916-like element in industrial strains of *Lactobacillus vini* that spread the tet-M resistance gene. *FEMS Microbiology Letters* [en línea], No. 3, Vol. 363 2016, Disponible en: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv240>.

MENEGHIN, S. P., REIS, F. C., ALMEIDA, P. G. D. y CECCATO-ANTONINI, S. R. Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* [en línea], No. 2, Vol. 39, 2008, pp. 337-343. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822008000200026&nrm=iso.

MUTHAIYAN, A., LIMAYEM, A. y RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Progress in Energy and Combustion Science* [en línea], No. 3, Vol. 37, 2011, pp. 351-370. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.peccs.2010.06.005>.

MUTTON, M. J. R., OLIVEIRA FILHO, J. H., COSTA, G. H. G., ROVIERO, J. P. y FREITA, L. A. Green and brown propolis: efficient natural biocides for the control of bacterial contamination of alcoholic fermentation of distilled beverage. *Food Science and Technology* [en línea], No. 4, Vol. 34, 2014, pp. 767-772. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6469>.

OLIVA-NETO, P. y YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [en línea], No. 6, Vol. 10, 1994, pp. 697-699. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/BF00327963>.

PAN, C., REZAEI, H. y SOOR, A. Chitosan disrupts membrane permeability of lactic acid bacteria. *J. Exp. Microbiol. Immunol.*, Vol. 15, 2011, pp. 7-14.

REISMAN, H. B. *Economic analysis of fermentation processes*. Edtion ed. Boca Raton: CRC Press, 2019. 236 p. ISBN: 978-0-429-26256-2.

RICH, J. O., BISCHOFF, K. M., LEATHERS, T. D., ANDERSON, A. M., LIU, S. y SKORY, C. D. Resolving bacterial contamination of fuel ethanol fermentations with beneficial bacteria – An alternative to antibiotic treatment. *Bioresource Technology* [en línea], Vol. 247, 2018, pp. 357-362. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.067>.

RICH, J. O., LEATHERS, T. D., BISCHOFF, K. M., ANDERSON, A. M. y NUNNALLY, M. S. Biofilm formation and ethanol inhibition by bacterial contaminants of biofuel fermentation. *Bioresource Technology* [en línea], Vol. 196, 2015, pp. 347-354. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.071>.

RÜCKLE, L. y SENN, T. Hop acids can efficiently replace antibiotics in ethanol production. *International Sugar Journal*, Vol. 108, 2006, pp. 139-147.

SILVA SABO, S., VITOLO, M., GONZÁLEZ, J. M. D. y OLIVEIRA, R. P. D. S. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International* [en línea], Vol. 64, 2014, pp. 527-536. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.041>.

SKINNER, K. A. y LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [en línea], No. 9, Vol. 31, 2004, pp. 401-408. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0159-0>.

VALERA, M. J., SAINZ, F., MAS, A. y TORIJA, M. J. Effect of chitosan and SO₂ on viability of *Acetobacter* strains in wine. *International Journal of Food Microbiology* [en línea], Vol. 246, 2017, pp. 1-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.022>.

VIÉGAS, E. K. D. Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica. Dissertation Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2011.

WALKER, G. M., ABBAS, C., INGLEDEW, W. M. y PILGRIM, C. *The alcohol textbook*. Edtion ed. Duluth, Georgia: Ethanol Technology Institute, 2018. 592 p. ISBN: 978-0-69-293088-5

WALTER, A. L., YANG, D., ZENG, Z., BAYROCK, D., URRIOLOA, P. E. y SHURSON, G. C. Assessment of antibiotic resistance from long-term bacterial exposure to antibiotics

commonly used in fuel ethanol production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [en línea], No. 4, Vol. 35, 2019, pp. 66. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2641-x>.

ZHU, C., CHEN, Z. y YU, G. Fungicidal mechanism of chlorine dioxide on *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology* [en línea], No. 2, Vol. 63, 2013, pp. 495-502. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0494-8>.